

Präparation von SAM und SAE

a) Aktivitätstest für die SAM-Synthase

- Reaktionsansätze in Mikrotiterplatten (insges. 50 µl):

10 µl L-Methionin	(25 mM, mit NaOH auf pH 8.0 eingestellt)
5 µl 10x SAMS-Puffer	(1 M Tris/HCl, 0.2 M MgCl ₂ , 2 M KCl, pH 8.0)
5 µl ATP	(50 mM, frisch herstellen)
20 µl H ₂ O	

50 µl
→ 6.06 g Tris
2.03 g MgCl₂ · 6H₂O
7.46 g KCl

- Vorinkubation bei 30 °C/100 rpm
- Starten der Reaktionen durch Zugabe von je 10 µl Enzymlösung (Stammlösung der SAMS-I317V in einer Verdünnung von 1:5 oder 1:10)
- Inkubation bei 30 °C/100 rpm für 0, 5, 10, 15, 20, 25 min
- Abstoppen mit je 100 µl Phosphatreagenz (s.u.)
- Messung der Absorption bei 620 nm nach 3 min
- Berechnung der Aktivität:

$$\text{Aktivität (mU/ml)} = (\text{Steigung der Gerade} / 0,006425) * \text{VF}$$

0.0374
→ 145 mU/ml
≅ 64 mU/mg

VF = 25 (bei 1:5-Verdünnung des Enzyms) oder 50 (bei Verdünnung 1:10)

Phosphatreagenz: 3 Vol. Ammoniummolybdat (15 mM in 2.2 M HCl) werden mit 1 Vol. Malachitgrün-Lösung (5.8 mM) gemischt, 30 min inkubiert und unlösliche Anteile durch Zentrifugation entfernt

b) Enzymatische Synthese der Cofaktoren

- Reaktionsansatz (insges. 20 ml):

2 ml	10x SAMS-Puffer
83 mg	ATP (direkt im Puffer lösen)
2 ml	D,L-Methionin oder D,L-Ethionin (100 mM, mit NaOH auf pH 8.0 eingestellt)

- mit H₂O auffüllen und Reaktion mit 200 mU SAMS-I317V starten
- Inkubation im Schüttler bei 30 °C/60 rpm für 18 Stunden
- Ansäuern durch Zugabe von 90 µl Essigsäure (10 M)
- 10 min auf Eis
- Zentrifugation (10 min, 15000 g)
- Überstand in 100 ml-Rundkolben überführen (dabei 2 µl für DC (s.u.) aufbewahren), in Flüssigstickstoff einfrieren und lyophilisieren
- Lagerung bis zur Aufarbeitung bei -20 °C

c) Aufarbeitung der Cofaktoren

- Extraktion des Lyophilisats durch Suspendieren in 3 ml wässrigem Ethanol (73 % (v/v)) (auf Eis, Rührschwein oder ggf. Glasstab)
- Extrakt in 2ml-Eppis überführen
- Zentrifugation (2 min, 14000 g)
- Überstand in separate Eppis überführen und auf Eis stellen
- erneute Extraktion des Lyophilisats im Kolben mit 1 ml wässrigem Ethanol (73 % (v/v)), der Extrakt wird zum Pellet der 1. Fraktion gegeben
- das Pellet suspendieren und anschließend zentrifugieren (2 min, 14000 g)
- Überstand mit demjenigen der 1. Extraktion vereinigen
- für die Ionenaustausch-Chromatographie 2 ml des Rohextrakts verwenden (der Rest kann für einige Tage bei -20 °C gelagert werden)
- Äkta mit 500 mM HCl spülen (PumpWash A1 und A2, dann Loop spülen)
- SP-Sepharose-Säule (25 ml) mit 500 mM HCl equilibrieren (anhand von Leitfähigkeit verfolgen)
- Probe (2 ml) direkt vor dem Auftragen mit 87 µl HCl (37 %) mischen und Gemisch in 5 ml-Loop laden
- Programm „SAM SP-Sepharose“ starten
- sofort Probe injizieren (Manual → Pump → Flowpath → Inject)
- SAM- oder SAE-haltige Fraktionen (zweiter großer Peak nach ~ 100 ml Elutionsvolumen) in 100 ml-Rundkolben überführen (insgesamt ca. 50 ml)
- Äkta komplett mit H₂O spülen und Säule neutral waschen
- am Roti den Hauptteil des Lösungsmittels entfernen (bei **max.** 35 °C Wasserbadtemperatur, Druck auf 0 mbar einstellen, Gerät mit Aceton säubern)
- Rest mit Flüssigstickstoff einfrieren und lyophilisieren
- Lagerung bei -20 °C

d) Bestimmung der Konzentration und des Reinheitsgrades

- Probe in 4 ml H₂O lösen, möglichst vollständig in Eppis überführen und auf Eis stellen
 - 2 µl für DC verwenden (Kieselgel F₂₅₄, Laufmittel: 958 µl 73 % EtOH + 42 µl Triethylamin), Rohextrakt (s.o.) als Standard mitführen
 - für Konzentrationsbestimmung 99 µl H₂O in Küvette vorlegen und Blank bei 260 nm messen
 - 1 µl Cofaktor-Lösung zupipettieren, mischen und Absorption bei 260 nm bestimmen
- Berechnung der Konzentration:

$$[\text{Cofaktor}] \text{ (mM)} = \frac{A_{260 \text{ nm}} * 100}{15.4}$$

- SAM- und SAE-Lösungen auf 5 mM verdünnen, Aliquots von 2010 µl bei -20 °C lagern

e) Bestimmung der Anteils an biologisch aktivem SAM:

Reaktionsansätze (Doppelbestimmung für SAM und Blindwerte):

8 µl	10x OMT-Reaktionspuffer	(1 M Tris/HCl, 10 mM MgCl ₂ , pH 7.5)
8 µl	Kaffeesäure	(10 mM in 20 % DMSO)
2 µl	L-Glutathion	(100 mM)
41 µl	H ₂ O	
5 µl	PFOMT	(3 mg/ml)

- 16 µl SAM (5 mM) oder Wasser (für Blindwerte) zugeben und bei RT inkubieren (mind. 4 Stunden oder über Nacht)
- Zugabe von 40 µl Catecholreagenz (2 mM FeCl₃ in 10 mM HCl)
- 5 min Inkubation bei RT
- Bestimmung der Absorption bei 595 nm

Berechnung des Anteils an biologisch aktivem SAM:

$$\text{Biol. aktives SAM (\%)} = \frac{A_{595 \text{ nm}}(\text{Blindwert}) - A_{595 \text{ nm}}(\text{SAM})}{A_{595 \text{ nm}}(\text{Blindwert}) - 0.121}$$

6. mM 48 µl Rohextrakt 2149 µl H₂O
 48 µl CA
 12 µl Glu
 27 µl PFOMT (345 mg/ml)

- Dokumentation:**
- DC von Rohextrakt und gereinigtem Cofaktor
 - Chromatogramm
 - Anteil an biol. aktivem SAM
 - Ausbeute an SAM- und SAE-Lösung (5 mM)

27.01.14 SAM CL Reinigung / 6 µl auf 1 Ex) nach 1 Ex & lyo. → klarer, fester Rückstand

- Abs.²⁶⁰ 8.8 → c = 5.91 mM → 1.1.7.2

1.71 mM
-0.25 mM

SAM (1 Reinigung / 6 µl auf 1 Ex)

- Abs.²⁶⁰ = 0.615 × 10 mm × 25 (VF) → 15.375 → 3.98 mM

→ kristallin und lyophil
→ kristallin gelblich (offwhite)