

Practical Course in Biopharmacy

Institute of Pharmaceutical
Sciences

Stefanie Krämer

skraemer@pharma.ethz.ch

Handout

Institut für Pharmazeutische Wissenschaften
Biopharmazie-Praktikum

ETH Zürich
Block I

Präparation von Schweinelebermikrosomen und -cytosol

Material

- Spektrophotometer (ohne Küvettenwechsler)
- Ultrazentrifuge (UZ, Beckman XE-90)
- 1 UZ-Röhrchen 30 ml (8.7 x 2.5 cm) für Ti50.2-Rotor (**nicht wegwerfen!**)
- 1 UZ-Röhrchen 10 ml (7.5 x 1.6 cm) für Ti90-Rotor (**nicht wegwerfen!**)
(Achtung: Die UZ-Röhrchen sind sehr teuer)
- 1 Skalpell
- 1 Homogenisator gross
- 1 Homogenisator klein
- Schweineleber (Stück à ca. 6 g)
- BioRad (Bradford) Protein-Assay (BioRad #500-0006)
- BSA (Rinderserumalbumin; MG 67'000)
- Kaliumdihydrogenphosphat (KH₂PO₄; MG 136.1)
- Dinatriumhydrogenphosphat (Na₂HPO₄·2H₂O; MG 178.0)
- TRIS (Tris(Hydroxymethyl)Aminomethan; MG 121.1)
- Kaliumchlorid (KCl; MG 74.6)

Methoden

Stammlösungen (Versuch 1)

- Phosphat-Puffer 10 mM, pH 7.4 mit 0.15 M KCl ca. 25 ml

Stammlösungen mit 10 mM KH₂PO₄ / 0.15 M KCl sowie 10 mM Na₂HPO₄ / 0.15 M KCl werden hergestellt und im korrekten Verhältnis für pH 7.4 gemischt. Die Feineinstellung erfolgt am pH-Meter durch Titration mit der entsprechenden Stammlösung.

- Phosphat-Puffer 100 mM, pH 7.4 ohne KCl ca. 200 ml

Die Stammlösungen 100 mM KH₂PO₄ und 100 mM Na₂HPO₄ werden im korrekten Verhältnis für pH 7.4 gemischt. Die Feineinstellung des pH erfolgt am pH-Meter durch Titration mit der entsprechenden Stammlösung. Dieser Puffer wird auch für die weiteren Versuche verwendet (kühl lagern).

Institut für Pharmazeutische Wissenschaften
Biopharmazie-Praktikum

ETH Zürich
Block I

- Rinderserumalbumin (BSA) für Eichgerade

Es wird eine Stammlösung BSA (10 mg/ml) in Phosphat-Puffer 100 mM pH 7.4 ohne KCl hergestellt.

- BioRad Protein Assay

Vor Gebrauch wird das Färbereagens mit Wasser 1:5 verdünnt. max. 50 ml

Stammlösungen (Versuch 2)

Das Eisen-Quecksilber-Reagens, das im Versuch 2 für die Quantifizierung der gebildeten Salicylsäure verwendet wird, ist inkompatibel mit Phosphaten. Für Versuch 2 wird deshalb immer TRIS/HCl-Puffer verwendet.

- TRIS/HCl-Puffer 100 mM, pH 7.4 ohne KCl ca. 200 ml

Die entsprechende Menge TRIS Base wird in einem Becherglas in ca. 150 ml Wasser gelöst und der pH wird mit konz. HCl eingestellt bevor im Messzylinder auf das Endvolumen von 200 ml ergänzt wird.

- TRIS/HCl-Puffer 10 mM, pH 7.4 mit 0.15 M KCl ca. 25 ml

TRIS/HCl 10 mM wird aus TRIS/HCl 100 mM (s. oben) hergestellt: Die entsprechende Menge KCl in einem Becherglas im entsprechenden Volumen TRIS/HCl 100 mM lösen und in einem Messzylinder mit Wasser auf das Endvolumen ergänzen.

- Rinderserumalbumin (BSA) für Eichkurve

Es wird eine Stammlösung BSA (10 mg/ml) in TRIS/HCl-Puffer 100 mM pH 7.4 ohne KCl hergestellt.

- BioRad Protein Assay

Vor Gebrauch wird das Färbereagens mit Wasser 1:5 verdünnt. max. 50 ml

Pharmazeutische Wissenschaften
Biopharmazie-Praktikum

Biotransformation

Reaktions-Reaktionen an den Beispielen von Phase I -
II unter Verwendung von Lebermikrosomen und -cytosol

Studierenden sollen fähig sein, enzymatisch aktive Leber
gewebe herzustellen.

