

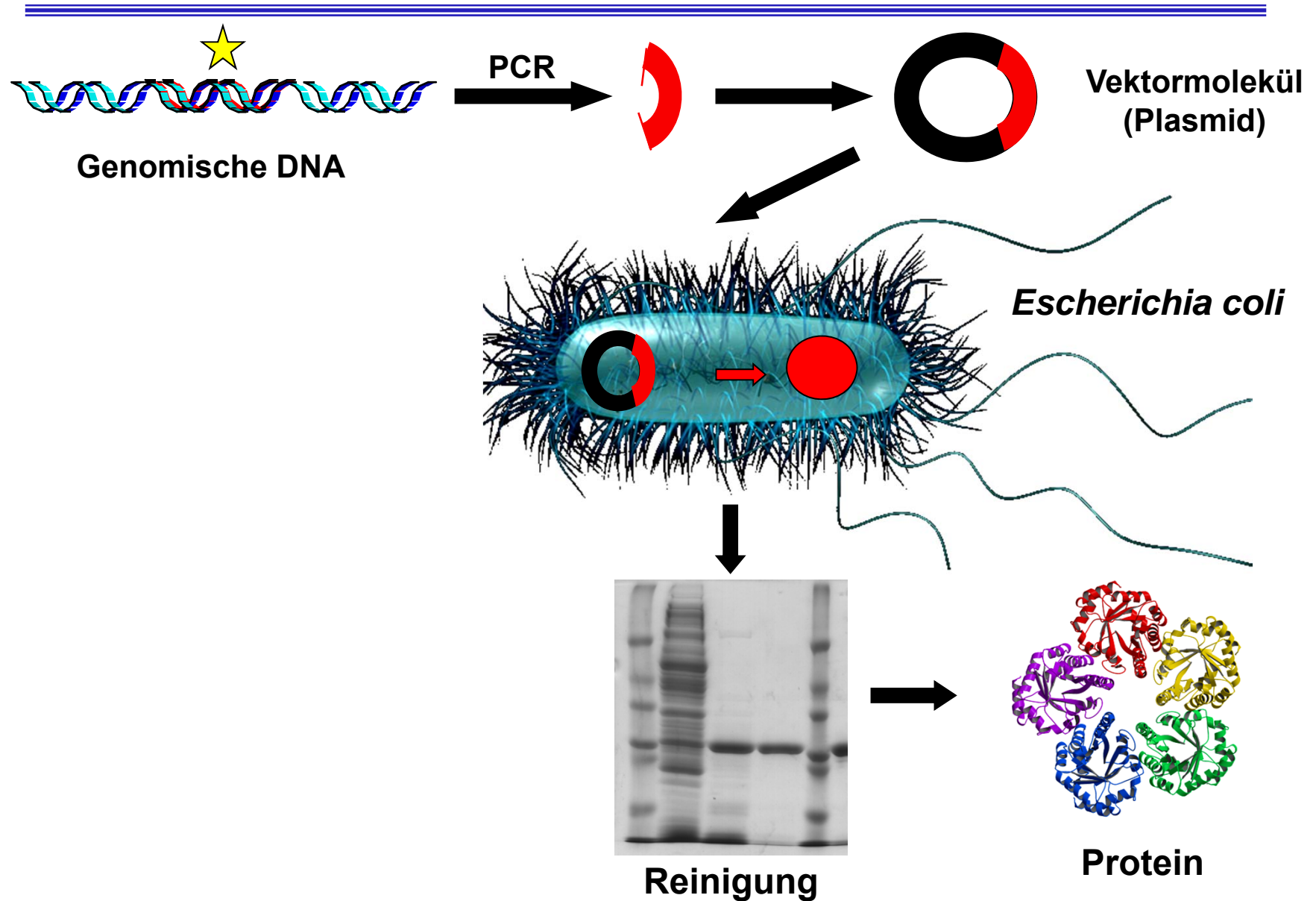
Praktikum Biochemie

„Biotechnologie“

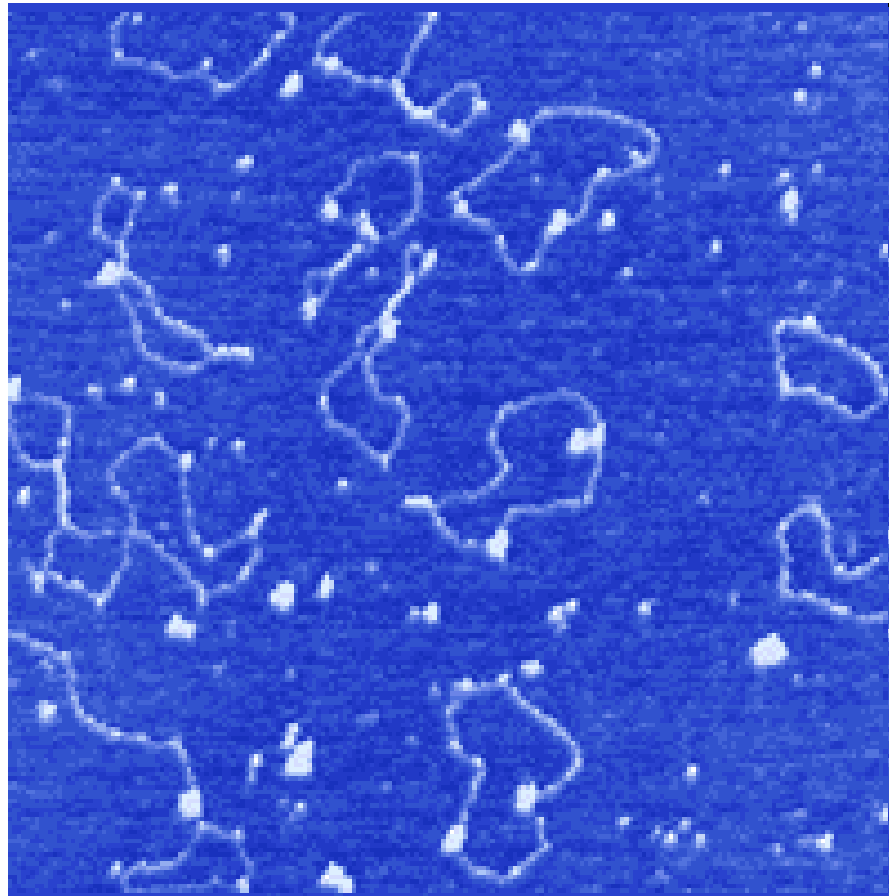
(Molekularbiologie & Biochemie)

Bettina Siebers

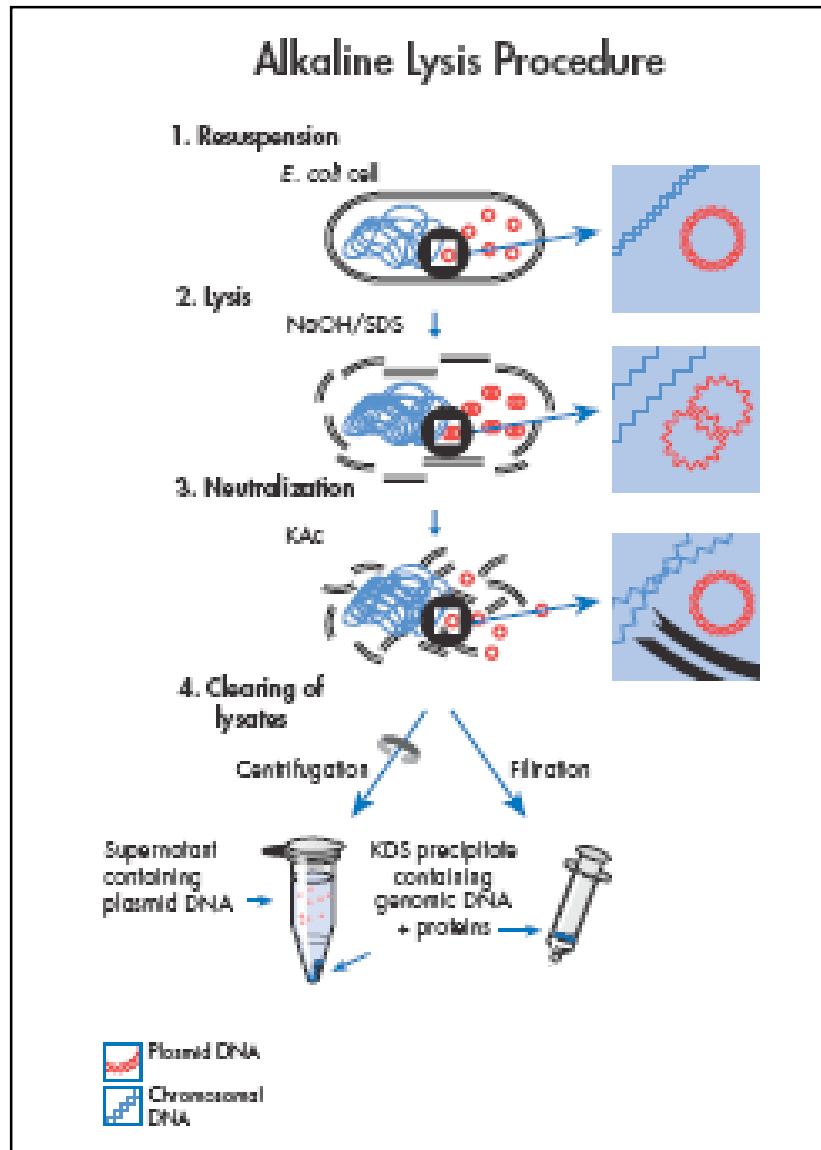
Protein Expression



Plasmidpräparation & Restriktion



Principle of alkaline lysis



P1 Resuspension

10 mM Tris-HCl

1 mM EDTA (Inhibition of nucleases, destabilization of outer membrane)

20 µg/ml RNase (digestion of RNA)

P2 Lysis

0.2 M NaOH (denaturation of DNA, hydrolysis of cell wall)

1% SDS (w/v) (protein denaturation, membrane solubilization)

P3 Neutralization

(2.55 M KAc⁻)

29.5 ml acetic acid

Make up to approx. 80 ml with H₂O

Alter to pH 4.8 by adding KOH pellets and mixing

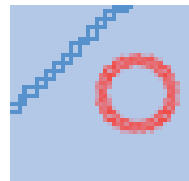
Make up to final volume 100 ml
(neutralization, KDS precipitates)

Plasmidpräparation

Alkaline Lysis Procedure

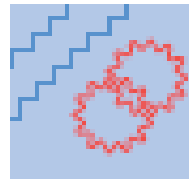
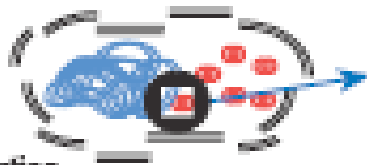
1. Resuspension

E. coli cell



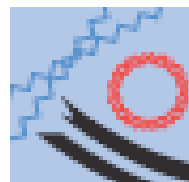
2. Lysis

NaOH/SDS

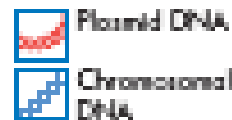


3. Neutralization

KAc

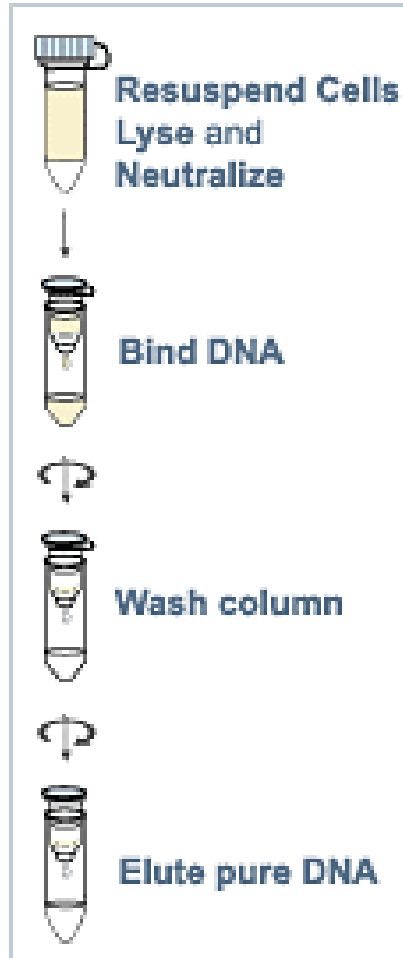


4. Clearing of lysates



- 2 ml der Übernachtskultur in 2 ml Eppendorf Cup
- 2 min zentrifugieren (13.000 rpm, RT), Überstand verwerfen (wdh.)
- Resuspendieren des Zellpellets in 250 µl Resuspensions-Puffer (TE Puffer + RNase A)
- Zugabe von 250 µl Lysis-Puffer (NaOH, SDS) mischen; **Zell-Lyse**
- Zugabe von 350 µl Neutralisationspuffer (KAc-) mischen (nicht vortexen!); **Neutralisation**
- 5 min bei 13000 rpm zentrifugieren
- Überführung des Überstandes in ein neues 1.5 ml Eppendorf Cup

