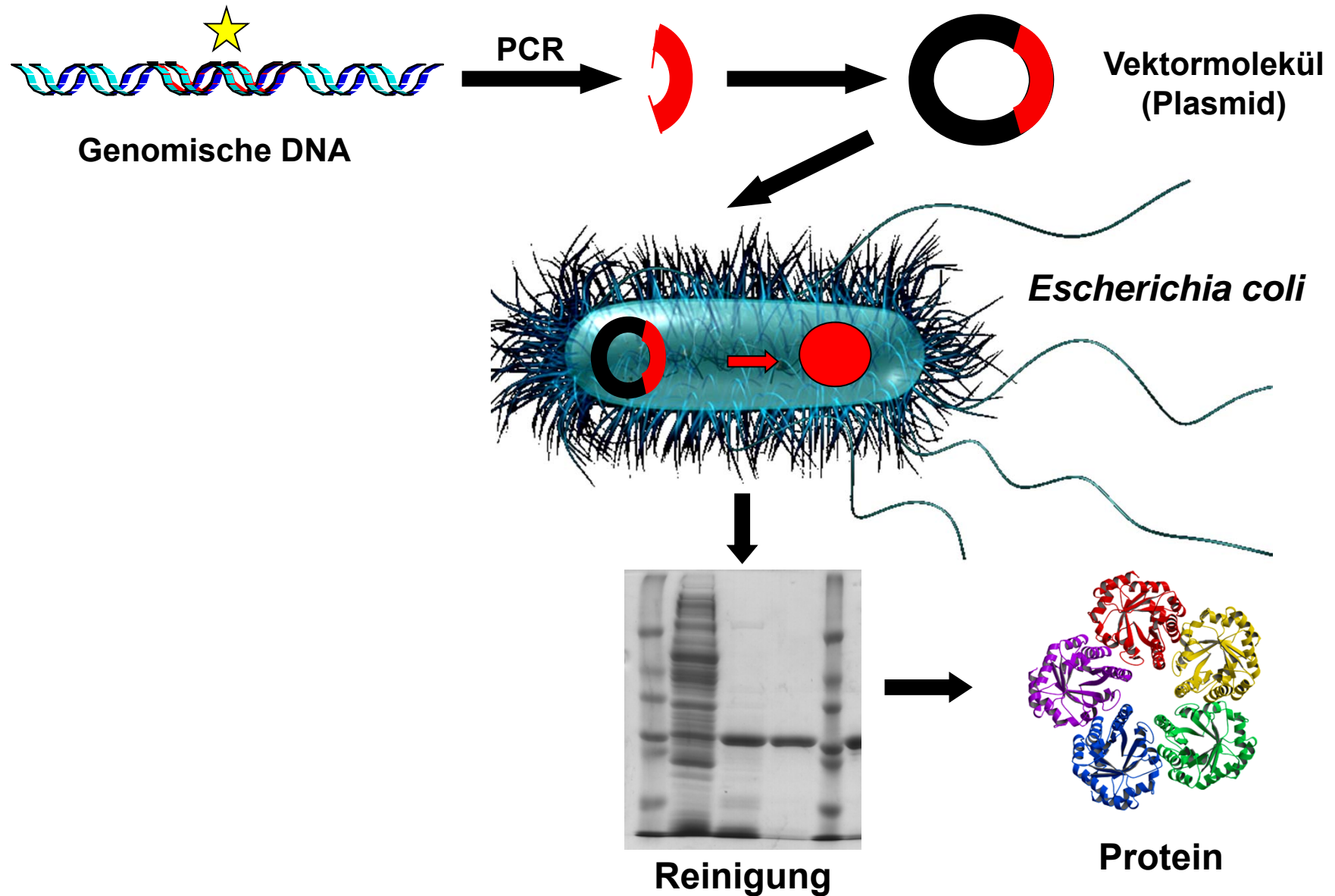


Praktikum Biochemie

„Einführung in die Molekularbiologie“

Bettina Siebers

Protein Expression



Proteinreinigung

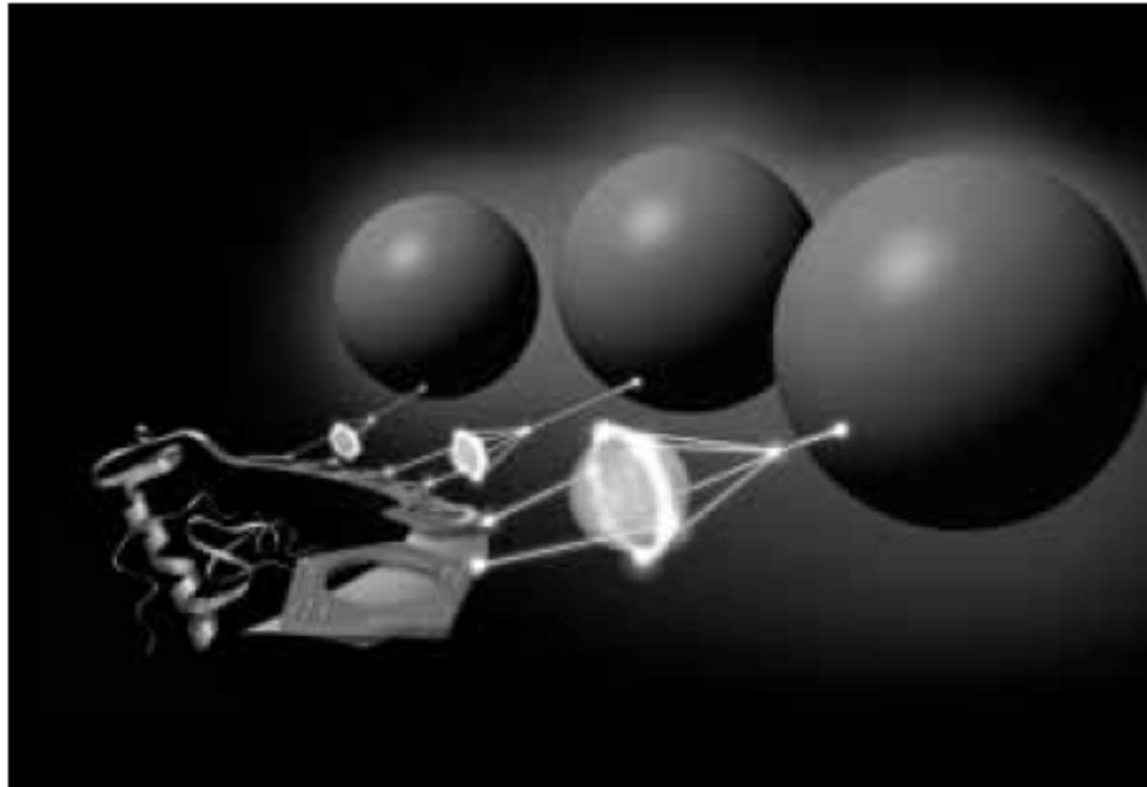
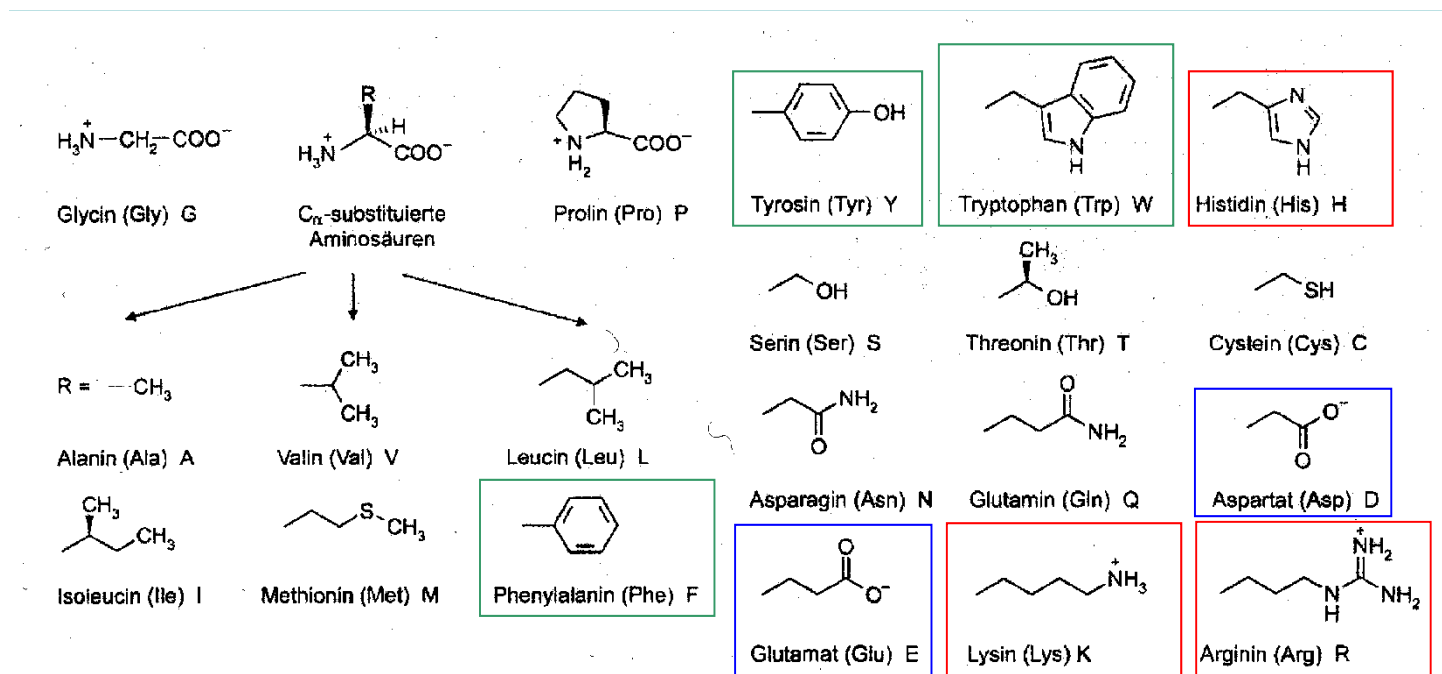


Figure 1. Interaction between NiNTA and a 6xHis-tagged protein

Aufbau von Proteinen: Aminosäuren

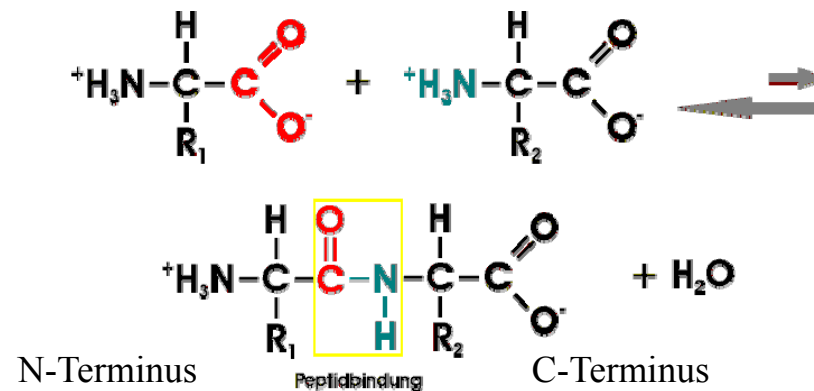
- 20 proteinogene Aminosäuren, die sich aufgrund ihrer Größe, Ladung, Polarität, Hydrophobizität, Aromatizität unterscheiden



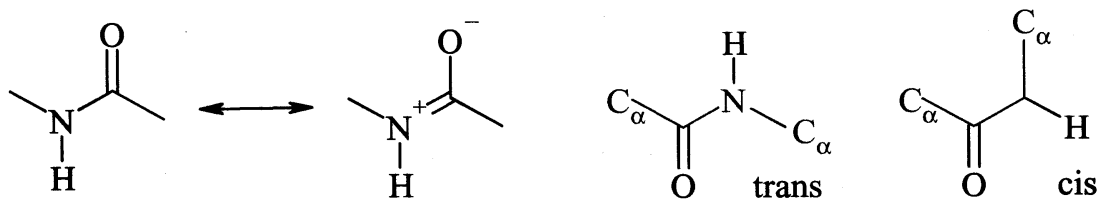
- Die Eigenschaften der Aminosäuren bestimmen die Funktion und die Struktur der jeweiligen Proteine

Peptidbindung

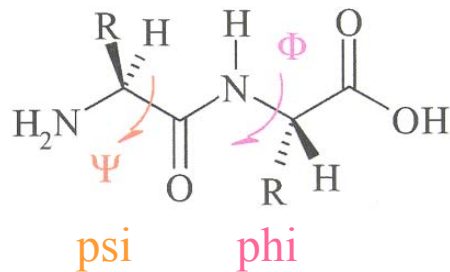
- Polymerisieren von Aminosäuren = Kondensationsreaktion



