

Anleitung zum Praktikum Biowissenschaften für BioinformatikerInnen

Teil I: Bestimmung der Hämoglobin-Konzentration

Die Bestimmung der Hämoglobin-Konzentration erfolgt nach der Hämoglobincyanid-Methode. Hierbei oxidiert Kaliumhexacyanoferrat Hämoglobin vollständig zu Hämiglobin ($\text{Fe}^{2+} \Rightarrow \text{Fe}^{3+}$). Dieses wird mit Kaliumcyanid in Hämiglobincyanid überführt. Die Hämiglobincyanid-Methode findet wegen folgender Vorteile auch im klinischen Bereich Anwendung:

- Das Absorptionsmaximum bei 546 nm ist flach, d. h. auch mit einfachen Photometern können reproduzierbare Resultate erzielt werden.
- Alle Hämoglobinderivate werden in Hämiglobincyanid überführt und damit erfaßt.

Für den folgenden Versuch erhalten Sie gereinigtes Hämoglobin, das in einer Konzentration von ca. 10% (ca. 100 g Hämoglobin/l) vorliegt. Füllen Sie zwei Plastik-Küvetten mit je 3 ml *Drabkinlösung* (50 mg KCN, 200 mg Kaliumhexacyanoferrat (III), 1 g NaHCO_3 , aufgefüllt mit Aqua dest. auf 1 Liter; *giftig, daher Handschuhe tragen!*). Geben Sie mit einer Kolbenhubpipette 20 μl Hämoglobin in eine Küvette und mischen Sie die Lösungen. Nehmen Sie ein Spektrum dieser Lösung im Bereich von 400 – 700 nm auf und notieren Sie sich die Lage der Maxima und deren Extinktionswerte. Stellen Sie im Photometer die Extinktion für den Leerwert (*Drabkinlösung* in Plastik-Küvette) bei der Wellenlänge des Maximums (541 nm) auf Null. Messen Sie dreimal nach fünf Minuten die Extinktion der Hämiglobincyanidlösung. Wiederholen Sie das Experiment mit einem neuen Ansatz. Übernehmen Sie die Werte der Nachbargruppe und bestimmen Sie das arithmetische Mittel und die Standardabweichung.

Berechnen Sie daraus die Hämoglobinkonzentration (in %) unter Verwendung eines millimolaren Extinktionskoeffizienten ϵ [$\text{mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$] für Hämiglobincyanid bei 541 nm von 44 und einer Molekularmasse des Hämoglobins von 64.500 g/mol.

Teil II: Sauerstoffbindung von gereinigtem Hämoglobin

In diesem Versuch wird eine gereinigte Hämoglobin-Lösung, die als Oxyhämoglobin vorliegt, bei unterschiedlichen Luftdrucken inkubiert. Zur Einstellung des Luftdrucks wird der unten abgebildete Pumpstand eingesetzt. Überlegen Sie dazu wie der eingestellte Luftdruck und der Sauerstoffpartialdruck zusammenhängen. In Abhängigkeit vom Sauerstoffpartialdruck sowie vom pH und der Temperatur stellt sich ein Gleichgewicht zwischen Oxyhämoglobin (HbO_2) und Hämoglobin (Hb) ein. Die Sauerstoffbindung wird photometrisch durch die Messung der Extinktion des jeweiligen Hb/HbO_2 -Gemisches bei 580 nm erfaßt.

