

Roland Gromes

Laborguide Puffer

**Eine Einführung zum Berechnen, Ansetzen und Verstehen von
Lösungen im biowissenschaftlichen Labor**



Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis.....	2
Impressum	2
Wieviel Pulver muss da jetzt rein? – Rechnen mit Mengen und Konzentrationen	3
Stoffmengenbezogene Konzentrationen	3
Massen- und Volumenbezogene Konzentrationen.....	4
Ersetzen von Substanzen – Die Sache mit dem Kristallwasser	6
Verdünnen und Mischen	7
Konzentrationen von Nukleinsäuren und Proteinen.....	8
Ein paar Rechenhilfen im Internet	9
Warum kipp ich das alles zusammen? – Lösungen ansetzen und verstehen	10
Was ist was in meinem Puffer?.....	10
Wie setze ich Lösungen an?.....	13
Wie finde ich die richtige Puffersubstanz?	18
Überblick über einige Puffersubstanzen	20
Pufferchemie: Rechnen mit Henderson-Hasselbalch.....	21
Tipps zum Weiterlesen und Surfen	23
Anhänge	24
Abkürzungsverzeichnis.....	24
SI-Einheiten und Umrechnungen.....	25
Vorsätze für Maßeinheiten und Rechnen mit Zehnerpotenzen	26
Griechische Zahlenpräfixe	26
Umrechnungsfaktoren für Längen, Flächen und Volumina.....	27
Einige gebräuchliche Pufferlösungen	28
Register.....	30

Impressum

Laborguide Puffer

Dr. rer. nat. Roland Gromes

Centre for Organismal Studies Heidelberg

Im Neuenheimer Feld 360

69120 Heidelberg

Kontakt: roland.gromes@cos.uni-heidelberg.de

Version: Mai 2020

Onlineversion: <http://www.cos.uni-heidelberg.de/index.php/r.gromes>

Copyrightinweis: Der Laborguide Puffer darf für alle Lehrveranstaltungen an der Universität Heidelberg oder mit der Universität in Heidelberg in der Lehre kooperierender Einrichtungen verwendet und Studierenden unentgeltlich elektronisch oder in gedruckter Form zugänglich gemacht werden. Er darf des Weiteren frei an Studierende oder Mitarbeiter an der Universität Heidelberg in elektronischer oder gedruckter Form weitergegeben werden.

Für eine darüberhinausgehende Nutzung wird um Rücksprache mit dem Urheber gebeten.

Wieviel Pulver muss da jetzt rein? – Rechnen mit Mengen und Konzentrationen

Wenn es sowas wie ein klassisches Alltagsproblem im Labor gibt, dann ist es das Rechnen mit Konzentrationen. Klar – eigentlich sollte man das seit der Schulzeit können, allerspätestens seit dem Grundstudium, und eigentlich braucht man es auch so oft, dass es einem in Fleisch und Blut übergegangen sein müsste. Aber in der Wirklichkeit tun sich viele bis in ihre Doktorarbeit oder darüber hinaus schwer damit, auszurechnen, wieviel Gramm Magnesiumsulfat-Heptahydrat jetzt in 50 Milliliter müssen, um eine Lösung mit 50 mM zu erreichen. Dieses Kapitel erklärt, wie man mit Konzentrationen rechnet, vom Einwiegen bis zum Mischen und Verdünnen und befasst sich auch mit der immer wieder quälenden Frage, wann man denn jetzt das Kristallwasser rein- oder herausrechnen muss.

Hinweis: Eine Übersicht zu den SI-Einheiten und Einheitenvorsätzen sowie zum Rechnen mit diesen findet sich im Anhang.

Stoffmengenbezogene Konzentrationen

Stoffmengenbezogene Konzentrationsangaben beziehen sich direkt auf die Anzahl der Ionen, Moleküle oder Atome in einer Lösung. Im Gegensatz zu den massen- und volumenbezogenen Konzentrationsangaben haben sie den großen Vorteil, dass sie den direkten Vergleich der chemisch relevanten Stoffkonzentrationen erlauben. Der Nachteil ist dagegen, dass man sie zum praktischen Arbeiten mit den Substanzen in Alltagswerte umrechnen muss.

Die Grundeinheit der Stoffmenge ist das **Mol** ($\approx 6,022 \cdot 10^{23}$ Teilchen). Ein Mol ist so definiert, dass das Gewicht eines Mols einer Substanz in Gramm genau dem molekularen Gewicht der Substanz in atomaren Masseneinheiten (u, units) entspricht. Oder andersherum ausgedrückt, wenn man die **molare Masse** (auch **Molmasse**) einer Substanz kennt, weiß man, wieviel Gramm man abzuwiegen hat, um ein Mol Teilchen zu erhalten. Die molare Masse wird bei Chemikalien auf der Packung angegeben, meist als M in g/mol, je nach Hersteller aber auch als M_r , M_w oder F_w (formula weight) mit oder ohne Einheitsangabe.

Stoffmengenkonzentrationen werden als **Molarität** angegeben, wobei gilt $1 \text{ M} = 1 \text{ mol/L}$ (eine ein-molare Lösung enthält also ein Mol Teilchen der angegebenen Substanz je Liter). Um eine solche Lösung anzusetzen, berechnet man also erst, wieviel Substanz man benötigt, wiegt diese ab und füllt dann auf das gewünschte Volumen auf.

$$\text{Also: Stoffmenge (g)} = \text{molare Masse (g/mol)} * \text{Molarität (mol/L)} * \text{Volumen (l)}$$

Beispiel: Es sollen 100 mL einer Lösung 50 mM NaCl ($M = 58,44 \text{ g/mol}$) angesetzt werden. Es werden also benötigt:

$$58,44 \text{ g/mol} * 0,05 \text{ mol/L} * 0,1 \text{ L} = 0,2922 \text{ g} = 292,2 \text{ mg}$$

Äquivalentkonzentrationen werden als **Normalität** angegeben, wobei ebenfalls gilt $1N = 1 \text{ mol/L}$, nur dass sich hierbei nicht auf die Stoffteilchen als ganze bezogen wird, sondern auf die wirksamen Elemente. Wenn man zum Beispiel Säuren betrachtet, bezieht man sich auf die Zahl der freisetzbaren H^+ -Ionen, bei Basen auf die OH^- -Ionen. Bei Salzsäure (HCl) wäre eine ein-molare Lösung daher auch ein-normal, bei Schwefelsäure (H_2SO_4) wäre eine ein-molare Lösung dagegen zwei-normal. Bei anderen Substanzen muss bei Äquivalentkonzentrationen angegeben werden, auf was man sich bezieht. Eine ein-molare Fe_2O_3 -Lösung wäre zwei-normal in Bezug auf Eisenionen und drei-normal in Bezug auf Sauerstoffionen (Auch wenn Eisen(III)oxid so hoch gar nicht löslich ist...). Um eine Lösung vorgegebener Normalität anzusetzen, muss also zuerst die entsprechende Molarität ausgerechnet werden, dann geht alles wie oben beschrieben.

Die **Molalität** wird in mol/kg angegeben und ist als Mol Substanz, die zu einer bestimmten Masse an Lösungsmittel zugegeben wird zu lesen. Im Labor ist diese Angabe ziemlich ungebräuchlich. Im Prinzip hat sie den Vorteil, dass sie im Gegensatz zur Molarität temperaturunabhängig ist, da sich zwar Volumen aber nicht die Masse von Flüssigkeiten mit der Temperatur ändern.

Massen- und Volumenbezogene Konzentrationen

Massen- und volumenbezogene Konzentrationsangaben sind zwar chemisch nicht so präzise, aber dafür alltagstauglicher, da sie mit vorstellbaren Größen arbeiten. Am einfachsten ist die **Massenkonzentration**, angegeben in g/L. $x \text{ g/L}$ bedeutet einfach x Gramm abwiegen und auf einen Liter auffüllen (Oder x mit dem gewünschten Volumen multiplizieren und entsprechend auffüllen, also mal 0,1 für 100 mL, mal 3 für 3 L etc.). Nicht verwechselt werden darf die Massenkonzentration mit der Dichte, die auch in g/L angegeben wird, sich aber auf das Gesamtgewicht eines Volumens bezieht, nicht auf den Anteil einer Substanz!

Bei **Prozentigkeiten** kommt es auf den Zusammenhang an. Am gebräuchlichsten ist die **Volumenkonzentration** in %, ‰, ppm oder ppb (Hundertstel, Tausendstel, Millionstel oder Milliardstel – parts per million/billion), teilweise durch (v/v), also volume/volume gekennzeichnet. Eine Lösung mit 5% (v/v) Glycerin hat also 5 ml Glycerin in 100 ml Gesamtlösung. Bei **Massenprozenten** (w/v) wird die Masse bezogen auf die Flüssigkeitsmenge angegeben, 10% (w/v) sind also 10 Gramm in 100 ml gelöst. Gelegentlich wird auch die **Sättigung** mit Prozentangaben versehen (am gebräuchlichsten wohl bei der Ammoniumsulfatfällung von Proteinen), dann bedeutet 100% eine gesättigte Lösung, während z.B. eine 50% gesättigte Lösung nur halb so hoch konzentriert ist.

Umrechnung in Stoffkonzentrationen: Massenkonzentrationen lassen sich leicht in Stoffkonzentrationen umrechnen, indem man einfach die g/L-Angabe durch die molare Masse der Substanz teilt.

$$\text{Molarität (mol/L)} = \text{Massenkonzentration (g/L)} / \text{molare Masse (g/mol)}$$

Beispiel: Eine 10% (w/v) NaCl-Lösung enthält 100g/1000ML, also 100g/L. Mit der molekularen Masse $M = 58,44 \text{ g/mol}$ ergibt sich:

$$(100\text{g/L}) / (58,44\text{g/mol}) = 1,711 \text{ mol/L} = 1,711 \text{ M}$$

Bei Volumenkonzentrationen muss zuerst aus dem Volumen des gelösten Stoffs die Masse berechnet werden, indem das Volumen mit der Dichte multipliziert wird, dann geht es weiter wie oben.

Beispiel: Die Desinfektionslösung mit 70% Ethanol (v/v) enthält 700 mL/L Ethanol. Bei einer Dichte für reines Ethanol von $0,79 \text{ g/mL}$ entspricht das:

$$(700 \text{ mL/L}) * (0,79\text{g/mL}) = 553 \text{ g/L}$$

Bei einer molaren Masse von $46,07 \text{ g/mol}$ sind das:

$$(553 \text{ g/L}) / 46,07 \text{ g/mol} = 12,0 \text{ mol/L}$$

70% Ethanol (v/v) ist also etwa 12 M Ethanol.

Nach dem gleichen Schema kann man übrigens für Reinsubstanzen auch **Konzentrationen aus der Dichte berechnen:**

$$\text{Dichte (g/L)} / \text{molare Masse (g/mol)} = \text{Molarität (mol/L)}$$

Beispiel: Glycerin hat bei Normalbedingungen eine Dichte von $1,26 \text{ g/mL}$ ($=1260 \text{ g/L}$) und eine molare Masse von $92,1 \text{ g/mol}$. Damit ist die Stoffkonzentration von reinem Glycerin:

$$(1260 \text{ g/L}) / (92,1 \text{ g/mol}) = 13,68 \text{ mol/L} = 13,68 \text{ M}$$

Beispiel 2: Rauchende Salzsäure enthält 37% HCl (molare Masse = $36,46 \text{ g/mol}$) und hat eine Dichte von $1,19 \text{ g/mL}$. Sie enthält also:

$$0,37 * 1190 \text{ g/L} = 440,3 \text{ g HCl pro Liter}$$

Das entspricht einer Konzentration von:

$$(440,3 \text{ g/L}) / (36,46 \text{ g/mol}) = 12,08 \text{ mol/L} = 12,08 \text{ M}$$

Ersetzen von Substanzen – Die Sache mit dem Kristallwasser

Substanzen, die Kristallwasser enthalten führen immer wieder zu Verwirrung, dabei ist die Sache eigentlich ganz einfach: Die molare Masse einer Substanz schließt vorhandenes Kristallwasser mit ein. Beim Herstellen einer stoffmengenbezogenen Lösung von z.B. 10 mM Magnesiumsulfat-Heptahydrat ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) hält man sich also einfach an die angegebene molare Masse (246,48 g/mol), wiegt ganz normal ab ($10 \text{ mM} = 0,001 \text{ mol/L} \rightarrow 0,001 \text{ ml/L} * 246,48 \text{ g/mol} = 2,46 \text{ g/L}$) und das mit abgewogene Kristallwasser stört nachher in der Lösung normalerweise nicht. Genauso wenig stört Kristallwasser natürlich, wenn bei einem massenbezogenen Rezept genau die vorhandene Substanz angegeben ist.

