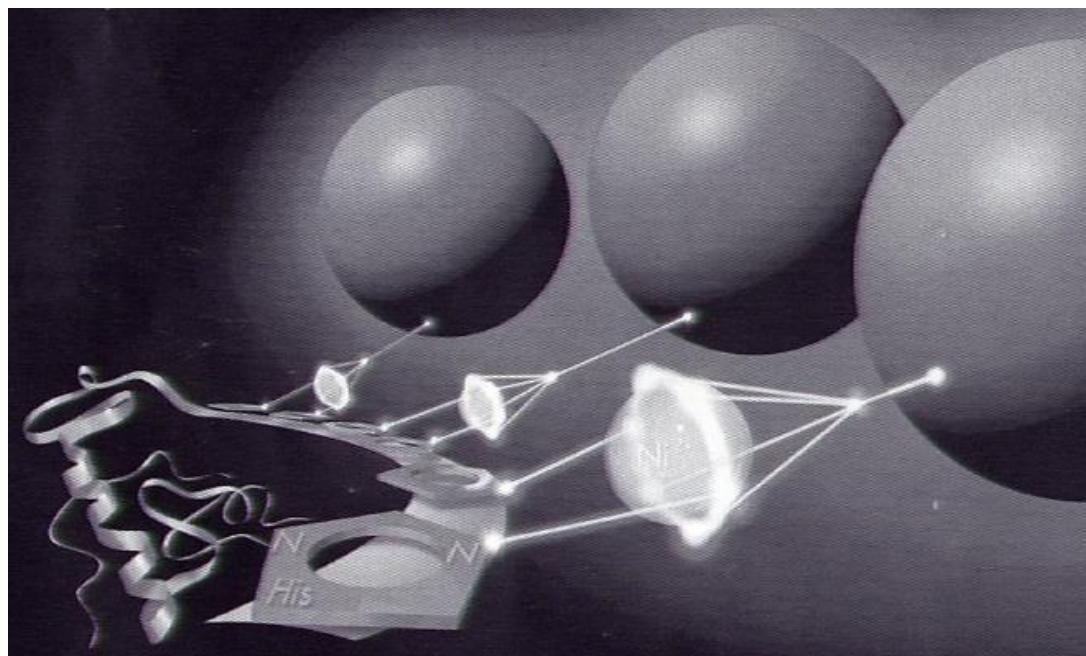


Biochemisches Praktikum 2017/2018

UNIVERSITÄT
DUISBURG
ESSEN

Biotechnologie (Molekularbiologie & Biochemie)

Bachelor: Water Science



INHALTSVERZEICHNIS

Inhaltsverzeichnis	Seite
Zeitplan	1
Vorwort	1
Ziel des Praktikums	3
Einführung Labor & Transformation von <i>E. coli</i> -Zellen	5
Kolonie-PCR	7
Agarose-Gelelektrophorese	12
Plasmid-Präparation	16
Restriktionsanalyse	17
Zellanzucht & Induktion der Proteinexpression	22
Herstellung von SDS-Gelen	25
Zellaufschluß	30
Aktivitätsprüfung	31
Proteinreinigung	32
Indikatorplattentest	33
SDS-PAGE	35
Proteinbestimmung (Bradford)	38
Western Blotting	41
Immunodetektion	44
Biochemische Proteincharakterisierung	46
Anhang	55
<i>Escherichia coli</i> -Expressionsstamm BL21(DE3)	55
Medienrezepte	55
Dokumentation der Versuche (Versuchsprotokoll)	59

ZEITPLAN 2017

MITTWOCH 25.10.2017 **08:00 UHR** **SICHERHEITSUNTERWEISUNG T03 R02 D39**

MONTAG 06.11.2017 **08:00 UHR** **VORBESPRECHUNG T03 R02 D39**

13:00 UHR **LABOR S05 T02 A32**

(VORBEREITUNG DER LABORMATERIALIEN, TRANSFORMATION VON KOMPETENTEN ZELLEN)

DIENSTAG 07.11.2017 **10:00 UHR** **VORBESPRECHUNG S06 S00 B41**

DANACH **LABOR S05 T02 A32**

(KOLONIE-PCR, AGAROSE-GELELEKTROPHORESE, ANIMPFEN VON ÜBERNACHT-KULTUREN)

MITTWOCH 08.11.2017 **08:00 UHR** **VORBESPRECHUNG T03 R02 D39**

DANACH **LABOR S05 T02 A32**

16:00 UHR **SEMINAR T03 R02 D39**

DONNERSTAG 09.11.2017 **8:00 UHR** **VORBESPRECHUNG T03 R02 D39**

DANACH **LABOR S05 T02 A32**

16:00 UHR **SEMINAR S05 T05 B01**

FREITAG 10.11.2017 **08:00 UHR** **VORBESPRECHUNG T03 R02 D39**

DANACH **LABOR S05 T02 A32**

(PLASMID-PRÄPARATION, KONTROLL-RESTRIKTION, AGAROSE-GELELEKTROPHORESE)

MONTAG 13.11.2017 **08:00 UHR** **VORBESPRECHUNG T03 R02 D39**

13:00 UHR **LABOR S05 T02 A32**

(EXPRESSION, HERSTELLUNG VON SDS-GELEN)

DIENSTAG 14.11.2017 **10:00 UHR** **VORBESPRECHUNG S06 S00 B41**

DANACH **LABOR S05 T02 A32**

(ZELLAUFSCHLUSS, PROTEINAUFAUFRUNGSUNG, INDIKATORPLATTENTEST)

MITTWOCH 15.11.2017 **08:00 UHR** **VORBESPRECHUNG T03 R02 D39**

DANACH **LABOR S05 T02 A32**

16:00 UHR **SEMINAR T03 R02 D39**

(SDS-PAGE, WESTERN BLOT (TRANSFER), BRADFORD-BESTIMMUNG)

DONNERSTAG 16.11.2017 8:00 UHR **VORBESPRECHUNG T03 R02 D39**

DANACH **LABOR S05 T02 A32**

16:00 UHR **SEMINAR S05 T05 B01**

(WESTERN-BLOT & DETEKTION, BIOCHEMISCHE PROTEIN-CHARAKTERISIERUNG)

FREITAG 17.11.2017 08:00 UHR **VORBESPRECHUNG T03 R02 D39**

DANACH **LABOR S05 T02 A32**

(WESTERN-BLOT & DETEKTION, BIOCHEMISCHE PROTEIN-CHARAKTERISIERUNG,
AUFRÄUMEN, GGF. VERSUCHSWIEDERHOLUNG)

PROTOKOLL-ABGABE BIS SPÄTESTENS 01.12.2017 UM 12 UHR

KORRIGIERTE PROTOKOLLE KÖNNEN AM 18.12.2017 ABGEHOLT WERDEN

ABGABE EVTL. ÜBERARBEITETER PROTOKOLLE BIS SPÄTESTENS 08.01.2018

UM 15 UHR

PRAKTIKUM BIOCHEMIE, WS 2017/18

AG PROF. SIEBERS

VORWORT

Das Praktikum findet vom 06.11.2017 – 17.11.2017 jeweils von 8:00 Uhr bis ca. 18:00 Uhr statt. Die genauen Praktikumszeiten werden in den täglichen Vorbesprechungen bekannt gegeben. **Bitte auch gesonderte Ankündigungen hierzu beachten!**

Ein Wort zum wissenschaftlichen Umfeld

Sie bearbeiten im Rahmen dieses Praktikums Themen aus der Biochemie und der Molekularbiologie. Für beide Bereiche gilt **natürlich** die Grundlage des guten wissenschaftlichen Arbeitens. Beachten Sie für die chemischen Handhabungen, dass Sie entsprechend den Einweisungen sorgfältig und vorsichtig mit teuren Geräten und Komponenten umgehen! Im Bereich der biochemisch-molekularbiologischen Arbeiten beachten Sie bitte, dass Sie mit empfindlichen biologischen Molekülen und z.T. mit lebenden Zellen und wertvollen Enzymen arbeiten. Diese entfalten ihre Funktion nur in der natürlichen - üblicherweise wässrigen - Umgebung und können bei unsachgemäßer Handhabung denaturieren, d.h., **ihre Funktion verlieren**. Dies gilt in gleicher Weise, wenn durch unsauberes Arbeiten Verunreinigungen in zu erstellende oder vorgegebene Lösungen eingetragen werden. **Entsprechend ist sorgfältiges und peinlich sauberes Arbeiten strikte Voraussetzung zum Verbleib in diesem Praktikum.** Beachten Sie, dass Sie diese Arbeiten unter der Sicherheitsstufe S1 nach Biostoffverordnung durchführen. Für diese Arbeiten mit biologischem Material gilt, dass diese, wie auch die benutzten wegwerfbaren Gerätschaften **nicht in den normalen Abfall gehören**. Sie müssen die Vorschriften für das Arbeiten in biologischen Labors unbedingt beachten. Über diese Vorschriften wurden/werden Sie im Rahmen der Sicherheitsunterweisung informiert und haben sich verpflichtet diese zu beachten. Auch liegen die Informationen im Praktikum aus. **Nicht-Beachten der entsprechenden Sicherheitsvorschriften führt zum Ausschluss aus dem Praktikum.**

Ein Wort zu den Arbeitsplätzen

Ihnen wird für dieses Praktikum ein **komplett** ausgestatteter Arbeitsplatz zur Verfügung gestellt. Zusätzlich werden Geräte bereitgestellt, die von allen Gruppen gemeinsam genutzt werden. Prüfen Sie die Gerätschaften vor Beginn Ihres Praktikumstages auf Vollständigkeit und Funktionsfähigkeit. Sollten Fehlbestände oder nicht-funktionsfähige Geräte vorhanden sein, teilen Sie dies bitte vor Beginn dem Assistenten mit.

Beachten Sie, dass die Ausstattung eines Arbeitsplatzes **teuer** ist, Steuergelder bzw. Gelder aus Studiengebühren kostet und die Reparatur bzw. im schlimmsten Fall Neubeschaffung erstens Zeit und zweitens Geld kostet. Die Geräte sollen auch von Studierenden in den Semestern nach Ihnen verwendet werden und somit in „gutem Zustand“ sein. Sollten also während Ihres Versuches ein Gerät defekt werden, teilen Sie dies umgehend mit!! Sollten Sie eine der Ihnen ausgeteilten Pipetten zerstören oder beschädigen; so müssen sie diese auch bezahlen!!

Ihr Praktikum endet mit der ordnungsgemäßen Übergabe des Laborplatzes, sowie der Abgabe wissenschaftlich korrekter Protokolle.