Methoden der hergestellten Lebermikrosomen bzw. des
Cytosols zur Biotransformation bestimmter Stoffe qualitativ und/oder quantitativ

Beispiel: Glucuronidierung von 4-Nitrophenol *in vitro* mittels
Lebermikrosomen als Beispiel für eine Phase II-Reaktion

Beispiel: Hydrolyse von Acetylsalicylsäure *in vitro* mittels
Lebermikrosomen und -cytosol als Beispiel für eine Phase I-Reaktion

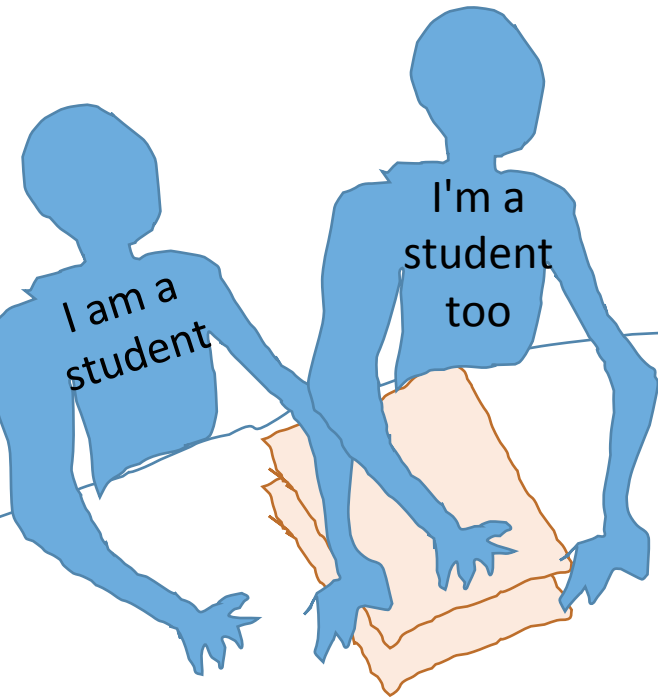
Fragestellung, welche Gruppe welchen Versuch macht, befindet sich
auf dem Handout zur Herstellung der Lebermikrosomen bzw. des Cyto-
sols. Dieselbe mit Ausnahme des Puffers, der dazu verwendet wird

Quelle: Krämer S.D.: The Biochemistry of Drug Metabolism. 2. Auflage
Verlag Helvetica Chimica Acta, Weinheim, Zürich, 2008 und 21
Bilder pdfs erhältlich via www.pubmed.gov, Suche nach „testa I

Quelle: P., Fricker G., Wunderli-Allenspach H.: Biopharmazie. Wik
2004

Quelle: www.ebi.ac.uk/Enzyme : The Comprehensive Enzyme Information System

Preparation phase (trial & error)



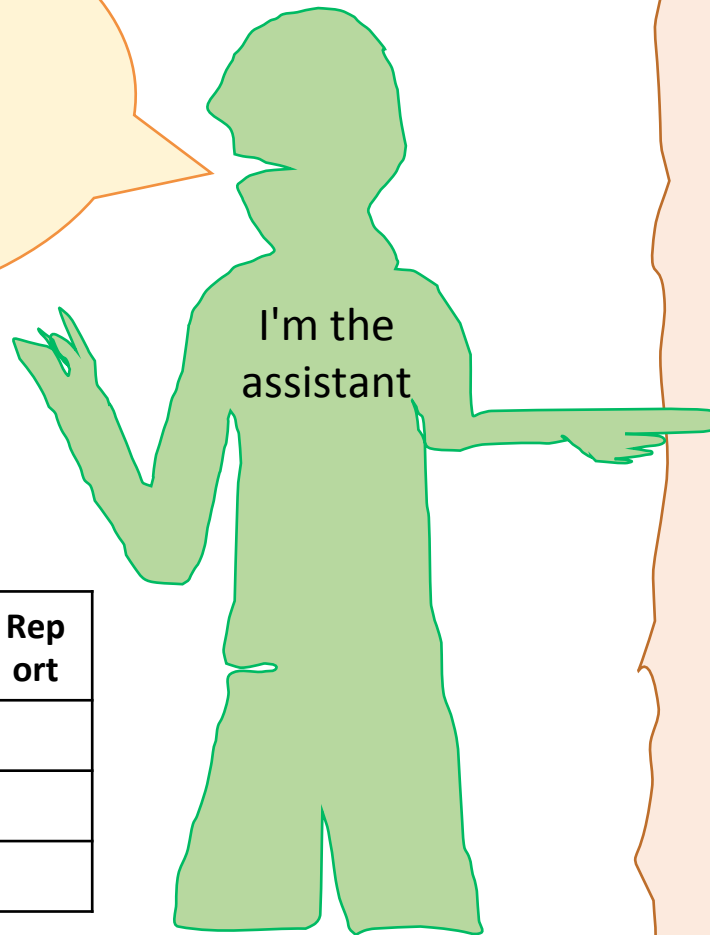
Students (groups of 2) prepare their working protocol

Sample	mL buffer A	mL solution B	mL solution C
Test	0.5	0.25	0.25
Control A	0.75	0.25	0

- Incubate for **????** min at 37°C (**we need to discuss the time, how can we estimate it?**)
- We need a total of 100 mL buffer A:
3.5 mg of this
7.6 mg of that
water to 100 mL
adjust pH with 0.1 M HCl
- ...