Der einzige Fall, bei dem man das Kristallwasser tatsächlich beachten muss, ist, wenn man eine Lösung ansetzt, deren Rezept massenbezogen ist (g/L) und für die ein Salz mit einer anderen Menge Kristallwasser angegeben ist. In dem Fall berechnet man aus dem Rezept die stoffmengenbezogene Konzentration und aus dieser die benötigte Menge des anderen Salzes. Falls für eine Variante die molare Masse nicht angegeben ist, ist das auch kein Problem, da je Wassermolekül einfach dessen molare Masse von 18 g/mol (oder ganz genau 18,0153 g/mol) addiert bzw. abgezogen wird.

Beispiel: Eine Lösung soll 10 g/L Magnesiumsulfat (wasserfrei) enthalten, im Labor ist aber nur Magnesiumsulfat-Heptahydrat (246,48 g/mol) vorhanden.

Die molare Masse von wasserfreiem Magnesiumsulfat lässt sich berechnen indem man von der Masse des Heptahydrats die Masse von 7 Wassermolekülen abzieht:

$$246,48 \text{ g/mol} - 7 * 18,0153 \text{ g/mol} = 120,37 \text{ g/mol}$$

Damit folgt für die gewünschte molare Konzentration:

$$(10 \text{ g/L}) / (120,37 \text{ g/mol}) = 0,0831 \text{ mol/L} = 83,1 \text{ mM.}$$

Vom Heptahydrat müsste man also einwiegen:

$$0,0831 \text{ mol/L} * 246,48 \text{ g/mol} = 20,48 \text{ g/L}$$

Allgemein lässt sich beim **Ersetzen von Substanzen** durch andere in massenbezogenen Rezepten am schnellsten nach folgendem Schema rechnen, welches obigem Rechenweg entspricht (Stoff 1 wird durch Stoff 2 ersetzt):

$$\text{Konzentration 2 (g/L)} = \text{Konzentration 1} * (\text{molare Masse 2} / \text{molare Masse 1})$$

Beispiel: Ein Puffer für ein Enzym soll 25 mM Chloridionen enthalten, das im ursprünglichen Rezept angegebene Natriumchlorid ($M = 58,44 \text{ g/mol}$, nach Rezept 1,461 g/L) erweist sich aber als inhibierend für das Enzym und soll daher durch KCl ($M = 74,55 \text{ g/mol}$) ersetzt werden. Man braucht also:

$$1,461 \text{ g/L} * (74,55 \text{ g/mol}) / (58,44 \text{ g/mol}) = 1,864 \text{ g/L}$$

Verdünnen und Mischen

Verdünnen und **Mischen** gehören beim Umgang mit Lösungen zum Laboralltag, zum einen beim Ansetzen von Experimenten, wo verschiedene Lösungen zusammengeführt werden, zum anderen beim Ansetzen von Lösungen aus **Stocklösungen** (von englisch „stock“ – „Vorrat“). Hochkonzentrierte Stocklösungen haben im Laboralltag eine Reihe von Vorteilen, insbesondere die leichtere Ansetzbarkeit (größere Mengen lassen sich genauer einwiegen!), die bessere Lagerung (hochkonzentrierte Lösungen sind oft stabiler, außerdem findet sich eher Platz für 10 mL 100x Stock als für einen Liter Fertiglösung) und die Möglichkeit, mehrere Stocklösungen zu einem fertigen Ansatz zu mischen.

Verdünnungen (oder Aufkonzentrierungen) werden dabei als **Verdünnungsfaktor** angegeben. Eine 1:x-Verdünnung heißt, dass die Lösung nachher nur noch ein x-tel der Konzentration aufweist, also dass ein Teil Ausgangslösung sich in x Teilen fertiger Lösung findet – und umgekehrt hat eine yx-Stocklösung die y-fache gewünschte Endkonzentration, muss also 1:y verdünnt werden. Um einen Verdünnungsfaktor zu berechnen, wird also die End- durch die Ausgangskonzentration geteilt. Denn Verdünnungsfaktor darf man dabei nicht mit einem **Mischungsverhältnis** verwechseln. Mischt man im Verhältnis 1:x, dann ist am Ende ein Teil Ausgangslösung in x+1 Teilen enthalten, man hat also 1:(x+1) verdünnt. Also:

1 zu X Verdünnen = 1 zu (X-1) Mischen

Beispiel 1: Aus rauchender Salzsäure (37%, 12 M) soll eine Arbeitslösung von 0,5 M HCl hergestellt werden. Der Verdünnungsfaktor ist dann:

$$0,5 \text{ M} / 12 \text{ M} = 1 : 24$$

Man würde also zu 23 ml Wasser 1 ml rauchender Salzsäure geben (Merke: Erst das Wasser, dann die Säure!).

Beispiel 2: Um einen Metaboliten photometrisch zu messen werden 15 μl Extrakt in einem Gesamtansatz von 0,5 ml verdünnt. Der Verdünnungsfaktor ist also:

$$500 \mu\text{l} / 15 \mu\text{l} = 1:33,3 \text{ (} 500/15 = 33,3\text{)}.$$

Um die ursprüngliche Konzentration im Extrakt zu berechnen, muss also die im Ansatz photometrisch bestimmte Konzentration mit 33,3 multipliziert werden.

Beispiel 3: Für einen enzymatischen Assay liegt der Basispuffer als 2x Stocklösung vor, die Metaboliten A und B als 10x Stocks und die Metaboliten C, D und E als 100x Stocks. Für 10 mL Versuchsansatz werden 5 mL Basispuffer (1:2) mit 1 mL A und 1 mL B Stocklösung (je 1:10) sowie 0,1 mL C-, D- und E-Lösung (je 1:100) gemischt und das Ganze mit Wasser auf 10 mL aufgefüllt.

Hinweis: Für technische Tipps zum Mischen und Verdünnen, und Dinge auf die man achten sollte, siehe das Kapitel „Warum kipp ich das alles zusammen? - Puffer ansetzen und verstehen“

Konzentrationen von Nucleinsäuren und Proteinen

Die Konzentrationen von Nucleinsäuren und Proteinen werden meist massenbezogen angegeben, da es sich bei Nucleinsäure- oder Proteinextrakten meist um Gemische aus verschiedenen Molekülen handelt, so dass man eine stoffmengenbezogene Konzentration nur auf die Menge der Nucleotide oder Aminosäuren angeben könnte. Will man das erreichen oder die stoffmengenbezogene Konzentration einer reinen Lösung abschätzen, dann kann man folgende Schätzwerte für die molaren Massen anwenden:

DNA: 330 Da/Base; 660 Da/Basenpaar

RNA: 340 Da/Base

Protein: 120 Da/Aminosäure

In beiden Fällen sind das natürlich nur Schätzwerte, die genaue Masse eines Moleküls hängt von dessen genauer Sequenz ab und kann durch Aufsummieren der einzelnen Nucleotid- bzw. Aminosäuremassen berechnet werden – was man am besten eines der zahlreichen dafür angebotenen Computerprogramme machen lässt.

Beispiel: Eine Plasmidlösung enthält 2,5 mg/mL eines Plasmids von 3.500 bp Größe. 3.500 Basenpaare entsprechen einer molaren Masse von etwa:

$$3.500\text{bp} * 660 \text{ (g/mol)/bp} = 2.310.000 \text{ g/mol}$$

Die Lösung hat also eine Konzentration von etwa:

$$(2,5 \text{ g/L}) / 2,31 * 10^6 \text{ g/mol} = 1,08 * 10^{-6} \text{ mol/L} = 1,08 \text{ }\mu\text{M}$$

Bei Nukleinsäure- und Proteinlösungen sind häufig die Verhältnisse interessanter als die absoluten Konzentrationen. Hierbei berechnet man am einfachsten das Massenverhältnis der Moleküle – bei Nukleinsäuren und Proteinen gleich dem Verhältnis der Längen – und bestimmt damit, wie viel Substanz für ein Verhältnis von 1:1 nötig wäre. Dies muss dann nur noch mit dem gewünschten Verhältnis multipliziert werden.

Beispiel: Für eine Ligation sollen 0,5 pg Plasmid (3.500 bp) mit der dreifachen Menge an Insert-Molekülen (400 bp) gemischt werden. Das Verhältnis der molaren Massen beträgt

$$400 \text{ bp} / 3.500 \text{ bp} = 0,114$$

Für gleiche Molekülmengen müsste man also

$$0,5 * 0,114 \text{ pg} = 0,057 \text{ pg}$$

Insert einsetzen und für ein Verhältnis von 1:3

$$0,57 * 3 \text{ pg} = 0,171 \text{ pg.}$$

Ein paar Rechenhilfen im Internet

- Molekulargewicht berechnen (Mit Standardsubstanzen zur Auswahl):
<http://www.lenntech.com/calculators/molecular/molecular-weight-calculator.htm>
- Rechner für Molarität/Volumen/Einwaage und Verdünnungsrechnen:
<http://www.graphpad.com/quickcalcs/molarityform.cfm>
- DNA-/Protein, Molaritäten, Verdünnungen: <http://www.promege.de/resources/tools/biomath-calculators>

Warum kipp ich das alles zusammen? – Lösungen ansetzen und verstehen

Das Ansetzen und die Verwendung von Lösungen sind Laboralltag und meist Routine, die wenig Gedankenarbeit benötigt. Dieses Kapitel soll dabei helfen, Lösungen zu verstehen und ein paar Tipps zum Umgang mit Ihnen geben. Denn nur, wer seinen Puffer versteht, kann ihn auch geeignet an sein Experiment anpassen. Chemisch gesehen ist eine Lösung natürlich nur dann ein Puffer, wenn der pH-Wert auch tatsächlich gepuffert wird, da das aber bei fast allen im biologischen Labor verwendeten Lösungen der Fall ist, spricht man etwas schlampig oft bei jeder Lösung von einem „Puffer“.

Was ist was in meinem Puffer?

