Bäckerhefe, getrocknet

In Puffer — Inkubation („Bäckerhefe soll ich wohlfühlen"; Wasseraufnahme und arbeitet wieder, „lebt")

↓

Lebende Bäckerhefe

Autolyse (selbstständig auflösen)

↓

Selbstmordhefe

20min Zentrifugation

↓

Keine groben Zelltrümmer mehr vorhanden

Eis/Wasserbad

↓

Niederschlag (dieser wird verworfen)

Hitzeschritt / Aktivitätstest

↓

Mazerationssaft

55°C, 15min inkubiert

↓

Trübung, Ausfällung von anderen Proteinen
ADH bleibt in Lösung

Abkühlen, zentrifugieren, Niederschlag verwerfen

↓

Überstand des Hitzeschritts

Abkühlung im Eis/Kochsalz-Gemisch auf 0 bis –2°C,
Zugabe von -15°C Aceton,
Zentrifugation,
weitere Acetonzugabe

↓

Niederschlag von ADH

Zentrifugation,
Abgießen des Überstandes,
Ablaufen des Acetons auf Saugpapier,
Aufbewahrung über Nacht bei 0 bis 4°C

↓

2. Acetonfällung

Lösen mit 0,01% EDTA (kalt mit Cystein-HCl und KOH),
Dialyse mit Na-Phosphatpuffer,
Zentrifugation

↓

↓ Rühren und Eiskühlung und dabei Zugabe von festem Ammonsulfat,
Zentrifugation,
Abgießen des Überstandes,
Lösen mit 7ml kaltem entionisiertem Wasser,
Verdünnung auf 1:50,
Leitfähigkeitsmessung,
Zugabe von kristallinem Ammonsulfat bis 30% Endkonzentration,
Rühren (10min) bei 0-4°C,
Zentrifugation

Klare Überstand

↓ Zugabe von kristallinem Ammonsulfat bis Trübung

Amorphes Fremdprotein / auskristallierende ADH

↓ Zentrifugation

Kristallines ADH

↓ Zugabe von Ammonsulfat

Kristallisation im Überstand

↓ Stehen lassen über Nacht bei 4°C

Shampoo-artigen „Seidenglanz“-Effekt