Assistant checks protocols

They know what they will be doing ... they get **5 points**



	Prep	Lab	Report
A12	5		
A13			
A14			

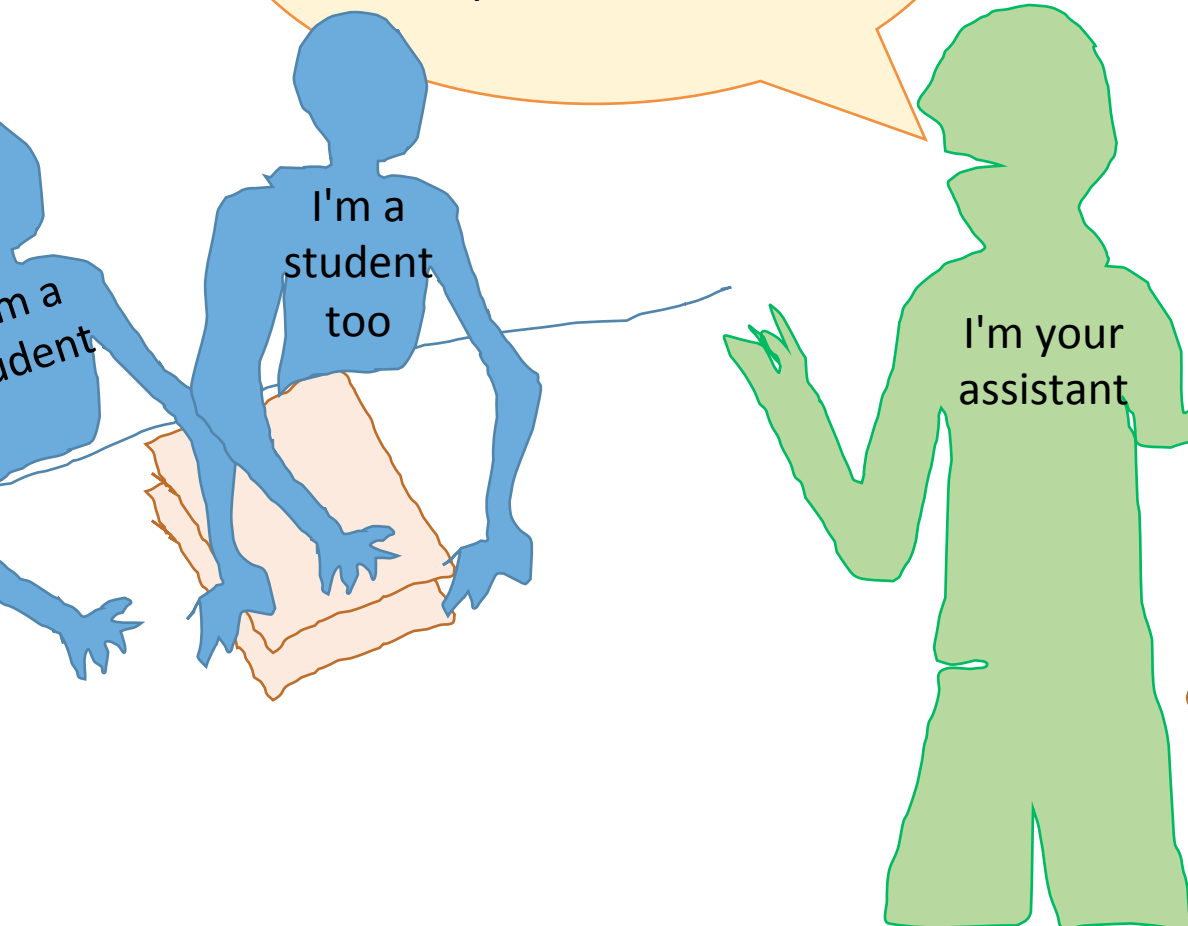
Our work protocol (Group A12)

Sample	mL buffer A	mL solution B	mL solution C
Test	0.5	0.25	0.25
Control A	0.75	0.25	0

- Incubate for **????** min at 37°C (**we need to discuss the time, how can we estimate it?**)
- We need a total of 100 mL buffer A:
 - 3.5 mg of this
 - 7.6 mg of that
 - water to 100 mL
 - adjust pH with 0.1 M HCl
- ...