Die meisten Puffer sind durch eine Mischung aus Überlegung und Versuch und Irrtum für ihre Anwendungen optimiert worden. Um einen Puffer für ein neues Experiment zu entwickeln, bietet es sich daher meistens an, von einem auszugehen, der für eine ähnliche Anwendung funktioniert hat und diesen bei Bedarf abzuwandeln. Für die einzelnen Pufferkomponenten sind dabei folgende Faktoren wichtig:

- Die **Funktion** muss natürlich erfüllt werden und das möglichst gut und unter den gewünschten Bedingungen (pH-Wert, Temperatur, andere Komponenten). Puffersubstanzen sollten also im gewünschten Bereich gut puffern, Metaboliten vom betrachteten Enzym verwertet werden können, notwendige Cofaktoren vorhanden sein, Substanzen bei der nötigen Temperatur löslich sein usw.
- Die eingesetzten Substanzen sollten untereinander und mit dem Ziel des Experiments **kompatibel** sein. Phosphatpuffer vertragen sich z.B. schlecht mit Kalzium, Tris inhibiert manche Proteine, EDTA fängt eventuell benötigte Ionen weg, Reduktionsmittel könnten Helferproteine inaktivieren usw.
- Die **Stabilität** von Pufferkomponenten kann zuweilen ein wichtiger Faktor werden. Substanzen, die leicht zerfallen, ausfallen, aus dem Puffer verdampfen, oxidieren oder ähnliches sollten vermieden oder erst kurz vor Gebrauch zugesetzt werden.
- Die **Giftigkeit** verschiedener Komponenten spielt bei Gebrauch und Entsorgung von Lösungen eine große Rolle. Sind giftige Komponenten wie z.B. Formaldehyd, Phenol oder Mercaptoethanol nötig, dann muss besonders sorgfältig mit dem Puffer umgegangen werden, insbesondere sollte man auch darauf achten, dass flüchtige giftige Substanzen sich nicht im Labor ausbreiten (Deckel drauf, nicht oder nur unter dem Abzug aufkochen, ...). Letztendlich sollten Puffer mit giftigen oder umweltgefährlichen Substanzen natürlich entsprechend entsorgt werden – im Zweifelsfall heißt das, den Abfallbeauftragten fragen! Neben den wirklich giftigen Sachen gibt es dann auch noch lästige Komponenten, die z.B. stinken – deren Entweichen mag für die eigene Gesundheit und die der Kollegen nicht so gefährlich sein, für das Arbeitsklima aber umso mehr.
- **Verfügbarkeit und Preis** sollten in einer perfekten Welt keine Rolle spielen, tun das in der Wirklichkeit aber sehr wohl. Tris und Phosphat sind bei weitem keine idealen Puffersubstanzen,

aber überall zu vertretbaren Preisen zu haben. Wenn man auf bestellte Substanzen nicht ewig warten muss und die Arbeitsgruppe am Ende des Jahres noch etwas Geld für das schicke Kit übrighat, dass man schon immer mal ausprobieren wollte, forsch es sich halt viel entspannter.

Was findet sich jetzt also in so einem Puffer und wozu ist es gut? Die folgende Liste enthält eine Reihe von Funktionen, die von verschiedenen Substanzen erfüllt werden können, erhebt aber keinerlei Anspruch auf Vollständigkeit. Außerdem sollte man im Hinterkopf behalten, dass eine Substanz auch sehr wohl mehrere Funktionen gleichzeitig erfüllen kann. 100 mM Tris stellen z.B. einen starken Puffer, beeinflussen aber gleichzeitig den osmotischen Wert des Puffers und sind ionisch.

- **Lösungsmittel** (z.B. Wasser, Methanol, Ethanol, Gemische): Das Lösungsmittel bestimmt Lösbarkeit von Substanzen, die zu einem guten Teil von der Hydrophilie bzw. Hydrophobizität abhängt. Das Lösungsmittel hat daneben auch Einfluss auf die Leitfähigkeit einer Lösung und die Hydrophilie der Lösung spielt bei chromatographischen Verfahren (Dünnschicht, HPLC, reverse phase FPLC, etc.) eine große Rolle.
- **Puffersubstanzen** (z.B. Tris, Phosphat, Acetat, Citrat, HEPES, Gemische): Puffersubstanzen dienen der Einstellung und der Konstanthaltung des pH-Werts. Ein Puffer besteht dabei aus einer Mischung aus Säure und Base, so dass überschüssige OH^- bzw. H^+ -Ionen von je einem der Partner abgefangen werden können. Meist werden Paare aus konjugierter Säure und Base verwendet (z.B. Essigsäure/Acetat, Hydrogenphosphat/Phosphat) Geeignete Puffersubstanzen werden nach ihrer Verträglichkeit mit anderen Komponenten und nach ihrem Pufferbereich ausgewählt – mehr dazu findet sich im nächsten Kapitel („Wie finde ich die richtige Puffersubstanz?“)
- **Osmotika** (z.B. NaCl, KCl, Saccharose, Sorbitol, PEG, die Summe aller gelösten Substanzen): der osmotische Wert einer Lösung ist abhängig von der Summe der gelösten Substanzen und kann als eine Art “Verfügbarkeit des vorhandenen Wassers” interpretiert werden. Er ist wichtig für die Integrität von Zellen – besonders solchen ohne Wand – und Organellen. Ist der osmotische Wert der Lösung höher als der der Zelle, wird dieses Wasser entzogen, ist er niedriger, nimmt sie Wasser auf – eventuell bis zum Platzen, was natürlich gewünscht oder unerwünscht sein kann. Außerdem hat der osmotische Wert Einfluß auf die Faltung und Löslichkeit von Molekülen, so lassen sich z.B. Proteine und Nukleinsäuren durch Zugabe geeigneter Substanzen aussalzen also fällen. Da die zum Einstellen des osmotischen Wertes verwendeten Substanzen meist in relativ hoher Konzentration vorliegen, ist hier eine Kompatibilität zu den anderen Komponenten der Lösung besonders wichtig.
- **Substanzen zur Einstellung der Dichte** (z.B. Saccharose, CsCl, Percoll, Glycerin): Ein Erhöhen oder genaues Einstellen der Dichte einer Lösung ist für manche Anwendungen vorteilhaft oder entscheidend, ersteres z.B. bei Ladepuffern für die Gelelektrophorese, die mit erhöhter Dichte (meist durch Glycerin) besser in die Geltaschen sinken, zweiteres z.B. bei der Dichtegradientenzentrifugation.
- **Ionen** (z.B. NaCl, KCl, SDS): Ionen stellen in der Summe die Ionenstärke ein, was entscheidend für die Leitfähigkeit einer Lösung ist und damit entscheidend für elektrophoretische Versuche. Bei zu wenigen Ionen fließt kaum Strom und nichts funktioniert wie es soll (Der klassische Fall hierfür ist das mit Wasser statt Puffer angesetzte Agarosegel), bei zu vielen Ionen fließt zu viel

Strom und es entsteht unerwünschte Hitze. Verschiedene Ionen haben außerdem einen Einfluß auf die Proteinfaltung und –aktivität, da sie entweder als nötige Kofaktoren dienen (z.B. Mg^{2+} oder Ca^{2+}) und das nötige Milieu bereitstellen (z.B. Na^+ , K^+ , Cl^-) oder eben die erwünschten Ionen verdrängen und so Proteine inhibieren (z.B. Schwermetalle)

- **Chelatoren** (z.B. EDTA, EGTA): Chelatoren binden vor allem zweiwertige Ionen und können so als Ionenfänger deren Verfügbarkeit verringern, z.B. um unerwünschte Proteine zu inaktivieren, so kann EDTA durch die Bindung von Mg^{2+} DNasen und eine ganze Reihe von Proteasen inhibieren. Chelatoren können aber auch ansonsten schwer lösliche Ionen überhaupt erst in Lösung bringen.
- **Detergenzien** (z.B. SDS, Triton, Tween): Detergenzien vermitteln zwischen hydrophoben und hydrophilen Substanzen und können so ansonsten unlösliche Substanzen in Lösung bringen und die Benetzung von Oberflächen verbessern. Von der Art des Detergens und der Konzentration hängt ab, welche Proteine und Lipide in Lösung gebracht und/oder denaturiert werden, sowie die Membranen welcher Organellen aufgebrochen werden. In der Gelelektrophorese hat SDS auch die Funktion, dass es Proteinen durch seine Bindung an diese negativen Ladungen entsprechend der Proteinlänge und damit ein gleichmäßiges Masse-zu-Ladungs-Verhältnis verschafft.
- **Reduktionsmittel** (z.B. Mercaptoethanol, DTT, TCEP, Glutathion): Reduzieren Substanzen im Puffer bzw. helfen, deren reduzierten Zustand aufrecht zu erhalten. Durch das Aufbrechen von Proteindisulfidbrücken wirken sie auf manche Proteine auch denaturierend und können daher z.B. benutzt werden, um Proteasen zu inaktivieren. Da Reduktionsmittel in Lösung meist recht schnell durch den Luftsauerstoff oxidiert werden, sollten sie möglichst vor Gebrauch frisch zugesetzt werden.
- **Enzyminhibitoren**: Proteinasen oder Nukleasen können teilweise durch Entfernen aus dem Extrakt (z.B. Fällung, Phasentrennung) oder durch Denaturieren (Erhitzen, Detergenzien) inhibiert werden. Ist das nicht möglich, existieren unspezifische (z.B. Chelatoren, Reduktionsmittel, siehe oben) und mehr oder weniger spezifische Inhibitoren (z.B. Proteinaseinhibitoren oder PMSF gegen Proteasen; RNase-Inhibitoren oder DEPC gegen RNasen). Spezifische Inhibitoren sind dabei meist teuer, oft instabil und häufig giftig, sollten also nur dann zugesetzt werden, wenn sie wirklich nötig sind und dann am besten frisch vor Gebrauch.
- **Absorber** (z.B. PVP, PVPP, Aktivkohle): Absorber sind unlösliche Substanzen, die auf Grund ihrer großen Oberfläche unerwünschte Stoffe (z.B. phenolische Sekundärmetaboliten) in einer Lösung binden und dadurch ausfällen können.
- **Farbstoffe** (z.B. Bromphenolblau, Orange-G): Farbstoffe sind bei vielen Nachweisverfahren essenziell. Andere dienen einfach der farblichen Markierung von Puffern und fungieren dabei teilweise auch als pH-Wert-Indikatoren, die eine Kontrolle der Versuchsbedingungen erlauben.
- **Versuchsbedingte Reagenzien**: Einige Substanzen sind für bestimmte Versuche wie enzymatische Assays notwendig, indem sie das chemische Milieu des Puffers einstellen (z.B. essenzielle Ionen wie Mg^{2+} für Enzyme die ATP umsetzen, Cofaktoren) oder als Substrat fungieren.
- **Nährstoffe, Vitamine und Hormone** (z.B. Glukose, Saccharose, Acetosyringon): Sind für das Wachstum oder zumindest Überleben von Zellen oder Organismen notwendig.

Wie setze ich Lösungen an?

Lösungen vorzubereiten besteht aus mehreren Schritten: Abmessen der Komponenten, Lösen der Komponenten, Einstellen des pH-Werts, Auffüllen auf das Endvolumen und Gebrauch oder Aufbewahren.

Das nötige Rechnen zum **Abwiegen oder Abmessen der Komponenten** sollte nach dem Kapitel „Wie viel Pulver muss da jetzt rein? – Rechnen mit Mengen und Konzentrationen“ ja kein Problem mehr darstellen. Besonders bei kleinen Mengen und kritischen Lösungen gilt es, Waagen bzw. Pipetten mit ausreichender Genauigkeit zu verwenden und diese gegebenenfalls vorher noch einmal zu überprüfen. Feinwaagen sollten richtig stehen (Die Luftblase in der integrierten Wasserwaage sollte mittig sein!), Pipetten geeicht sein (im Zweifelsfall mit einer Feinwaage austesten: 1 µl destilliertes Wasser sollte genau 1 mg wiegen). Muss man kleine Mengen Pulver möglichst vollständig überführen, kann es sinnvoll sein, sie durch hoch- und runter pipettieren im Wägeschälchen zu lösen oder mit dem Lösungsmittel aus dem Schälchen in das Zielgefäß zu spülen. Und dann gibt es noch den einen essenziellen Schritt, der immer wieder vergessen wird: Nach dem Abwiegen Waagen und den Wägeplatz saubermachen!

