

2 Methoden

2.1 Die enzymatische Analytik

2.1.1 Aktivierung von Affinitätschromatographiegelen

In dieser Arbeit wurde die CNBr-aktivierte Sepharose[®] 6MB als aktiviertes Affinitätschromatographiegel verwendet. Dieses Gel wird von dem Hersteller in Anwesenheit von weiteren Zusätzen gefriergetrocknet geliefert. Diese Zusätze müssen vor der Enzymkopplung bei einem niedrigen pH-Wert (pH 2-3) herausgewaschen werden. Zuerst wiegt man die erforderliche Menge des kaltgetrockneten Gelpulvers ab (wobei 1 g Pulver ungefähr 3,5 ml des aufgequollenen Gels ergibt) und mischt es in die 1 mM Salzsäure ein. Das Gel quillt sofort auf und wird darauf mit der 1 mM Salzsäure 15 min lang auf einem gesinterten Glasfilter gewaschen. Üblicherweise nimmt man etwa 200 ml Salzsäure pro Gramm kaltgetrockneten Pulvers.

Dann wird das benötigte Enzym in einem Kopplungspuffer aufgelöst. Die Pufferlösung enthält 0,1 M NaHCO₃ mit einem pH-Wert von 8,3 und einem 0,5 M NaCl-Gehalt. Es werden 5 ml des Puffers pro Gramm Ligand entnommen, der Ligand wird in der Pufferlösung aufgelöst und mit dem aktivierten Gel in einem verschlossenen Gefäß vermischt, indem das Gemisch über zwei Stunden bei Raumtemperatur oder über Nacht bei 4°C durchgeschüttelt wird. Dabei soll die magnetische Rührmethode vermieden werden. Im nächsten Schritt wäscht man den Ligandenüberschuß mit Hilfe von Kopplungspuffer heraus und blockiert jegliche restlichen funktionellen Gruppen, indem man dem Kopplungspuffer das 0,2 M Glycin über zwei Stunden bei Raumtemperatur beimischt. Anschließend wird das erhaltene Produkt in drei Zyklen mit jeweils wechselnden pH-Werten gewaschen. Jeder Zyklus besteht aus einer Reinigung mit dem 0,1 M Acetatpuffer (pH 4), das 0,5 M NaCl enthält, gefolgt von einem Spülen des Gels mit dem, ebenfalls 0,5 M NaCl enthaltenden, 0,1 M Trispuffer (pH 8).