Colloquium with assistant

- Let me give you a hint
- Here you have an error
- What about controls B, C?
- ...
- Now you can start in the lab

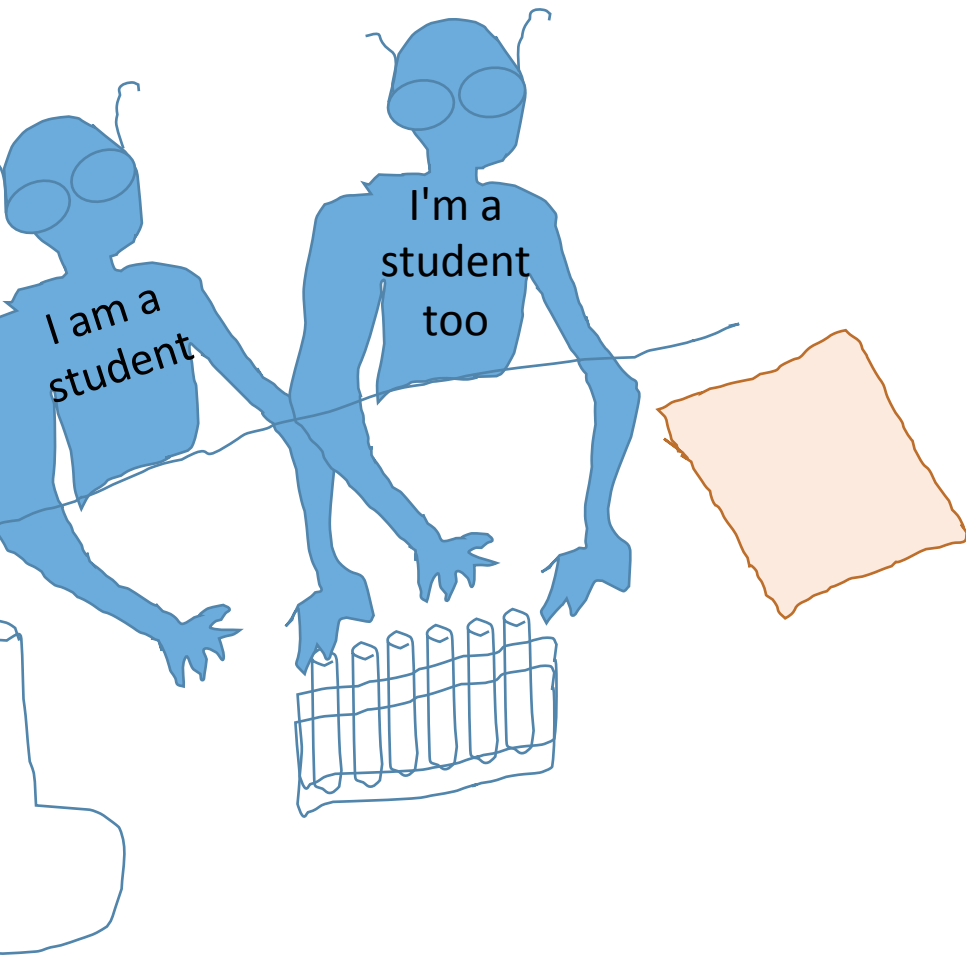


Our work protocol (Group A12)

Sample	mL buffer A	mL solution B	mL solution C
Test	0.5	0.25	0.25
Control A	0.75	0.25	0

- Incubate for **????** min at 37°C (**we need to discuss the time, how can we estimate it?**)
- We need a total of 100 mL buffer A:
 - 3.5 mg of this
 - 7.6 mg of that
 - water to 100 mL
 - adjust pH with 0.1 M HCl
- ...

Lab work



Sample	mL buffer A	mL solution B	mL solution C
Test	0.5	0.25	0.25
Control A	0.75	0.25	0
Control B	0.75	0	0.25
Control C	1.0	0	0

- Incubate for 30 min at 37°C
- We need a total of 100 mL buffer A:
 - 3.5 mg of this
 - 7.2 mg of that
 - water to 100 mL
 - adjust pH with 0.1 M HCl
- ...

Report



Discussion

Based on our results, we **predict** that the drug will This is in **agreement** with results from clinical trials (ref. 7).
...

Assistant@ethz.ch

Very good.
I made some comments
in the report.

I'm your
assistant

	Prep	Lab
A12	5	5
A13		
A14		

Experiences

- Students are not used to prepare **protocols** (complains "missing information")
- In the end they like it ("first time to really **think about an experiment**")
- First version of **report is final** version: Better **quality** than before when corrections were accepted
- Defined **criteria for points** for preparations, lab work, reports
- Students need to **reach a certain number of points**

Acknowledgments

- Prof. em. Heidi Wunderli-Allenspach
- Teaching Assistants
- Students
- Persons involved with administration, infrastructure, advice