Das **Lösen der Komponenten** ist oft trivial (Wasser und Rührfisch dazu, auf den Magnetrührer stellen, eventuell etwas erhitzen und warten), allerdings gibt es ein paar Punkte, bei denen man Fehler machen kann:

Das **Volumen**, in dem die Stoffe gelöst werden, sollte weit genug unter dem Endvolumen liegen, um noch den pH-Wert einzustellen. Das heißt, vorsichtig auffüllen oder eine mäßige Menge Lösungsmittel vorlegen.

Lösen ist grundsätzlich eine **chemische Reaktion** und kann daher mit einer Erwärmung oder Abkühlung einhergehen. Besonders beim Lösen größerer Mengen von Säuren oder Basen ist Vorsicht angebracht, da hier die (De-)Protonierung als zusätzliche Reaktion hinzukommt und ein starkes Erhitzen im schlimmsten Fall zum Hochkochen führen kann!

Erhitzen beschleunigt den Lösungsvorgang, erhöht aber nicht unbedingt die Löslichkeit von Stoffen. Außerdem sollten natürlich manche Stoffe nicht erhitzt werden, weil sie beim Erhitzen instabil oder flüchtig sind. Flüchtige Stoffe wie Formaldehyd oder Mercaptoethanol würden dann nicht nur in der Lösung fehlen, sie stinken auch und sind giftig. Also entweder erst nach dem Erhitzen und Abkühlen zugeben oder unterm Abzug arbeiten. Dabei sollte man nicht vergessen, dass manche Lösungen auch autoklaviert werden – auch hier werden z.B. Antibiotika der ansonsten fertigen Lösung erst nach dem Autoklavieren zugegeben.

Ein anderes Problem, das beim Erhitzen von Lösungen auftreten kann, ist **Siedeverzug** – das Phänomen, dass eine Überhitze Lösung erst bei Störung zu Kochen anfängt. Das passiert besonders dann, wenn eine Lösung schnell in der Mikrowelle erhitzt wurde (Klassiker: Agarose Aufkochen!) oder zu schnell aus dem Autoklaven geholt wird. Hier kann das Bewegen des Gefäßes zum Hochkochen führen, was dann üble Verbrühungen als Folge haben kann, wenn Teile der Lösung herauspritzen. Also: Lösungen im Zweifelsfall etwas abkühlen lassen und vorsichtig bewegen!

Detergenzien neigen dazu, beim Gerührt oder geschüttelt werden zu schäumen, was zum einen das genaue Einstellen des Volumens stört, zum anderen auch beim pH-Wert-Einstellen sehr lästig sein kann. Also erst am Ende zugeben, wenn die schwieriger zu lösenden Stoffe die mechanisch härtere Tour hinter sich haben.

Schwer lösliche Substanzen können beim Ansetzen von Lösungen auf verschiedene Weise Schwierigkeiten machen. Die eine Gruppe sind hier häufig **organische Stoffe**, die in Wasser teilweise nur schwer löslich sind. Hier lohnt sich meist schon ein Blick in das MSDS (Material Safety Data Sheet, das Begleitblatt des Herstellers), oft gelingt nämlich das Lösen in einem anderen Lösungsmittel und die Zugabe zur wässrigen Lösung aus dieser Stocklösung.

Die andere Problemgruppe sind **schwer lösliche Salze** und hier vor allem die Tatsache, dass diese durch das Mischen anderer Salze entstehen können. Die Löslichkeit von wenig löslichen Salzen lässt sich chemisch durch das **Löslichkeitsprodukt** (K_L oder L_P) beschreiben, welches sich aus dem chemischen Gleichgewicht ableitet. Hierzu werden die Konzentrationen der entsprechenden Ionen – mit der Zahl der Ionen in der Summenformel als Potenz – multipliziert. Übersteigt das Produkt der Konzentrationen der einzelnen Ionen eines Salzes dessen Löslichkeitsprodukt, so beginnt das Salz auszufallen.

Beispiel: Kalziumsulfat (CaSO_4) hat ein Löslichkeitsprodukt von $2,4 \times 10^{-5}$. Es soll eine Lösung mit 1 mM CaCl_2 und 20 mM Na_2SO_4 angesetzt werden. Vergleicht man jetzt die Konzentration der Kalzium- und Sulfat-Ionen mit dem Löslichkeitsprodukt, so sieht man:

$$1 \text{ mM} \times 20 \text{ mM} = 10^{-3} \times 2 \times 10^{-2} = 2 \times 10^{-5}$$

Da dies kleiner als $2,4 \times 10^{-5}$ ist, sollte Kalziumsulfat also nicht ausfallen, wir wären aber nah an der Grenze.

Hat man es mit Puffern zu tun, in denen schwer lösliche Salze entstehen könnten, was vor allem bei Kalziumsalzen, sowie generell bei Karbonaten, Hydroxiden und Sulfaten häufig der Fall ist, dann bietet es sich an, ein Ausfallen zu verhindern, da ein Rücklösen des ausgefallenen Salzes teilweise nur schwer möglich ist. Hierbei ist es meist hilfreich, das „kritische“ Salz erst zuzugeben, wenn schon eine gewisse Menge Flüssigkeit vorliegt und es nicht von Anfang an mit anderen Salzen zu mischen, vor allem sollte das Mischen hochkonzentrierter Stocklösungen in geringem Volumen vermieden werden! Manche Salze lösen sich übrigens so gut wie überhaupt nicht (z.B. Kalziumphosphat) – hier kann höchstens die Zugabe von Chelatbildnern helfen, um das Metallion in Lösung zu halten.

Auch gilt es zu beachten, dass das Löslichkeitsprodukt temperaturabhängig und teilweise pH-abhängig ist, zweiteres dann, wenn das Anion protoniert bzw. deprotoniert werden kann, womit letztendlich ein anderes Salz vorliegt. Im biologischen Labor sind hier vor allem Phosphate (X_nPO_4) zu nennen, die oft schlechter löslich sind als Hydrogen- oder Dihydrogenphosphate (X_nHPO_4 , $\text{X}_n\text{H}_2\text{PO}_4$) sowie schwer lösliche Hydroxide (X_nOH), die in basischen Lösungen entstehen und ausfallen können. In beiden Fällen kann also ein Ansäuern der Lösung helfen.

Zum **Einstellen des pH-Werts** verwendet man am besten eine Säure oder Base, die keine neuen Ionen in die Lösung einbringt, also z.B. HCl bei Puffern, in denen schon Cl⁻-Ionen vorhanden sind, H₃PO₄ bei Phosphatpuffern und NaOH oder KOH als Basen bei Na⁺ bzw. K⁺-haltigen Puffern. Starke Säuren und Basen sind besser als schwächere (z.B. Essigsäure, H₃PO₄, NH₃), da sie beim pH-Wert-Einstellen die Ionenstärke weniger verändern. Dass man mit Säuren ansäuert, also den pH-Wert senkt und mit Basen den pH-Wert steigert sollte bekannt sein. Da der pH-Wert auf einem Logarithmus beruht, benötigt man für in ungepufferten Lösungen für die gleiche Wert-Änderung bei hohen oder niedrigen pH-Werten mehr Säure oder Base. Bei gepufferten Lösungen benötigen Änderungen um den pK_S-Wert der Puffersubstanz (siehe nächstes Kapitel) besonders viel Säure oder Base. Im Zweifelsfall empfiehlt es sich, zuerst gering konzentrierten Lösungen tropfenweise zuzugeben und dann zu der höchstkonzentrierten Lösung zu gehen, die vorhanden ist und mit der sich die Einstellung gut kontrollieren lässt. Vor dem Einstellen des pH-Werts sollten alle Substanzen in der Lösung gelöst sein und möglichst die Temperatur der Temperatur entsprechen, bei der der Puffer auch verwendet werden soll, da manche Substanzen temperaturabhängig dissoziieren, was zu pH-Wert-Änderungen bei Temperaturänderungen führt. Im Laboralltag fällt das besonders bei Tris- oder Harnstoff-haltigen Lösungen ins Gewicht. Rein praktisch sollte man darauf achten, dass das verwendete pH-Meter ordentlich geeicht (im Zweifelsfall mit kommerziellen Eichlösungen testen) und die Elektrode intakt ist. Die Lösung wird während des Einstellens entweder auf dem Magnetrührer weiter gerührt, wobei der Rührfisch natürlich nicht gegen die Elektrode schlagen sollte oder die Lösung wird nach jeder Zugabe durch Schütteln oder Rühren ordentlich gemischt. Auf jeden Fall sollte man nach Zugabe einen Moment wartet, bis die zugegebene Säure oder Base gut gelöst und eingemischt ist, so dass der gemessene pH-Wert konstant ist.

Zum **Auffüllen auf das Endvolumen** gibt es wenig zu sagen, nur einen kleinen Trick: Soll eine Lösung schnell abgekühlt werden, kann man einen wässrigen Puffer auch mit Eis auffüllen. Schmilzt dieses, nimmt es das gleiche Volumen an wie das Wasser, das es vorher verdrängt hat, der Wasserspiegel verändert sich also nicht. Allerdings bietet sich der Trick nicht für besonders empfindliche Lösungen an, da das von Eismaschinen verwendete Wasser nicht unbedingt das sauberste und ganz sicher nicht bidestilliert ist.

Sollen Lösungen nicht sofort verwendet werden, dann sollte man sich eventuell ein paar Gedanken zur richtigen **Aufbewahrung** machen. Hierbei ist vor allem eine gute Beschriftung wichtig, damit man auch später noch weiß, was in der Flasche ist, wer das angesetzt hat und wie alt die Lösung ist. Werden Lösungen längere Zeit aufbewahrt, die Lösungsmittel enthalten, die die Beschriftung angreifen können oder wenn die Lösungen eingefroren werden sollen, bietet es sich an, die Beschriftung mit durchsichtigem Klebeband darüber zu schützen. Soll die Lösung autoklaviert werden, empfiehlt es sich, sie davor nur auf einem Klebeband zu beschriften, da sich die Beschriftung sonst nach dem Autoklavieren oft kaum noch entfernen lässt.

Des Weiteren gilt es, ein passendes Gefäß zu wählen – besonders organische Lösungsmittel greifen z.B. manche Kunststoffe an, die Lösung nötigenfalls vor Licht zu schützen – besonders wenn Farbstoffe enthalten sind und sie haltbar zu machen, also das Wachstum unerwünschter Organismen und chemischen Zerfall zu unterbinden.

Um Lösungen vor Kontaminationen mit Mikroorganismen zu schützen, eignen sich Sterilmachen, Vergiften oder Kühlen, wobei Kühlen auch chemische Zerfallsprozesse bremst. Die am häufigsten verwendeten Methoden, um Lösungen zu sterilisieren, sind **Autoklavieren** und **Sterilfiltrieren**. Im Gegensatz zur chemischen Sterilisierung haben Autoklavieren oder Filtrieren den Vorteil, dass die Lösungen danach weiterhin ungiftig sind und in Kulturen verwendet werden können – der Nachteil ist, dass die Lösungen nur solange sicher steril bleiben, bis ihre Flasche geöffnet wird und Kontaminanten hereinkönnen. Für eine längere Lagerung bietet sich also an, die Lösung nachher zu kühlen.

Autoklavieren ist nichts anderes als Erhitzen unter Druck, gewöhnlich für 20 Minuten bei 121°C und bei etwa einem Bar Überdruck. Da das nicht ganz ungefährlich ist, sollte ein Autoklav nie ohne Einführung eines erfahrenen Benutzers verwendet werden.