PROTOKOLL-ABGABE BIS SPÄTESTENS 01.12.2017 UM 12 UHR

KORRIGIERTE PROTOKOLLE KÖNNEN AM 18.12.2017 ABGEHOLT WERDEN

ABGABE EVTL. ÜBERARBEITETER PROTOKOLLE BIS SPÄTESTENS 08.01.2018

UM 15 UHR

ZIEL DES PRAKTIKUMS

Biotechnologie bezeichnet den Einsatz biologischer Systeme im Rahmen technischer Prozesse und industrieller Produktion. Die **Produktion rekombinanter Proteine** ist ein wichtiger Zweig der Biotechnologie. Man unterscheidet zwischen der Massenproduktion von z.B. Proteasen, Amylasen und Lipasen für Waschmittel und der Produktion kleiner Mengen therapeutischer oder für die Forschung relevanter Proteine. Der Bedarf an Proteinen, die in Waschmitteln eingesetzt werden, liegt bei vielen 1 000 Tonnen/Jahr. Der Bedarf an therapeutischen Proteinen liegt im Bereich von einigen kg pro Jahr.

Das Ziel dieses Praktikums ist, Ihnen Kenntnisse über die rekombinante Expression von Proteinen in *Escherichia coli*, sowie über die Reinigung und biochemische Charakterisierung von Proteinen zu vermitteln. Dies soll am Beispiel einer **Esterase** gezeigt werden. Dabei wird zunächst der Expressionsstamm überprüft (Amplifikation des Esterase Gens über Kolonie PCR, Restriktion der Plasmid DNA), die Reinigung des His-Tag-Proteins durchgeführt, sowie anschließend dessen Aktivität untersucht.

Um ein Protein gezielt untersuchen zu können, benötigt man dieses in großen Mengen und in möglichst reiner Form. Dies wird in der Regel dadurch erzielt, dass das kodierende Gen in einen Expressionsvektor kloniert wird. Es folgt die Transformation eines Wirtsstamms (häufig *E. coli*). Die einzelnen Arbeitsschritte bis zur Fertigstellung eines entsprechenden Überexpressionsstamms zur Produktion des rekombinanten Proteins sind folgende:

1. Isolierung der genomischen DNA aus dem Spenderstamm
2. Amplifikation des Zielgens mittels PCR
3. Isolierung und Verdau des Vektors (Expressionsplasmid)
4. Klonierung des Gens in den Vektor
5. Transformation des Wirtsstamms mit dem Vektor → Gewinnung des Expressionsstamms.

Im Praktikum werden wir das entsprechende Esterase-Expressionsplasmid zur Verfügung stellen, welches Sie zur Transformation des Wirtsstamms nutzen und zunächst über entsprechende molekularbiologische Methoden (Kolonie-PCR, Restriktionsanalyse der Plasmid DNA) überprüfen.

Die Gewinnung des Zielproteins in möglichst hoher Konzentration und möglichst reiner Form bis zur Charakterisierung umfasst die folgenden Schritte, die Sie im Praktikum durchführen werden:

6. Anzucht der Expressionszellen
7. Induktion der Expression
8. Aufschluss der Zellen
9. Isolierung & Aufreinigung des Proteins
10. Charakterisierung des Proteins

1. Tag

(Mo, 06.11.2017)

EINFÜHRUNG IM LABOR, VORBEREITUNG DER LABORMATERIALIEN, TRANSFORMATION DER KOMPETENTEN ZELLEN

EINFÜHRUNG IM LABOR

Machen Sie sich an diesem Tag mit den Gegebenheiten des Labors (Einrichtung Arbeitsplatz, sicherheitsrelevante Einrichtungen etc.) vertraut.

Die Betreuer werden mit Ihnen den richtigen Umgang mit Kolbenhubpipetten, das Pipettieren kleiner Volumina und den richtigen Umgang mit Zentrifugen besprechen und üben.

Für die Durchführung der Experimente ist steriles arbeiten, zur Vermeidung von Kontamination durch Luftkeime, notwendig. Darum ist arbeiten am Brenner vorgesehen!!

VORBEREITUNG DER LABORMATERIALIEN (REZEPTE SIEHE ANHANG)

Je Gruppe:

- 100 ml LB-Medium für Expressionskultur (wird von den Betreuern gestellt)
- 100 ml LB-Agar für 2 Platten (mit Ampicillin Endkonz.:100 µg/ml; Stammlsg.:100 mg/ml) (werden von den Betreuern gestellt)

Antibiotika-Zugabe erfolgt erst NACH dem Autoklavieren, wenn die Lösung auf ca. 55 °C (handwarm) heruntergekühlt ist.

- 12 Reagenzgläser mit je 5 ml LB-Medium (werden von den Betreuern gestellt)

Allgemein:

- 2x 400 mL 1%-ige Agarose-Lösung
- Herstellung 1x TAE-Puffer
- Herstellung 100 mg/ml Ampicillin (100x)

TRANSFORMATION DER KOMPETENTEN *E.COLI* ZELLEN

Die *E. coli*-Zellen sind normalerweise nicht kompetent und werden erst durch Behandlung mit CaCl₂ kompetent gemacht. Anschließend werden die Zellen schockgefroren und bei -80 °C gelagert. Während des sogenannten

Hitzeschocks kommt es zur Aufnahme der Plasmid-DNA und die Zellen werden transformiert.

Material:

- 100 µl kompetente Zellen *E. coli* BL21(DE3)
- 2 µl Plasmid-DNA (pET19b::*EstCE*)
- 400 µl LB-Medium (ohne Ampicillin)
- LB-Agar-Platte (mit Ampicillin)

Durchführung:

- Steriles Arbeiten am Brenner
- Nach Auftauen der Zellen auf Eis (ca. 5 min), werden sie mit der Plasmid-DNA versetzt und für 30 min auf Eis inkubiert.
- Dann folgt ein Hitzeschock für 80 sec bei 42 °C, kurz im Eis abkühlen und die Regeneration in 400 µl LB-Medium für 45 min bei 37 °C / 180 rpm (Inkubator)
- Anschließend werden 100 µl der Zellsuspension auf einer LB-Agar-Platte (Ampicillin) ausplattiert, den Rest der Suspension 3 min, 4.000 rpm und Raumtemperatur (RT) zentrifugieren, den Überstand bis auf ca. 100 µl abnehmen, das Zellpellet vorsichtig lösen und ausplattieren. Die Platten werden über Nacht bei 37 °C inkubiert.

Wichtig: Drigalski-Spatel ausreichend abkühlen lassen nach dem Abflämmen!!!

2. Tag

(Di, 07.11.2017)

KOLONIE-PCR & ANIMPfen VON ÜBERNACHTKULTUREN & AGAROSE-GELELEKTROPHORESE

ÜBERPRÜFUNG DES EXPRESSIONSSTAMMES DURCH KOLONIE-PCR

Die **Polymerasekettenreaktion (PCR)** dient der Amplifikation (=Vervielfältigung) ausgewählter DNA-Bereiche (z.B. genomische DNA oder Plasmid-DNA). Hier nutzen wir die sog. **Kolonie-PCR** als Wachstums-unabhängige, schnelle Methode, um Einzelkolonien des Expressionsstamms (*E.coli* BL21(DE3)) auf die Präsenz des Plasmides mit dem entsprechenden Insert (Esterase Gen) zu überprüfen.

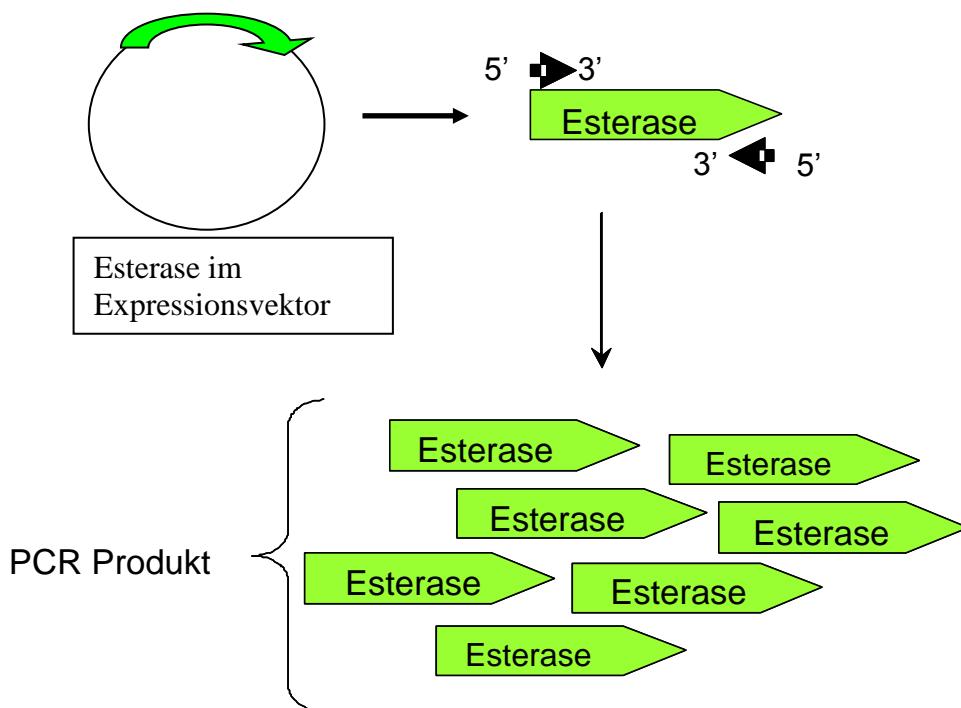


Abbildung 1: PCR Amplifikation des Esterase-Gens aus Plasmid DNA.