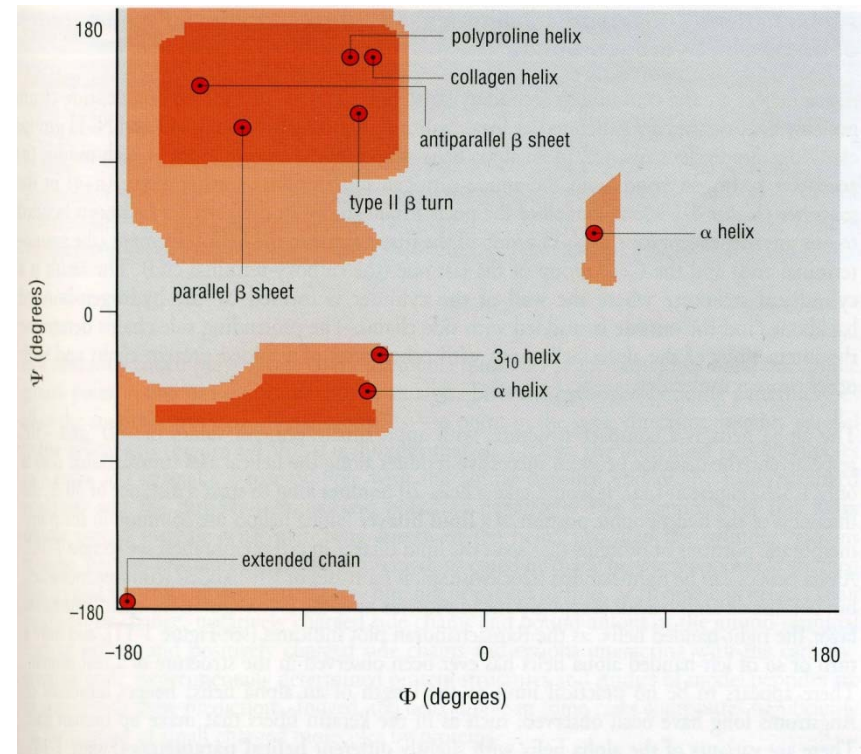
- Peptidbindung mit partiellem Doppelbindungscharakter
⇒ Starr und planar
- Aus sterischen Gründen meist mit trans-Konfiguration (Ausnahme Prolin)



Torsionswinkel



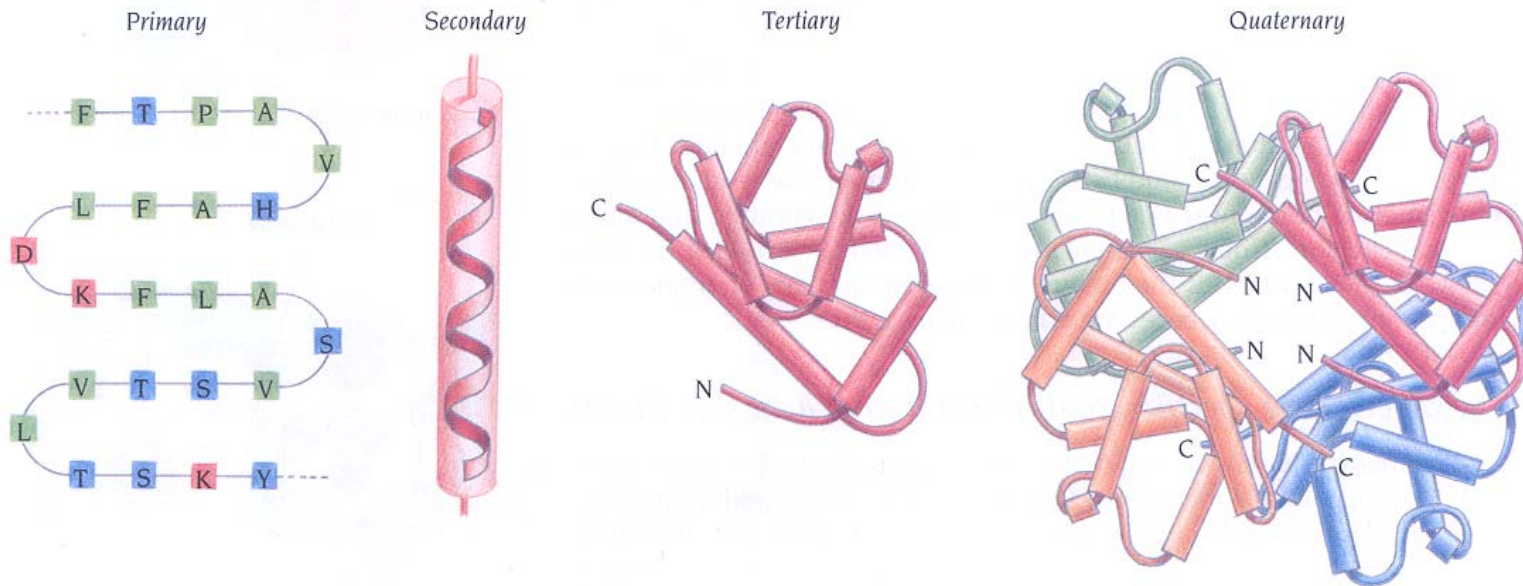
- $C_{\alpha}-CO$ und $N-C_{\alpha}$ -Bindungen sind als Einfachbindungen prinzipiell frei drehbar
- aus sterischen Gründen aber nur bestimmte Kombinationen aus Ψ und Φ möglich
- Diese Winkelkombinationen definieren die Konformation des Proteinerückgrats



Sekundärstruktur = lokale Gerüstkonformation des Polypeptidgerüsts, in denen sich die Torsionswinkel des Proteinerückgrats regelmäßig wiederholen

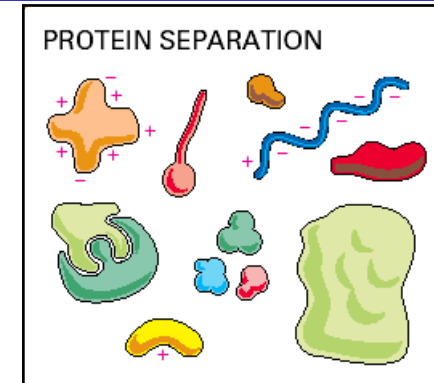
Aufbau von Proteinen: Strukturen

- Primärstruktur Lineare Abfolge der Aminosäuren
- Sekundärstruktur Lokale Faltung von Segmenten, Helix, Faltblatt
- Tertiärstruktur Dreidimensionale Anordnung der Sekundärstrukturen zueinander
- Quartärstruktur Dreidimensionale Anordnung mehrerer Tertiärstrukturen zueinander

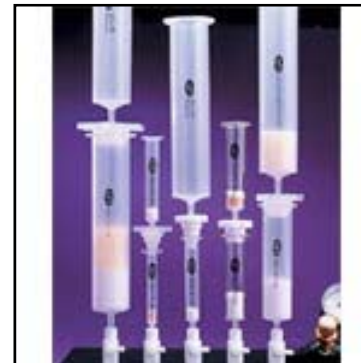


Methoden der Proteinreinigung

- Löslichkeit
 - Stabilität
- } ⇒ Fällungsmethoden



- Ladung ⇒ Ionenaustausch-Chromatographie
- Hydrophobizität ⇒ Hydrophobe Interaktions-Chromatographie
- Größe ⇒ Gelfiltration (= Größen-Ausschluss-Chromatographie)
- Funktion ⇒ Affinitäts-Chromatographie
(Ligandenbindung)



Chromatographie

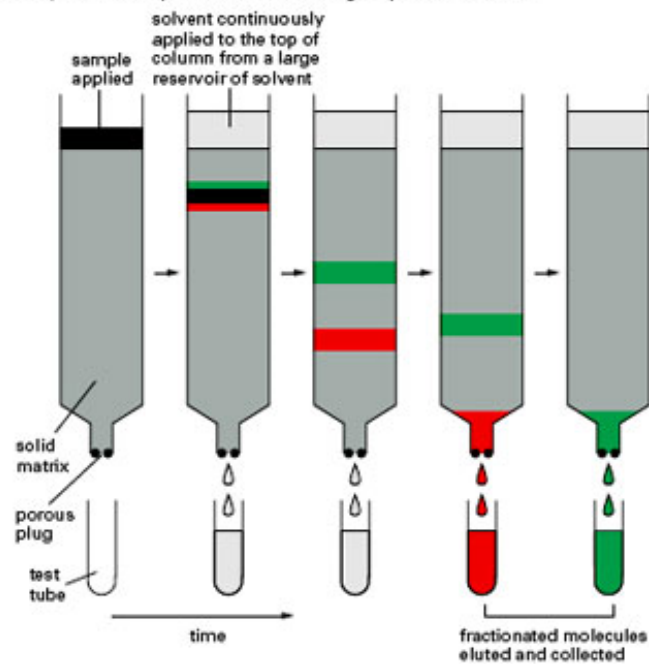
Prinzip: unterschiedliche Verteilung verschiedener Stoffe auf zwei nicht miteinander mischbare Phasen

- Mobile Phase: Laufmittel (Puffer)
- Stationäre Phase: Säulenmatrix
- Adsorptionschromatographie \Rightarrow stabile Bindung der zu trennenden Substanz, Elution durch Änderung des Laufmittels (z.B. Ionenaustausch-Chromatographie) = Elution mit einem *Gradienten*
- Verteilungschromatographie \Rightarrow Substanzen werden aufgrund ihrer unterschiedlichen Laufgeschwindigkeit aufgetrennt (z.B. Gelfiltration) = Elution erfolgt *isokratisch* (Laufmittel bleibt unverändert)
 - FPLC = fast protein liquid chromatography
 - HPLC = high performance liquid chromatography

Säulenchromatographie

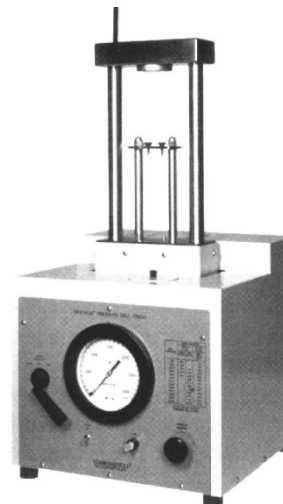
COLUMN CHROMATOGRAPHY

Proteins are often fractionated by **column chromatography**. A mixture of proteins in solution is applied to the top of a cylindrical column filled with a permeable solid matrix immersed in solvent. A large amount of solvent is then pumped through the column. Because different proteins are retarded to different extents by their interaction with the matrix, they can be collected separately as they flow out from the bottom. According to the choice of matrix, proteins can be separated according to their charge, hydrophobicity, size, or ability to bind to particular chemical groups (see *below*).



Zellaufschluß

- Abh. Von Ausgangsmaterial und der Lokalisation und Beschaffenheit des Zielmoleküls (neutraler pH ggf. isotone Bedingungen, Proteaseinhibitoren)
- Mechanische Methoden:
 - Schwache Scherkräfte
 - Messerhomogenisator
 - Mörser
 - Vibrationszelmühlen
 - French press
 - Ultraschall
- Nicht-mechanische Methoden
 - Osmolyse
 - enzymatisch
 - Detergenzien



Zellaufschluss

Zellaufschluss

- Zellpellet auftauen
- Zellen werden in Lysis Puffer resuspendieren (3 ml pro Gramm Feuchtgewicht).
- 100 µl f. Aktivitätstest & SDS-PAGE (Zellpellet)
- 5 min Ultraschall unter Eiskühlung (50% Amplitude, Cycle 0,5).

Das Ultraschallgerät darf nicht ohne Betreuer bedient werden!!!!

- Zentrifugation Lysat 30 min bei 13000 x rpm (4°C)
- Der Überstand (Rohextrakt) in ein neues Zentrifugenröhrchen,
- 100 µl f. Aktivitätstest & SDS-PAGE (Rohextrakt)
- Den Zellaufschluss bei 4°C im Kühlschrank oder auf Eis lagern
- **Jede Gruppe erhält ca. 1,5 ml Rohextrakt**