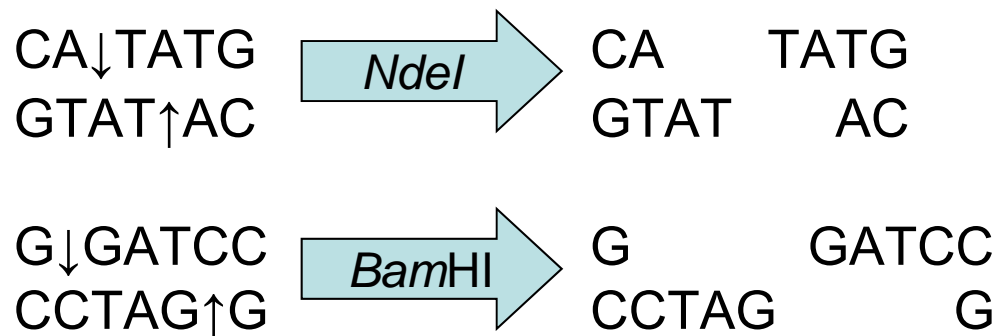
Reinigung der Plasmid DNA



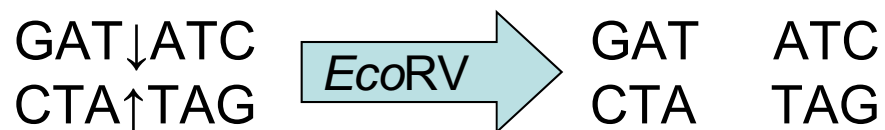
- **Binden der DNA** an die Silikamatrix der Säule: Überführen des Überstandes auf die Säule; 1 min zentrifugieren, 13.000 rpm, RT (Durchlauf verwerfen)
- **Waschen:** 500 µl Waschpuffer auf die Säule geben; 1 min zentrifugieren, 13.000 rpm, RT (Durchlauf verwerfen); Waschschrift wiederholen
- 2 min „trocken“ zentrifugieren, 13.000 rpm, RT
- **Elution:** Säule in neues Cap überführen, 30 µl H₂O zur Elution auf die Säule geben, 1 min inkubieren, RT; 1 min zentrifugieren, 13.000 rpm, RT; Säule verwerfen

Plasmid Restriktion

- **Restriktionsenzyme** erkennen und schneiden DNA spezifisch an kurzen Erkennungssequenzen
- ***NdeI*** und ***BamHI*** sind „sticky end cutter“, bilden Einzelstrangüberhänge



- ***EcoRV*** ist ein „blunt end cutter“ bildet glatte Enden ohne Einzelstrangüberhänge.



Restriktionsenzyme

- Restriktionsendonukleasen
- In Prokaryonten weit verbreitet
- Wichtige Werkzeuge der Molekularbiologie
- Type II Enzyme erkennen Sequenzen mit doppelter Symmetrie „**Palindrome**“ (beide DNA Stränge haben die gleiche Sequenz von links bzw. von rechts gelesen)

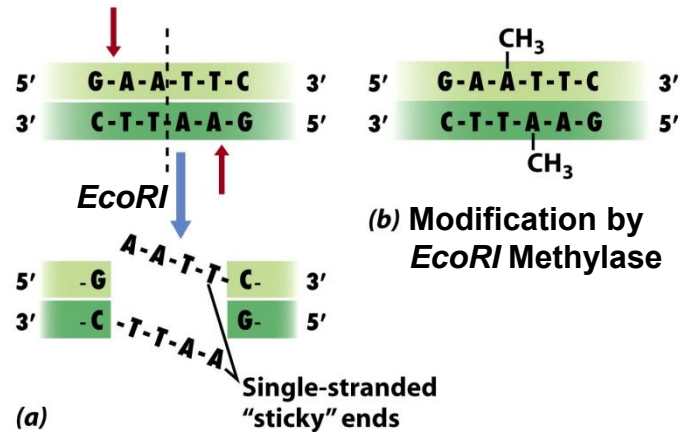


Figure 7-21 Brock Biology of Microorganisms 11/e
© 2006 Pearson Prentice Hall, Inc.

- Funktion:
 - Schutz vor Aufnahme von Fremd-DNA
 - die Zelle schützt ihre eigene DNA vor Abbau durch Modifikations-Systeme (typischer Weise durch Methylierung, z.B. *EcoRI* Methylase)

Table 7.4 Recognition sequences of a few restriction endonucleases

Organism	Enzyme designation ^a	Recognition sequence ^b
<i>Bacillus globigii</i>	<i>Bgl</i> III	A↓GATCT
<i>Bacillus subtilis</i>	<i>Bsu</i> RI	GG↓CC
<i>Brevibacterium albidum</i>	<i>Bal</i> I	TGG↓CCA
<i>Escherichia coli</i>	<i>Eco</i> RI	G↓AATTC ^c
<i>Haemophilus haemolyticus</i>	<i>Hha</i> I	GCG↓C
<i>Haemophilus influenzae</i>	<i>Hind</i> II	GTPy↓PuAC
<i>Haemophilus influenzae</i>	<i>Hind</i> III	A↓AGCTT
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	<i>Kpn</i> I	GGTAC↓C
<i>Nocardia otitidiscaviarum</i>	<i>Not</i> I	GC↓GGCCGC
<i>Proteus vulgaris</i>	<i>Pvu</i> I	CGAT↓CG
<i>Serratia marcescens</i>	<i>Sma</i> I	CCC↓GGG
<i>Thermus aquaticus</i>	<i>Taq</i> I	T↓CGA

^a Nomenclature: The first letter of the three letter abbreviation of a restriction endonuclease designates the genus from which the enzyme originates, the second two letters, the species. The roman numeral designates the order of discovery of enzymes in that particular organism, and any additional letters are strain designations.

^b Arrows indicate the sites of enzymatic attack. Asterisks indicate the site of methylation (modification). G, guanine; C, cytosine; A, adenine; T, thymine; Pu, any purine; Py, any pyrimidine. Only the 5' → 3' sequence is shown.

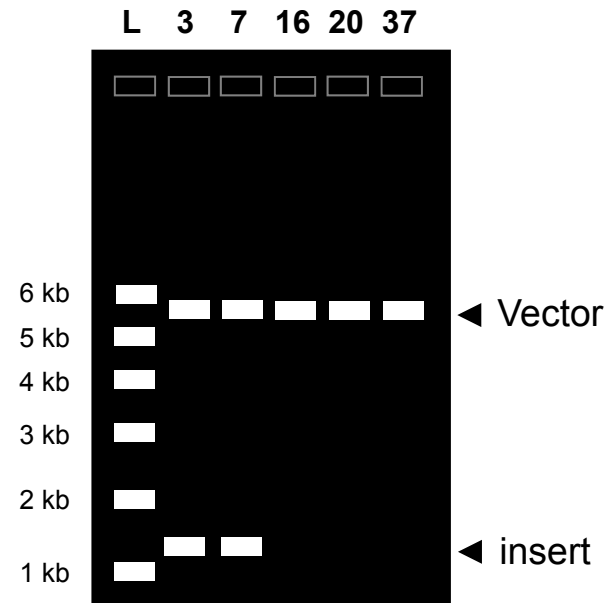
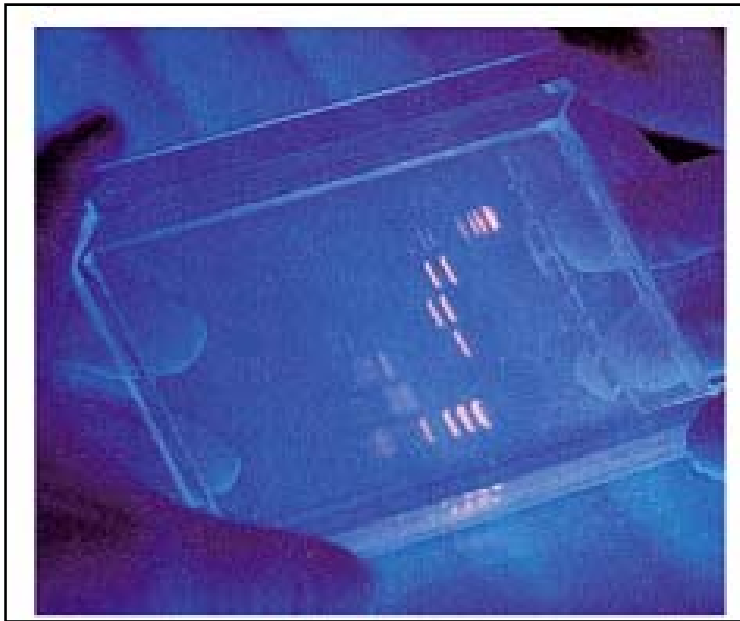
^c See Figure 7.21a

Table 7-4 Brock Biology of Microorganisms 11/e
© 2006 Pearson Prentice Hall, Inc.

Restriktionsanalyse

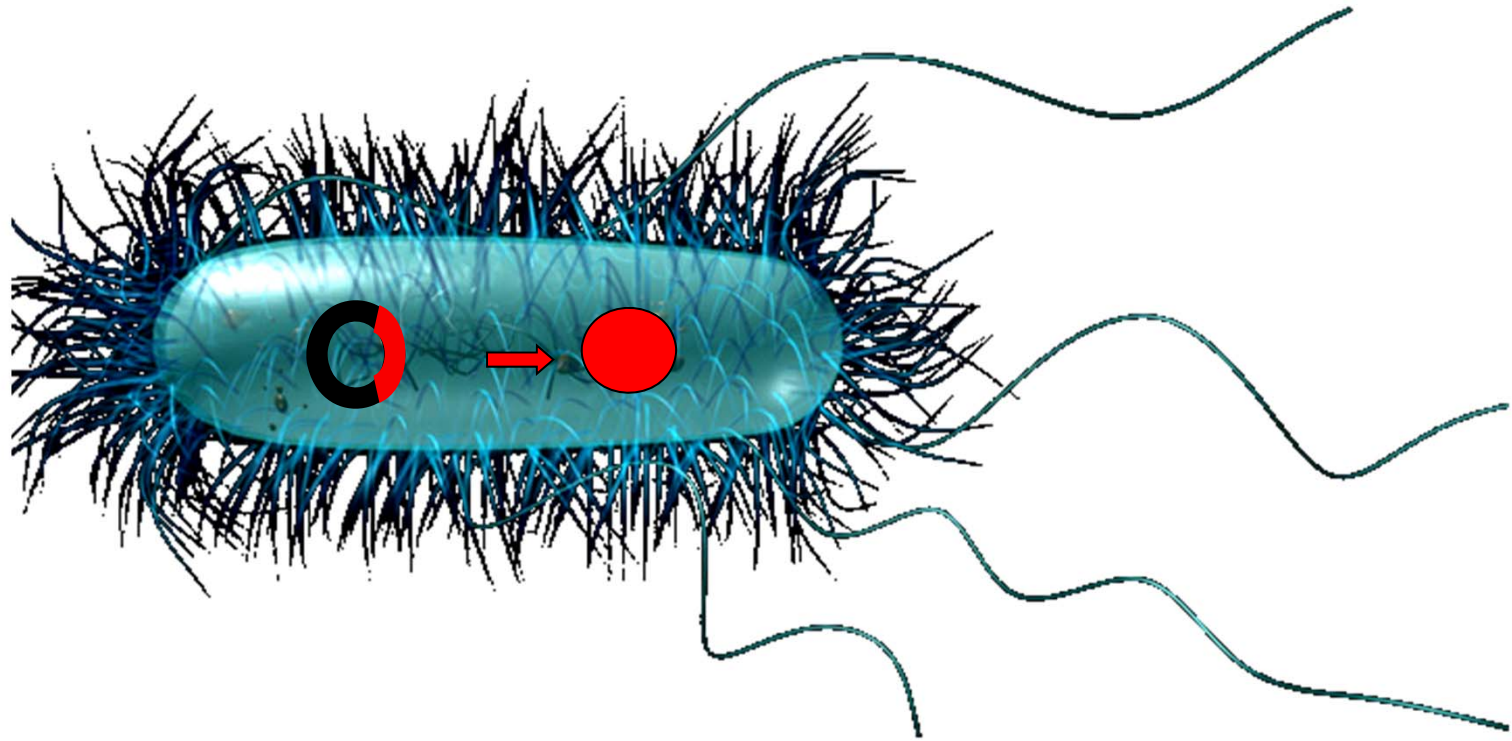
- 4.0 μ l Plasmid-DNA
 - 2.0 μ l 10xRestriktions Puffer (FastDigest)
 - 0.5 μ l BamHI Restriktions-Enzym (FastDigest)
 - 0.5 μ l NdeI Restriktions-Enzym (FastDigest)
 - 13.0 μ l Aqua bidest
- Vorsichtig mischen und kurz an zentrifugieren
 - Inkubation für 10 Min bei 37°C
 - Abstoppen der Enzymreaktion durch 10-minütige Inkubation bei 80°C
 - Proben direkt mittels **Agarose-Gelelektrophorese** analysiert