Material:

- 1 LB-Agar-Ampicillin Platte mit Einzelkolonien (vom Vortag)
- 5 PCR-Cups
- Tris-Puffer (10 mM Tris/HCl, pH 7,0)

-
- 8 Reagenzgläser mit 5 ml LB Medium + 100 µg/ml Ampicillin 1 LB-Agar-Ampicillin Platte

Durchführung:

- Aufteilung des Tris-Puffers auf 4x 1,5 ml Reaktionsgefäß (50 µl pro 1,5 ml Reaktionsgefäß)
- Vorbereitung der LB-Agar-Platte: Platte einteilen in 4 Felder
- Vorbereitung des 5 ml LB-Medium: Ampicillin Zugabe
- Jede Gruppe wählt 4 Kolonien aus, die sie für die Kolonie-PCR und Plasmid Präparation (3. Tag) einsetzt. Das Plasmid (Expressionsvektor) kodiert für eine Ampicillin-(Antibiotika) Resistenz und erlaubt so über die Anwesenheit von Ampicillin im Medium auf *E. coli* Zellen, die dieses Plasmid besitzen, zu selektieren.
- Die folgenden Schritte werden analog für alle 4 Kolonien durchgeführt
- Benutzen Sie jeweils eine sterile Spitze, um eine Kolonie zu „picken“ (abzunehmen). Mit dieser Spitz werden folgende Schritte durchgeführt:
 1. LB-Agar-Ampicillin Platte (Klone 1-4 markieren, kurzer Strich über die LB-Agar-Platte; dient als Replikat)
 2. 1,5 ml Reaktionsgefäß für die Kolonie-PCR mit 50 µl Tris-Puffer (Spitze kurz eintauchen und einmal rühren)
 3. 5 ml LB-Medium + Ampicillin (ebenfalls kurz eintauchen und rühren; als mögliche Vorkultur für Expression)
 4. Spitze in einem zweiten Röhrchen mit 5 ml LB Medium + Ampicillin abwerfen. Diese Kultur dient der Plasmid-Präparation (3. Tag)

!! Alle Arbeiten sind steril in der Nähe des Bunsenbrenners aus zu führen!!

Bitte beachten Sie die entsprechende Nummerierung der Reaktionsgefäß und Platten (Gruppennummer nicht vergessen)!

- Die Agar Platten und 5 ml Kulturen werden über Nacht bei 37°C inkubiert (Schrank bzw. Schüttler)
- **Kolonie-PCR:** 4 Kolonien wurden gepickt und in die markierten 1,5 ml Reaktionsgefäß mit Tris-Puffer (50 µl 10 mM Tris/HCl, pH 7,0) überführt (s.o.)

- Die Reaktionsgefäße werden für 5 min bei 94°C zur Zell-Lyse inkubiert.
- Zentrifugation des Zell-Lysats für 1 min bei 13.000 rpm (Raumtemperatur).
- Setzen sie 5 µl des Überstandes direkt in die PCR als Template-DNA (Matrize) ein. Die PCR wird mit der Phusion-Polymerase durchgeführt. Positive Klone werden über Agarose Gelelektrophorese identifiziert.

Die Sequenzen der beiden verwendeten Esterase-Sequenzspezifischen Primer können der Tabelle 1 entnommen werden.

Tabelle 1: Esterase-Sequenz spezifische Primer

Primer	Sequenz 5' – 3'
EstCE-FW	GG CAT ATG TCG ATA GCG GAT CAG TCA
EstCE-REV	GGA TCC TTA GCG AGT AGG TTC GTT TG

NdeI-Schnittstelle, Startcodon
BamHI-Schnittstelle, Stoppcodon

Bestimmung der Schmelztemperatur eines Primers:

$$T_m = ((G + C) \times 4^\circ\text{C} + (A + T) \times 2^\circ\text{C}) - 5^\circ\text{C}$$

- PCR immer ~ 3-5 °C niedriger fahren als der T_m -Wert

Material:

- 5 PCR-Cups
- Primer EstCE-FW
- Primer EstCE-REV
- 5x-Puffer Phusion-Polymerase
- Magnesiumchlorid (im Puffer enthalten)
- Nukleotid Mix (2 mM jedes Nukleotids)
- Template (= Zell-Lysat)
- H₂O (DNAse/RNAse frei; bitte nicht entsorgen, wird während des gesamten Praktikums benötigt)
- Phusion-Polymerase

Durchführung:

- Arbeiten auf Eis!
- Zu jedem PCR-Ansatz gehört eine Negativkontrolle; d.h. statt der DNA (5 µl Zell-Lysat) wird H₂O eingesetzt.
- Beschriften sie die 5 PCR-Cups (Klon 1-4, Kontrolle, Gruppennummer)
- Pipettieren sie einen Mastermix für 6 Reaktionen in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß, beginnend mit dem größten Volumen (hier H₂O) bis hin zu dem kleinsten Volumen, als letztes pipettieren Sie die Phusion-Polymerase (das Template kommt nicht in den Mastermix!!).
- Mischen Sie den Ansatz mit Hilfe einer Pipette.
- Der Mastermix wird auf 5 PCR-Cups (45 µl pro PCR-Cup) aufgeteilt, erst dann werden die 5 µl Template hinzugegeben.

Pipettierschema für eine Reaktion:

	Konzentration der Vorratslösung.	Ansatz Vol. [µl]
Phusion-Puffer	5X	10
§ dNTPs	2 mM	5
§ EstCE-FW	10 µM	2,5
§ EstCE-REV	10 µM	2,5
# Phusion Polymerase	2.5U/µl	1
DNA template/H ₂ O	5	5
H ₂ O (PCR clean*)		24
Total volume		50

§ auf Eis auftauen und lagern

bis zur Verwendung die Phusion-Polymerase bei -20°C im Gefrierschrank lassen, anschließend sofort wieder in den Gefrierschrank bringen.

* DNase- und RNase-freies Wasser

-
- Programmieren Sie die PCR Maschine
(PCR Bedingungen s.u.; die Programmierung der PCR-Maschine wird von den Betreuern vorgenommen)

PCR-Bedingungen:

Zyklus	1.	2 - 31	32
Denaturation	98°C, 30 sec	98°C, 10s	
Annealing		52°C, 30s	
Elongation		72°C, 40s	72°C, 10 min

ZUSATZINFO PCR

Sekundärstrukturen

GC-reiche DNA-Templates bilden oft Sekundärstrukturen aus, die eine hohe Schmelztemperatur besitzen, da GC-Komplexe 3 statt nur 2 Wasserstoffbrücken (wie AT-Komplexe) ausbilden. Das organische Lösungsmittel Dimethylsulfoxid (DMSO) oder der sog. Q-Puffer der Firma Qiagen lösen sich in Wasser, erniedrigen die Bindungsstärke von Wasserstoffbrücken und verringern somit die Bildung von Sekundärstrukturen, die eine Amplifizierung verhindern würden. Bei der Zugabe von z.B. DMSO zum PCR-Ansatz sollte darauf geachtet werden, die Annealing Temperatur der Primer um 1°C zu verringern.

Proof-reading-Polymerasen

So genannte „Proof-Reading“ Polymerasen besitzen neben ihrer DNA-Polymerase-Aktivität auch 3'-5'-Exonuklease-Aktivität. Dadurch können fehlerhaft eingebaute Nukleotide entfernt und dafür die richtigen, zum Template-Strang komplementären Nukleotide eingesetzt werden. Diese sogenannte Proofreading-Aktivität ermöglicht eine 10-12 Mal genauere (fehlerfreie) Amplifikation der Ziel-DNA. Die Phusion-Polymerase besitzt eine solche Proofreading-Aktivität.

AGAROSE GELELEKTROPHORESE

Die Agarose-Gelelektrophorese ist ein Verfahren zur Auf trennung von DNA-Molekülen in einem elektrischen Feld. Agarose, bestehend aus glykosidisch verbundener D-Galaktose und 3,6-Anhydrogalaktose, dient als Matrix, in der die DNA-Moleküle getrennt werden. DNA wandert wegen der negativ geladenen Phosphatgruppen im Desoxyribose-Phosphat-Rückgrat in einem elektrischen Feld zur Anode (+). Die Wanderungsgeschwindigkeit wird durch verschiedene Faktoren, wie die Molekülgröße, die Konformation der DNA, die Agarosekonzentration und die angelegte Gleichspannung, beeinflusst. Lineare, doppel-strängige DNA-Fragmente bewegen sich im Agarosegel indirekt proportional zum dekadischen Logarithmus ihres Molekulargewichtes. Die bei der Agarose-Gelelektrophorese eingesetzte Agarosekonzentration ist abhängig von dem DNA-Molekulargewichtsbereich, in dem eine effektive Auf trennung der Fragmente erfolgen soll. Zur Detektion der DNA wird ein interkalierender DNA-Farbstoff (Ethidiumbromid, GelRed oder Midori Green) eingesetzt, d.h. dieser lagert sich in den Spalt zwischen zwei Basenpaaren ein. So gebunden, zeigt der gewählte Farbstoff bei einer Anregung mit UV- oder Blau-Licht eine starke Fluoreszenz (Extinktion max 532 nm, Emission max 585 nm). Es kann bis zu 1 ng DNA detektiert werden. Eine gut sichtbare DNA-Bande erhält man bei ca. 50-100 ng DNA.

Welche Agarosekonzentration ist zur Auf trennung von DNA-Fragmenten einer bestimmten Größe ideal?

Agarosekonzentration (%)	Größe der DNA-Fragmente (kb)
0,5	30 - 1,0
0,7	12 - 0,8
1,0	10 - 0,5
1,2	7 - 0,4
1,5	3 - 0,2

Um den Erfolg der PCR zu überprüfen, werden die PCR-Produkte elektrophoretisch in einem Agarosegel aufgetrennt. Anhand des Gels kann man folgende Fragen beantworten:

- Ist ein einzelnes PCR-Produkt entstanden?
- Entspricht die Größe des PCR-Produktes den Erwartungen? (Ist es das richtige Produkt?)
- Ist in der Negativ-Kontrolle (Wasser) ein PCR-Produkt zu sehen?

Es wird ein 1%-iges Agarose-Gel und TAE (Tris-Acetat-EDTA) als Puffer verwendet.

Durchführung:

- Jeweils 4 Gruppen teilen sich ein Agarosegel (2 Kämme, à 12 Spuren)
- Die Gelkammern werden zusammengebaut, der Kamm eingesetzt und die am 1. Tag vorbereitete Agarose in die Kammer gegossen. Dabei Bläschenbildung vermeiden.