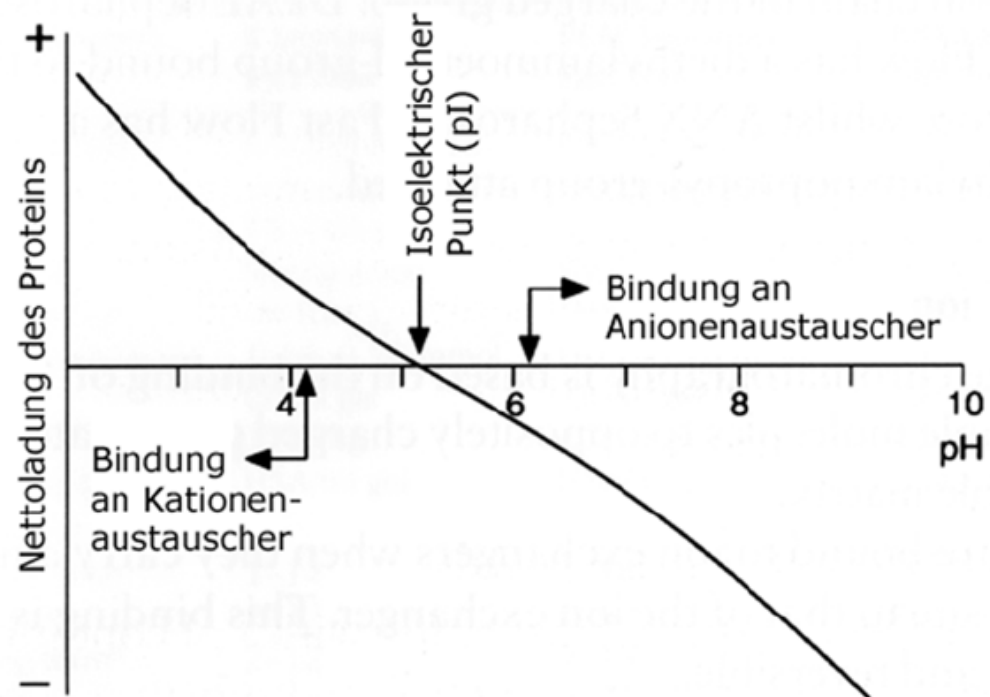
Proteinreinigung - Informationen

http://www.gelifesciences.com

The screenshot shows the GE Healthcare Life Sciences website interface. At the top, there is a navigation bar with the GE logo and the text "GE Healthcare Life Sciences". To the right of the logo, there are links for "Register", "Forgot Password?", "Quick Order", and "Shopping Cart (0)". Below the navigation bar is a search bar with the text "Search GE Healthcare Life Sciences" and a magnifying glass icon. To the right of the search bar are input fields for "E-mail" and "Password", and a "Login" button. Below the search bar is a main navigation menu with the following items: "Products & Solutions", "Applications & Technologies", "Brands", "Service & Support", "About Us", and "Contact Us". The "Service & Support" menu is expanded, showing a list of sub-menus: "Service Solutions", "Development and Manufacturing Services", "Education & Consulting Services", "GoldSeal Remanufactured Instruments", "Life Sciences Equipment Services", "Multi-Vendor Services", "Security of Supply", "Validation Services", "Support", "Customer & Technical Support", "Documents & Downloads", "Online Tools & Mobile Apps", "Regulatory Support Web Application", and "Training Courses". Each sub-menu has a list of links. For example, "Multi-Vendor Services" includes "Lab Optimization Solutions", "Multivendor Life Cycle Asset Management", and "Multi-Vendor Services Requests". "Support" includes "Customer & Technical Support Requests". "Documents & Downloads" includes "MSDS Search", "Certificates Search", "Handbooks", "Online Newsletters", and "Instructions for Use". "Online Tools & Mobile Apps" includes "General", "Cell Preparation", "Chromatography", "Crossflow and Normal Flow Filtration", "Laboratory Filtration", and "Cell Imaging and Microscopy". "Regulatory Support Web Application" includes "About Regulatory Support", "Brochures & Data Files", "Statements for Bioprocess Chromatography Media", "Frequently Asked Questions", and "Contact Regulatory Support". "Training Courses" is also listed. Below the main navigation menu, there are three columns of content. The first column is a "Feedback" button. The second column is a "MEDICA" advertisement with the text "Meet our experts at MEDICA" and "16-19 NOVEMBER 2015 DÜSSELDORF GERMANY". The third column is a "News & Press Releases" section with two items: "MabSelect SuRe LX for biomanufacturing" and "Single-use membrane chromatography". Below the news section is a "Quick Links" section. To the right of the news section is an "Events & Fairs" section with two items: "BPI Conference and Expo 2015 (BPI)" and "VWS1 (Fast Trak course)". At the bottom of the page, there is a Windows taskbar with various application icons and a system tray showing the date and time as "26.10.2015 07:09".

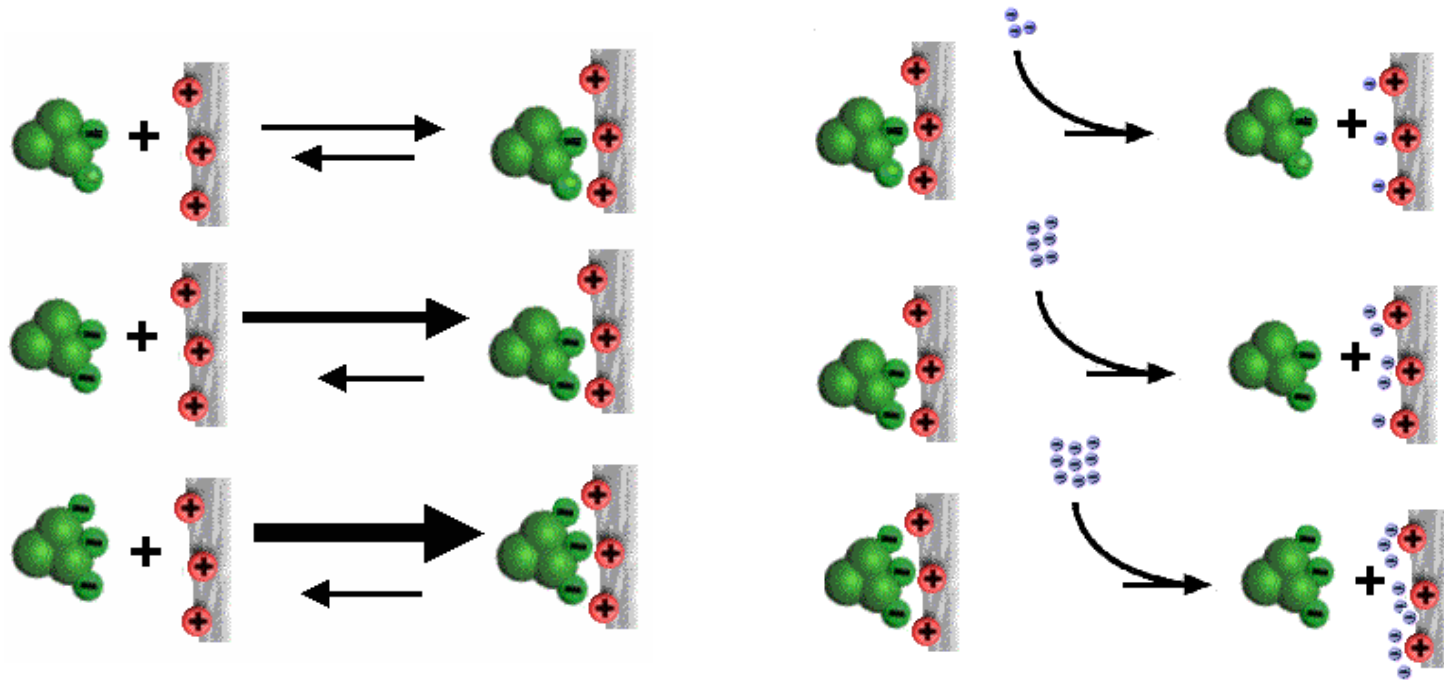
Ionen-Austausch Chromatographie

- Nettoladung von Proteinen ist abhängig vom pH-Wert



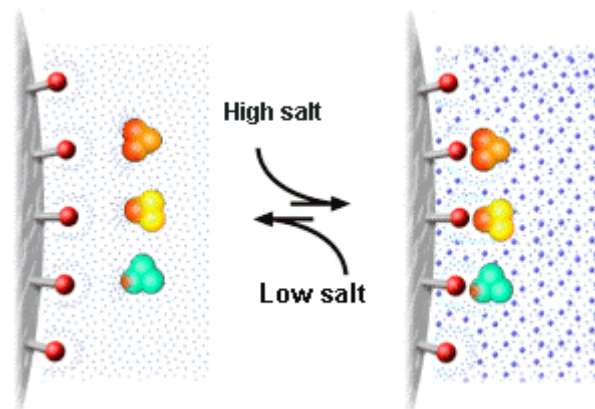
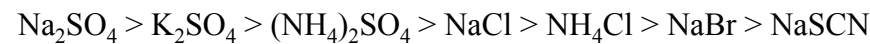
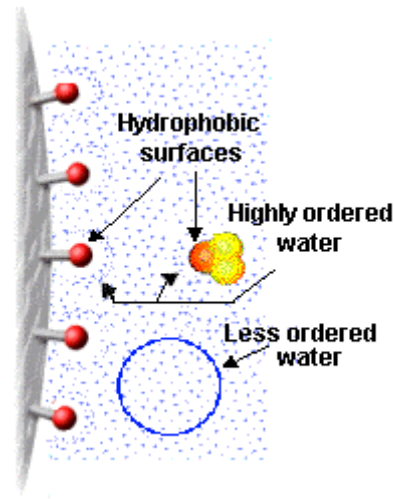
Ionen-Austausch Chromatographie

- Geladene Proteine werden an entgegengesetzt geladene Gruppen gebunden
- Die Bindungsaffinität ist abhängig von der Nettoladung des Proteins



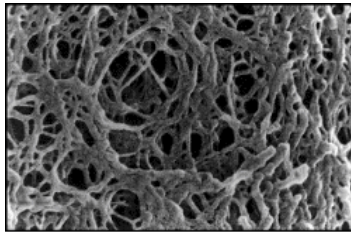
- Die Bindung erfolgt bei niedrigen Salzkonzentrationen und basischem pH-Wert (Anionentauscher) bzw. saurem pH-Wert (Kationentauscher)

Hydrophobe Interaktions-Chromatographie (HIC)

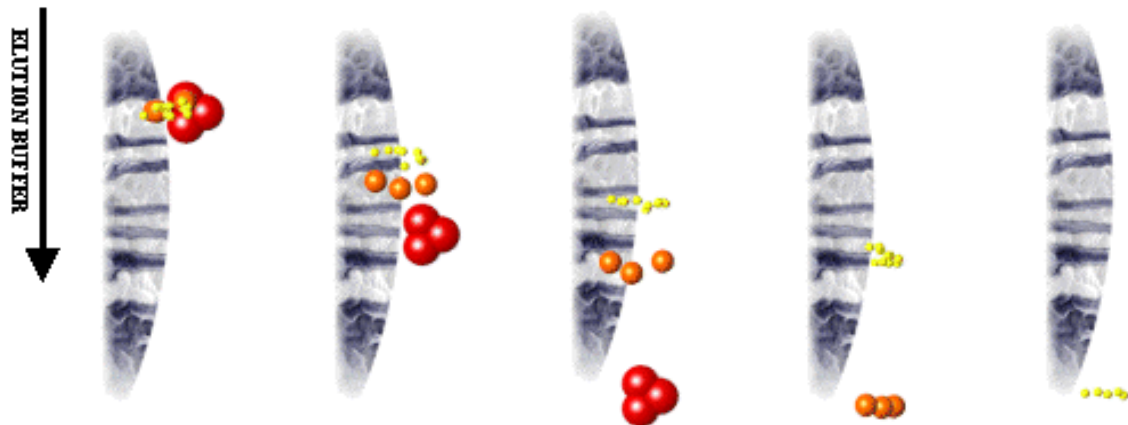


- Hydrophober Effekt = Bestreben von Wasser, seinen Kontakt mit hydrophoben Molekülen so gering wie möglich zu halten
- Die Aggregation apolarer Gruppen in Wasser minimiert die Grenzfläche hydrophob – hydrophil, die Entropie nimmt zu
- HIC Materialien haben hydrophobe Liganden, die mit hydrophoben Oberflächenarealen von Proteinen interagieren
- Bestimmte Salze verstärken den hydrophoben Effekt (Hofmeister Serie)

Gelfiltration (size exclusion chromatography)

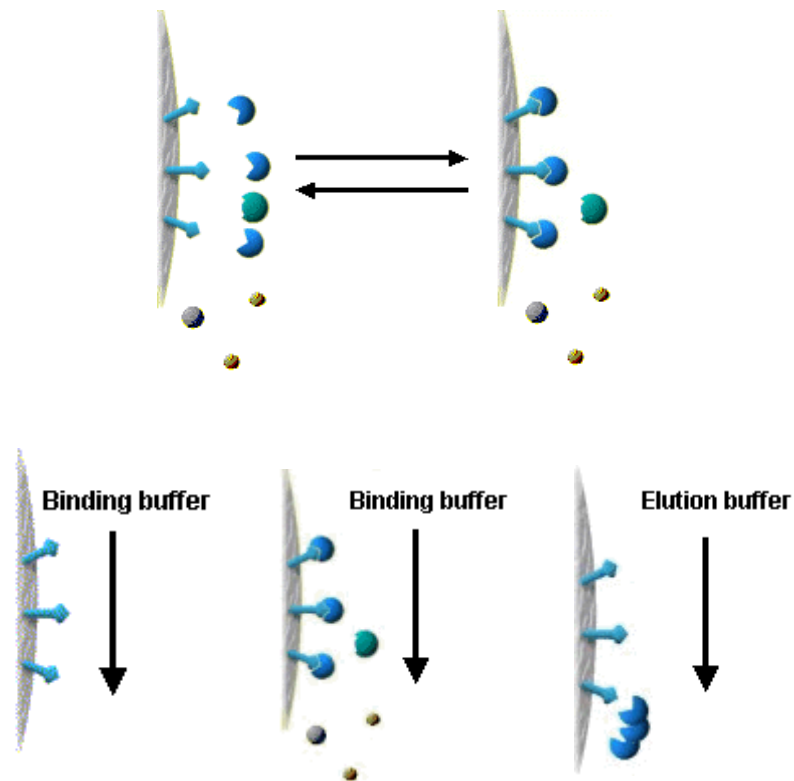


- Proteine werden nach Größe (und Form) aufgetrennt
- Gelfiltrationsmaterialien enthalten Poren
- Je nach Größe verteilen sich die Proteine zwischen den Poren und dem Laufpuffer
- Große Moleküle durchwandern die Säule schneller als kleine, weil letztere leichter/öfter in die Poren diffundieren können