*NdeI/Bam*HI Restriktionsanalyse



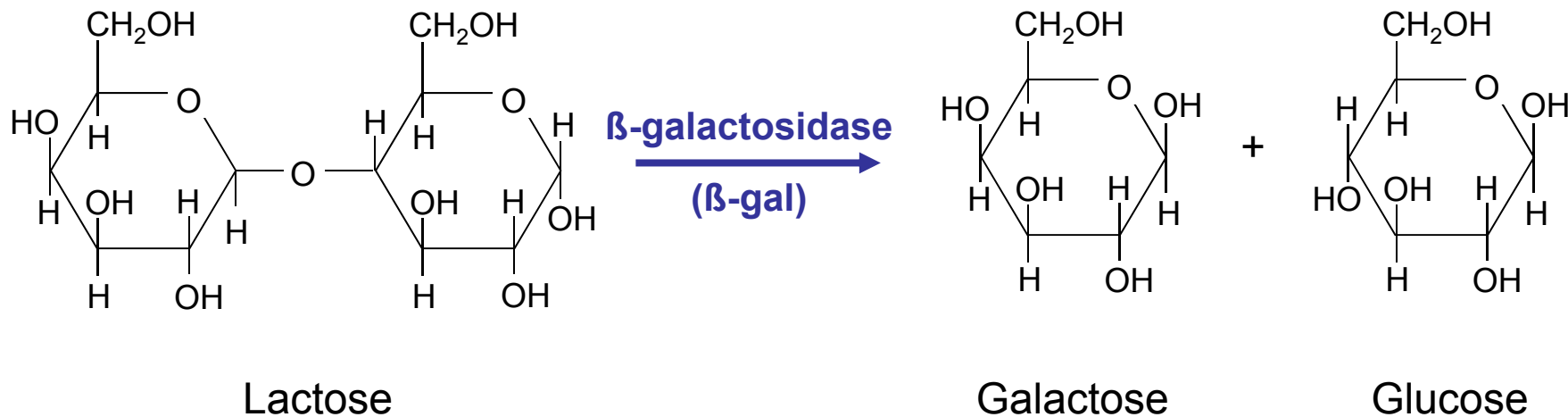
Rekombinante Expression

einer Esterase in *E. coli*



Jacob and Monod 1961

- Untersuchungen zum bakteriellen Wachstum auf verschiedenen C-Quellen



- Lactose schaltet das *lacZ* Gen an, das die β -Galactosidase kodiert
- Lactose ist der **INDUKTOR**.

Regulation des Lactose-Operons

„Negative Kontrolle: Induktion“

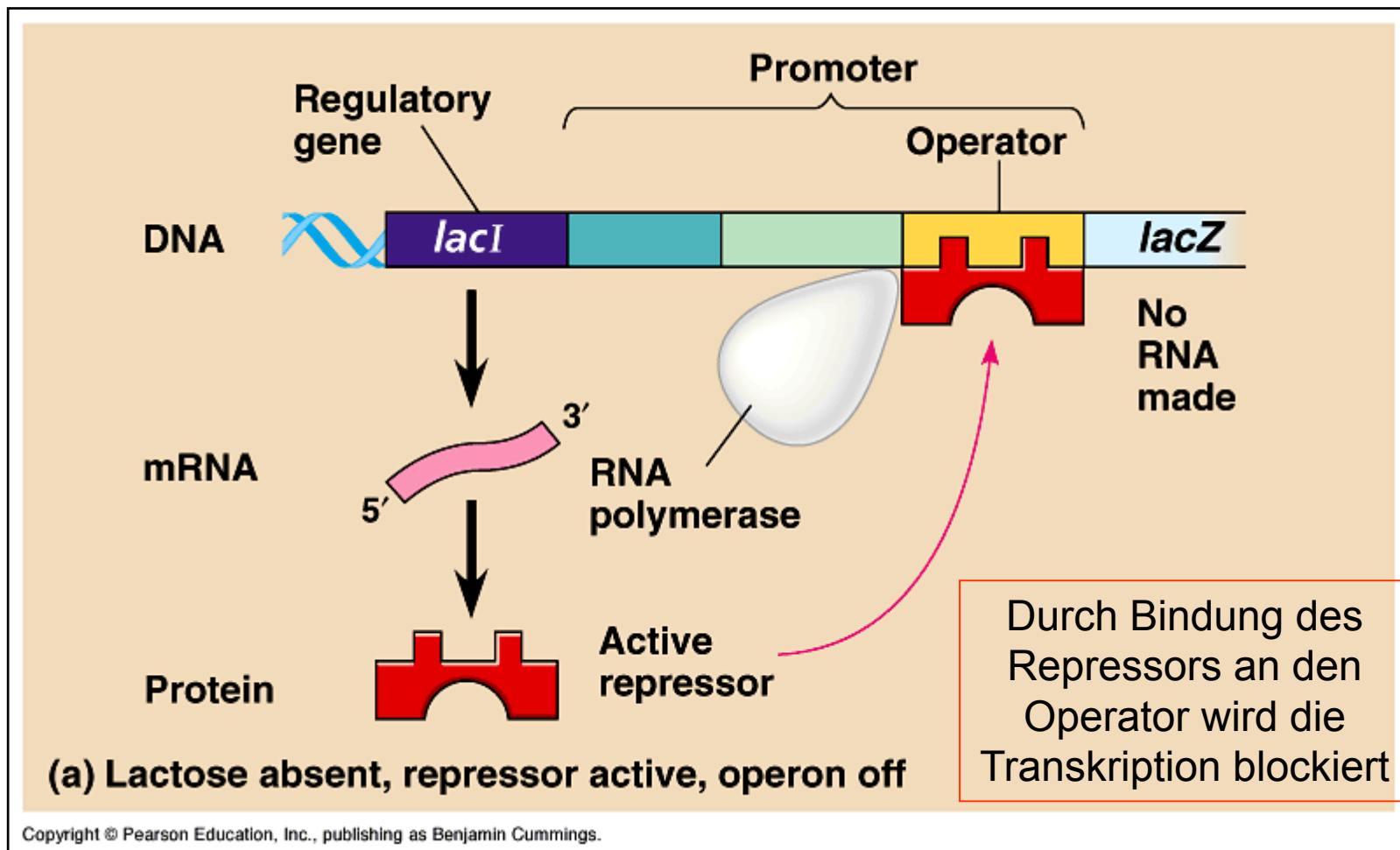


FIGURE 18.21 Biology 6/e

Regulation des Lactose-Operons

„Negative Kontrolle: Induktion“

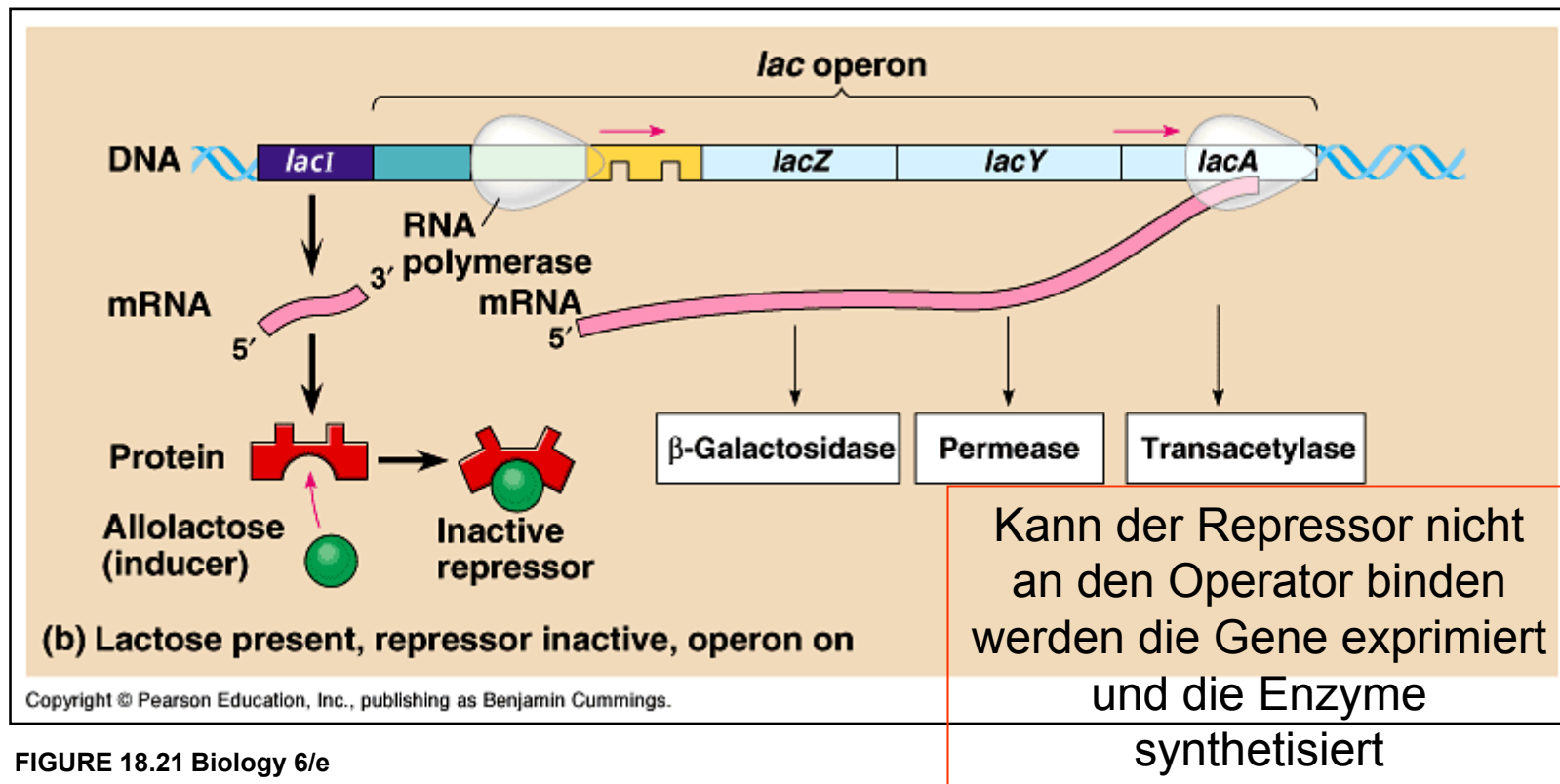
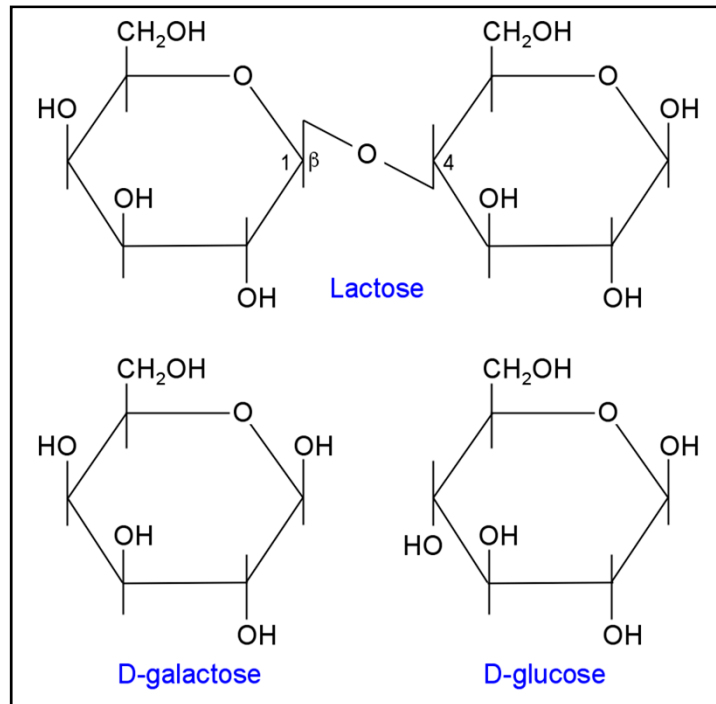