[Gelkammer und Kämme müssen sauber und trocken sein!](#)

Front, top view

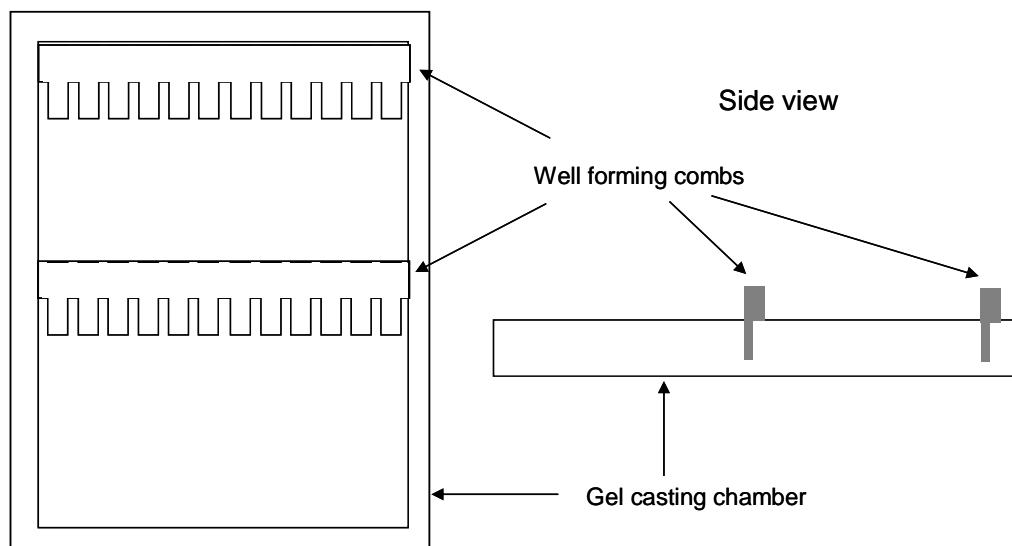


Abbildung 2: Aufbau der Gelkammer, Position des Kammes, Gießen und Beladen des Geles. Ein Kamm wird ca. 1 cm vor dem oberen Ende des Gels platziert (12 Probentaschen).

- Nach ca. 15 min ist die Agarose erstarrt. Nun wird die Kammer mit 1x TAE-Puffer gefüllt (bis das Gel vollständig bedeckt ist). Die Kämme werden entfernt und die Proben können entsprechend des Belegungsschemas (s. Abbildung 3) aufgetragen werden
- Es werden je 10 µl „Loading Dye“–Probenpuffer (6x) zu den 50 µl PCR-Ansätzen gegeben.
- Pipette auf 60 µl einstellen, Probenpuffer und DNA mit der Pipette mischen (durch Aufnehmen und Entlassen)
- 5 µl aus diesem Ansatz entnehmen und 1 µl „Loading Dye“–Probepuffer (6x) und 0,5 µl „Midori Green“ in einem separatem 1,5 ml Eppendorf Cup mischen (für alle Ansätze wiederholen, Beschriftung nicht vergessen)
* „Midori Green“ → Ist ein DNA interkalierender Farbstoff, dieser wird ggf. durch GEL RED ersetzt (Bitte Ankündigungen der Betreuer beachten!)
- jeweils 5 µl in die vorgesehene Geltasche füllen (s. Abbildung 2). Jede Gruppe trägt 5 µl Probe (Kolonie-PCR Klon 1-4) und 5 µl Negativ-Kontrolle auf das Gel auf.
- Vom DNA-Größenstandard „Gene Ruler 1 kb DNA-Ladder“ werden 5 µl pro Spur aufgetragen.

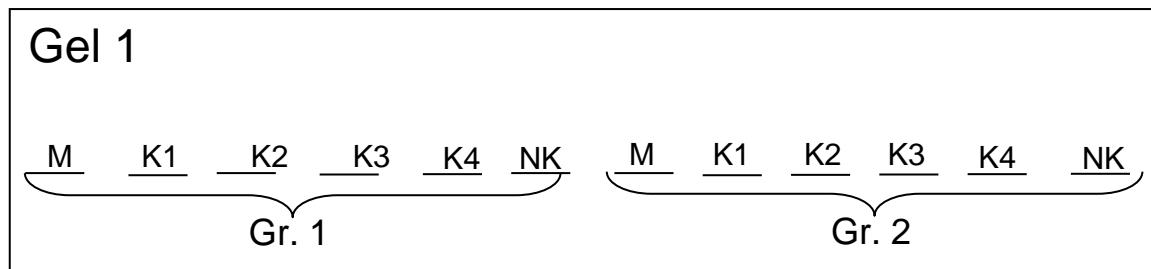


Abbildung 3: Beladung der Agarosegele mit den PCR-Proben; M = Größenstandard (1kb Marker), NK = Negativ-Kontrolle

- **Elektrophorese.** Die Gele laufen mit 100 V/400 mA Spannung ca. 35 min. Die negativ geladene DNA wandert zu der positiv Elektrode (Anode). Überzeugen Sie sich das die Kontakte richtig angeschlossen sind!
- Das Gel unter UV-Licht (GelDoc, BioRad) auf Banden überprüfen (nur unter Aufsicht des Betreuers)

-
- Von den Gelen werden Bilder aufgenommen, die der Ergebnisdokumentation dienen.

Als Größenmarker wird der Gene Ruler 1 kb DNA-Ladder der Firma Fermentas verwendet (s. Abbildung 4).

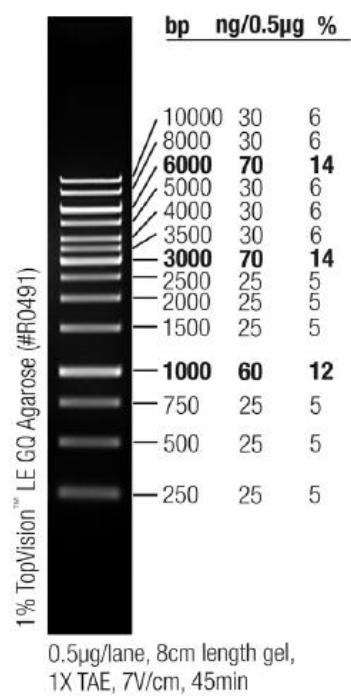


Abbildung 4: Bandenmuster des Markers Gene Ruler 1 kb DNA-Ladder der Firma Fermentas.

3. Tag

(Mi, 08.11.2017)

ÜBERPRÜFUNG DES EXPRESSIONSSTAMMES DURCH PLASMID-PRÄPARATION UND RESTRIKTION

Neben der Wachstums-unabhängigen Methode der Kolonie-PCR wird die Plasmid-Präparation und anschließende Restriktionsanalyse als zweite, Wachstums-abhängige Methode eingesetzt. Wobei die Kolonie-PCR die schnellere, aber nicht immer zuverlässigere Methode ist. Daher werden oftmals beide Methoden gleichzeitig zur Kontrolle/Überprüfung von Klonierungen oder Expressionsstämmen in der Molekularbiologie eingesetzt und sollten übereinstimmende Ergebnisse liefern. Das erste Ziel ist dabei die Isolation der Plasmid-DNA (Expressionsvektor) aus den am 2. Tag hergestellten Übernachtkulturen (5 ml, 4 Klone je Gruppe). Anschließend wird die Plasmid-DNA mit den Restriktionsenzymen *Nde*I und *Bam*HI geschnitten (= restringiert), welche für die Klonierung der Esterase in den Expressionsvektor verwendet wurden (s. Tabelle 1). Ist der Expressionsvektor mit dem entsprechenden Insert vorhanden, sollten auf dem anschließenden Agarosegel zwei Banden der Größen **1167 bp (Insert) und 5705 bp (Vektor)** zu sehen sein.

PLASMID-PRÄPARATION

Die benötigten Puffer (Aliquots) und Säulen stammen aus dem GeneJET™ Plasmid Miniprep Kit (Fermentas) und werden zur Verfügung gestellt.

Durchführung:

- **Resuspensionspuffer** liegt gekühlt vor
- Insgesamt werden 4,5 ml der Übernachtkultur pelletiert
- dazu: ~1,5 ml in ein 1,5 ml Eppendorf Cup pipettieren
2 min zentrifugieren, 7.000 rpm, RT, Überstand verwerfen, und ~1,5 ml der Übernachtkultur im selben E-Cup zentrifugieren, nochmals wiederholen, Überstand verwerfen.

-
- Resuspendieren des Zellpellets in 250 µl **Resuspensionspuffer** (bis das Zellpellet komplett gelöst ist).
 - Zugabe von 250 µl **Lysispuffer**. Mischen durch invertieren! Nicht vortexen!
 - Zugabe von 350 µl **Neutralisationspuffer**. Mischen durch invertieren! Nicht vortexen!
 - 5 min zentrifugieren, 13.000 rpm, RT
 - Überführung des Überstandes durch pipettieren auf die Säule (Kein ausgefälltes Protein überführen!)
 - 1 min zentrifugieren, 13.000 rpm, RT. Durchlauf verwerfen.
 - Säule waschen: 500 µl **Waschpuffer** auf die Säule geben.
1 min zentrifugieren, 13.000 rpm, RT. Durchlauf verwerfen.
 - Säule waschen: 500 µl **Waschpuffer** auf die Säule geben.
1 min zentrifugieren, 13.000 rpm, RT. Durchlauf verwerfen.
 - 2 min „trocken“ zentrifugieren, 13.000 rpm, RT.
 - Säule in ein neues 1,5 ml Eppendorf Cup überführen. 30 µl RNase/ DNase freies Wasser zur Elution auf die Säule geben. 1 min Inkubation bei RT.
 - 1 min zentrifugieren, 13.000 rpm, RT.
 - Säule verwerfen.

RESTRIKTIONSANALYSE

Die isolierte Plasmid-DNA kann nun durch Restriktionsenzyme geschnitten werden. Da Vektoren zirkuläre DNA-Moleküle sind, müssen sie linearisiert werden, um ihre Größe im Agarosegel bestimmen zu können. Für die Restriktion wird folgender Ansatz pipettiert:

4,0 µl Plasmid-DNA
 2,0 µl 10x-Restriktionspuffer Green (FastDigest®)
 0,5 µl *Bam*HI Restriktionsenzym (FastDigest®)
 0,5 µl *Nde*I Restriktionsenzym (FastDigest®)
13,0 µl RNase/DNase freies Wasser
 20,0 µl

- Stellen Sie einen Mastermix (5 Reaktionen) ohne Plasmid-DNA her

-
- Begonnen wird mit dem größten Volumen (in diesem Fall Wasser) s.o.
 - Geben Sie 4x je 16 µl des Mastermixes in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß und geben Sie dann die Plasmid-DNA dazu
 - Vorsichtig mischen und kurz anzentrifugieren.
 - Inkubation für 25 min bei 37 °C.

Zur Kontrolle des Expressionsvektors wird die Größe des geschnittenen Vektors über Agarose-Gelelektrophorese bestimmt. Die Durchführung erfolgt wie am zweiten Tag nach der Kolonie-PCR (s.o.). Da der im Restriktionsansatz verwendete Puffer bereits „Loading-Dye“ enthält, können direkt jeweils 10 µl der Ansätze auf ein Agarose-Gel aufgetragen werden.