Beim Autoklavieren sollte der Lösungsbehälter nicht luftdicht verschlossen sein, da die Lösung sonst eben nicht unter Überdruck gesetzt wird, anfängt zu kochen und so ihr Gefäß sprengen kann – Flaschendeckel also leicht lose drehen! Außerdem sollte das Gefäß, in dem der Messfühler des Autoklaven steckt etwa so viel Flüssigkeit enthalten wie die größte mit autoklavierte Lösungsmenge, da es sonst passieren kann, dass die eben nicht die gewünschte Temperatur erreicht. Um die Funktionsweise des Autoklaven zu überprüfen, wird in den meisten Labors ein spezielles Klebeband verwendet, das sich bei erfolgreichem Autoklavieren verfärbt. Da das Band relativ teuer ist, wird es meist nicht gern gesehen, wenn es für andere Zwecke verwendet wird. Beim Autoklavieren kann ein Teil des Lösungsmittels verdampfen, daher bietet es sich an, Wasser mit zu autoklavieren, um nachher wieder auf das gewünschte Volumen aufzufüllen.

Manche Substanzen lösen sich erst beim Erhitzen im Autoklaven, z.B. der Agar in Festmedien (siehe hierzu auch das Kapitel zur Bakterienkultur). In diesem Fall bietet es sich an, einen Rührfisch mit zu autoklavieren, um nachher noch einmal ohne Kontaminationsrisiko ordentlich durchmischen zu können. Auf der anderen Seite können manche Substanzen auch beim Erhitzen und wieder Abkühlen ausfallen, wozu insbesondere Phosphate neigen. Hier bietet es sich an, den Phosphatpuffer als Stocklösung separat zu autoklavieren und erst danach mit dem Rest der Lösung zu mischen. Letztendlich gibt es Substanzen, die ein Autoklavieren nicht vertragen, z.B. viele Antibiotika. Dies sollten erst nach genügendem Abkühlen (auf etwa 50°C) zugegeben werden.

Sterilfiltrieren ist eine Alternative zum Autoklavieren für temperaturempfindliche Lösungen. Hierzu wird die Lösung durch einen geeigneten Filter gepresst, dessen Poren Bakterien zurückhalten sollen. Sterilfiltrieren hält aber meist weder Viren noch Mykoplasmen zurück, da hierfür die Poren der meisten Filter zu groß sind. Ein weiterer Nachteil des Sterilfiltrierens kann das Verstopfen des Filters bei Lösungen mit inkompatiblen Lösungsmitteln, hoher Viskosität oder schlecht gelösten Inhaltsstoffen sein – im Zweifelsfall also vorher die Beschreibung des verwendeten Filters genau anschauen.

Zum **Vergiften** von Lösungen werden meist spezifische Gifte wie Antibiotika oder unspezifisch giftige Substanzen wie Natriumazid (NaN_3 ; meist 0,1 bis 0,001%) verwendet. Der Vorteil von spezifisch giftigen Substanzen ist, dass sie gleichzeitig zum Schutz der Lösung und zur Selektion gewünschter Organismen, die von der Substanz nicht betroffen sind, verwendet werden können. Bei allen vergifteten Lösungen ist natürlich besondere Vorsicht im Umgang geboten – also immer als Gefahrstoff kennzeichnen, entsprechend lagern und entsorgen! Außerdem sollte man sich klar sein, dass kaum eine Substanz wirklich vor allen Organismen schützt, dass auch Giftstoffe nicht unbegrenzt haltbar sind und dass ein Giftstoff eventuell auch in folgenden Experimenten stören kann.

Kühlen ist natürlich ein Klassiker, um die Haltbarkeit von Lösungen zu erhöhen. Dabei gibt es in den meisten Labors verschiedene Stufen: 4°C im Kühlschrank, im Kühlraum oder auf Wassereis, -20° und -80°C in Tiefkühlschrank oder Tiefkühltruhe oder durch Trockeneis (-78°C) und flüssiger Stickstoff (-196°C). Die Grundidee hinter dem Kühlen ist die klassische RGT-Regel, die besagt, dass chemische (und damit auch biologische) Reaktionen bei 10°C Abkühlung etwa 2- bis 3-mal langsamer ablaufen. Verglichen mit einer Raumtemperatur von 25°C heißt das, dass eine Lösung bei 4°C etwa vier- bis zehnmal so lange haltbar ist, bei -20°C etwa 20- bis 140-mal so lange, bei -80°C 1.500 bis 100.000-mal so lange und bei -200°C tatsächlich nahezu nichts mehr passiert. Das heißt aber umgekehrt auch, dass eine Lösung auch gekühlt nicht ewig hält! Was man nach einer Nacht bei Raumtemperatur nicht mehr verwenden würde, sollte man also auch nach zwei bis fünf Tagen im Kühlschrank, nach zwei bis zehn Wochen auf -20°C oder nach ein paar Jahren auf -80°C entsorgen. Ein weiteres Problem beim Kühlen von Lösungen kann sein, dass Substanzen Ausfallen und vor Gebrauch rückgelöst werden müssen, hier sind wieder Phosphate häufig ein Problem, sowie SDS. Wird eine Lösung tatsächlich eingefroren und wieder aufgetaut, dann kann dieser Vorgang insbesondere Makromoleküle (Nukleinsäuren, Proteine) mechanisch beschädigen. Häufiges Auftauen und wieder Einfrieren sollte also vermieden werden. Oft – aber nicht immer – ist schnelles Einfrieren (Stickstoff!) und Auftauen (Wasserbad) schonender als die langsame Variante, da hierbei die Bildung großer Kristalle verhindert wird.

Bei der **Verwendung von Lösungen, die längere Zeit gelagert wurden**, sollte überprüft werden, ob die Lösung überhaupt noch brauchbar ist. Wenn Alter und Lagerung in Ordnung sind (und die Person, die die Lösung angesetzt hat vertrauenswürdig ist), sollten Kontaminationen ausgeschlossen werden (Trübung, wolkenartiges Pilzwachstum, grünliche Algen, ...), eventuell ausgefallene Substanzen wieder in Lösung gebracht und dann der pH-Wert überprüft werden. Vor Gebrauch werden dann nur noch schlecht haltbare Substanzen wie Reduktionsmittel neu zugesetzt und es kann wieder losgehen.

Wie finde ich die richtige Puffersubstanz?

Für eine Pufferlösung ist die Puffersubstanz das zentrale Element, bei dem breiten Angebot an verfügbaren Substanzen fällt die Wahl aber nicht immer ganz einfach. Um die richtige Puffersubstanz für ein Experiment zu finden, sind vor allem drei Punkte wichtig:

- Der **Pufferbereich**, also die Frage nach dem pH-Wert, den ich erreichen und halten möchte.
- Die **Kompatibilität** – meine Puffersubstanz sollte also mein Experiment nicht stören, indem sie mit anderen Komponenten reagiert oder die Reaktion meiner Enzyme oder Zellen stört.
- Der **Preis**. Viele spezialisierte Puffersubstanzen sind relativ teuer, weshalb z.B. Tris- und Phosphatpuffer trotz ihrer Nachteile so weit verbreitet sind.

Ein Puffer im chemischen Sinn ist eine Lösung, deren pH-Wert sich bei der Zugabe von Säuren oder Basen nur wenig ändert. Dies wird erreicht, indem man eine schwache Säure und ihre konjugierte Base – oder umgekehrt – mischt. Da diese beiden Substanzen im chemischen Gleichgewicht stehen, kann diese Mischung hinzukommende H^+ - oder OH^- -Ionen abfangen und so einer pH-Wert-Änderung entgegenwirken (Eine genauere Betrachtung der Zusammenhänge findet sich weiter unten). Bei gleicher Menge an Säure und Base liegt der pH-Wert der Lösung beim pK_S -Wert der Säure. Da die Titrationskurve einer Säure-Base-Lösung an dieser Stelle am flachsten verläuft, der pH-Wert sich also am wenigsten ändert, folgt daraus, dass ein Puffer am stärksten im pH-Bereich um den pK_S -Wert der beteiligten Säure puffert. Als Faustregel wird meist der Bereich angegeben, bei dem Säure oder Base mindestens 10% ausmachen, was einem Bereich von einer pH-Einheit um den pK_S -Wert entspricht. Außerhalb dieses **Pufferbereichs** puffert eine Lösung also nur schlecht bis gar nicht! Ein wichtiger Punkt ist hierbei noch, dass die pK_S -Werte einiger Substanzen mehr oder weniger stark temperaturabhängig sind – für die Wahl einer geeigneten Puffersubstanz, insbesondere aber für das Einstellen des pH-Werts, ist also die Frage, bei welcher Temperatur ein Experiment stattfinden soll wichtig! Eine Übersicht über pK_S -Werte und Pufferbereiche einiger gebräuchlicher Puffer findet sich in der Tabelle am Ende dieses Kapitels.

Manche Substanzen haben **mehrere Dissoziationsstufen** und daher auch mehrere Pufferbereiche (z.B. hat Phosphorsäure einen sauren, einen neutralen und einen basischen Pufferbereich für die drei Dissoziationsstufen: $H_3PO_4/H_2PO_4^-$, $H_2PO_4^-/HPO_4^{2-}$ und HPO_4^{2-}/PO_4^{3-}), zwischen diesen Bereichen puffert eine solche Lösung aber nur schlecht. Soll ein Puffer einen breiteren pH-Bereich abdecken, zum Beispiel weil die Aktivität eines Enzyms von pH 4 bis 8 untersucht werden soll, dann benötigt man einen **gemischten Puffer** mit mehreren Puffersubstanzen, deren Pufferbereiche überlappen. Da solche Gemische recht komplex reagieren können, sollte im Zweifelsfall die Titrationskurve überprüft werden.

Die **Pufferstärke** hängt vor allem von der Konzentration der Puffersubstanz an, wobei der Zusammenhang grob linear ist – eine Lösung mit 10 mM Tris ändert ihren pH-Wert also erst bei der gleichen Zugabe an Säure oder Base nur etwa ein zehntel so stark wie eine Lösung mit 1 mM Tris. Dabei ist allerdings zu beachten, dass der pH-Wert einiger Puffer mehr oder weniger stark von der **Konzentration abhängig** ist. Allgemein gilt, dass die Konzentration des Puffers so gering wie möglich sein sollte, da dadurch unerwünschte Interaktionen minimiert werden und auch die Ionenstärke der

Lösung möglichst wenig beeinflusst wird. Im Zweifelsfall einfach ein Probeexperiment mit 10-20 mM Puffer durchführen und wenn der pH-Wert sich dabei um mehr als $\pm 0,05$ Einheiten verändert die Konzentration erhöhen.

Ob eine Puffersubstanz für ein geplanten Experiment geeignet ist, kann natürlich noch von einer Reihe weitere Faktoren abhängen. Hinweise kann hier die Literatur oder die Herstellerbeschreibung der Substanz geben, manchmal bleibt aber nichts anderes übrig, als auszuprobieren, womit es am besten geht. Dabei sollte man ein paar Punkte im Hinterkopf behalten und geeignete Kontrollen nicht vergessen (Parallelansätze mit verschiedenen Puffern, Konstanz des pH-Werts kontrollieren):

Reagiert meine Puffersubstanz mit irgendetwas (Primäre Amine (R-NH₂, z.B. Tris, Glycin) können mit Aldehyden und Ketonen (R=O) reagieren, Borate mit Zuckern, Ribose und Nukleotiden)? Bindet sie Ionen oder fällt mit diesen aus (vor allem anorganische Puffer wie Phosphat)? Wirkt meine Puffersubstanz in der verwendeten Konzentration inhibierend auf Proteine oder toxisch auf Zellen (z.B. wegen der oben genannten Reaktionen, Herstellerangaben und Literatur prüfen, beim Ausprobieren Kontrollen mitmachen)? Wird meine Puffersubstanz von meinen Enzymen oder Zellen umgesetzt (z.B. organische Säuren, die auch im Stoffwechsel vorkommen)? Ist meine Puffersubstanz bei den Bedingungen des Experiments und evtl. Beim Autoklavieren stabil oder zerfällt sie möglicherweise oder dampft aus?