FIGURE 18.21 Biology 6/e

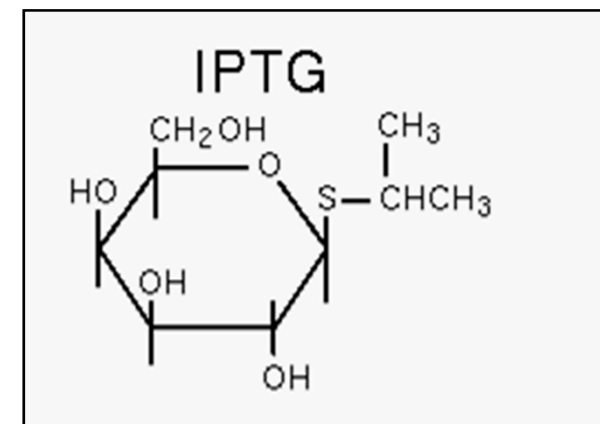
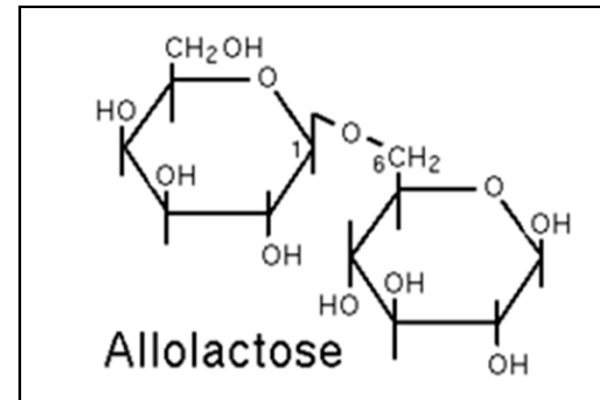
Induktor „Allolactose“



Lactose: β 1 \rightarrow 4

Allolactose: β 1 \rightarrow 6 (isomer of lactose)

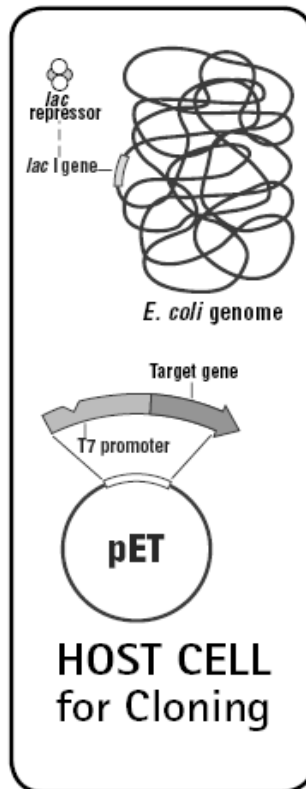
Isopropyl- β -D-thio-galactoside (IPTG):
artificial inducer of *lac* operon (not used
as substrate)



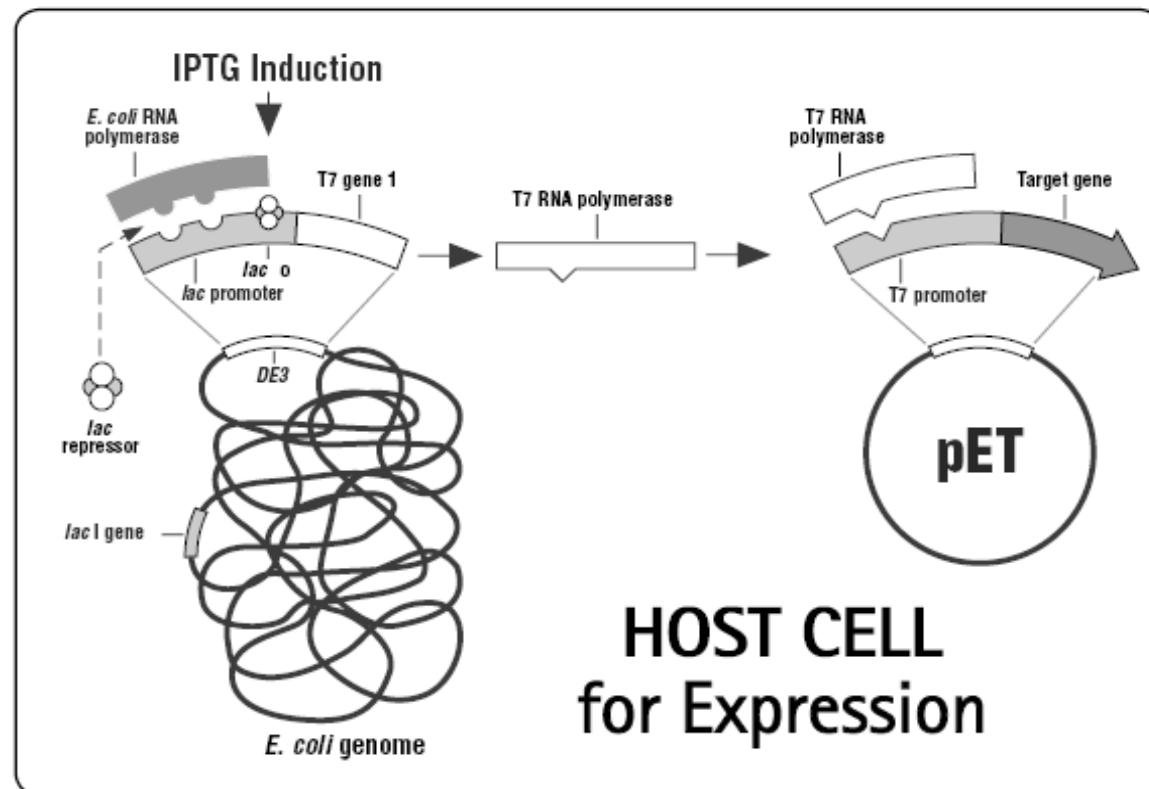
IPTG ist durch die β -Galactosidase nicht hydrolisierbar, ist aber genau wie Lactose in der Lage an den Repressor zu binden und ihn zu inaktivieren.

pET Expressions System

Hosts for cloning



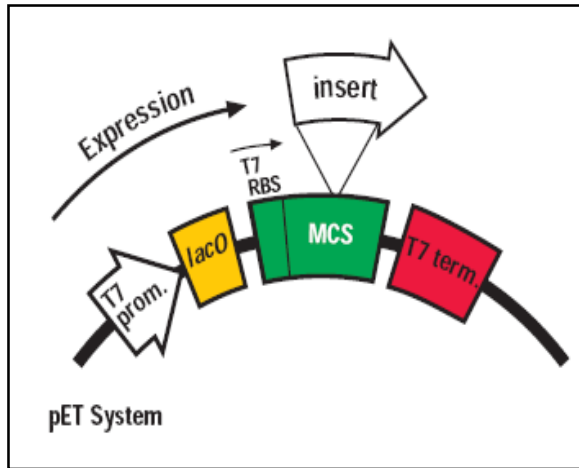
Hosts for expression



Novagen-pET System Manual-11th edition

“Spezielle Expressionsstämme mit chromosomaler **T7 RNA polymerase gene (λ DE3)** (BL21 DE3)”

pET-19b Klonierungs & Expressions Region



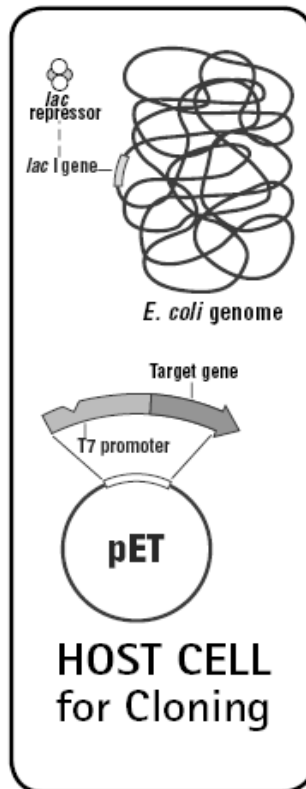
Bgl II T7 promoter lac operator Xba I rbs
 AGATCTCGATCCCGCGAAA TAATACGACTCACTATA GGGGAATTGTGAGCGGATAACAATTCCCCTCTAGAAATAATTTTGTTTAACTTTAAGAAGGAGA

Nco I His-Tag Nde I Xho I BamH I
 TATACCATGGGCCATCATCATCATCATCATCATCATCACAGCAGCGGCCATATCGACGACGACGACAAGCATATGCTCGAGGATCCGGCTGCTAACAAA
 MetGlyHisHisHisHisHisHisHisHisHisSerSerGlyHisIleAspAspAspAspLysHisMetLeuGluAspProAlaAlaAsnLys

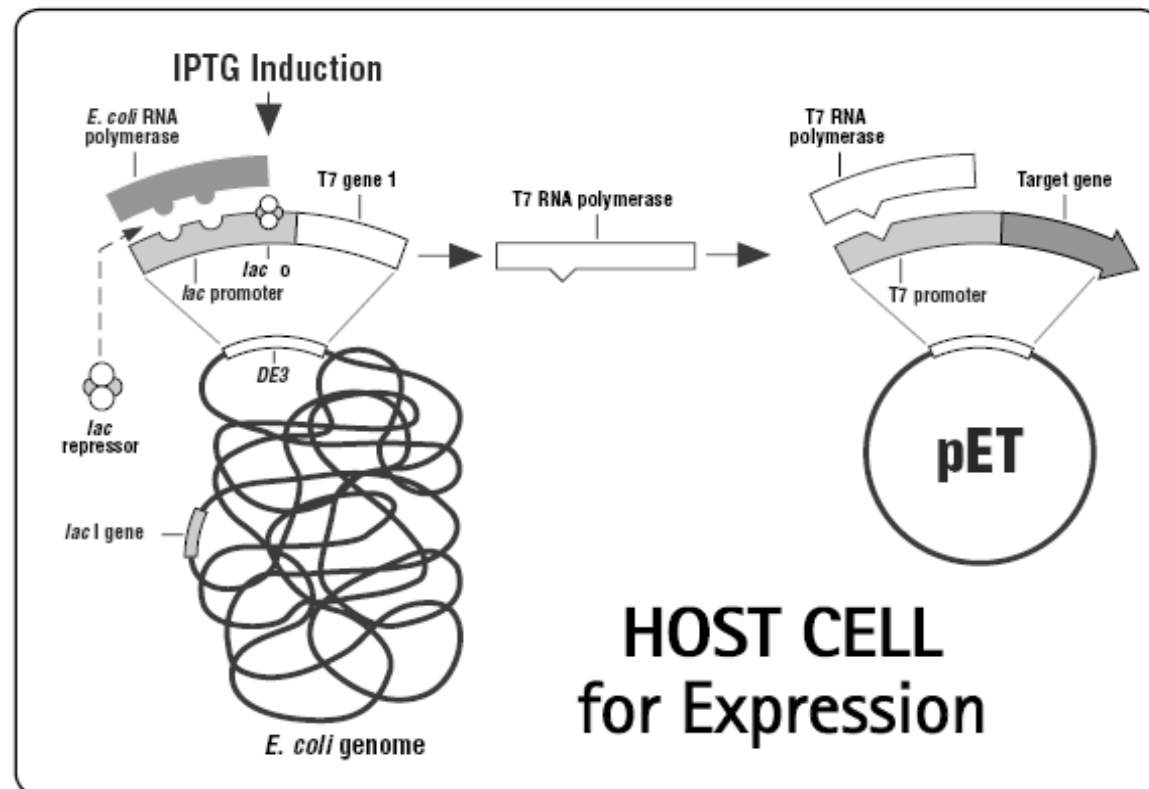
Bpu1102 I T7 terminator
 GCCCGAAAGGAAGCTGAGTTGGCTGCTGCCACCGCTGAGCAATAACTAGCATAACCCCTGGGGCCTCTAAACGGGTCTTGAGGGGTTTTTTG
 AlaArgLysGluAlaGluLeuAlaAlaAlaThrAlaGluGlnEnd