Im Protokoll soll das Bild des Gels gezeigt werden und die Größe des Vektors mit Insert (Esterase-Gen) bestimmt werden. Die Größe des Vektors ohne Insert kann zum Beispiel in der Vektor Karte abgelesen werden (Abbildung 6).

4. Tag (Do, 09.11.2017)

REKOMBINANTE EXPRESSION DER ESTERASE

Theorie zur heterologen Überexpression

Zur Aufklärung der Funktion eines unbekannten Proteins aus einem bestimmten Organismus ist es oft notwendig, über ausreichende Proteinmengen zu verfügen. Damit können dann z.B. enzymatische Tests, Bindungsstudien, immunologische Versuche u.a. durchgeführt werden. Oft kann das Protein allerdings nicht in ausreichenden Mengen aus den natürlichen Zellen (oder Gewebe) isoliert werden. Daher werden Verfahren angewendet, mit denen eine **heterologe Überexpression** des Proteins in einem geeigneten Wirtsorganismus ermöglicht wird. *Escherichia coli* ist der am besten untersuchte und manipulierbare Organismus. Er stellt deshalb das wichtigste **Überexpressionssystem** in der Biotechnologie dar. Unter günstigen Umständen kann ein optimierter *E. coli*-Stamm bis zu 70% seines Gesamtproteins in Form des gewünschten „Fremd“-Proteins enthalten. Das zu überexprimierende Gen wird hierfür hinter starke und regulierbare Promotoren in einen **Expressionsvektor** kloniert. Der **T7-Promoter** des Kapselproteins des T7-Bakteriophagen ist ein Beispiel für einen sehr starken Promoter. Abhängig von der T7-RNA-Polymerase treibt er nahezu die gesamte Proteinbiosynthese der Wirtszelle (*E. coli*) zur Expression des einen Proteins. Überexpressionsvektoren, die auf diesem System beruhen (s. Abbildungen 5-7), sind z.B. die **pET-Vektoren** (Novagen). Sie können nur in *E. coli*-Stämmen verwendet werden, die die T7-RNA-Polymerase exprimieren, denn nur diese erkennt den T7-Promoter optimal. In den sogenannten **DE3-Stämmen** wurde die T7-Polymerase über einen **lysogenen Phagen** in das Chromosom des Expressionsstammes eingebracht. Die Polymerase ihrerseits steht dabei unter der Kontrolle des *lac*-Promoters/Operators. Mit **Isopropylthiogalactosid** (IPTG) kann somit die T7-Polymerase und dadurch indirekt die Expression des klonierten Gens induziert werden (Abb. 5).

Die Expression eines Gens in *E. coli* ist nicht immer unproblematisch. Oft neigen überexprimierte Proteine z.B. eukaryontischer Zellen dazu, im Cytoplasma von *E. coli* sog. "inclusion bodies" zu bilden, die sich ohne Denaturierung nur schwer in Lösung bringen lassen oder sich nach Lösung in denaturierenden Puffern nicht

wieder rückfalten lassen. Sekretorische Proteine können zwar normalerweise vom sekretorischen Apparat der *E. coli*-Zelle erkannt und transportiert werden, aber sie können nicht posttranslational verändert werden, weil in *E. coli* ein glykosylierendes Enzymsystem fehlt. Die Überexpression von Membranproteinen ist oft problematisch, da der Einbau solcher Proteine in die *E. coli*-Membran meistens toxisch ist. Dies gilt übrigens auch für die Überexpression von *E. coli*-eigenen Membranproteinen. Die Überexpression von löslichen bakteriellen Proteinen liefert in der Regel aber sehr hohe Ausbeuten.

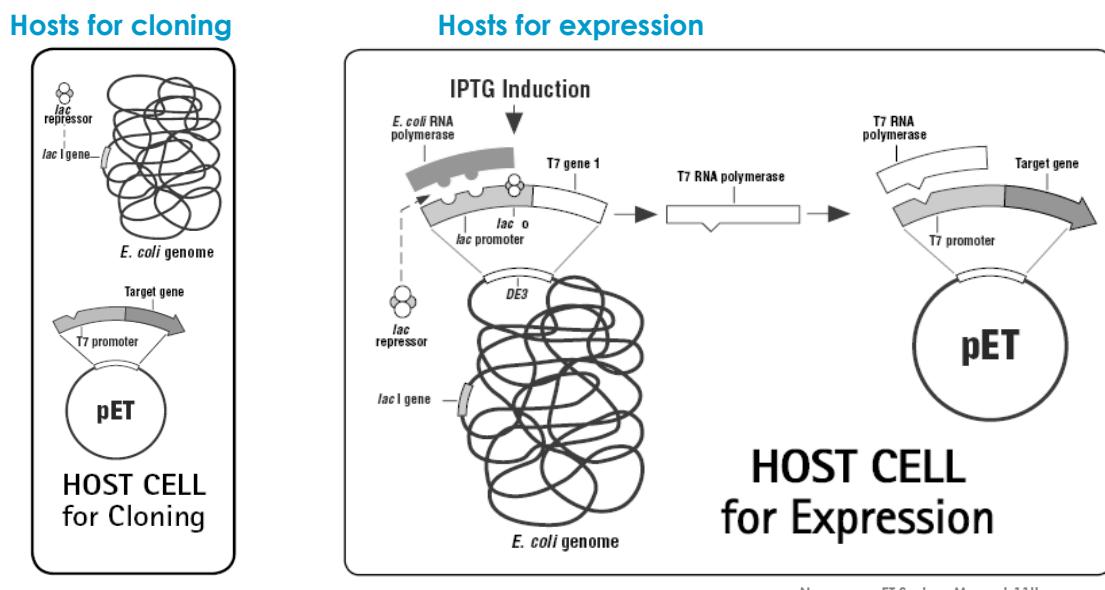


Abbildung 5: Das Prinzip des pET Expressionssystems in *E. coli*. Zur (heterologen) Überexpression in den speziellen *E. coli* DE3-Stämmen bedient man sich verschiedener T7 Expressionvektoren, wie z.B. pET19b.

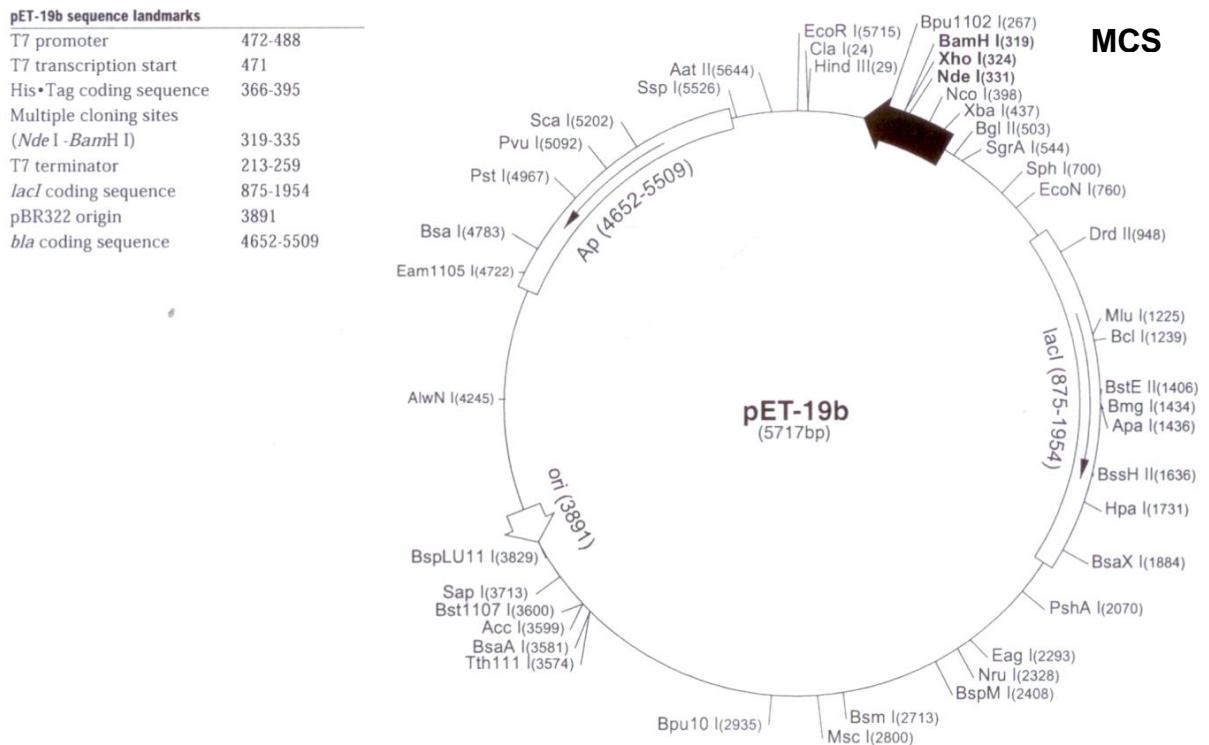


Abbildung 6: Expressionsvektor pET19b.

Die pET19b Vektorkarte mit allen Restriktionsschnittstellen sowie die "multiple cloning site" (MCS; schwarzer Pfeil) sind gezeigt.

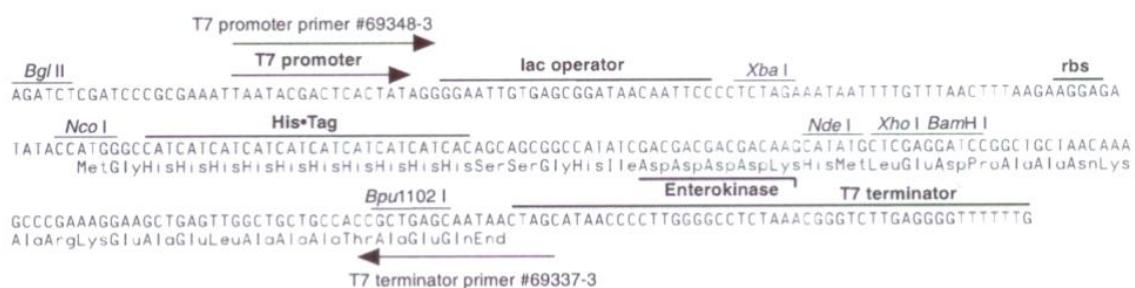


Abbildung 7: Multiple Klonierungs- (MCS) und Expressionsregion des Vektors pET19b.