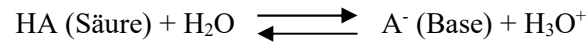
Überblick über einige Puffersubstanzen

Trivialname: Chemischer Name (Anmerkungen)	pK _s (25°C)	ΔpK _s /°C
Phosphat (pK ₁ – H ₃ PO ₄ /H ₂ PO ₄ ⁻)	2,15	0,0044
Glycin (pK ₁)	2,35	-
Malat (pK ₁)	3,40	-
Succinat (pK ₁)	4,21	-0,0018
Essigsäure/Acetat	4,75	-0,0002
Citrat (pK ₂)	4,76	-0,0016
Malat (pK ₂)	5,13	-
MES : 2-(N-Morpholino)ethansulfonsäure	6,10	-0,011
Citrat (pK ₃)	6,40	0,0
Bis-Tris : Bis(2-hydroxyethyl)imino]tris(hydroxymethyl)methan	6,46	0,0
ADA : N-2-Acetamidoiminodiessigsäure	6,59	-0,011
PIPES : Piperazin-N,N-bis(2-ethan-Sulfonsäure)	6,76	-0,0085
MOPSO : 3-N-Morpholino)-2-hydroxypropansulfonsäure	6,95	-0,015
Imidazol	6,95	-0,020
BES : N,N,-Bis(2-hydroxyethyl)-2-aminoethansulfonsäure	7,09	-0,016
MOPS : 3-(N-Morpholino)propansulfonsäure	7,20	0,015
Phosphat (pK ₂ – H ₂ PO ₄ ⁻ /HPO ₄ ²⁻)	7,20	-0,0028
HEPES : N-2-Hydroxyethylpiperazin-N-2-ethansulfonsäure	7,48	-0,014
DIPSO : 3-[N-Bis(hydroxyethyl)amino]-2-hydroxypropansulfonsäure	7,60	-0,015
POPSO : Piperazin-N,N-bis(2-hydroxypropansulfonsäure)	7,85	-0,013
TEA : Triethanolamin	7,76	-0,020
EPPS bzw. HEPPS : 4-(2-Hydroxyethyl)-piperazin-1-propansulfonsäure	8,00	-
Tricin : N-[Tris(hydroxymethyl)methyl]glycin	8,05	-0,021
Tris : Tris(hydroxymethyl)aminomethan	8,06	-0,028
Glycylglycin	8,25	-0,025
Bicin : N,N-Bis(2-hydroxyethyl)glycin	8,26	-0,018
TAPS : 3- {[Tris(hydroxymethyl)methyl]amino} propansulfonsäure	8,40	0,018
Borsäure (H ₃ BO ₃)	9,23	-0,008
Ethanolamin	9,50	-0,029
CHES : cyclohexylaminoethansulfonsäure	9,3	0,029
Glycin (pK ₂)	9,78	-0,025
CAPS : 3-(Cyclohexylamino)propansulfonsäure	10,40	0,032
Phosphat (pK ₃ – HPO ₄ ²⁻ /PO ₄ ³⁻)	12,33	-0,026

Quelle: Stoll & Blanchard (1990) „Buffers:Principle and Practice“ in Methods in Enzymology, Vol. 182, S. 24-38, ergänzt nach Sigma-Aldrich-Datenblätter

Pufferchemie: Rechnen mit Henderson-Hasselbalch

Das Prinzip eines Puffers beruht auf dem chemischen Gleichgewicht. Bei schwachen Säuren oder Basen stehen in einer Lösung die Säure und Base immer in einem Gleichgewicht der Art:



Die Stärke der Säure lässt sich dabei anhand der Säurekonstante beschreiben, wobei $[\text{H}_2\text{O}]$ als konstant angenommen und deshalb außen vorgelesen wird:

$$K_s = [\text{A}^-][\text{H}_3\text{O}^+] / [\text{HA}]$$

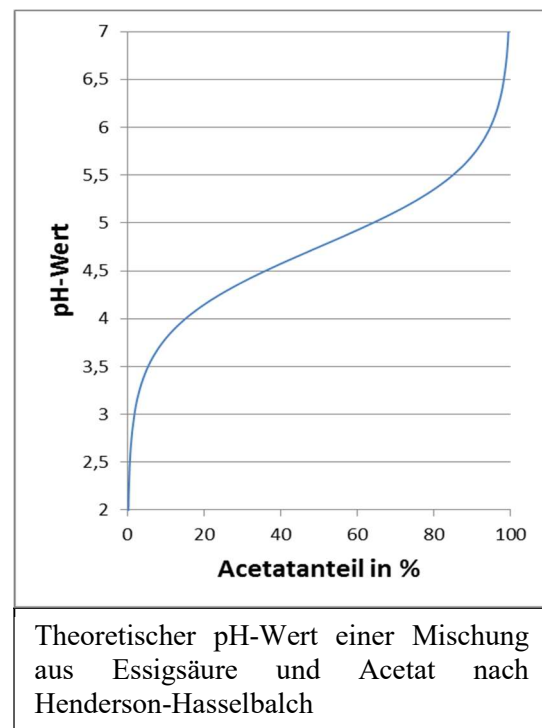
Wie jedes chemische Gleichgewicht reagiert auch das Säure-basen-gleichgewicht auf Veränderungen von außen so, dass dieser Veränderung entgegengewirkt wird. Kommt als von außen Säure ($[\text{H}_3\text{O}^+]$) dazu, wird diese durch Reaktion mit A^- aufgebraucht und umgekehrt. Da die Reaktion je nach Säure mehr oder weniger stark exotherm oder endotherm, also Wärme erzeugend oder verbrauchend, ablaufen kann, ist K_s auch temperaturabhängig. Löst man die Gleichung nach $[\text{H}_3\text{O}^+]$ auf, dann erhält man:

$$[\text{H}_3\text{O}^+] = K_s * [\text{HA}]/[\text{A}^-]$$

Und da der pH-Wert als negativer Logarithmus zu Basis 10 von $[\text{H}_3\text{O}^+]$ definiert ist, kommt man damit zur **Henderson-Hasselbalch**-Gleichung für Pufferlösungen:

$$\text{pH} = \text{p}K_s + \log([\text{Base}]/[\text{Säure}])$$

Aus dem Verhältnis von Base zu Säure und dem $\text{p}K_s$ -Wert lässt sich also der pH-Wert der Lösung berechnen – und umgekehrt aus dem gewünschten pH-Wert das benötigte Säure-Base-Verhältnis. Wichtig ist dabei zu beachten, dass die Henderson-Hasselbalch-Gleichung eine Näherung ist ($[\text{H}_2\text{O}]$ wurde ignoriert) – bei besonders hohen oder niedrigen Konzentrationen und bei pH-Werten unter 3 oder über 11 wird sie ungenau. Auch ist der pH-Wert nur bedingt unabhängig von der absoluten Konzentration $[\text{Säure}] + [\text{Base}]$, man kann Puffer also verdünnen, ohne dass sich der pH-Wert stark ändert, sollte aber im Zweifelsfall kontrollieren. Das gleiche gilt natürlich für nach der Henderson-Hasselbalch-Gleichung angesetzte Pufferlösungen.



Beispiel 1: Der Bereich, in dem eine Lösung gut puffert, entspricht dem Bereich, in dem das Verhältnis Base zu Säure zwischen 10/1 und 1/10 liegt. Welchem pH-Wert-Bereich entspricht das?

$$\log(10/1) = \log(10) = 1$$

$$\log(1/10) = \log(0,1) = -1$$

Eine Lösung puffert also im Bereich um etwa eine pH-Einheit um den pK_S -Wert gut.

Beispiel 2: Eine Lösung enthält 10 mM Essigsäure und 30 mM Natriumacetat (NaCOOCH_3) – welchen pH-Wert hat sie? Mit dem pK_S -Wert von Essigsäure (4,76) ergibt sich:

$$pH = 4,76 + \log([30 \text{ mM}] / [10 \text{ mM}]) = 4,76 + \log(3) = 4,76 + 0,48 = 5,24$$

Beispiel 3: Ein Tris-Puffer ($pK_S = 8,06$) soll einen pH-Wert von 8,5 bei einer Konzentration von 20 mM haben. Wieviel Tris (Base) und Tris-HCl (Säure) brauche ich?

$$8,5 = 8,06 + \log([Base]/[Säure])$$

$$\log([Base]/[Säure]) = 0,44$$

$$[Base]/[Säure] = 10^{0,44} = 2,75$$

Es muss also 2,75-mal so viel Base wie Säure eingesetzt werden. Entweder kann jetzt aus zwei Stocklösungen gleicher Konzentration gemischt werden:

$$2,75 \text{ ml Base} / 1 \text{ ml Säure}$$

$$\text{Also: } 2,75 / (2,75 + 1) = 0,733 \text{ (73,3\% des Endvolumens Base)}$$

Oder Säure und Base werden einzeln abgewogen (Zum Ausrechnen der Mengen in Gramm siehe das Kapitel „Wie viel Pulver muss da jetzt rein?):

$$\text{Säure: } 20 \text{ mM} / (2,75 + 1) = 20 \text{ mM} / 3,75 = 5,33 \text{ mM}$$

$$\text{Base: } 20 \text{ mM} - 5,33 \text{ mM} = 14,67 \text{ mM}$$

Entsprechend lassen sich alle Puffer ansetzen von denen konjugierte Säure und Base vorhanden sind. Für das Mischen setzt man hierzu am besten höher konzentrierte Lösungen an, mischt diese bis man den gewünschten pH-Wert erreicht (Mischungsverhältnis mit Henderson-Hasselbalch berechnen und am Ende durch Zugabe von Säure oder Base den pH-Wert genau einstellen) – von diesem Gemisch kann man dann auf die gewünschte Endkonzentration herunterverdünnen. (Für Phosphatpuffer finden sich im Anhang Tabellen). Wenn nur eine Komponente vorhanden ist, muss diese in der gewünschten Konzentration gelöst werden und die andere durch Zugabe von Säure (meist HCl) oder Base (meist NaOH oder KOH) erzeugt werden, bis der gewünschte pH-Wert erreicht wird.