pET Expressions System

Hosts for cloning



Hosts for expression

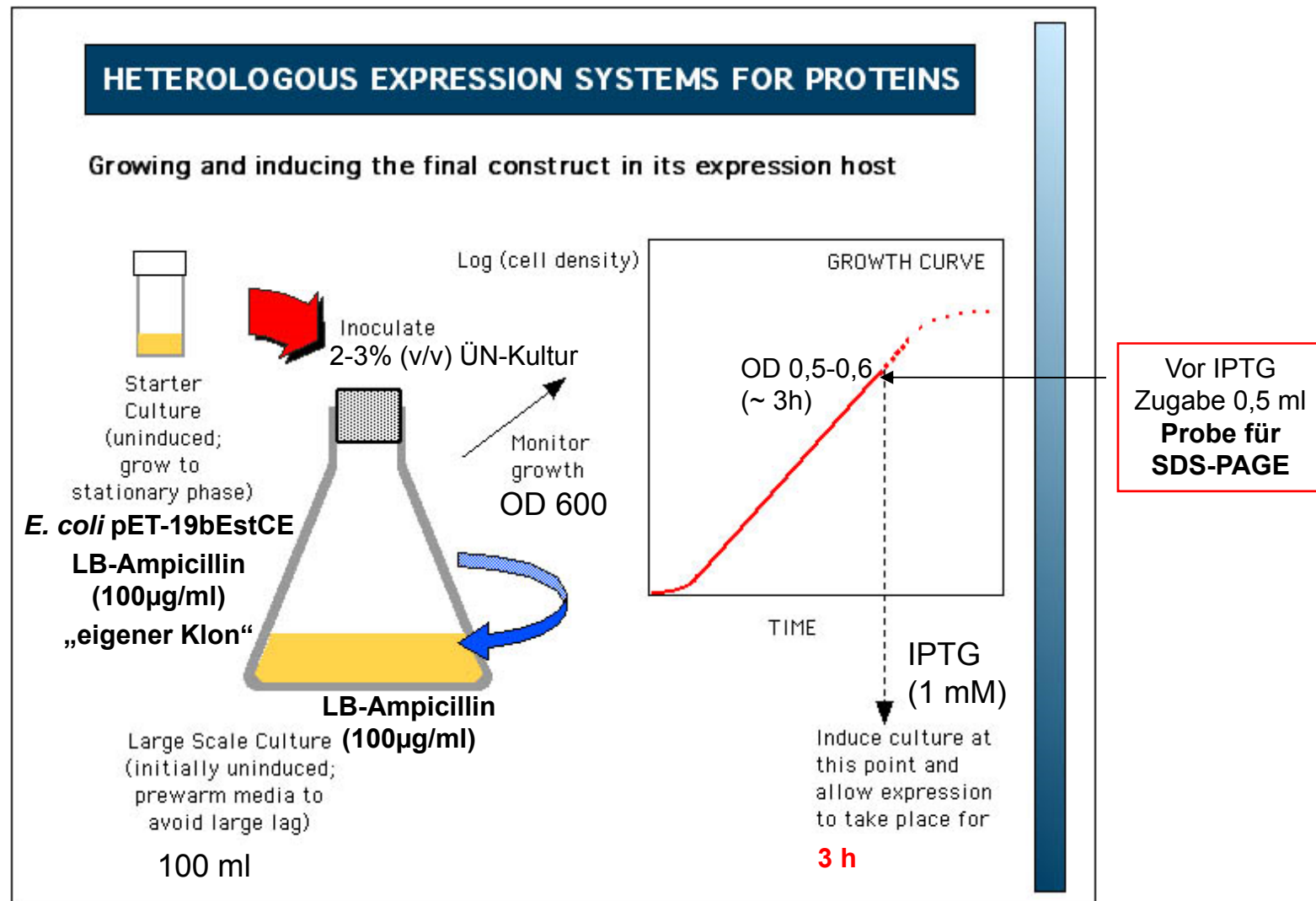


Novagen-pET System Manual-11th edition

“Spezielle Expressionsstämme mit chromosomaler
T7 RNA polymerase gene (λ DE3) (BL21 DE3)”

Heterologe Expression in *E. coli*

Esterase Gen kloniert in den Expressionsvektor pET-19b in einem *E. coli* Expressionsstamm



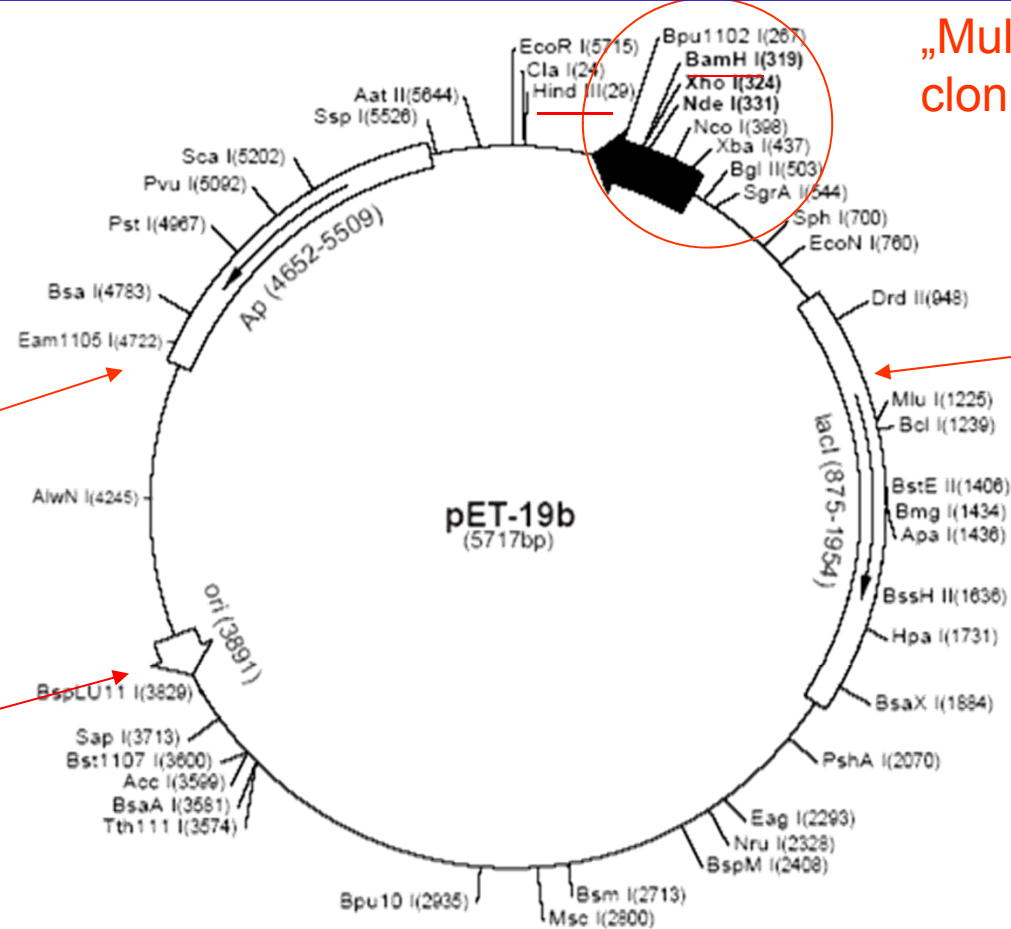
Expressionsvektor: pET-System

pET-19b sequence landmarks

T7 promoter	472-488
T7 transcription start	471
His•Tag coding sequence	366-395
Multiple cloning sites (<i>Nde</i> I - <i>Bam</i> H I)	319-335
T7 terminator	213-259
<i>lacI</i> coding sequence	875-1954
pBR322 origin	3891
<i>bla</i> coding sequence	4652-5509

Ampicillin Resistenz

Origin of replication

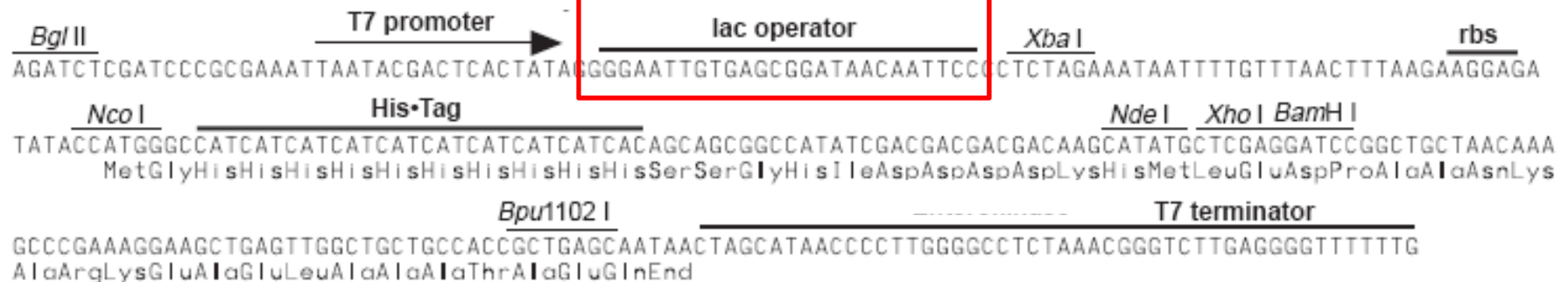
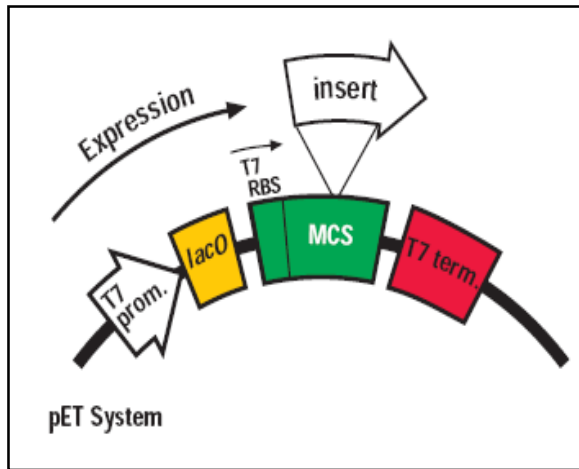


„Multiple cloning site“

lac inhibitor

- Expressionvektor für die Herstellung von Proteinen mit N-terminalem His-tag

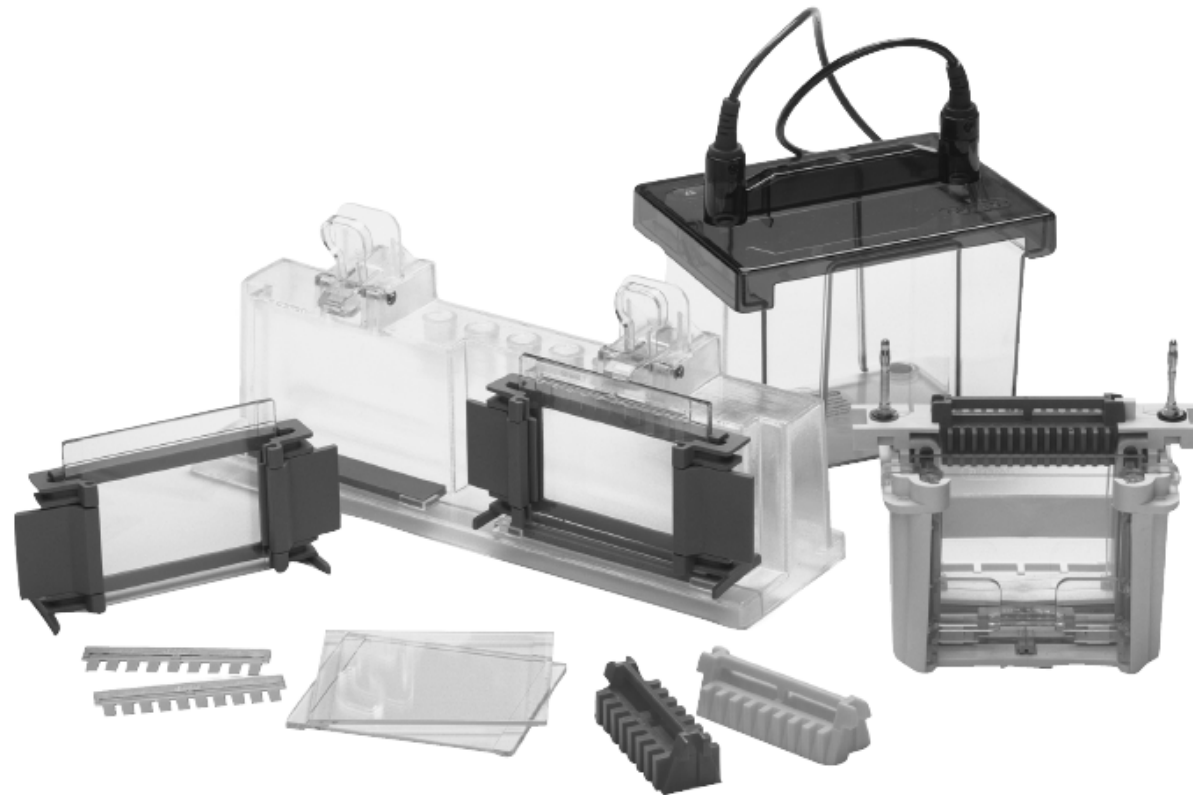
pET-19b Klonierungs & Expressions Region



- IPTG bindet an den Inhibitor und verhindert so die Bindung an den Operator = das Gen kann exprimiert werden