ZELLANZUCHT UND INDUKTION DER PROTEINEXPRESSION

Bei der Auswahl des Substrates und der Wachstumsbedingungen muss als erstes gewährleistet sein, dass das gewünschte Protein induziert und exprimiert wird. Weiterhin entscheidend ist, dass die Zellen zu einem Zeitpunkt geerntet werden, an dem die Expression und somit die Konzentration des gewünschten Proteins sehr hoch ist. Die Ernte der Zellen erfolgt durch Zentrifugation. Diese und alle folgenden Schritte der Proteinreinigung sollten nach Möglichkeit gekühlt (4°C) erfolgen, um Aktivitätsverluste zu minimieren.

Können geerntete Zellen nicht direkt weiterverarbeitet werden oder ist die benötigte Zellmenge nur über einen längeren Zeitraum zu gewinnen, können geerntete Zellen bei –20 bis –70 °C gelagert werden oder je nach Protein auch bei 4°C. Eine Lagerung bedeutet jedoch zumeist Aktivitätsverlust und ist, falls möglich, zu vermeiden.

Material:

- Vorkultur mit dem Esterase-Expressionsstamm *E. coli* BL21 (DE3) pET19b::*EstCE* (ein positiver Klon der vier gepickten Klone)
- 1 steriles Kulturgefäß mit 100 ml LB-Medium (am 1. Tag vorbereitet)
- 1 x 50 ml Falcon-Tubes pro Gruppe
- Küvetten
- Eppendorf Cups
- IPTG-Stammlösung (1 M)
- Ampicillin-Stammlösung (100 mg/ml; Endkonz.: 100µg/ml)
- LB-Medium (als Referenz und zum Verdünnen)
- Falcon-Tube-Ständer

Durchführung:

- Jede Gruppe arbeitet mit einem positiv getesteten Klon von den 4 Klonen des Esterase-Expressionstammes weiter.
- Sie benutzen die entsprechende Übernachtkultur (vom 2. Tag). Das Esterase-Gen wurde so kloniert, dass am N-Terminus des Proteins 6

Histidin-Reste (sog. „His-Tag“, siehe Abbildung 7 und 8) angefügt sind. Da diese mit dem Protein translatiert werden und Histidin eine hohe Affinität zu 2-wertigen Metallen besitzt (z.B. Ni^{2+}), kann der His-Tag zur Reinigung des Proteins genutzt werden.

- Die Übernachtkultur dient als Vorkultur für die Zellanzucht, die so gewonnenen Zellen dienen anschließend der Isolierung des Proteins.

Dazu impfen Sie je Gruppe 100 ml LB-Medium an:

- Hierzu pipettieren Sie die **Ampicillin-Stammlösung (Endkonzentration 100 µg/mL)** in das Kulturgefäß und überführen Sie 1ml LB-Medium in eine Halb-Mikroküvette (als Blank für die OD_{600} -Messungen)
- Pipettieren Sie aus der Vorkultur des ausgewählten Klones unter sterilen Bedingungen 2 ml in die 100 mL LB-Ampicillin-Medium (2% (v/v)).
- Die Inokulation (animpfen) der Kultur erfolgt in der Regel VOR der Praktikums-Vorbesprechung
- Start OD_{600} nach Inokulation bestimmen
- Die Kulturen werden dann im Schüttler bei 37°C und 180 rpm inkubiert.
- Überprüfen Sie die OD_{600} alle 30 min (nach der Vorbesprechung).
- Sobald eine OD_{600} von etwa 0.5-0.6 erreicht wird, entnehmen Sie eine **Rückstellprobe** (VOR Induktion; 0,5 ml Probe für die SDS-PAGE in einem E-Cup abnehmen und pelletieren bei 7.000 rpm, 5 min, RT)
- Geben Sie IPTG in den Kolben: Die Protein Expression wird durch die Zugabe von **100 µl** einer 1 M Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid (IPTG) - Lösung in die 100 ml Kultur induziert. Die Lösung enthält somit eine IPTG-Endkonzentration von 1 mM.
- Anschließend inkubieren Sie für 3 Stunden bei 37 °C oder über Nacht bei 22 °C. (Erfahrungsgemäß wird die Inkubation über Nacht bei 22 °C durchgeführt).

Ernte der induzierten Zellen:

Die Zellen müssen immer auf Eis gelagert werden!

- !!! NACH der Kultivierung 0,5 ml als Probe für die SDS-PAGE in einem E-Cup aufbewahren (0,5 ml abnehmen und pelletieren, s.o.)!!!
- Falcon-Tubes im Leerzustand abwiegen!!!
- Messen Sie erneut die OD₆₀₀ (ggf. Verdünnung der Proben notwendig!)
- Füllen Sie 50 ml Kultur in ein steriles 50 ml Falcon-Tubes und suchen Sie sich eine 2. Gruppe zur Zentrifugation, um beide Gefäße gegeneinander auszutarieren (**Genauigkeit +/-10 mg**).
- Zentrifugieren der Zellen bei 4.500 rpm in der Biofuge für 20 min bei 4°C.
- Vorsichtiges Dekantieren des Mediumüberstandes und anschließendes Abnehmen des Rücklaufes mit einer Pipette. Der klare Medienüberstand wird verworfen, muss aber autoklaviert werden, bevor er in den Ausguss darf!
- Falcon-Tubes erneut wiegen und das Nassgewicht bestimmen.
- Das Zellpellet wird bei –20°C gelagert.

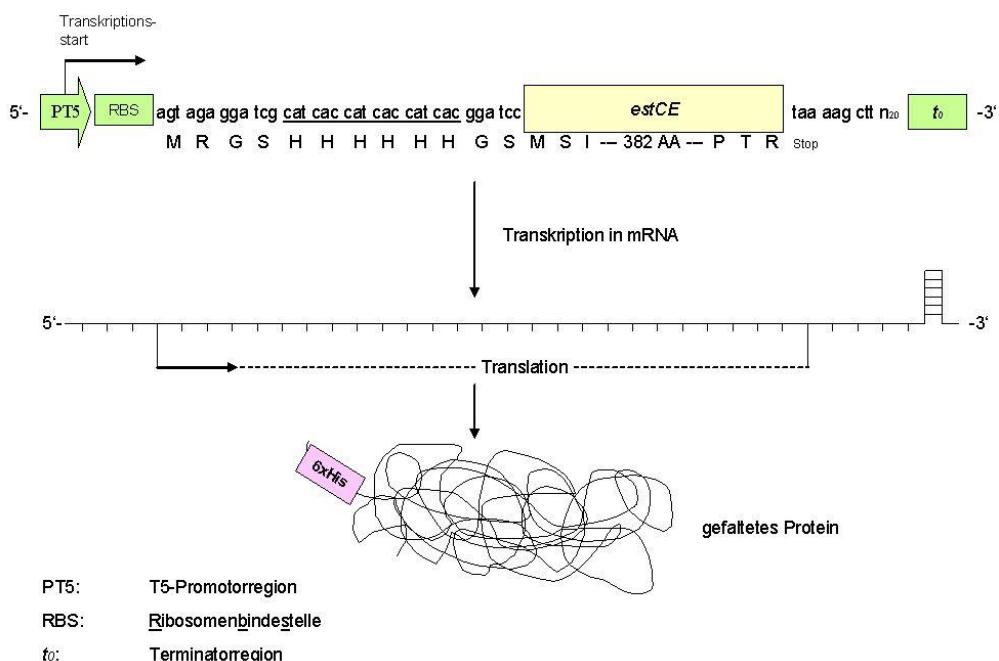


Abbildung 8: Schematische Darstellung der Expression eines N-terminal Histidin-getagten Proteins.

SDS-PAGE

(**SDS-PAGE** = sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (engl.),

Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelektrophorese)

Bei der **Nativ-Polyacrylamidgelektrophorese** erfolgt die Auftrennung von Proteinen im elektrischen Feld in Abhängigkeit ihrer Ladung (bei gegebenem pH des Elektrophoresepuffers) und ihrer Größe (bei gegebenem Vernetzungsgrad des Polyacrylamids).

Bei der **SDS-Polyacrylamidgelektrophorese** werden dagegen alle Proteine durch die Einlagerung des negativ geladenen SDS denaturiert und mit einer identischen Ladungsdichte versehen (maskiert). Durch die identische Ladungsdichte ist nun ein ladungsunabhängiges Auftrennen der Proteine allein nach der Größe in einem Polyacrylamid-Netzwerk möglich. Es werden ausschließlich diskontinuierliche Gele verwendet, die aus einem Trenngel und einem darüber liegendem Sammelgel bestehen, was zu einer besseren Auftrennung der Protein-Untereinheiten führt. Es gibt verschiedene Puffersysteme, die spezifische Vorteile je nach Trennproblem besitzen. Am häufigsten wird das diskontinuierliche **Lämmli-System** mit Tris-Glycin-Puffern verwendet (Laemmli UK (1970), Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680-685). Für die Trennleistung in einem bestimmten Molekularmassenbereich ist der Vernetzungsgrad des Trenngels entscheidend.

Bei dem in diesem Praktikum isolierten Protein (45 kDa) eignet sich ein 12%-iges Trenngel am besten.

Als Elektrophoresesystem wird die Mini Protean® 3 Apparatur von BioRad verwendet. Die Vorbereitungen und Mengenangaben entsprechen dieser Apparatur.

Bitte bedenken Sie, dass eine Apparatur so wie im Praktikum verwendet wird, ca. 1.500 Euro kostet. Also bitte mit Vorsicht behandeln. Dies gilt besonders für die dazu gehörigen Glasplatten!

Material:

- 30% (v/v) Acrylamidstammlösung
- Trenngelpuffer
- Sammelgelpuffer
- 10× Elektrophoresepuffer
- 4× Probenauftragspuffer
- Ammoniumpersulfat (APS, 10% (w/v))
- N,N,N',N'-Tetramethylendiamin (TEMED)
- Behälter mit Deckel zum Färben und Entfärben
- Coomassie-Färbelösung

HERSTELLEN DER GELE**Durchführung :**

! 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.
- Zur Überprüfung der Dichtheit der Platten diese mit Wasser bis zum Rand auffüllen und 5 min warten.
- die unten angegebenen Mengen reichen für **zwei** Gele
- 12%-iges Trengel nach Angaben im Pipettierschema herstellen und bis 1,5 cm unter den Rand der kleineren Glasplatte zwischen die beiden Glasplatten pipettieren. Vorsicht: mit Zugabe von TEMED beginnt die Polymerisation.
- Vorsichtig bis zum Rand mit Wasser überschichten und etwa 25-30 min polymerisieren lassen, bis eine scharfe Grenze zwischen Wasser und Gel sichtbar ist. Durch leichtes, horizontales Schwenken kann auch kontrolliert werden, ob das Gel auspolymerisiert ist!
- Wasser abgießen, 4%-iges Sammelgel (siehe Pipettierschema) pipettieren und den Kamm für die Geltaschen luftblasenfrei einsetzen.
- Sammelgel etwa 15-20 min polymerisieren lassen.