Tipps zum Weiterlesen und Surfen

- Sambrook & Russel (2001) "Molecular Cloning – A Laboratory Manual", Cold Spring Harbor Laboratory Press (Anhang 1 gibt viele wertvolle Hinweise zu Puffern)
- Stoll & Blanchard (1990): „Buffers: Principle and Practice“ in Methods in Enzymology, Vol. 182, S. 24-38 (Guter Überblick und Pufferrezepte)
- Gute allgemeine Übersicht zum Thema Puffer:
<http://www.sigmaaldrich.com/life-science/metabolomics/bioultra-reagents/biological-buffers.html>
- Eine schöne Übersicht über verschiedene Puffersubstanzen und Standardpuffer (mit vielen pK_s -Werten für 20°C, 25°C und 37°C und einer temperaturabhängigen Tabelle für Tris-Puffer!):
<http://www.sigmaaldrich.com/life-science/core-bioreagents/biological-buffers/learning-center/buffer-reference-center.html>
- Verschiedene Puffer (nicht nur) zum Mikroskopieren:
<http://microscopy.berkeley.edu/Resources/instruction/buffers.html>
- Pufferrezepte nach Henderson-Hasselbalch online berechnen:
<http://dbr.csoft.net/chem/bufcalc.php>

Anhänge

Abkürzungsverzeichnis

Siehe auch die nachfolgenden Kapitel „SI-Einheiten und Umrechnungen“ und „Vorsätze für Maßeinheiten und Rechnen mit Zehnerpotenzen“ für Abkürzungen von Maßeinheiten

%	Prozent , von lateinisch <i>pro centum</i> = von Hundert, Hundertstel
‰	Promille , von lateinisch <i>pro mille</i> = von Tausend, Tausendstel
bp/Bp	Basenpaare (engl. <i>base pairs</i>), Maßeinheit für die Länge von Nukleinsäuren, auch zusammen mit den üblichen Vorsätzen für Maßeinheiten (z.B. kBp)
Da	Dalton , in der Biochemie verwendetes Synonym für die atomare Masseneinheit
dNTP(s)	Desoxynukleotidtriphosphat(e) , die Bausteine der DNA
DTT	Dithiothreitol , Reduktionsmittel
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure (engl. <i>ethylene diamine tetraacetic acid</i>), Chelatkomplexbilder mit zwei- oder höherwertigen Ionen, v.a. Mg^{2+}
EGTA	Ethylenglycoltetraessigsäure (engl. <i>ethylene glycol tetraacetic acid</i>), Chelatkomplexbilder mit zwei- oder höherwertigen Ionen, v.a. Ca^{2+}
FPLC	Fast protein liquid chromatography , ein chromatografisches Verfahren
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure , eine Puffer-substanz
HPLC	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie bzw. Hochdruckflüssigchromatographie (engl. <i>high performance/pressure liquid chromatography</i>)
MSDS	Material Safety Data Sheet , ein Datenblatt, das chemischen Substanzen beiliegt und die nötigen Informationen zu Eigenschaften, Umgang und Entsorgung bietet
NTP	Nukleotidtriphosphat(e) , die Bausteine der RNA
PEG	Polyethylenglykol , ein chemisch inertes Polymer
PCR	Polymerasekettenreaktion (engl. <i>Polymerase Chain Reaction</i>), Verfahren zur Vervielfältigung von DNA
pH	Negativer Zehnerlogarithmus der Konzentration an H^+ -Ionen, Maß dafür, wie sauer oder basisch eine Lösung ist
pK_B	Basenkonstante , pH-Wert, bei dem die Hälfte der Basenmoleküle protoniert vorliegt
pK_S	Säurekonstante , pH-Wert, bei dem die Hälfte der Säuremoleküle deprotoniert vorliegt
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid , ein chemischer Proteaseinhibitor
ppb	parts per billion , Milliardstel
ppm	parts per million , Millionstel
PVP/PVPP	Polyvinylpyrrolidon/Polyvinylpolypyrrolidon , Polymere, die zur Bindung unerwünschter Substanzen eingesetzt werden
RGT-Regel	Reaktionsgeschwindigkeits-/Temperatur-Regel: Je zehn Grad Temperaturerhöhung laufen chemische Reaktionen zwei bis dreimal schneller ab
SDS	Natriumdodecylsulfat (engl. <i>Sodium dodecyl sulfate</i>) – ein Detergens
SI	Internationales Einheitensystem (französisch: <i>Système international d'unités</i>)

SI-Einheiten und Umrechnungen

Das **Internationale Einheitensystem**, abgekürzt **SI** (von französisch *Système international d'unités*) kennt folgende Grundeinheiten (Bei Umrechnungen in nicht-SI-Einheiten bedeutet „ \approx “ eine auf drei Stellen gerundete Angabe)

- Meter (m) für die **Länge** (l)
 - Nicht SI-Einheit: Zoll (inch, in), wobei $1 \text{ in} = 2,54 \text{ cm}$ und $1 \text{ cm} \approx 0,394 \text{ in}$
- Kilogramm (kg) für die **Masse** (m)
 - Nicht SI-Einheit: britisches Pfund (pound, lb. oder pd.), wobei $1 \text{ lb} \approx 0,454 \text{ kg} = 16 \text{ oz. (Unzen)}$, $1 \text{ oz.} \approx 28,3 \text{ g}$
- Sekunden (s) für die **Zeit** (t)
 - mit einer Minute (min) = 60 s, einer Stunde (h) = 60 min = 3600 s und einem Tag = 24 h = 1.440 min = 86.400 s
- Kelvin (K) für die **Temperatur** (T)
 - Wobei die Temperatur in Kelvin der in Grad Celsius ($^{\circ}\text{C}$) + 273,15 entspricht
- Ampere (A) für **Stromstärke** (I)
- Mol (mol) für die **Stoffmenge** (n)
 - Wobei ein mol $\approx 6,022 \cdot 10^{23}$ Teilchen
- Candela (cd) für die **Lichtstärke** (I_v)

Daraus lassen sich für alle möglichen Größen Einheiten ableiten, z.B.:

- **Fläche** in Quadratmetern (m^2) mit $1 \text{ m}^2 = 10^4 \text{ cm}^2 = 10^6 \text{ mm}^2$ und $1 \text{ cm}^2 = 100 \text{ mm}^2$
 - Nicht-SI: 1 in^2 (square inch) = 6,4516 cm^2
- **Volumen** in Kubikmetern (m^3) mit $1 \text{ m}^3 = 10^6 \text{ cm}^3 = 10^9 \text{ mm}^3$ und $1 \text{ cm}^3 = 1.000 \text{ mm}^3$
 - Nicht-SI: 1 Liter (L) = $1/1000 \text{ m}^3 = 1.000 \text{ cm}^3$, $1 \text{ mL} = 1 \text{ cm}^3$, $1 \mu\text{l} = 1 \text{ mm}^3$
- **Geschwindigkeit** in m/s, mit $1 \text{ m/s} = 3,6 \text{ km/h}$
- **Frequenz** in Hertz (Hz), mit $1 \text{ Hz} = 1/\text{s}$
- **Kraft** in Newton (N), mit $1 \text{ N} = 1 \text{ kg} \cdot \text{m/s}^2 = 1 \text{ J/m}$
- **Energie/Arbeit** in Joule (J), mit $1 \text{ J} = 1 \text{ N} \cdot \text{m} = 1 \text{ W} \cdot \text{s} = 1 \text{ kg} \cdot \text{m}^2/\text{s}^2$
 - Nicht-SI: 1 Kalorie (cal) = 0,239 J
- **Leistung** in Watt (W), mit $1 \text{ W} = 1 \text{ J/s} = 1 \text{ kg} \cdot \text{m}^2/\text{s}^3$
 - Nicht-SI: 1 Pferdestärke (PS) $\approx 735,5 \text{ Watt}$
- **Druck** in Pascal (Pa), mit $1 \text{ Pa} = 1 \text{ N/m}^2$ oder Bar (bar) mit $1 \text{ bar} = 100.000 \text{ Pa}$
 - Nicht SI: technische Atmosphäre (at) mit $1 \text{ at} \approx 0,981 \text{ bar} = 98.100 \text{ Pa}$ – auch als Über- oder Unterdruck gekennzeichnet (atü bzw. atu)
 - pound-force per square inch (psi) mit $1 \text{ psi} \approx 6,89 \cdot 10^3 \text{ Pa} = 6,89 \cdot 10^{-2} \text{ bar}$
 - Torr oder Millimeter Quecksilber (mmHg) mit $1 \text{ mmHg} \approx 133 \text{ Pa}$
- **Elektrische Ladung** in Coloumb (C) mit $1 \text{ C} = 1 \text{ A} \cdot \text{s}$ also. $1 \text{ A} = 1 \text{ C/s}$
- **Elektrische Spannung** in Volt (V) mit $1 \text{ V} = 1 \text{ J/C} = 1 \text{ m}^2 \cdot \text{kg} \cdot \text{s}^{-3} \cdot \text{A}^{-1}$
- **Elektrischer Widerstand** in Ohm (Ω) mit $1 \Omega = 1 \text{ V/A} = 1 \text{ m}^2 \cdot \text{kg} \cdot \text{s}^{-3} \cdot \text{A}^{-2}$
- **Radioaktivität** in Becquerel (Bq) mit $1 \text{ Bq} = 1 \text{ Zerfall/s}$
 - Nicht-SI: Curie (Ci) mit $1 \text{ Ci} = 3,7 \cdot 10^{10} \text{ Bq}$
- **Katalytische Aktivität** in katal (kat) mit $1 \text{ kat} = 1 \text{ mol/s}$
 - Nicht-SI: Enzymeinheit (U) mit $1 \text{ kat} = 60 \cdot 10^6 \text{ U}$, aber mit Enzymabhängiger Definition (Bedingungen!)

Vorsätze für Maßeinheiten und Rechnen mit Zehnerpotenzen

Den folgenden Vorsätzen für Maßeinheiten begegnet man im Labor gelegentlich bis häufiger. Sie erlauben es, die wissenschaftliche Schreibweise für große und kleine Zahlen über Zehnerpotenzen in die Maßeinheit einzubeziehen, so dass man mit „handlichen“ Zahlen arbeiten kann.

Name	Symbol	Größe	Name	Symbol	Größe
Dezi	d	10^{-1}	Deka	da	10^1
Zenti	c	10^{-2}	Hekto	h	10^2
Milli	m	10^{-3}	Kilo	k	10^3
Mikro	μ	10^{-6}	Mega	M	10^6
Nano	n	10^{-9}	Giga	G	10^9
Piko	p	10^{-12}	Tera	T	10^{12}
Femto	f	10^{-15}	Peta	P	10^{15}
Atto	a	10^{-18}	Exa	E	10^{18}

Kommen in einer Formel verschiedene Vorzeichen vor Einheiten vor oder sollen Einheiten ineinander umgerechnet werden, ist es am einfachsten, entweder in entsprechende Einheiten umzurechnen oder die entsprechenden **Zehnerpotenzen** der Einheiten unabhängig von den Zahlenwerten zu verrechnen. Eine Zehnerpotenz höher heißt dabei, das Komma um eins nach rechts zu verschieben und anders herum (also $10^3 = 1.000$, $10^2 = 100$, $10^1 = 10$, $10^0 = 1$, $10^{-1} = 0,1$, $10^{-2} = 0,01$, $10^{-3} = 0,001$ usw.). Des Weiteren gelten die Rechenregeln für Potenzen:

$$\begin{aligned} 10^x * 10^y &= 10^{x+y} \\ 10^x/10^y &= 10^{x-y} \\ (10^x)^y &= 10^{x*y} \end{aligned}$$

Beispiel 1: 2 mL sind $2 * 10^{-3} \text{ L} = 2 * 10^{-3 - (-6)} \mu\text{L} = 2 * 10^3 = 2.000 \mu\text{L}$, da $1 \mu\text{L} = 10^{-6} \text{ L}$

Beispiel 2: Eine Lösung mit $5 \text{ pg}/\mu\text{L}$ einer Substanz enthält $5 * 10^{-12} \text{ g}/10^{-6} \text{ L} = 5 * 10^{-12 - (-6)} = 5 * 10^{-6} \text{ g/L}$ oder $5 \mu\text{g/L}$ bzw. 5 ng/mL

Griechische Zahlenpräfixe

Nützlich zum Angeben, oder um herauszufinden, wie viele Wassermoleküle in „Magnesiumsulfat-Heptahydrat“ sind:

Zahl	Präfix	Zahl	Präfix	Zahl	Präfix
1	Mono-	8	Okta-	20	Eikosa-
2	Di-	9	Ennea-	30	Triakonta-
3	Tri-	10	Deka-	40	Tettarakonta-
4	Tetra-	11	Hendeka-	50	Pentekonta-
5	Penta-	12	Dodeka-	100	Hekaton(to)-
6	Hexa-	13	Triskaideka-*	1000	Chilio- (Kilo-)
7	Hepta-	14	Tetrakaideka-	10000	Myrio-