SDS-PAGE

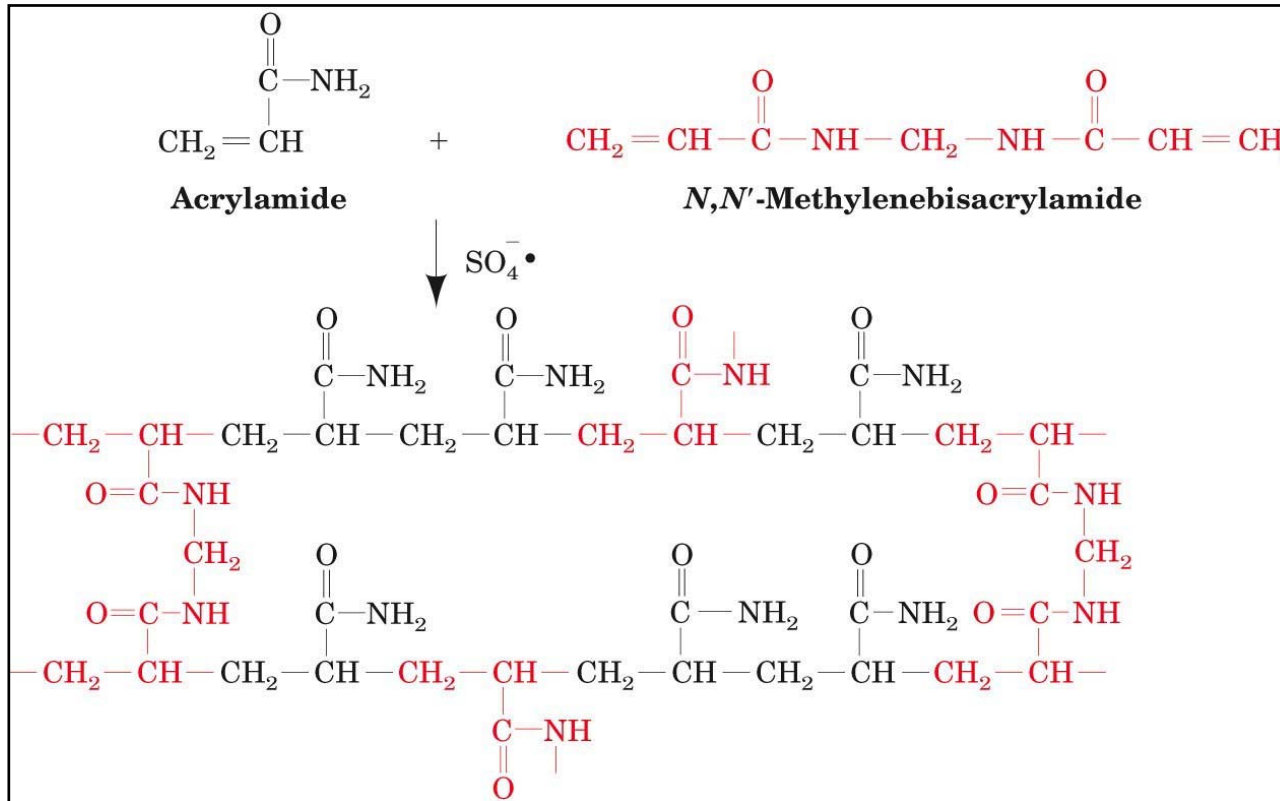
Sodiumdodecylsulphate Polyacrylamide Gelelektrophorese



SDS-PAGE

- SDS-PAGE = **S**odium**d**odecyl**s**ulfate-**P**oly**a**crylamide-**g**ele**e**lectrophoresis
- Analytisch: Reinheitskontrolle, Molekulargewichtsbestimmung unter denaturierenden Bedingungen
- Elektrophorese = Wanderung geladener Teilchen im elektrischen Feld
- Beweglichkeit unter nicht-denaturierenden Bedingungen ist abhängig von:
 - Nettoladung
 - Molekülgröße (kleine Moleküle sind schneller als große)
 - Molekülgestalt (kugelförmige sind schneller als stäbchenförmige)
 - Porengröße des Mediums
 - Temperatur
 - pH-Wert, Ionenstärke des Laufpuffers
 - Feldstärke

Polyacrylamid



T

Giftig

(Nervengift)

Sensibilisierend

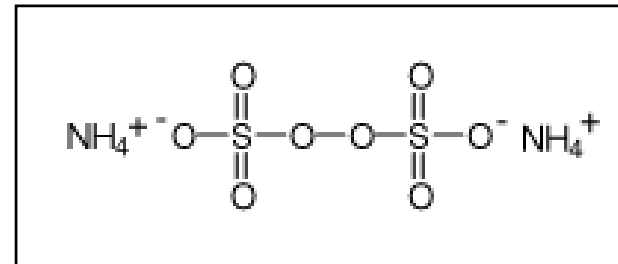
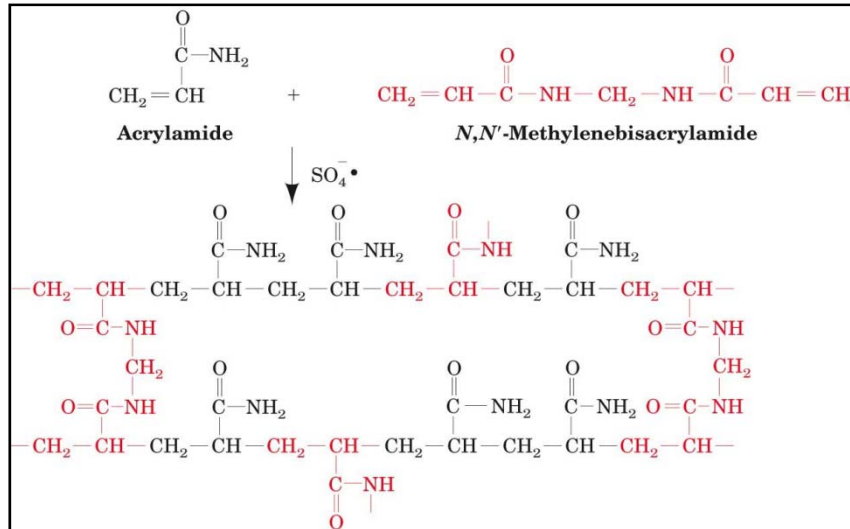
R45- Krebserzeugend

R46- Erbgutverändernd

R62- Fortpflanzungsgefährdend

- Polyacrylamid ist ein Polymerisations- und Vernetzungsprodukt aus Acrylamid mit *N,N'*-Methylenbisacrylsäureamid (**VORSICHT: GIFTIG!**)
- Dreidimensionales Netzwerk

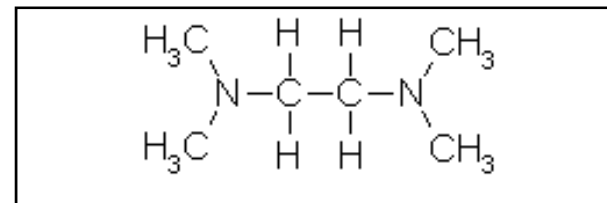
Polyacrylamid



- Ammoniumpersulfat (APS) = Radikalbildner, „Starter“ der Polymerisation

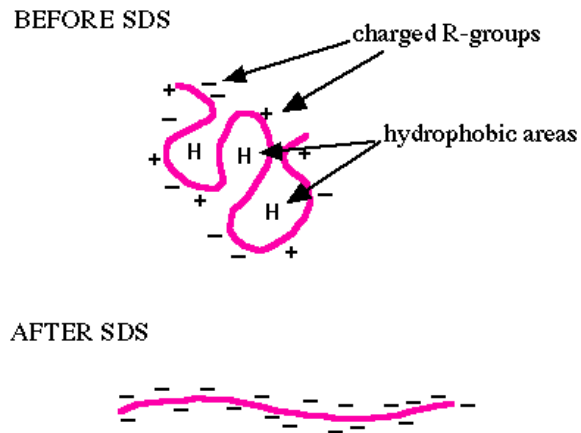
- Je mehr Acrylamid/Bisacrylamid desto engporiger die Gele

MW 10 – 60 kDa 15 % Trenngel
 MW 30 – 120 kDa 10 % Trenngel
 MW 50 – 200 kDa 8 % Trenngel



- N,N,N',N'-Tetramethylethylenediamine = Katalysator, -komplexiert Me^{2+} , verhindert Wegfangen der Radikale

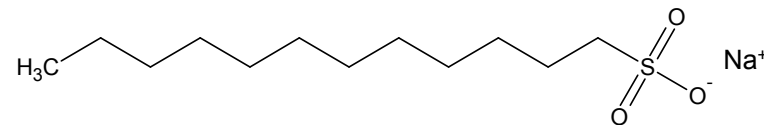
Denaturierende SDS-PAGE



- SDS = stark denaturierendes Detergenz (Anlagerung an die hydrophoben Proteinbereiche; Tertiär- und Quartärstrukturen werden zerstört)
- viele Proteine binden SDS im konstanten Verhältnis (1.4 g SDS/g Protein)
- maskiert die eigentliche Proteinladung

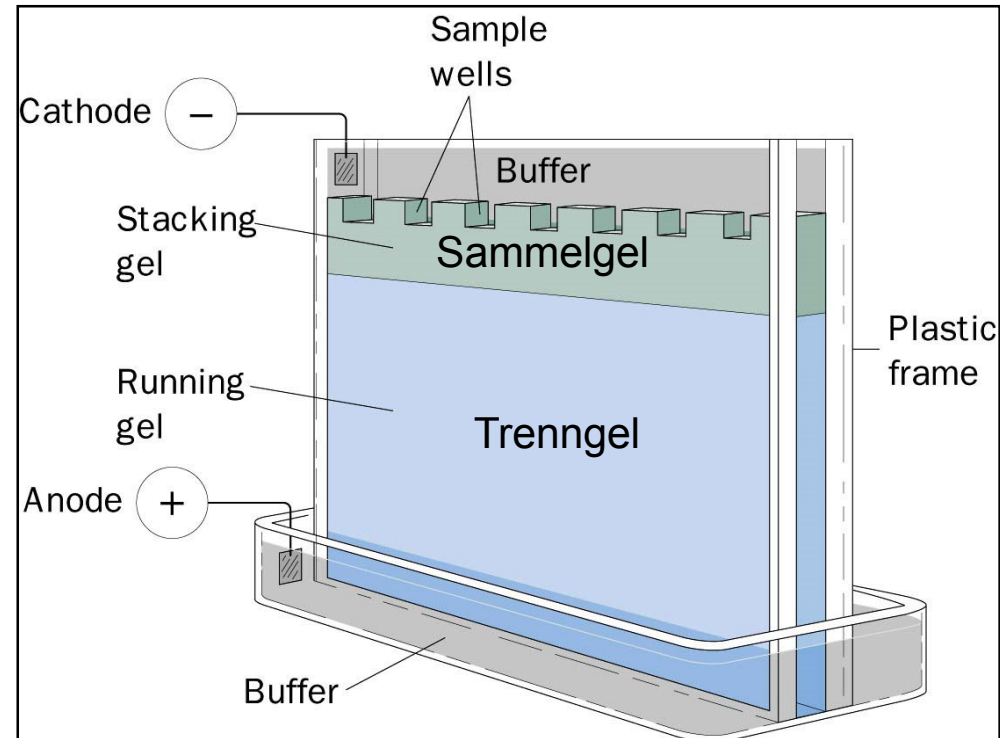
- Durch SDS :
 - alle Proteine denaturiert
 - +/- einheitliche Form
 - konst. Verhältnis von negativer Ladung zu Masse