Affinitätschromatographie

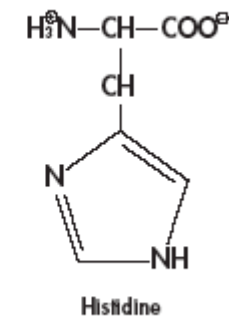
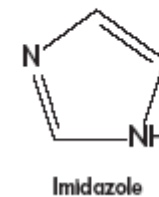
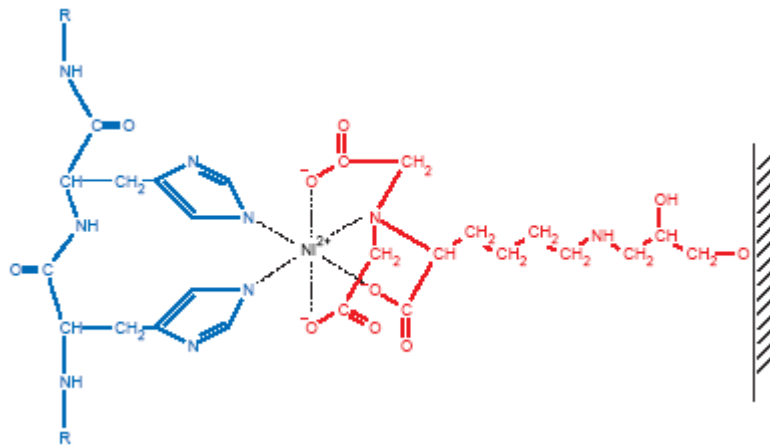
- Die AC macht sich spezifische Eigenschaften (nativ oder hinzugefügt) des Zielproteins zunutze, spezielle Moleküle fest aber nicht kovalent zu binden (z.B. Antigen ↔ Antikörper, Enzym ↔ Substrat(-Analogon))



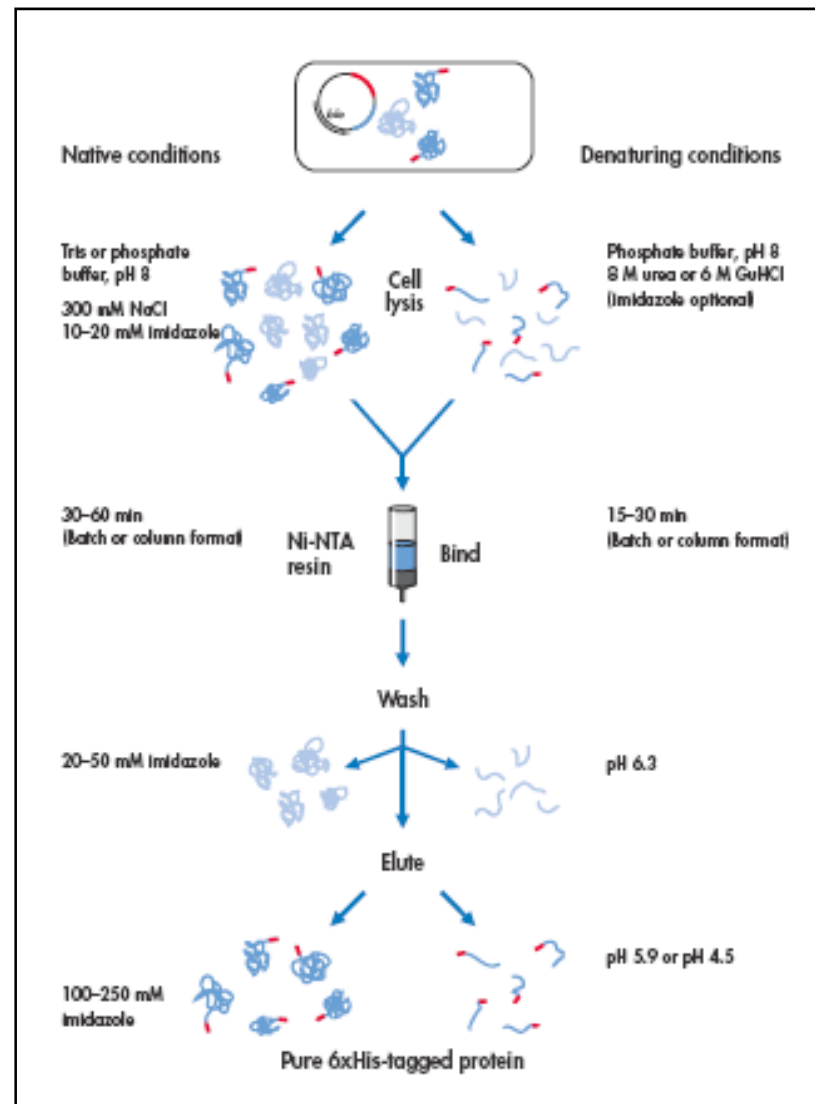
- Ein Molekül (Ligand), das das interessierende Protein spezifisch bindet, wird kovalent an eine Matrix gebunden
- Das interessierende Protein bindet an diesen Liganden, während die anderen Proteine mit dem Puffer von der Säule gewaschen werden
- Elution erfolgt durch Änderung der Pufferbedingungen oder durch Hinzufügen einer Komponente im Überschuss, die das Zielmolekül vom Liganden verdrängt

Affinitätschromatographie

- Metall-Affinitätschromatographie (immobilized metal ion affinity chromatography = IMAC)
- Ligand = Nickel-Nitrilotriacetic acid (Ni-NTA), bzw. Nickel tris(carboxymethyl) ethylene diamine (Ni-TED)
- His-tag rekombinant ins Protein eingebracht
- His-tag bildet mit dem Nickel-Atom des Liganden eine komplexe Bindung aus
- Die Elution erfolgt mit Imidazol, das auch Bestandteil der Histidinseitenkette ist



Immobilized Metal Ion Affinity Chromatography (IMAC)



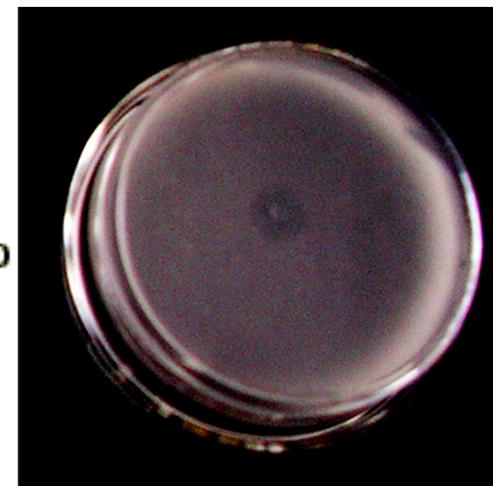
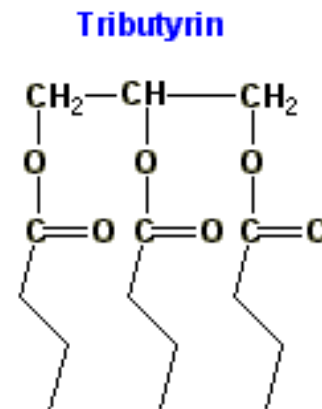
Aktivitätstest

Esterase (EC 3.1.1.1):

- Carboxylester-Hydrolasen, hydrolysieren Glycerinester von kurzkettigen Fettsäuren (C<10)
- Aufbau des aktiven Zentrums, Hydrolyse-Mechanismus weitgehend identisch mit Lipasen (Unterschied: Kinetik der Umsetzung hydrophober Substrate)
- Biotechnologische Anwendung zur Herstellung enantiomerenreiner Produkte (chirale Carbonsäuren, primäre, sekundäre und tertiäre Alkohole)
 - z.B. Carboxylesterase NP aus *Bacillus subtilis* zur Herstellung von Naproxen (eines der meistverkauften, entzündungshemmenden Medikamente)

Tributyryn (Glyceryltributyrat):

- Triester aus Glycerin und Butansäure (Buttersäure) C_3H_7COOH (Öl)
- opake Platten



Aktivitätstest

Esterase-Assay:

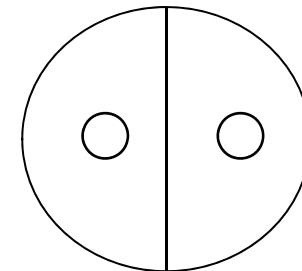
- Proteinexpression?
- Aktives Protein?

Tributyrin Indikatorplatten

Probe: Rohextrakt

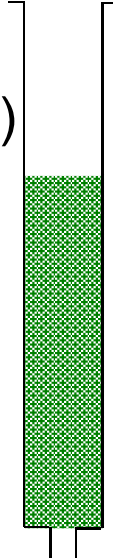
Negativkontrolle: Wasser

- Einteilung der Tributyrin-Indikatorplatte in zwei Hälften (Markierung auf der Bodenunterseite mit Edding)
- 5 μ l Rohextrakt bzw. Wasser auftropfen (genaue Markierung des Tropfens mit Edding)
- Trocknen der Platte (Sterilbank)
- Inkubation der Platte, 30-60 min, 37°C
- **Hofbildung/Aufklärung bei aktivem Enzym!!**



Protein Reinigung

- Äquilibration der Säule
 - 320 µl LEW Puffer und durchlaufen lassen (Durchlauf verwerfen)
- Probenauftrag/Proteinbindung
 - Rohextrakt auf die Säule geben, durchlaufen lassen
 - **Durchlauf sammeln (D, SDS PAGE & Aktivität)**
 - Esterase bindet an die Säule (His-tag) andere *E. coli* Proteine laufen durch, Fraktion ohne Esterase Aktivität
- Waschen (Entfernen ungebundener Proteine)
 - 320 µl LEW Puffer
 - **Durchlauf sammeln, Waschen 1, (W1, SDS PAGE & Aktivität)**
 - 320 µl LEW Puffer
 - **Durchlauf sammeln, Waschen 2, (W2, SDS PAGE & Aktivität)**
 - Ungebundene Proteine sind entfernt, Fraktion ohne Esterase Aktivität



Protein Purification

- Proteinelution
 - 240 µl Elutionspuffer
 - **Durchlauf sammeln, Eluat 1, (E1, SDS PAGE & Aktivität)**
 - 240 µl Elutionspuffer
 - **Durchlauf sammeln, Eluat 2, (E2, SDS PAGE & Aktivität)**
 - 240 µl Elutionspuffer
 - **Durchlauf sammeln, Eluat 3, (E3, SDS PAGE & Aktivität)**
- In den 3 Elutionsproben sollte Esterase Aktivität vorhanden sein!!

Protein Proben

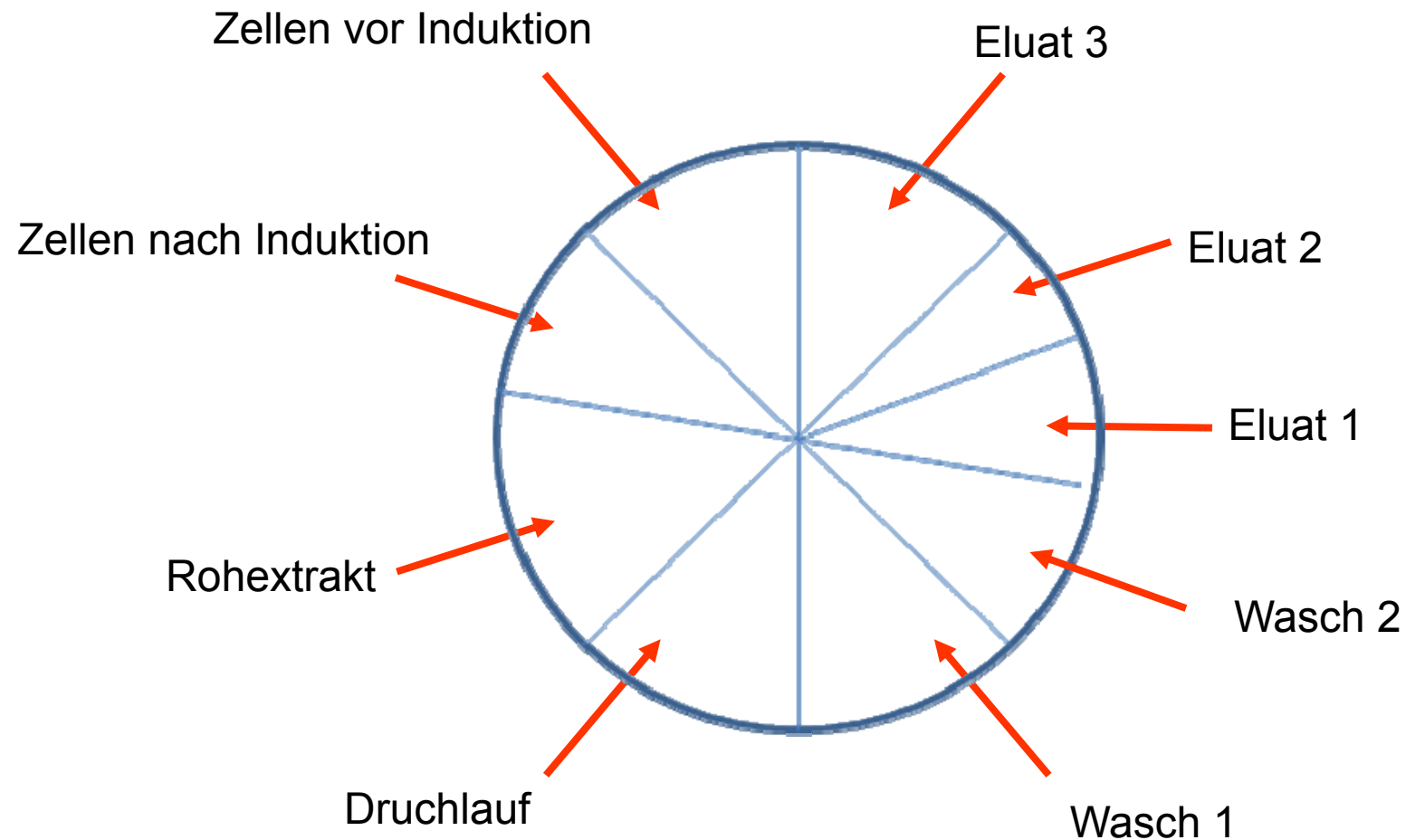
Proben für SDS-Page und Aktivitätstests:

1. Zellpellet vor Induktion
2. Zellpellet nach Induktion
3. Rohextrakt (R)
4. Durchlauf (D)
5. Waschen 1 (W1)
6. Waschen 2 (W2)
7. Eluat 1 (E1)
8. Eluat 2 (E2)
9. Eluat 3 (E3)

**!! Markieren sie die Reaktionsgefäße
bevor sie die Proben sammeln !!**

Aktivitätstest

- Platte in 9 Teile unterteilen
- 10 μ l der verschiedenen Proben auftragen

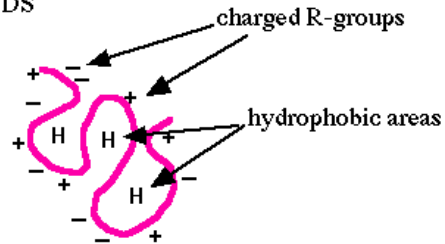


Aktivitätstest

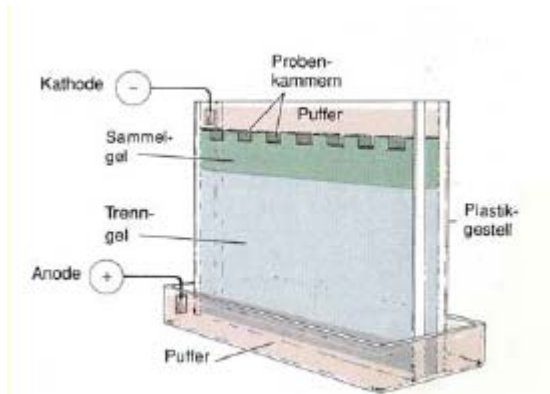


SDS-PAGE

BEFORE SDS



AFTER SDS

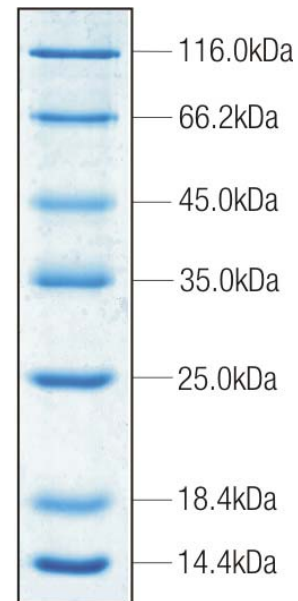


- Analytisch: Reinheitskontrolle, Molekulargewichtsbestimmung
- SDS-PAGE = **S**odium**d**odecyl**s**ulfate-**P**olyacrylamide-**g**elelectrophoresis
- Elektrophorese = Wanderung von Ionen im elektrischen Feld
- Durch Beladen mit SDS werden alle Proteine in der Probe denaturiert, nehmen eine einheitliche Form an und bekommen ein konst. Verhältnis von negativer Ladung zu Masse, so dass die Wandergeschwindigkeit ausschließlich nach Größe erfolgt
- Sammelgel: Ankonzentrieren der Probe, Trennschärfe (grobporig, kein Siebeffekt)
- Trenngel: Auftrennen der Probe (engporig, Siebeffekt)

Bestimmung der Molekülgröße

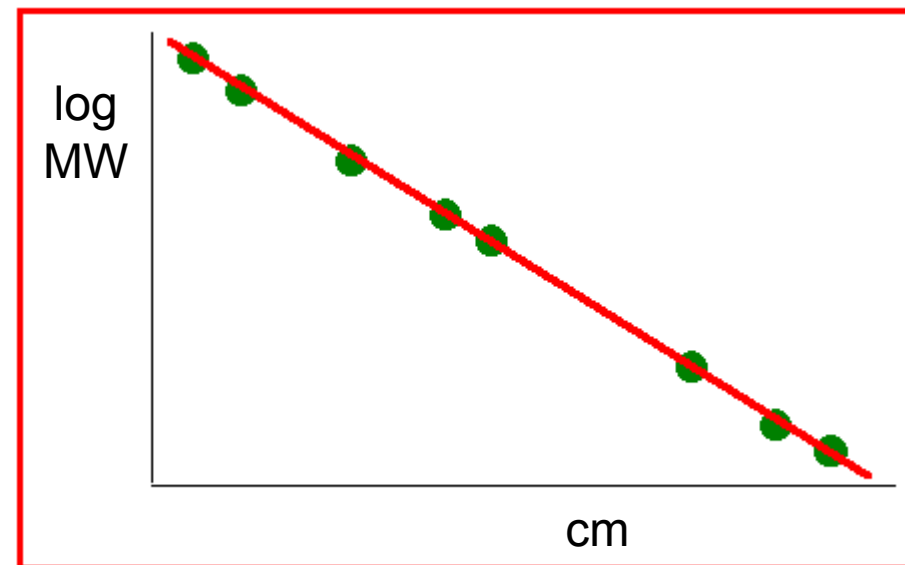
Molekulargewicht (MW):

- 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)

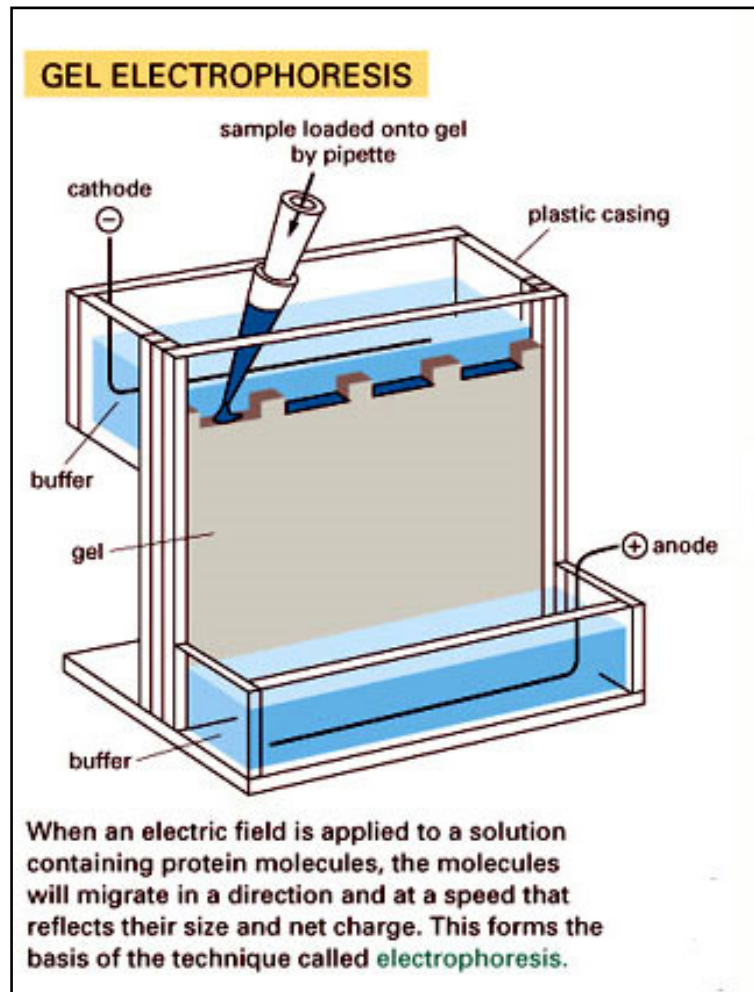


12%SDS-PAGE

Marker
(Fermentas)



Probenauftrag SDS-PAGE



Laufpuffer:

- TRIS, Glycine, SDS

Probenpuffer (2 x Laemmli):

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

Hitze-Inkubation: **5 min 95°C**

Färben & Entfärben des Gels

- Entfernen des Gels (Vorsichtig!)

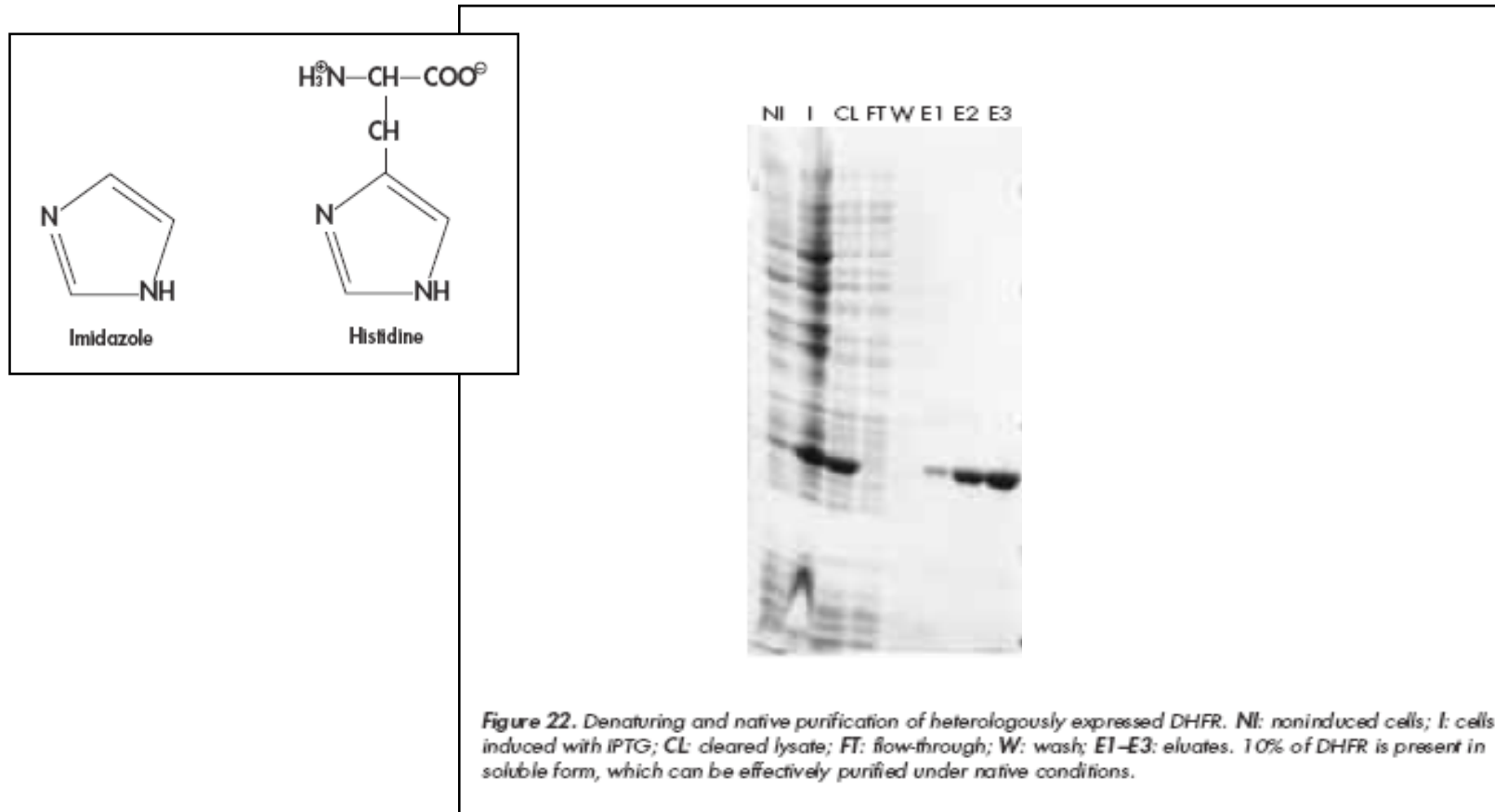
Färbung des Gels

- Überschichten mit Coomassie-Blue Färbelösung (ca. 1 min Mikrowelle)
- 20 min Schüttler
- Färbelösung abgießen (wiederverwendbar)

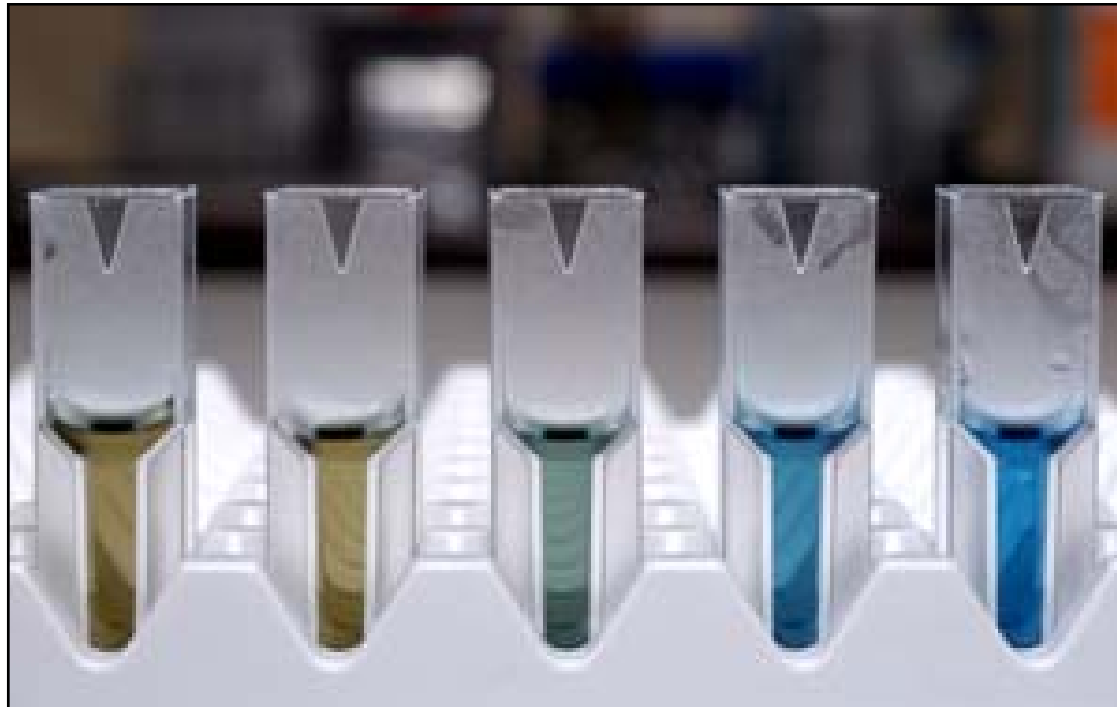
Entfärben des Gels

- Waschen des Gels mit deionisiertem Wasser (mehrmals Wasser wechseln)
- Gel mit Wasser bedecken, 3 min Mikrowelle
- wiederholen bis Gel genügend entfärbt.