*gebildet mit griechisch „kai“ = „und“

Umrechnungsfaktoren für Längen, Flächen und Volumina

Länge	in km	in m	in dm	in cm	in mm	in μm	in nm
1 km	1 (10^0)	1000 (10^3)	10.000 (10^4)	100.000 (10^5)	1.000.000 (10^6)	10^9	10^{12}
1 m	0,001 (10^{-3})	1 (10^0)	10 (10^1)	100 (10^2)	1.000 (10^3)	1.000.000 (10^6)	10^9
1 dm	0,0001 (10^{-4})	0,1 (10^{-1})	1 (10^0)	10 (10^1)	100 (10^2)	100.000 (10^5)	10^8
1 cm	0,00001 (10^{-5})	0,01 (10^{-2})	0,1 (10^{-1})	1 (10^0)	10 (10^1)	10.000 (10^4)	10^7
1 mm	10^{-6}	0,001 (10^{-3})	0,01 (10^{-2})	0,1 (10^{-1})	1 (10^0)	1000 (10^3)	1.000.000 (10^6)
1 μm	10^{-9}	10^{-6}	0,00001 (10^{-5})	0,0001 (10^{-4})	0,001 (10^{-3})	1 (10^0)	1000 (10^3)
1 nm	10^{-12}	10^{-9}	10^{-8}	10^{-7}	10^{-6}	0,001 (10^{-3})	1 (10^0)

Fläche	in km^2	in m^2	in dm^2	in cm^2	in mm^2	in μm^2	in nm^2
1 km^2	1 (10^0)	1.000.000 (10^6)	10^8	10^{10}	10^{12}	10^{18}	10^{24}
1 m^2	10^{-6}	1 (10^0)	100 (10^2)	10.000 (10^4)	1.000.000 (10^6)	10^{12}	10^{18}
1 dm^2	10^{-8}	0,01 (10^{-2})	1 (10^0)	100 (10^2)	10.000 (10^4)	10^{10}	10^{16}
1 cm^2	10^{-10}	0,0001 (10^{-4})	0,01 (10^{-2})	1 (10^0)	100 (10^2)	10^8	10^{14}
1 mm^2	10^{-12}	10^{-6}	0,0001 (10^{-4})	0,01 (10^{-2})	1 (10^0)	1.000.000 (10^6)	10^{12}
1 μm^2	10^{-18}	10^{-12}	10^{-10}	10^{-8}	10^{-6}	1 (10^0)	1.000.000 (10^6)
1 nm^2	10^{-24}	10^{-18}	10^{-16}	10^{-14}	10^{-12}	10^{-6}	1 (10^0)

Volumen	in km^3	in m^3	in dm^3	in cm^3	in mm^3	in μm^3	in nm^3
1 km^3	1 (10^0)	10^9	10^{12}	10^{15}	10^{18}	10^{27}	10^{36}
1 m^3	10^{-9}	1 (10^0)	1000 (10^3)	1.000.000 (10^6)	10^9	10^{18}	10^{27}
1 dm^3 = 1L	10^{-12}	0,001 (10^{-3})	1 (10^0)	1000 (10^3)	1.000.000 (10^6)	10^{15}	10^{24}
1 cm^3 = 1 mL	10^{-15}	10^{-6}	0,001 (10^{-3})	1 (10^0)	1000 (10^3)	10^{12}	10^{21}
1 mm^3 = 1 μL	10^{-18}	10^{-9}	10^{-6}	0,001 (10^{-3})	1 (10^0)	10^9	10^{18}
1 μm^3 = 1 fL	10^{-27}	10^{-18}	10^{-15}	10^{-12}	10^{-9}	1 (10^0)	10^9
1 nm^3	10^{-36}	10^{-27}	10^{-24}	10^{-21}	10^{-18}	10^{-9}	1 (10^0)

Einige gebräuchliche Pufferlösungen

Allgemeine Hinweise:

Für die meisten gebräuchlichen Pufferlösungen existieren in verschiedenen Arbeitsgruppen zahlreiche mehr oder weniger stark abgewandelte Rezepte – daher besteht auch oft keine Einigkeit darüber, ob für Waschschritt X jetzt z.B. TBS oder TBST besser geeignet ist. Besonders Detergenzien (SDS, Tween) und divalente Kationen (Ca^{2+} , Mg^{2+}) aber auch Indikatoren können manchmal notwendig und manchmal inhibierend für ein Experiment sein – im Zweifelsfall hält man sich am besten erstmal an das Rezept, das im eigenen Labor bei den Kollegen funktioniert.

Die meisten Puffer lassen sich gut als 10x Stocks vorbereiten und dann verdünnen, danach sollte aber der pH-Wert überprüft werden. **Achtung:** 10x-Puffer sind sehr stark, beim Ansetzen also etwa 20 % des Endvolumens zum pH-Wert einstellen freilassen!

PBS (Phosphate buffered saline)

1xPBS:

	Dulbecco	Mol. Cloning	Nur Kalium	Nur Natrium
NaCl	137 mM (8 g/L)	137 mM (8 g/L)	133 mM (7,8g/L)	150 mM (8,7 g/L)
KCl	2,7 mM (0,2 g/L)	2,7 mM (0,2 g/L)	-	-
$\text{Na}_2\text{HPO}_4^a$	8,1 mM (1,15 g/L)	10 mM (1,42 g/L)	-	10 mM ^c
K_2HPO_4	-	-	86 mM (15,0 g/L)	-
KH_2PO_4	1,47 mM (0,2 g/L)	2 mM (0,27 g/L)	15 mM (2,04 g/L)	-
CaCl_2	0,9 mM (0,1 g/L)	1 mM ^b	-	-
$\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	1 mM (0,1 g/L)	1 mM ^b	-	-
Tween-20	-	-	0,05 % ^b	-
pH	Ergibt sich	7,4	7,6	7,2

Nach 1) Dulbecco & Vogt (1954): "Plaque formation and isolation of pure lines with poliomyelitis viruses", Journal of Experimental medicine, 99 (2), S. 167-182; 2) Sambrook & Russel (2001) "Molecular Cloning – A Laboratory Manual", Cold Spring Harbor Laboratory Press; 3) <http://www.abcam.com/20x-PBS-Buffer-with-Tween-20-ab64028.html> und 4) <https://www.beckmancoulter.com/eCatalog/CatalogItemDetails.do?productId=16310>

^a Achtung: Mengenangaben in g/L für wasserfreies Na_2HPO_4 ! ^b Optionale Zutaten, am besten nach dem Autoklavieren aus Stocklösung hinzugebn, fallen sonst evt. aus; ^c Gesamt- $\text{Na}_x\text{H}_x\text{PO}_4$ -Konzentration

Phosphatpuffer

Phosphatpuffer wird durch das Mischen von Stocklösungen (NaH_2PO_4 und Na_2HPO_4 bzw. KH_2PO_4 und K_2HPO_4) hergestellt. Hochkonzentrierte Stocklösungen (ab $\sim 0,5$ M) fallen bei längerer Lagerung leicht aus, können aber durch Erhitzen rückgelöst werden. **Achtung:** Phosphatpuffer sind billig, einfach herzustellen und relativ temperaturunabhängig, kann aber manche Ionen ausfällen (v.a. Ca^{2+} , Mg^{2+}) und Enzyme inhibieren. **Hinweis:** Die Tabellen basieren auf Ausgetesteten Mischungen und ergeben sich daher nicht exakt aus der Henderson-Hasselbalch-Gleichung

pH	NaH_2PO_4	Na_2HPO_4	pH	NaH_2PO_4	Na_2HPO_4	pH	KH_2PO_4	K_2HPO_4
5,7	93,5	5,7	6,9	45,0	55,0	5,8	91,5	8,5
5,8	92,0	5,8	7,0	39,0	61,0	6,0	86,8	13,2
5,9	90,0	10,0	7,1	33,0	67,0	6,2	80,8	19,2
6,0	87,7	12,3	7,2	28,0	72,0	6,4	72,2	27,8
6,1	85,0	15,0	7,3	23,0	77,0	6,6	61,9	38,1
6,2	81,5	18,5	7,4	19,0	81,0	6,8	50,3	49,7
6,3	77,5	22,5	7,5	16,0	84,0	7,0	38,5	61,5
6,4	73,5	26,5	7,6	13,0	87,0	7,2	28,3	71,7
6,5	68,5	31,5	7,7	10,5	89,5	7,4	19,8	80,2
6,6	62,5	37,5	7,8	8,5	91,5	7,6	13,4	86,6
6,7	56,5	43,5	7,9	7,0	93,0	7,8	9,2	90,8
6,8	51,0	49,0	8,0	5,3	94,7	8,0	6,0	94,0

Nach Stoll & Blanchard (1990): „Buffers: Principle and Practice“ in Methods in Enzymology, Vol. 182, S. 24-38 und Sambrook & Russel (2001) “Molecular Cloning – A Laboratory Manual”, Cold Spring Harbor Laboratory Press

TBS (Tris-buffered saline) und TBST bzw. TBS-T (Tris buffered saline + Tween)-Puffer

Komponente	Grundrezept ¹	Vereinfacht	Variationen ²
Tris	24,7 mM (3 g/L)	20 mM (2,4 g/L)	20-50 mM
NaCl	137 mM (8 g/L)	150 mM (8,8 g/L)	100-150 mM
KCl	27 mM (0,2 g/L)	-	0-27 mM
pH	7,4 (HCl)	7,4	7,4-7,6

¹ nach Sambrook & Russel (2001) “Molecular Cloning – A Laboratory Manual”, Cold Spring Harbor Laboratory Press – das Originalrezept enthält außerdem 0,015 g/l Phenolrot als Indikator ²nach Durchsicht verschiedener Quellen

TBST wird aus TBS durch Zugabe von 0,5-1 mL/L (0,05%-0,1%) Tween-20. Es bietet sich an, das aus dem 10xTBS-Stock jeweils frisch anzusetzen, da die hohe Tween-Konzentration in 10xTBST stark schäumt und die Handhabung und das Verdünnen sehr schwer macht.

TE-Puffer

Zum Lösen von Nukleinsäuren, EDTA soll dabei die von manchen Nukleasen benötigten Kationen wegfangen. Üblich ist pH 8,0 für DNA und pH 7,4-7,6 oder 7,0 für RNA, die im weniger basischen Bereich stabiler ist. **Achtung:** Sowohl Tris als auch EDTA können manche empfindlichen Reaktionen inhibieren.

10 mM Tris
1 mM EDTA

Register

A		
Autoklavieren	16	
C		
Chelatoren	12	
D		
Detergenzien	12, 14	
Dichte Konzentrationen aus der Dichte berechnen	5	
H		
Henderson-Hasselbalch-Gleichung	21	
I		
Internationales Einheitensystem	25	
Ionenstärke	11	
K		
Konzentration Äquivalentkonzentration	4	
Ersetzen von Substanzen	6	
Massenkonzentration	4	
Massenprozent	4	
Nukleinsäuren und Proteine	8	
Prozentigkeit	4	
Sättigung	4	
Stoffmengenbezogene Konzentration	3	
Verhältnis von Konzentrationen	9	
Volumenkonzentration	4	
L		
Löslichkeitsprodukt	14	
Lösungen Ansetzen	13	
Aufbewahrung	15	
Erhitzen	13	
Funktion von Komponenten	10	
Komponenten Lösen	13	
Kühlen	17	
Vergiften	16	
Lösungsmittel		11
M		
Mischen	7	
Mischungsverhältnis	7	
Mol	3	
Molalität	4	
Molare Masse	3	
Molarität	3	
N		
Normalität	4	
O		
osmotischer Wert	11	
P		
pH-Wert Einstellen	15	
Puffer Pufferbereich	18	
Pufferstärke	18	
Puffersubstanzen	11, 18	
Puffersubstanzen (Tabelle)	20	
Rezepte	28	
R		
Reduktionsmittel	12	
RGT-Regel	17	
S		
Salze schwer lösliche	14	
Siedeverzug	13	
SI-Einheiten	24, 25	
Sterilfiltrieren	16	
Stocklösung	7	
Stoffmenge	3	
V		
Verdünnen	7	
Vorsätze für Maßeinheiten	24, 26	