⇒ Wandergeschwindigkeit ausschließlich von der Größe abhängig



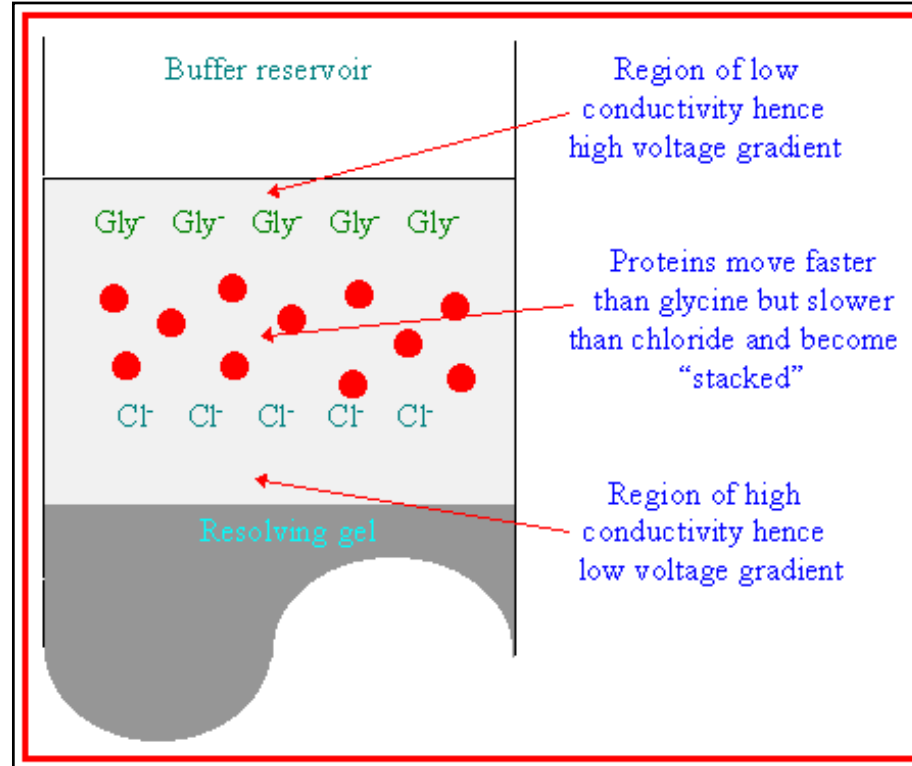
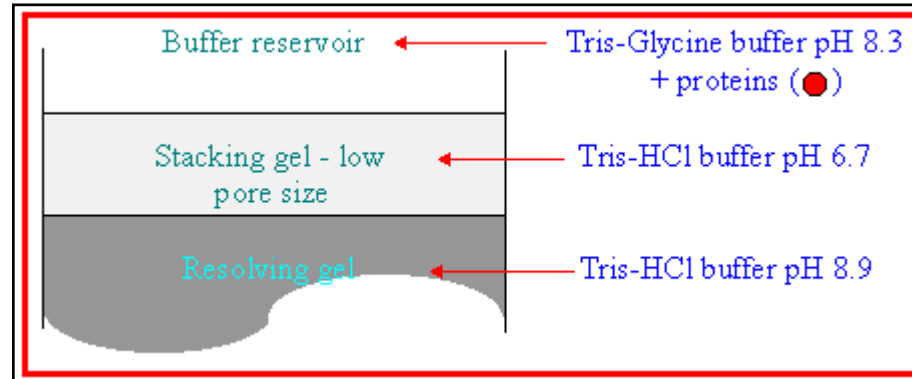
Diskontinuierliche SDS-PAGE

- Sammelgel (3-4 %)
Ankonzentrieren der Probe,
bessere Trennschärfe
(grobporig, kein Siebeffekt)
- Trenngel (8-15 %)
Auftrennen der Probe
(engporig, Siebeffekt)

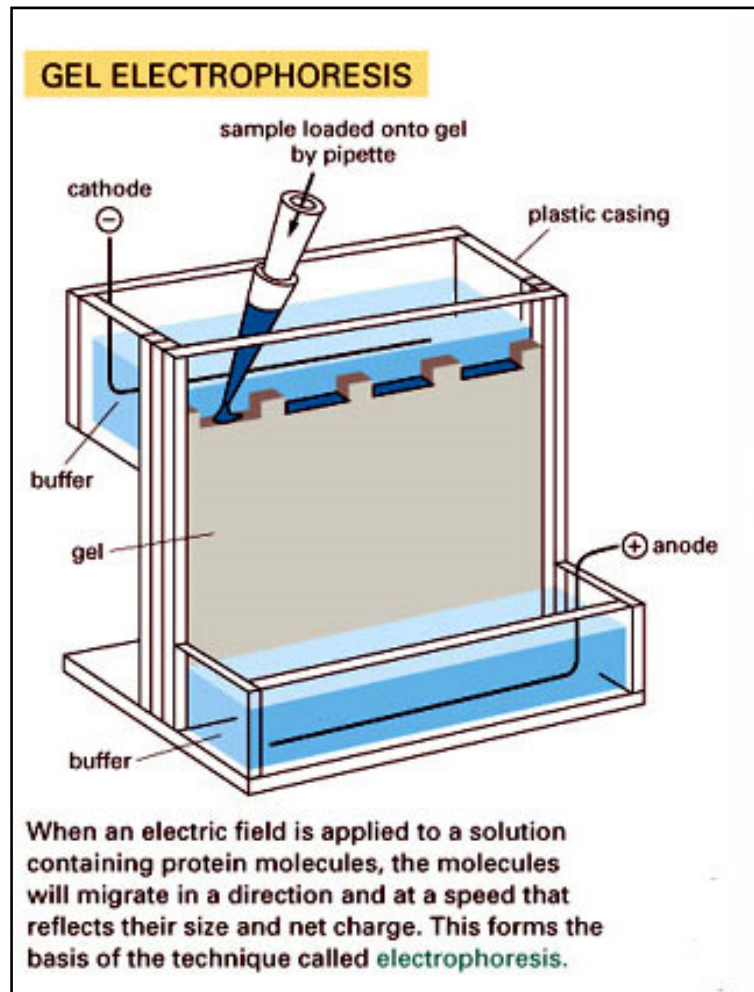


⇒ Diskontinuierliche SDS-PAGE mit besserer Trennschärfe der Proteinbanden

Diskontinuierliche SDS-PAGE



Probenauftrag SDS-PAGE



Laufpuffer:

- TRIS, Glycine, SDS

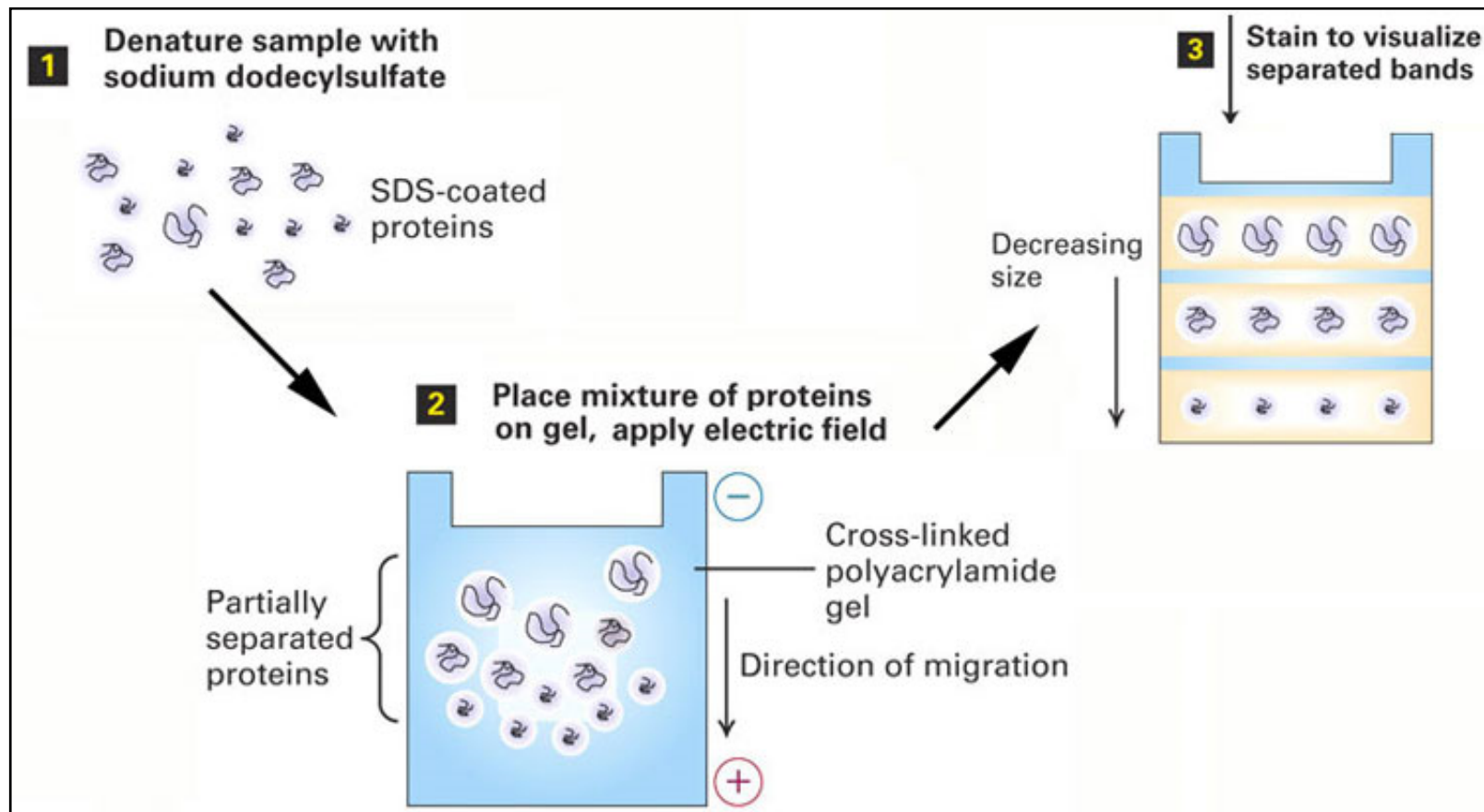
Probenpuffer (2 x Laemmli):

- SDS „Detergenz“
- Mercaptoethanol „Reduktionsmittel“
Reduktion von Disulfidbrücken
- Glycerin „Beschweren der Probe“
- Bromphenolblau „Farbstoff, läuft an der Front“
- Puffer „stabiler pH-Wert“
- Proteinlösung (ca. 1-20 µg)

Hitze-Inkubation: **5 min 95°C**

Denaturierende SDS PAGE

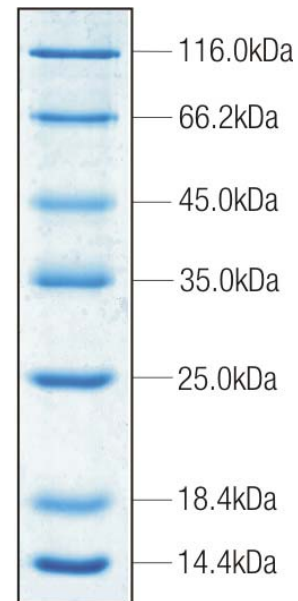
- Trennung der Proteine nur nach Größe
- Ladungsmäßige Uniformierung der Proteine (SDS)
- Dissoziation der Oligomere → nur Monomere



Bestimmung der Molekülgröße

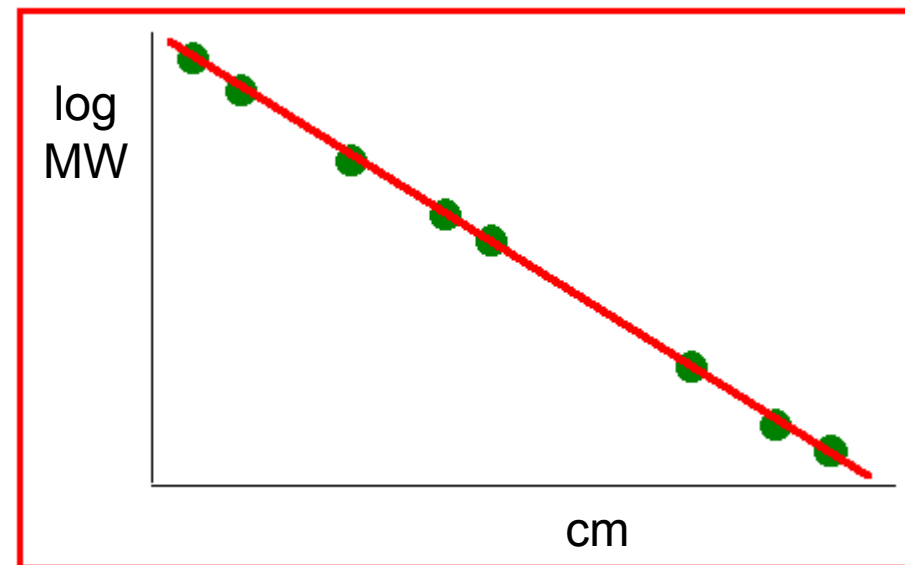
Molekulargewicht (MW):

- Summe des Gewichts der Atome
- Einheit: Dalton (Da) oder kDa (1/12 des Gewichts von ^{12}C ; Bsp: $\text{H}_2\text{O} = 18 \text{ Da}$)
- Bestimmung über einen MW-Standard (Proteine mit definiertem MW, Eichgerade)