IMAC

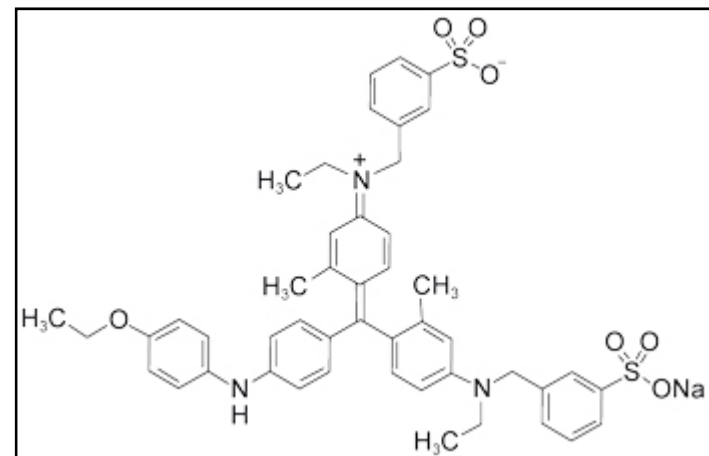


Proteinbestimmung



Proteinbestimmung nach Bradford

- Verschiebung des Absorptionsmaximums von *Coomassie Brilliant Blue G-250* in saurer Lösung von 465 nm zu 595 nm durch Bindung an Proteine (basische und hydrophobe Aminosäuren; Bradford, 1976)
- Der Farbstoff *coomassie brilliant blue G-250* kommt in drei Zuständen vor, die jeweils bei unterschiedlichen Wellenlängen absorbieren.



Proteinbestimmung

Eichkurve: 0,2,4,6,8,10 µg BSA „bovine serum albumin“

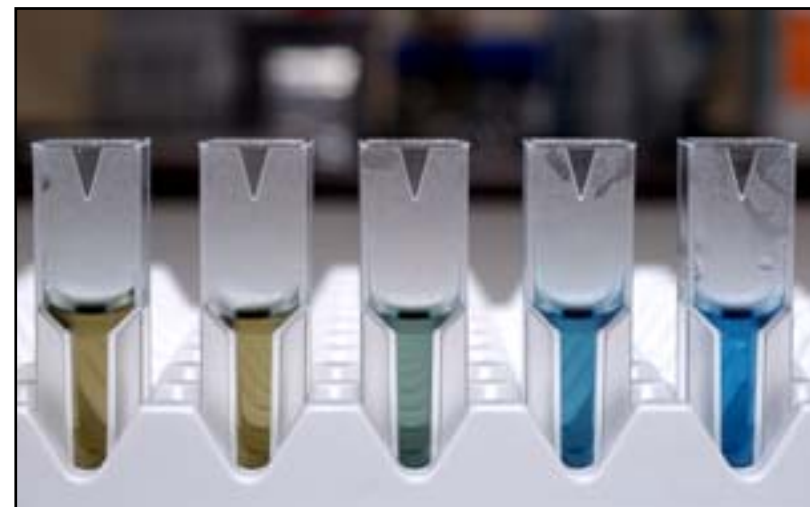
Standard: 0,2 µg/µl

µg BSA in der Küvette	0	2	4	6	8	10
µl BSA-Lösung	0	10	20	30	40	50
µl dest H ₂ O	600	590	580	570	560	550

Proben:

- **1:100 Verdünnung** (H₂O) Rohextrakt
- **unverdünnt** Elutions-Fraktion
- **jeweils 5, 10, 20 µl** einsetzen
(ad 600 µl H₂O)
- Start: 400 µl Biorad-Reagenz
- Mischen, 15 min RT
- Extinktion bei 595 nm

!! Parallel zur Eichkurve !!

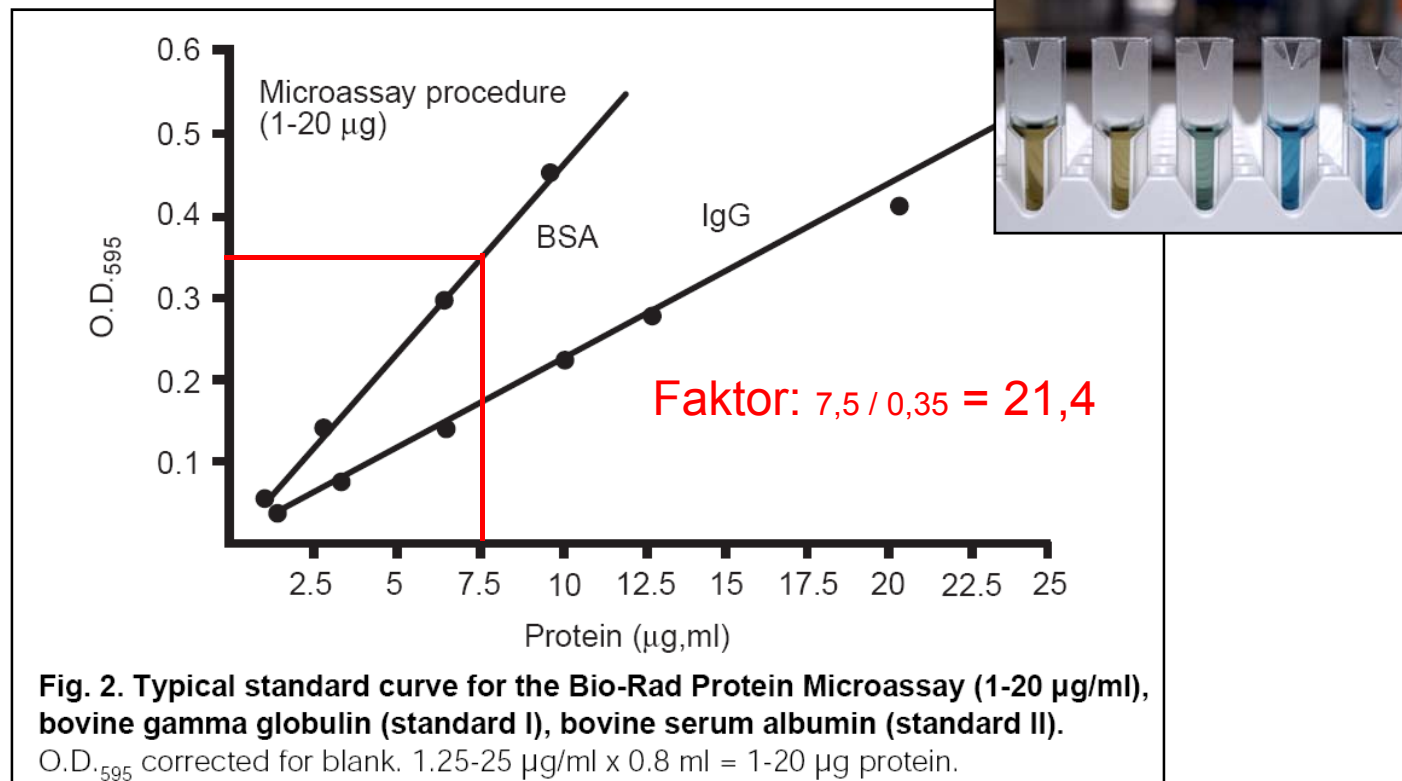


Proteinbestimmung

Proteinkonzentration [mg/ml] = $E_{595} \times \text{Faktor} \times \text{Verdünnung}$

- Bsp:
- Rohextrakt Verdünnung 1:100
 - 20 µl Probe / ml (Verdünnung 1:50),
 - Gesamt Verdünnung 1:5000
 - $E_{595} = 0,5$

Proteinkonzentration Probe = $0,5 \times 5000$ (Verdünnung) $\times 21,4$ (Faktor Eichgerade)
= 53.500 µg/ml = 53,5 mg/ml



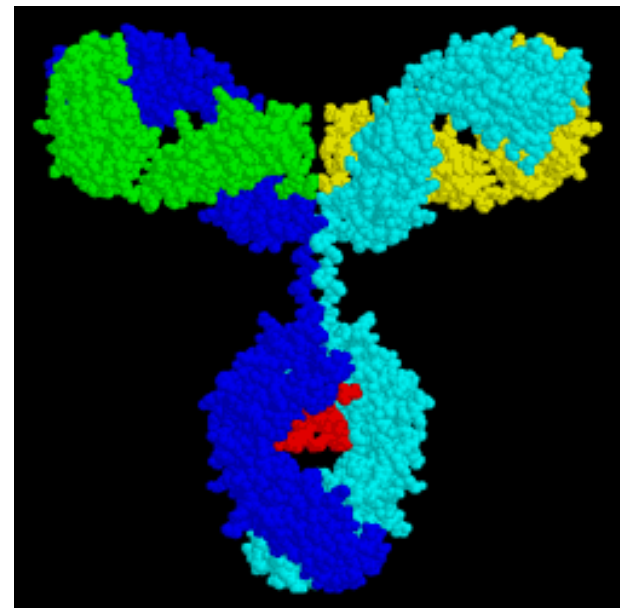
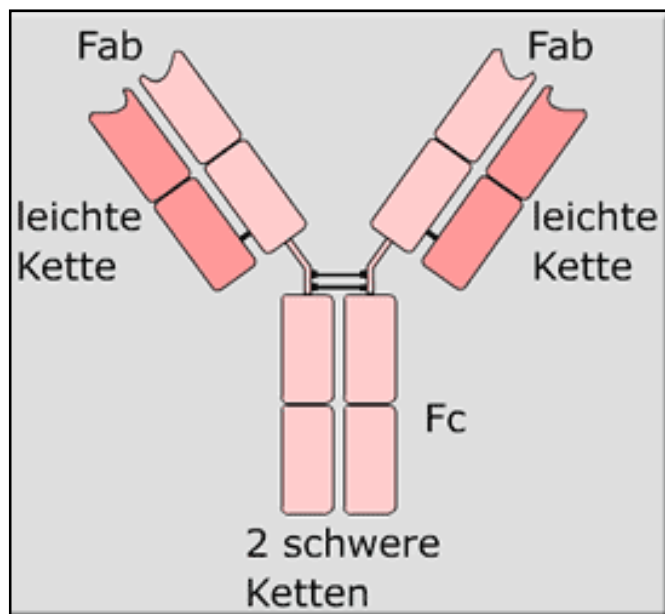
Proteinbestimmung

<i>assay</i>	Prinzip	Bereich	Störungen	Bemerkungen
Biuret	Cu ²⁺ -Reaktion mit Peptidbindung	1 – 20 mg	NH ₄ ⁺ , Tris, Good's Puffersubstanzen	schnell; wenig empfindlich
Lowry	Cu ²⁺ -Reaktion mit Peptidbindung; Reduktion von Phosphormolybdat und Phosphorwolframat durch Tyr und Trp	2 – 100 µg	NH ₄ ⁺ , Mercaptoverbindungen	langsam; abhängig von Proteinzusammensetzung; Färbung nicht stabil
BCA	Cu ²⁺ -Reaktion mit Peptidbindung; Cu ⁺ -Reaktion mit Bicinchoninat	0.2 – 50 µg	NH ₄ ⁺ , EDTA	geeignet für detergentenhaltige Lösungen
Bradford	Coomassie-Brilliant-Blue-Bindung an basische und aromatische Aminosäurereste	0.2 – 20 µg	Triton X-100, SDS	schnell
280 nm	π-π* Absorption aromatischer Aminosäurereste	20 – 3 000 µg	Nukleinsäuren	Störungen durch Nukleinsäuren können korrigiert werden; keine Eichung notwendig
205 nm	n-π* Absorption der Peptidbindung	1 – 100 µg	viele Puffersubstanzen, Additive, etc.	verlangt sehr exakte Messung (Wellenlängeneinstellung, Abgleich mit Puffer); sehr empfindlich gegenüber Streuung; keine Eichung notwendig