-
- Das Gel ist nun bereit für die Elektrophorese, kann aber auch bei nicht sofortiger Verwendung bei 4°C gelagert werden (dazu in feuchtes Papier einwickeln).

Pipettierschema (für 2 Gele):

	Trenngel 12,5%	Sammelgel 4%
Trenngelpuffer	2,5 ml	/
Sammelgelpuffer	/	1,5 ml
H ₂ O	3,3 ml	3,6 ml
Acrylamid (30% (v/v))	4,2 ml	0,8 ml
APS (10% (w/v))	70 µl	28 µl
TEMED	5 µl	6 µl

5. Tag

(Fr, 10.11.2017)

PROTEINREINIGUNG & AKTIVITÄTSPRÜFUNG

Proteinreinigung bezeichnet den Vorgang, aus einer Lösung die mehrere Proteine enthält, eines oder mehrere dieser Proteine zu isolieren. Meistens wird die Trennung auf biochemischem Wege (z.B. Fällung) und unter Verwendung chromatographischer Systeme (FPLC) ausgeführt.

Zu den meist verbreiteten Methoden zählen:

- Ionenaustauschchromatographie (IEX)
- Gelfiltration (Ausschlusschromatographie)
- Affinitätschromatographie
- Hydrophobe Interaktions Chromatographie (HIC)
- Immobilisierte Metallionen Affinitätschromatographie (IMAC)

Um Proteine zu trennen, werden ihre spezifischen Merkmale ausgenutzt. Solche charakteristischen Eigenschaften sind z.B. Größe und Ladung eines Proteins, die Stabilität in Anwesenheit von Proteasen oder die Thermostabilität. Auch die speziellen Eigenschaften der Oberfläche eines Proteins können zur Trennung verwendet werden. Beispiele sind die Adsorption an eine Matrix (Chromatographie) oder der Einsatz von Antikörpern in der Immunchemie, die spezifische Oberflächenstrukturen eines Proteins (Epitope) erkennen und an diese Strukturen binden. Bei der IEX und der Isoelektrischen Fokussierung ist dies der isoelektrische Punkt (IEP), bei der Gelfiltration das Molekulargewicht und die Konformation. Bei der Affinitätschromatographie basiert die Trennung auf der unterschiedlichen Affinität der Proteine zu einem Liganden, bei der hydrophoben Interaktions Chromatographie auf der unterschiedlichen Hydrophobizität. In der Immobilisierten Metallionen Affinitätschromatographie (IMAC) wird die Fähigkeit des Stickstoffes der terminalen Histidinreste ausgenutzt das Wasser im Nickel-

Komplex selektiv zu verdrängen. Somit wird das Protein am Säulenmaterial gebunden und kann von anderen Proteinen getrennt werden.

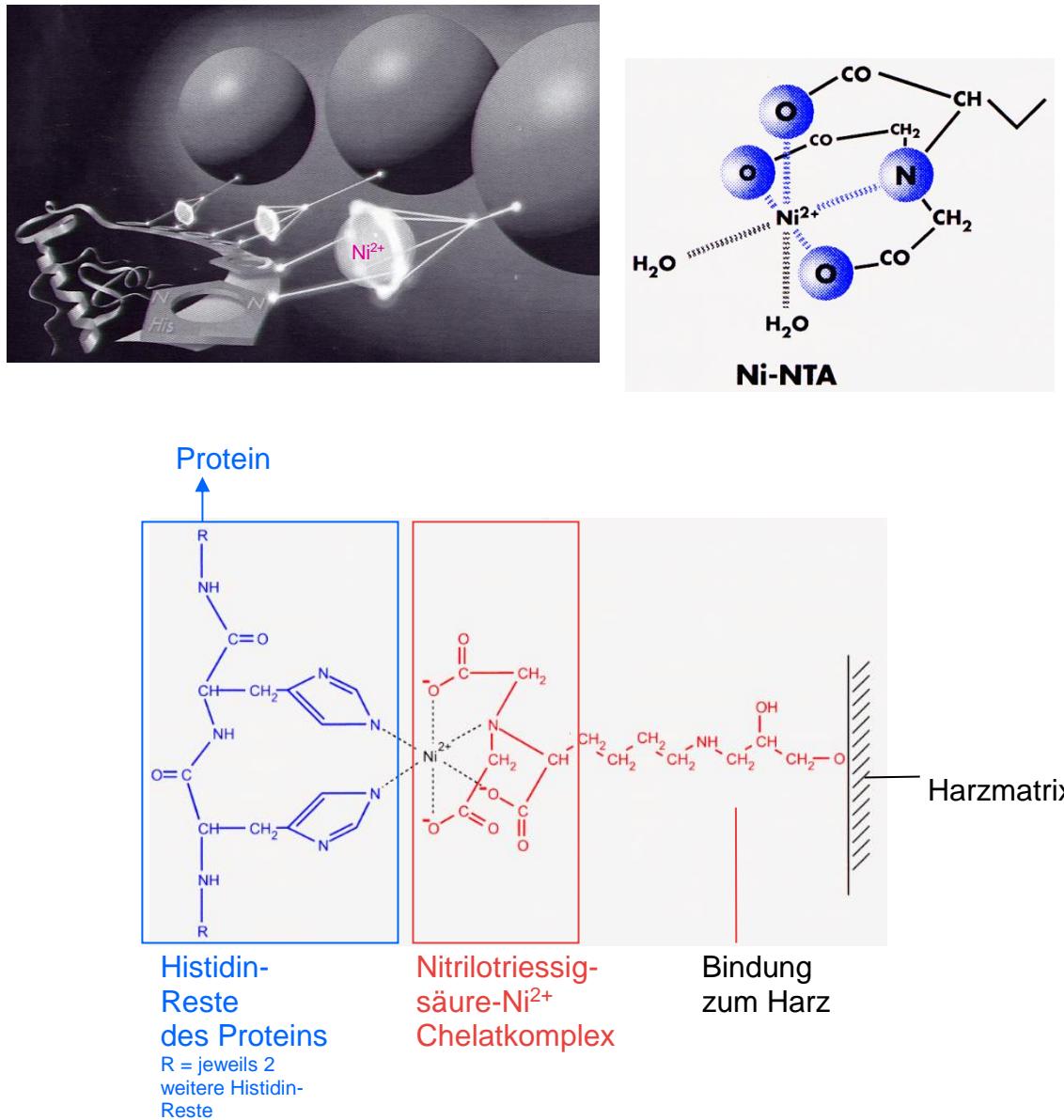


Abbildung 9: Wechselwirkung zwischen der Ni-NTA-Matrix und einem 6X His-Tag-Protein.

Der erste Schritt einer Proteinreinigung ist ein Zellaufschluss, durch den cytoplasmatische Proteine in Lösung gebracht werden oder die Isolierung der gewünschten Zellkompartimente (Membranfraktion, Organellen) ermöglicht wird. Generell unterscheidet man zwischen Methoden der enzymatischen Lyse und

der mechanischen Lyse. Die Methoden der enzymatischen Lyse basieren auf dem Verdau von Komponenten der bakteriellen Zellwand (Peptidoglykan-Gerüst), beispielsweise durch Lysozym. Die freigelegten hochsensiblen Protoplasten werden anschließend durch Detergenzien, osmotischen Schock, Ultraschall oder mechanische Behandlung geöffnet.

Methoden der mechanischen Zelllyse beinhalten Verfahren des Schüttelns mit gleichzeitiger Schürfung und Verfahren der Scherung. Am häufigsten verwendet man ein Verfahren „French pressure cell“, dass die Zellen unter hohem Druck durch ein enges Ventil presst. Gerne wird auch die Ultraschallbehandlung verwendet. Diese Methode wird hier zum Einsatz kommen.

Die Entfernung unlöslicher Membran- und Zellwandbestandteile sowie nicht aufgeschlossener Zellen gelingt durch Zentrifugation bei hohen g-Zahlen. Bei dem dabei erhaltenen klaren Überstand spricht man auch vom zellfreien Rohextrakt.

PROTEINREINIGUNG EINER ESTERASE MITTELS 6xHis-TAG: ZELLAUFSCHLUSS

Material:

- Zellpellet
- 6 E-Cups
- Ultraschall-Quelle
- 4 Zentrifugenröhrchen
- Lysis Puffer

Durchführung:

- Das Zellpellet wird mit Lysis Puffer versetzt (3 ml pro 1 g Pellet)
Der Lysis Puffer enthält oft 10 mM Imidazol um die unspezifische Bindung von Proteinen ohne His-Tag zu minimieren und die Reinheit trotz einer geringeren Anzahl von Waschschriften zu erhöhen. Im Praktikum verwenden wir einen Puffer ohne Imidazol.
- Die Zellsuspensionen von je 6 Gruppen werden zum Zellaufschluss vereinigt (Gruppe 1-6; 7-12 usw.).
- Die Zellsuspension wird für 10 min unter Eiskühlung mit Ultraschall behandelt (50% Amplitude, Cycle 0,5). Hier werden die Betreuer

Hilfestellung leisten!

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

- Das Lysat wird wieder auf die sechs Gruppen verteilt und für 30 min bei 13.000 rpm (4°C) zentrifugiert, um ganze Zellen und Zelltrümmer zu entfernen.
- Der Überstand wird in ein neues Eppendorf Cup überführt (= Rohextrakt = RE; kein Zellpellet überführen!!!).
- Den Rohextrakt auf Eis lagern
- Außerdem werden 50 µl RE in ein weiteres E-Cup gegeben und bei 4°C für die Indikatorplattentests sowie die SDS-PAGE gelagert. (Beschriftung Probe: Rohextrakt).

AKTIVITÄTS-ÜBERPRÜFUNG – INDIKATORPLATTENTEST I

Bevor Sie mit der Reinigung beginnen, sollen Sie herausfinden, ob die Expression des Proteins erfolgreich induziert und es von *E. coli* produziert wurde. Auch wollen Sie wissen, ob das gebildete Protein aktiv ist. Dies erfolgt mit Hilfe von Tributyrin-Indikatorplatten.