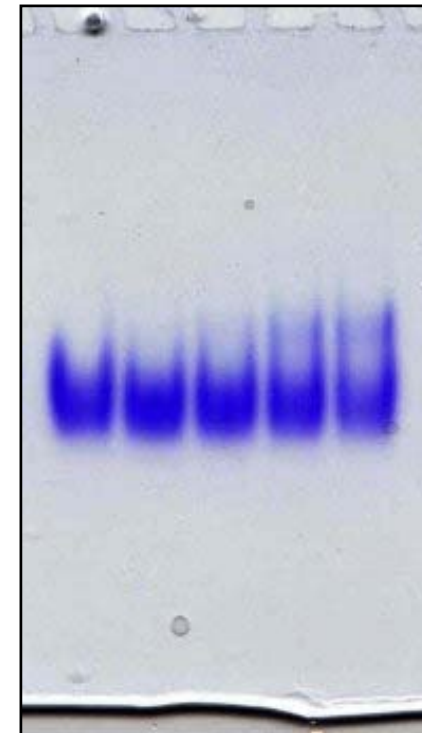
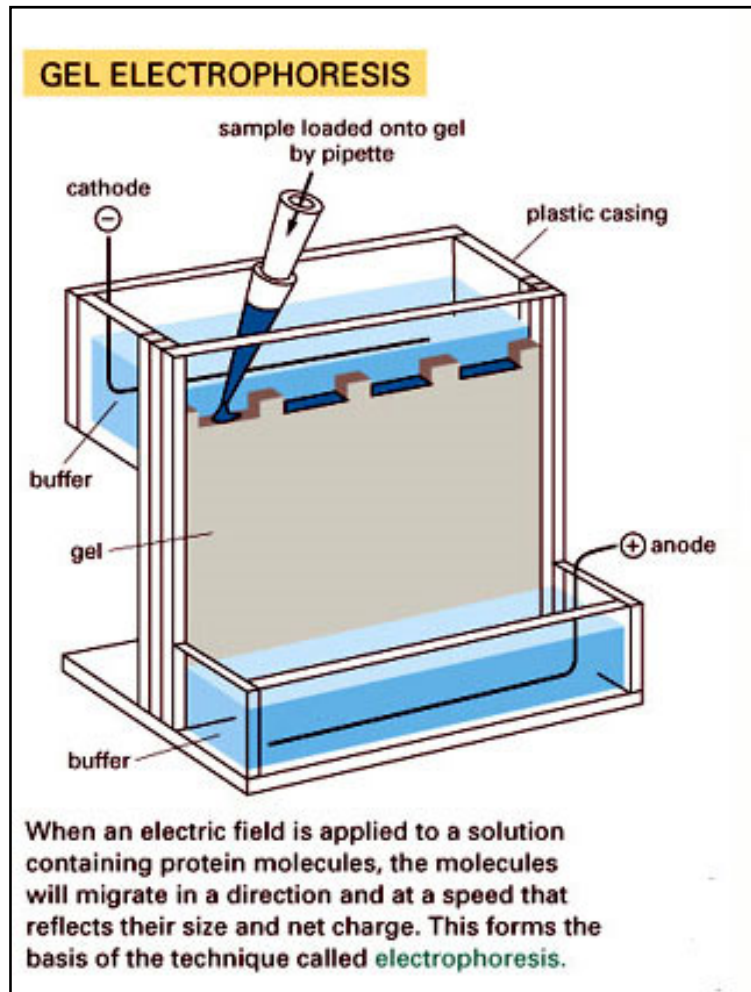


12%SDS-PAGE

Marker
(Fermentas)



Native PAGE



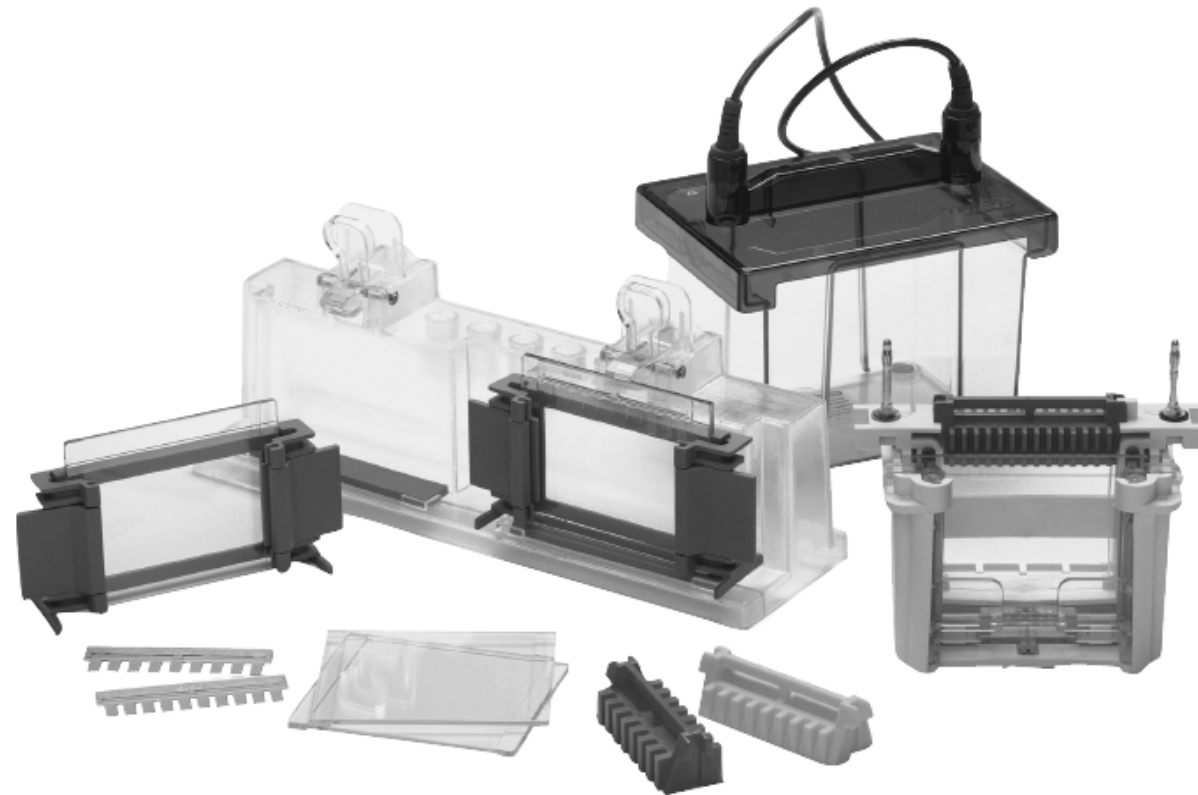
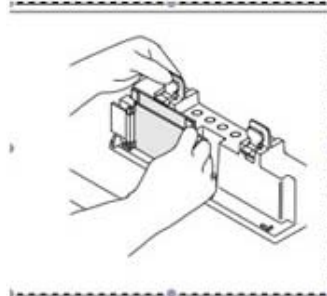
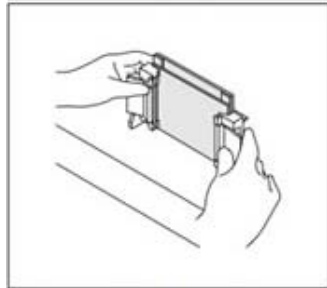
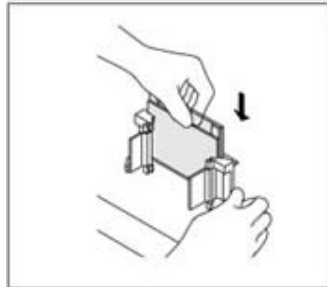
- Trennung der Proteine nach Größe & Ladung
- pH, Ionenstärke, Temperatur wichtig
- Vorteil: Proteine nach Trennung noch nativ (präparative Gele)
- Nachteil: Oligomere dissoziieren (Gemisch, Schmier), Oxidation empfindlicher Reste (z.B. Cys)

Herstellen der Gele

Achtung: nicht-polymerisierte Acrylamidlösungen sind toxisch. Beim Umgang Handschuhe tragen!!

- 2 kleine und 2 große **Glasplatten** mit **96 % Ethanol reinigen** und zusammen in den Gießstand einsetzen.
- **12.5 %iges Trenngel** (siehe Pipettierschema) zusammenpipettieren und bis 1,5 cm unter den Rand der kleinen Glasplatte zwischen die Glasplatten pipettieren/gießen. Vorsicht mit Zugabe von TEMED beginnt die Polymerisation.
- Vorsichtig bis zum Rand mit **Wasser (oder Isopropanol)** **überschichten** und etwa **30 min polymerisieren** lassen, bis eine scharfe Grenze zwischen Wasser und Gel sichtbar ist.
- Wasser abgießen, **Sammelgel** (siehe Pipettierschema) einfüllen und den **Kamm** für die Geltaschen luftblasenfrei einsetzen.
- Sammelgel etwa **30 min polymerisieren** lassen.
- Das Gel ist nun bereit für die Elektrophorese

PAGE Apparatur



Herstellen der Gele

Achtung: nicht-polymerisierte Acrylamidlösungen sind toxisch. Beim Umgang Handschuhe tragen!!

- 2 kleine und 2 große **Glasplatten** mit **96 % Ethanol reinigen** und zusammen in den Gießstand einsetzen.
- **12.5 %iges Trenngel** (siehe Pipettierschema) zusammenpipettieren und bis 1,5 cm unter den Rand der kleinen Glasplatte zwischen die Glasplatten pipettieren/gießen. Vorsicht mit Zugabe von TEMED beginnt die Polymerisation.
- Vorsichtig bis zum Rand mit **Wasser (oder Isopropanol) überschichten** und etwa **30 min polymerisieren** lassen, bis eine scharfe Grenze zwischen Wasser und Gel sichtbar ist.
- Wasser abgießen, **Sammelgel** (siehe Pipettierschema) einfüllen und den **Kamm** für die Geltaschen luftblasenfrei einsetzen.
- Sammelgel etwa **30 min polymerisieren** lassen.
- Das Gel ist nun bereit für die Elektrophorese

Herstellen der Gele

Achtung: nicht-polymerisierte Acrylamidlösungen sind toxisch.

Beim Umgang Handschuhe tragen

Pipettierschema:

	Trenngel 12.5 %	Sammelgel 4 %
	2 Gele	2 Gele
Trenngelpuffer	2,5 ml	/
Sammelgelpuffer	/	1,5 ml
H ₂ O	3,3 ml	3,6 ml
AA (30 %)	4,2 ml	0,8 ml
APS (10 %)	70 µl	28 µl
TEMED	5 µl	6 µl

Herstellen der Gele

Achtung: nicht-polymerisierte Acrylamidlösungen sind toxisch. Beim Umgang Handschuhe tragen!!

- 2 kleine und 2 große **Glasplatten** mit **96 % Ethanol reinigen** und zusammen in den Gießstand einsetzen.
- **12.5 %iges Trenngel** (siehe Pipettierschema) zusammenpipettieren und bis 1,5 cm unter den Rand der kleinen Glasplatte zwischen die Glasplatten pipettieren/gießen. Vorsicht mit Zugabe von TEMED beginnt die Polymerisation.
- Vorsichtig bis zum Rand mit **Wasser (oder Isopropanol) überschichten** und etwa **30 min polymerisieren** lassen, bis eine scharfe Grenze zwischen Wasser und Gel sichtbar ist.
- Wasser abgießen, **Sammelgel** (siehe Pipettierschema) einfüllen und den **Kamm** für die Geltaschen luftblasenfrei einsetzen.
- Sammelgel etwa **30 min polymerisieren** lassen.
- Das Gel ist nun bereit für die Elektrophorese

Herstellen der Gele

Achtung: nicht-polymerisierte Acrylamidlösungen sind toxisch.

Beim Umgang Handschuhe tragen

Pipettierschema:

	Trenngel 12.5 %	Sammelgel 4 %
	2 Gele	2 Gele
Trenngelpuffer	2,5 ml	/
Sammelgelpuffer	/	1,5 ml
H ₂ O	3,3 ml	3,6 ml
AA (30 %)	4,2 ml	0,8 ml
APS (10 %)	70 µl	28 µl
TEMED	5 µl	6 µl

Herstellen der Gele

Achtung: nicht-polymerisierte Acrylamidlösungen sind toxisch. Beim Umgang Handschuhe tragen!!

- 2 kleine und 2 große **Glasplatten** mit **96 % Ethanol reinigen** und zusammen in den Gießstand einsetzen.
- **12.5 %iges Trenngel** (siehe Pipettierschema) zusammenpipettieren und bis 1,5 cm unter den Rand der kleinen Glasplatte zwischen die Glasplatten pipettieren/gießen. Vorsicht mit Zugabe von TEMED beginnt die Polymerisation.
- Vorsichtig bis zum Rand mit **Wasser (oder Isopropanol) überschichten** und etwa **30 min polymerisieren** lassen, bis eine scharfe Grenze zwischen Wasser und Gel sichtbar ist.
- Wasser abgießen, **Sammelgel** (siehe Pipettierschema) einfüllen und den **Kamm** für die Geltaschen luftblasenfrei einsetzen.
- Sammelgel etwa **30 min polymerisieren** lassen.
- Das Gel ist nun bereit für die Elektrophorese

Loading