Westernblot – Anwendungen

Immunoblot (Western blot) Anwendung:

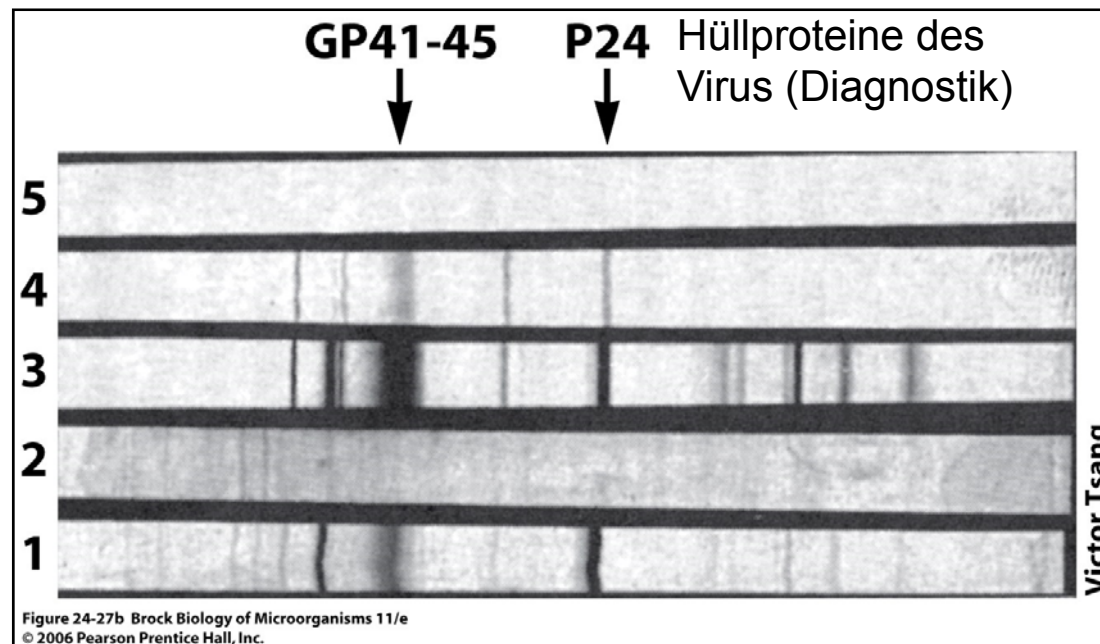
- Detektion von Antikörpern für spezifische Antigene
- Nachweis von Antigenen
- Nachweis posttranslationaler Modifikationen



Westernblot & Immunodetektion

Human immunodeficiency detection (HIV)

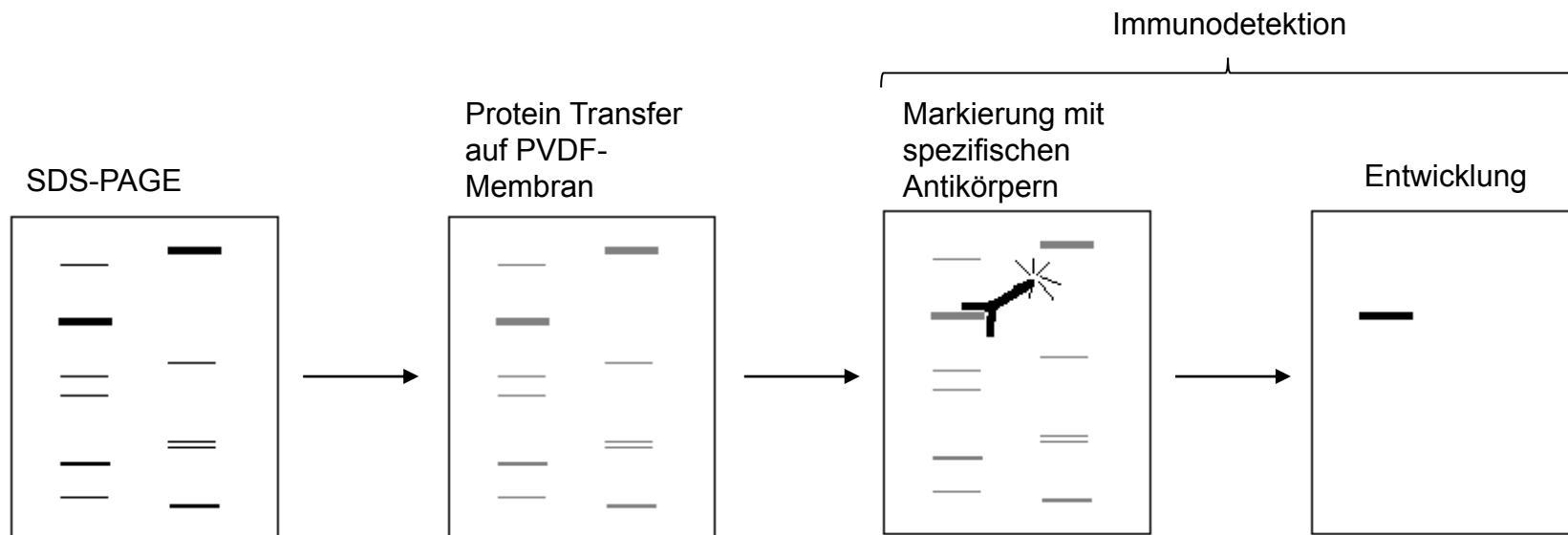
- 1) Positives Kontroll-Serum (AIDS Patient)
- 2) Negativ Kontrolle (gesunder Freiwilliger)
- 3) Stark positiver Patient
- 4) Schwach positiver Patient
- 5) „Blank“ Hintergrund (unspezifische Bindung)



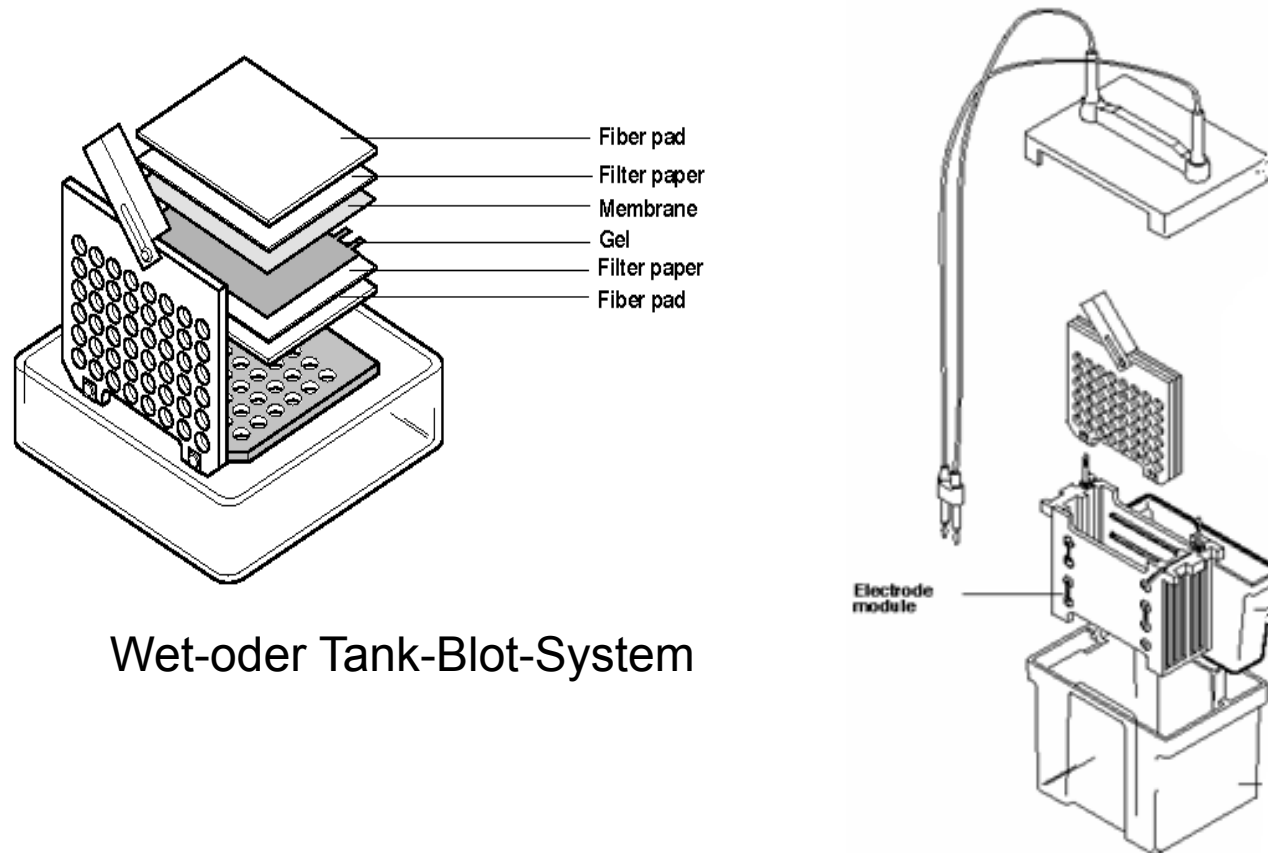
Westernblot

➤ = Transfer von elektrophoretisch aufgetrennten Proteinen auf eine Träger-Membran (PVDF = Polyvinylidenfluorid; Nitrocellulose)

1. Elektrophoretische Auftrennung (SDS-PAGE)
2. Elektrophoretischer Transfer der Proteine vom Gel auf eine Membran
3. Immunodetektion mit spezifischen Antikörpern



Westernblot

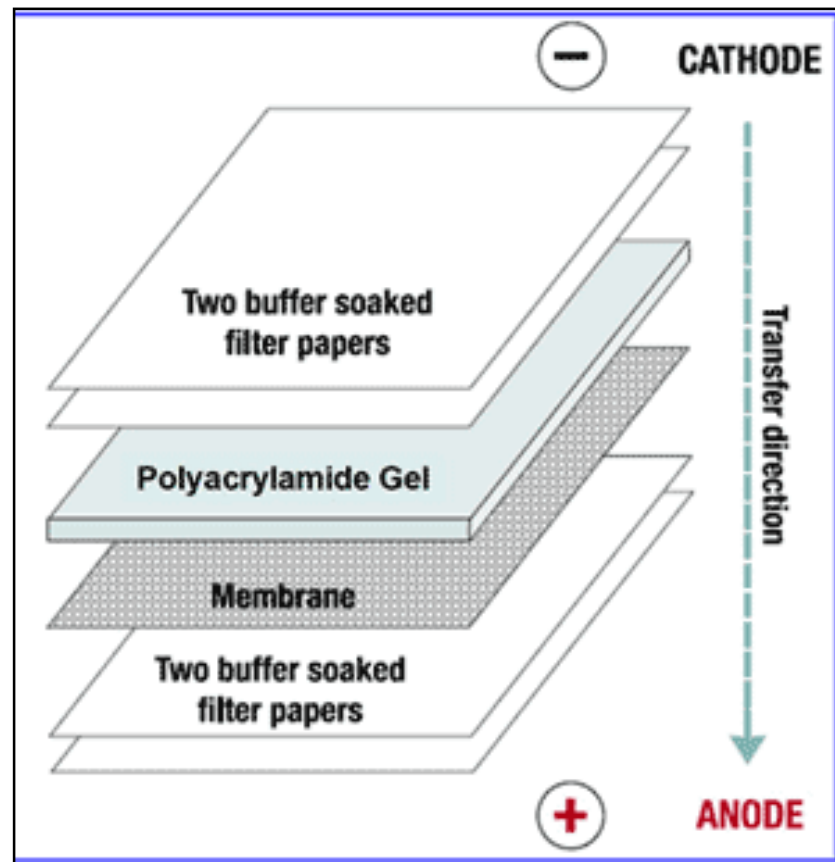


Wet-oder Tank-Blot-System

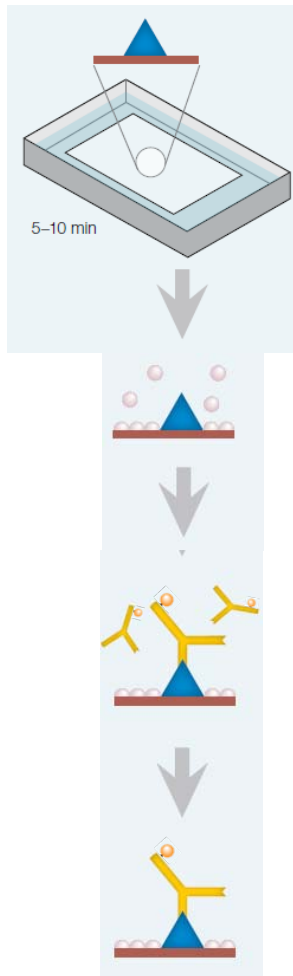
- SDS-Gel, Fiber pads und Filter Papier in Transferpuffer equilibrieren
- PVDF Membran zunächst in 100% Methanol aktivieren und dann in Transferpuffer equilibrieren