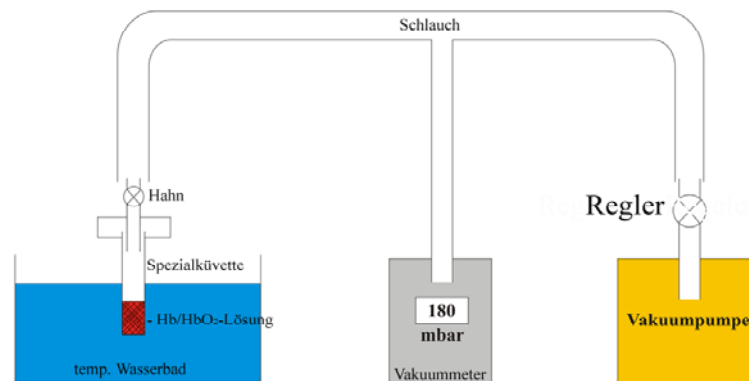


Abb.1: Schematischer Aufbau des Pumpstandes zum Einstellen der Partialdrücke

- Hierzu stellen Sie durch Verdünnen mit Phosphatpuffer (50 mM, pH 7,4) jeweils 10 ml einer 0,072 %-igen HbO_2 -Lösung her. Überprüfen Sie die Richtigkeit der Verdünnung photometrisch mit Hilfe des Hämoglobincyano-Nachweises (s. oben).
- Nehmen Sie zunächst ein Spektrum der HbO_2 -Lösung im Wellenlängenbereich von 400 – 700 nm auf. Stellen Sie dann die Extinktion des Puffers bei 580 nm auf Null. Messen Sie die Extinktion ΔE_{HbO_2} bei der gleichen Wellenlänge. Deoxygenieren Sie nun die Lösung mit einer Spatelspitze Dithionit und messen Sie danach ΔE_{Hb} (580 nm) sowie das Spektrum.

ΔE_{HbO_2} :

ΔE_{Hb} :

- Deoxygenieren Sie die HbO_2 -Lösungen, indem Sie sie bei Raum-Temperatur unterschiedlichen Luftdrucken (300 mbar, 150 mbar, 50 mbar) aussetzen und die Extinktionen solange in Abständen kontrollieren, bis sich ein stabiles Gleichgewicht zwischen HbO_2 und Hb ausgebildet hat.
 - Pipettieren Sie dazu 2,5 ml HbO_2 -Lösung in eine Plastik-Spezialkuvette und verbinden Sie die Kuvette (vergl. Abb. 1, Hahn geschlossen) mit dem Schlauch der Vakuumapparatur.
 - Stellen Sie den Luftdruck auf 50, 150 oder 300 mbar und öffnen Sie danach den Hahn. Damit stellt sich auch in der Kuvette ein Luftdruck von 50, 150 bzw. 300 mbar ein.
 - Verschließen Sie den Hahn der Kuvette, nehmen Sie die verschlossene Kuvette vom Schlauch ab und schütteln Sie die Lösung leicht. Indem Sie die Kuvette schräg halten, erreichen Sie eine größtmögliche Oberfläche der Lösung.

- Messen Sie die Extinktion nach fünf Minuten.
- Schließen Sie nach der Messung die Küvette wieder an die Vakuumapparatur an und kontrollieren Sie durch Öffnen des Hahns, ob der Luftdruck stabil geblieben ist. Stellen Sie ihn notfalls wieder auf den gewünschten Wert ein und verschließen Sie den Hahn.
- Inkubieren Sie weiter, wie oben beschrieben, und messen Sie solange in Abständen von fünf Minuten ΔE , bis sich der Wert um weniger als 5 % gegenüber der vorigen Messung ändert (entspricht dem Gleichgewicht zwischen HbO_2 und Hb).

Berechnen Sie für die Gleichgewichtsbedingungen (jeweils letzte Werte) die relativen Sauerstoffsättigungen des Hämoglobins. Setzt man die Konzentration des Gesamthämoglobins = 1, den Anteil an $\text{HbO}_2 = x$ und demnach den von Hb = $(1 - x)$, so setzt sich die Extinktion eines Gemisches anteilig aus den Teilextinktionen der Komponenten zusammen als

$$E_{\text{Gemisch}} = x \cdot E_{\text{HbO}_2} + (1 - x) \cdot E_{\text{Hb}}.$$

Die relative Sauerstoffsättigung berechnet sich somit als

$$x = (E_{\text{Hb}} - E_{\text{Gemisch}}) / (E_{\text{Hb}} - E_{\text{HbO}_2}).$$

Bedingung

Relative Sauerstoffsättigungen

pH 7,4 – 300 mbar – RT:

pH 7,4 – 150 mbar – RT:

pH 7,4 – 50 mbar – RT:

Nachbargruppe:

pH 7,4 – 300 mbar – RT:

pH 7,4 – 150 mbar – RT:

pH 7,4 – 50 mbar – RT:

- Vergleichen Sie die Sauerstoffsättigung des Hämoglobins bei den eingestellten Luftdrücken (wie groß sind die Sauerstoffpartialdrucke, wenn Sie den Wasserdampfdruck unberücksichtigt lassen?).
- Leiten Sie aus dem Ergebnis der Sauerstoffsättigung den Kooperativitätsfaktor ab (Hill-Plot!).
- Diskutieren Sie die Ergebnisse im Hinblick auf die physiologische Bedeutung (Sauerstoffpartialdruck in den kleinen Blutgefäßen von ca. 30 mbar und in den Lungenalveolen von ca. 100 mbar).