Westernblot

- Transfer von elektrophoretisch aufgetrennten Proteinen auf eine Träger-Membran (PVDF = Polyvinylidenfluorid; Nitrocellulose)



Immunodetektion

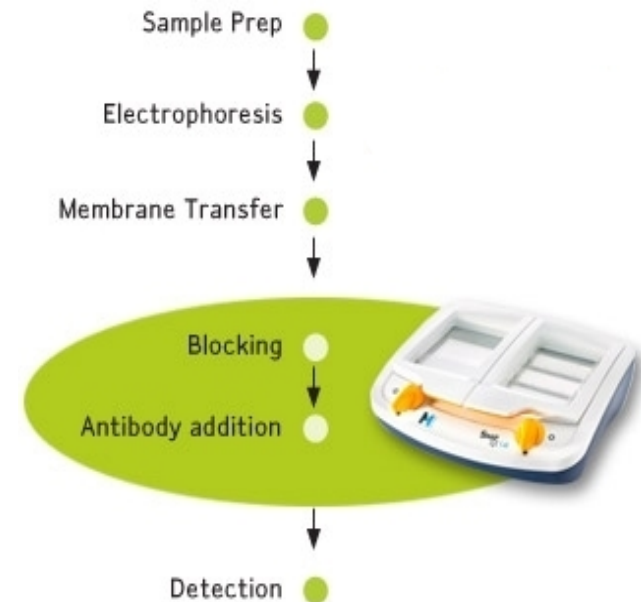


Waschen, 3 x mit je 30 ml PBST-Puffer (1x PBS + 0,3% Tween-20) unter laufendem Vakuum

Blocken der freien Bindestellen auf der Membran, mit PBST + 5 % Milchpulver unter laufendem Vakuum

AP-konjugierter Primärantikörper **Anti-His-tag AK**, 1:1000 (10 µl in 10 ml) in 3 ml PBST + 2,5 % Milchpulver 10 min **ohne Vakuum**

Waschen, 3 x mit je 30 ml PBST-Puffer (1x PBS + 0,3% Tween-20) unter laufendem Vakuum

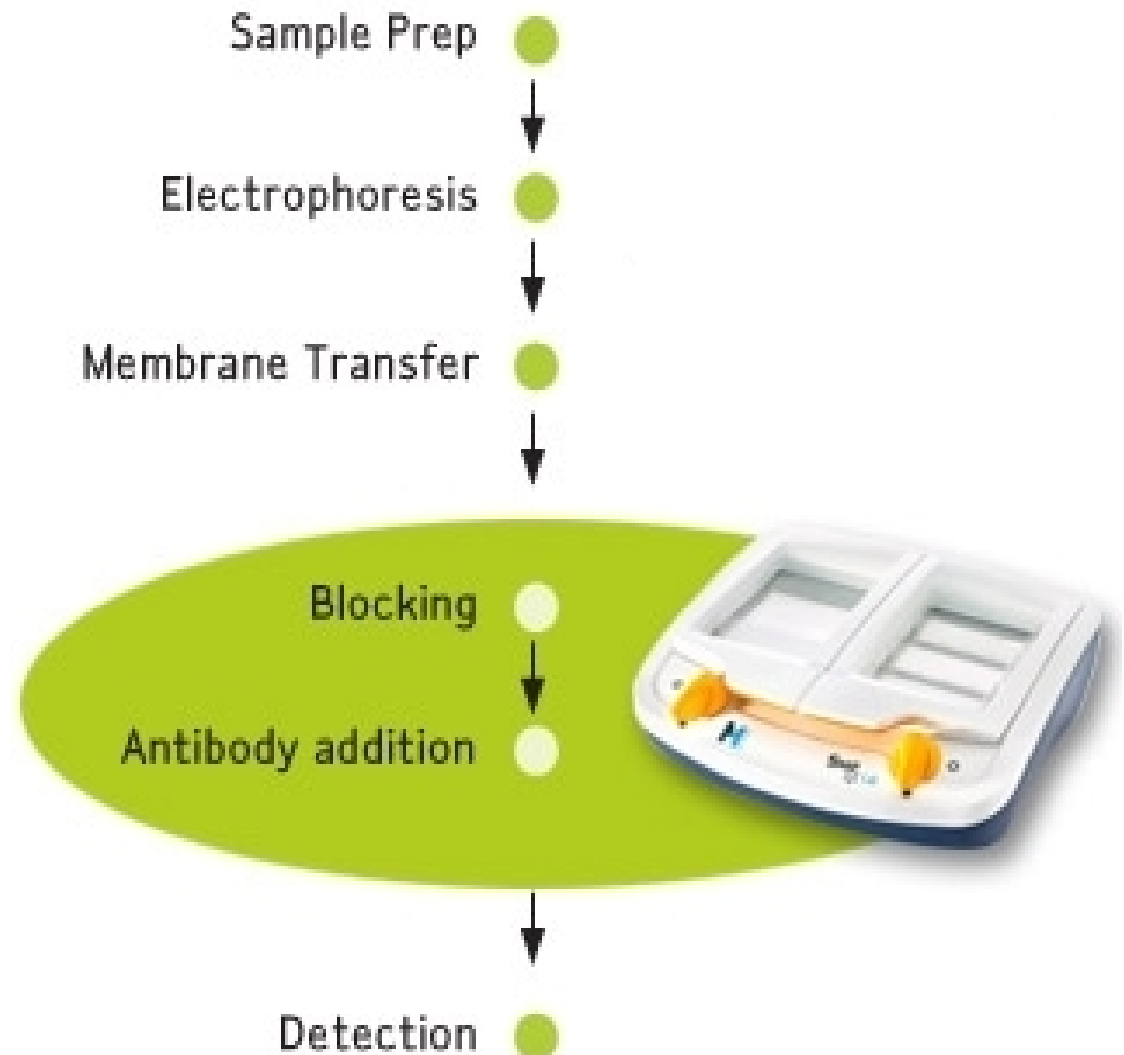


SNAP i.d. Western Blot System

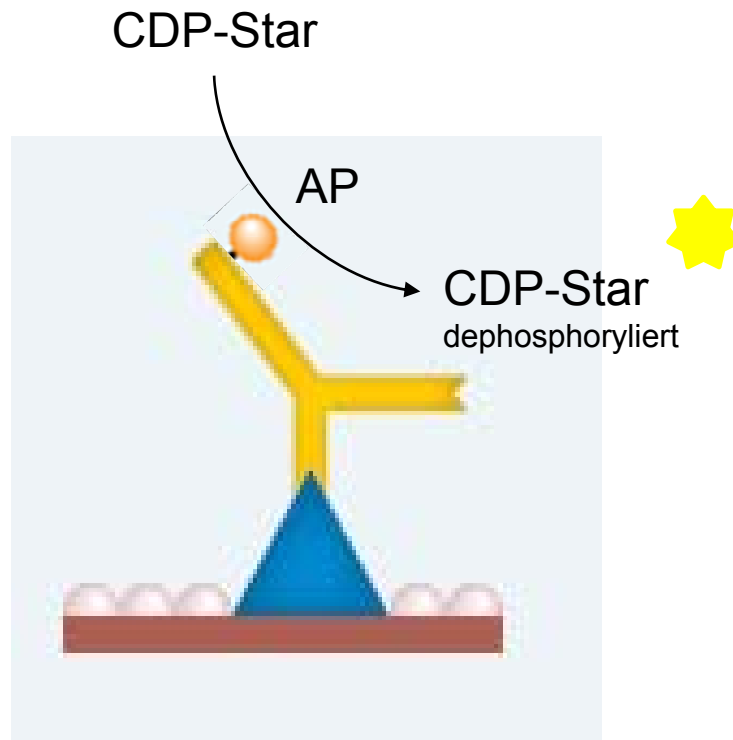
- SNAP i.d.™ Western Blot-System ermöglicht den Proteinnachweis auf der Blottingmembran innerhalb von 30-60 Minuten.
- Mittels Vakuum werden alle verwendeten Lösungen durch die Membran gesaugt.

Vorteile:

- Blots mit niedrigem Hintergrund
- Zeitersparnis von mindestens 4 Stunden

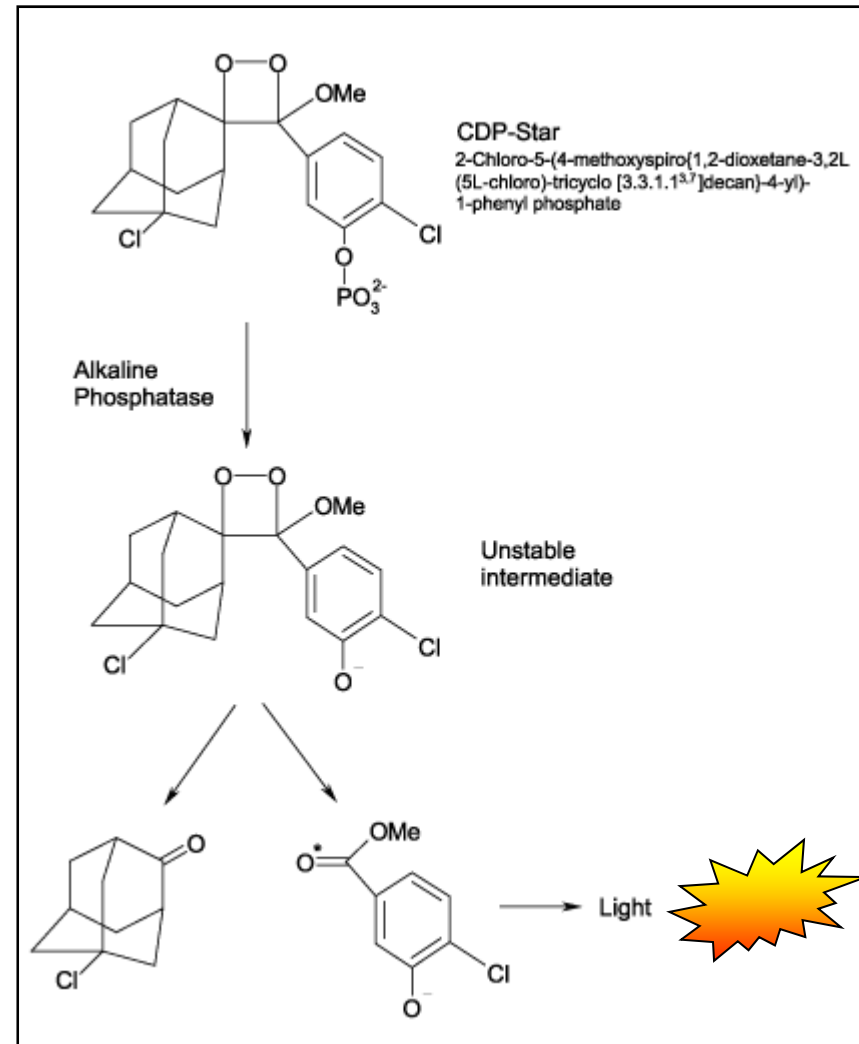
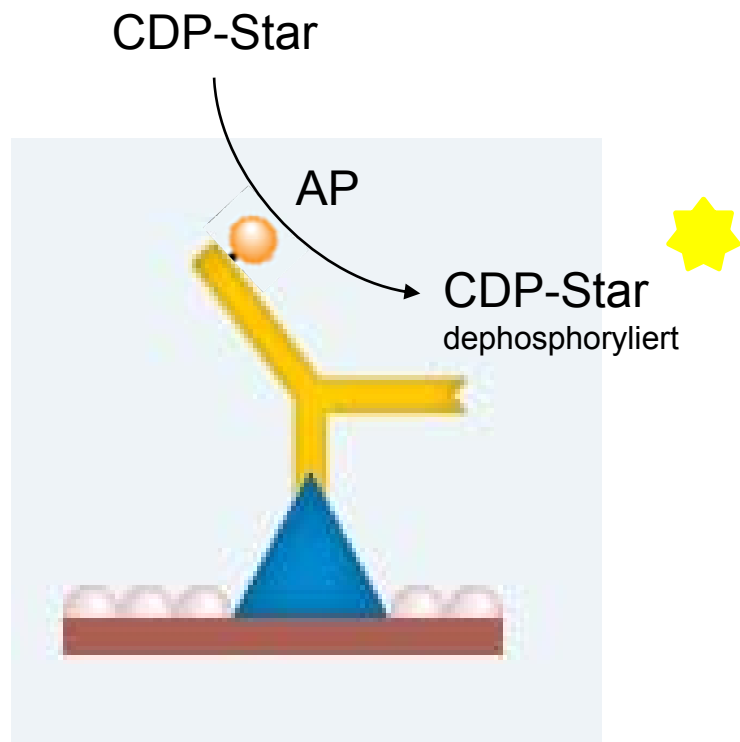


Immunodetektion



- Primärer Antikörper:
Anti-His-Tag AK
(mouse (Firma Abcam))
- **Alkalische Phosphatase**
(AP) konjugiert
- Substrat: CDP Star

Immunodetektion



Immunodetektion

- **Entwickeln:** 2 x mit H₂O Bidest. In Schale waschen
- Blot in eine Klarsichthülle legen (mit EtOH säubern) und mit ~ 1 ml CDP-Star überschichten (je nach Blotgröße!)
- Folie **blasenfrei!** schließen
- 5 min Inkubation
- **Detektion** der Chemilumineszens
VersaDoc (BioRad)