Anmerkung:

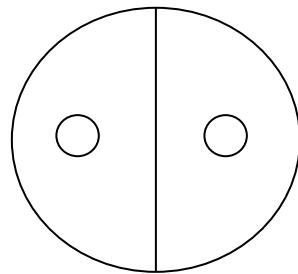
Die benötigten Platten werden Ihnen fertig vorbereitet gestellt!

Material:

- 1 Tributyrin-Indikatorplatte pro Gruppe (Handschuhe!!!)
Tributyrin ist der Trivialname für Glycerintributerat und kann von den meisten Esterasen hydrolysiert werden.
- Probe: Rohextrakt
- Negativ-Kontrolle: Wasser

Durchführung:

- Der Boden der Tributyrin-Indikatorplatte wird in zwei Hälften unterteilt (Markierung auf der Bodenunterseite mit Edding, siehe Schema)



- Es werden 5 µl des Rohextraktes (ggf. Änderung der Menge durch Betreuer beachten) auf eine Hälfte der Tributyrin-Indikatorplatte getropft.
- Auf die andere Hälfte werden 5 µl einer Negativkontrolle (Wasser) getropft.
- Daran schließt sich eine Inkubation von 30 min bei 37°C an.

Nach kurzer Zeit sollte eine Hofbildung (Aufklärung) bei der Probe zu sehen sein. Wenn ja, dann kann mit der Reinigung fortgefahren werden; falls nicht dann wurde das Protein nicht korrekt exprimiert und/oder die Zellen nicht effektiv aufgeschlossen.

PROTEINREINIGUNG

Material:

- Ni-TED Säule 150
- 1x-LEW-Puffer
- 1x-Elutionspuffer
- Eppendorf Cups

Durchführung:

!! Alle Fraktionen werden auf Eis aufbewahrt !!

- Zunächst wird die Ni-TED-Matrix äquilibriert:
 - 320 µl LEW-Puffer auf die Säule geben und durchlaufen lassen
 - den Durchlauf verwerfen (Ausguss)
- Probenauftrag (gesamter restlicher Rohextrakt)
Die Esterase bindet in diesem Schritt an die Säule, während andere Proteine die Säule passieren und sich im Durchlauf befinden; die Durchlaufprobe hat demnach keine Esterase-Aktivität.

-
- Den Rohextrakt auf die Säule geben, durchlaufen lassen und auffangen (= Durchlauf /D; für SDS-PAGE und Indikatorplattentest zurückstellen)
 - Waschen:

Die Waschschritte dienen der Entfernung von ungebundenen Proteinen, die sich noch auf der Säule befinden.

 - 320 µl LEW-Puffer auftragen, durchlaufen lassen und den Durchlauf auffangen (=Waschen 1/W1; für weitere Tests zurückstellen)
 - nochmals 320 µl LEW-Puffer auftragen, durchlaufen lassen und den Durchlauf auffangen (=Waschen 2/W2; für weitere Tests zurückstellen)
 - Proteinelution:

Im Elutionsschritt wird das Zielprotein von der Säule gelöst (= eluiert)

 - 240 µl Elutionspuffer auftragen, durchlaufen lassen und den Durchlauf auffangen (=Eluat 1/E1; für weitere Tests zurückstellen)
 - nochmals 240 µl Elutionspuffer auftragen, durchlaufen lassen und den Durchlauf auffangen (=Eluat 2/E2; für weitere Tests zurückstellen)
 - nochmals 240 µl Elutionspuffer auftragen, durchlaufen lassen und den Durchlauf auffangen (=Eluat 3/E3; für weitere Tests zurückstellen)

INDIKATORPLATTENTEST II

MEDIENVORBEREITUNG ZUR QUALITATIVEN BESTIMMUNG DER LIPOLYTISCHEN AKTIVITÄT

Anmerkung:

Die benötigten Platten werden Ihnen fertig vorbereitet gestellt!

Die nachfolgenden Angaben dienen ausschließlich der Information!

Material:

- 1 L Erlenmeyerkolben
- Rührkern
- Homogenisator

-
- Petrischalen

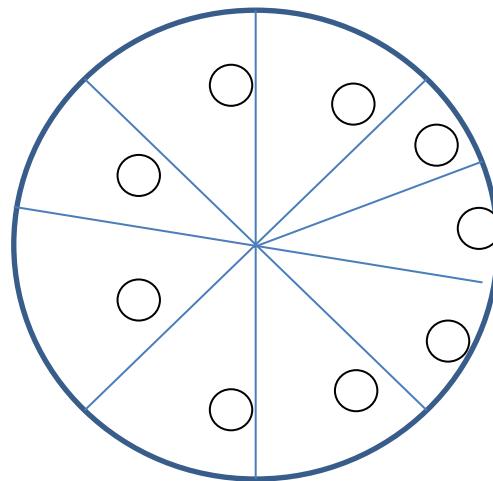
Durchführung:

- Die für 500 ml entsprechenden Mengen Trypton, Hefe Extrakt, NaCl und Agar werden abgewogen.
- Die abgewogenen Mengen werden in einen 1L Erlenmeyerkolben mit Rührkern gegeben.
- Es wird 500 ml Wasser hinzugefügt und für 10 min gerührt.
- Die Lösung wird auf ca. 60°C erhitzt.
- Es werden 5 ml Tributyrin hinzugegeben
- Mit Hilfe eines Homogenisators wird das Tributyrin in der Lösung emulgiert. (Dauer 2 min)
- Die Emulsion wird autoklaviert.
- Abkühlen der Lösung auf 60°C und anschließend kurz zur homogenen Durchmischung röhren.
- Die Platten können gegossen werden.

Indikatorplattentest II

Tributyrin-Indikator-Plattentests zur Bestimmung der Aktivität in den Fraktionen.

- Der Boden der Indikator-Platte wird in 9 gleich große Felder unterteilt (siehe Schablone).



- Es werden in jeweils einem Feld 10 µl des Zellpellets vor und nach Induktion aufgetragen (die Pellets werden in 50 µl RNA- und DNA freiem Wasser gelöst) und jeweils 10 µl des Rohextraktes des Durchlaufs, der Wasch- und

der Elutions-Fraktionen aufgetragen (ggf. Änderungen der Mengen durch Betreuer beachten)

- Die Indikatorplatte wird bei 37 °C für 1h inkubiert.

Wenn nötig werden die Tributyrin-Platten länger bei 37 °C inkubiert!

6. Tag (Mo, 13.11.2017)

SDS-PAGE. WESTERN BLOTTING, BRADFORD

Steriles Arbeiten ist ab diesem Tag nicht mehr nötig, da nicht mehr mit Zellen gearbeitet wird.

ELEKTROPHORESE

Die von Ihnen bereits gegossenen Gele werden nun mit den unten aufgeführten Proben beladen. Zusätzlich werden alle Gruppen eine Probe (je nach Testergebnis der Tributyrin-Indikator-Platten) auf ein gesondertes SDS-Gel auftragen. Dies dient der Untersuchung mittels Antikörpern (siehe unten unter Western Blotting, anschließend Immunodetektion).

Durchführung:

- Mischen Sie die unten angegebenen Mengen der einzelnen Proben jeweils mit Wasser und Probenpuffer (2 Teile der Proteinprobe mit 1 Teil Probenpuffer) und erhitzen Sie beides für 5 min auf 94°C (Denaturierung) im bereitgestellten Heizblock.

Die Zellpellets vor und nach Induktion sollten bereits in 50 µl H₂O gelöst sein.

1. 5 µl Proteinmarker
2. 2 µl Zellpellet vor Induktion + 8 µl Wasser + 5 µl Probenpuffer
3. 2 µl Zellpellet nach Induktion + 8 µl Wasser + 5 µl Probenpuffer
4. 2 µl Rohextrakt + 8 µl Wasser + 5 µl Probenpuffer
5. 5 µl Durchlauf + 5 µl Wasser + 5 µl Probenpuffer
6. 10 µl Waschen 1 + 5 µl Probenpuffer
7. 10 µl Waschen 2 + 5 µl Probenpuffer

-
- 8. 10 µl Eluat 1 + 5 µl Probenpuffer
 - 9. 10 µl Eluat 2 + 5 µl Probenpuffer
 - 10. 10 µl Eluat 3 + 5 µl Probenpuffer

 - Unteres Pufferreservoir mit 1:10 verdünnten Elektrophoresepuffer füllen. Gele (mit Glasplatten, Kamm vorher entfernen) in die Elektrophoreseapparatur einsetzen (Luftblasen unter dem Gel entfernen) und oberes Pufferreservoir mit 1:10 verdünnten Elektrophoresepuffer befüllen.
 - Proteinproben in die Geltaschen einfüllen: 15 µl (max. 20 µl bei einem Kamm mit 10 Taschen). Vom Proteinmarker werden 5 µl aufgetragen.
 - Bei zwei Gelen werden die Proben konstant bei 50 mA aufgetrennt (bei einem Gel mit 25 mA).
 - Die Elektrophorese wird durchgeführt bis der Farbstoff Bromphenolblau (wandert voran an der Lauffront) das untere Ende des Gels erreicht hat.

FÄRBEN

Nur das SDS-Gel mit den Reinigungsfraktionen färben! Das SDS-Gel für den Western Blot nicht färben! Dieses wird zunächst in der Apparatur belassen.

Durchführung:

- Entfernen Sie nach der Elektrophorese vorsichtig das Gel (samt Glasplatten) aus der Kammer.
- Die Glasplatten vorsichtig mit einem Spatel voneinander trennen (Niemals an den Ecken mit dem Spatel ansetzen sonst brechen die Glasplatten!!) und das Gel in den Färbebehälter mit etwas Coomassie-Blue-Färbelösung überführen (Handschuhe!!!).
- Achtung: Das Gel ist sehr instabil!
- Gel mit der Coomassie-Blue-Färbelösung überdecken, so dass das Gel in der Lösung schwimmen kann.
- 20 min auf der Laborwippe leicht schwenken
- Färbelösung abgießen (wiederverwendbar, wird gesammelt)
- Das Gel solange mit deionisiertem Wasser abspülen, bis die Waschlösung nicht mehr blau gefärbt ist

-
- Das Gel nun mit deionisiertem Wasser reichlich bedecken und mit einem Tuch in eine Schale gegeben
 - In der Mikrowelle kurz zum Kochen bringen
 - 3-5 min auf die Wippe zurückstellen
 - Tuch entfernen
 - Falls nötig, deionisiertes Wasser wechseln und noch mal aufkochen
 - Diesen Vorgang solange wiederholen bis das Gel genügend entfärbt ist
 - Gel in deionisiertem Wasser aufbewahren

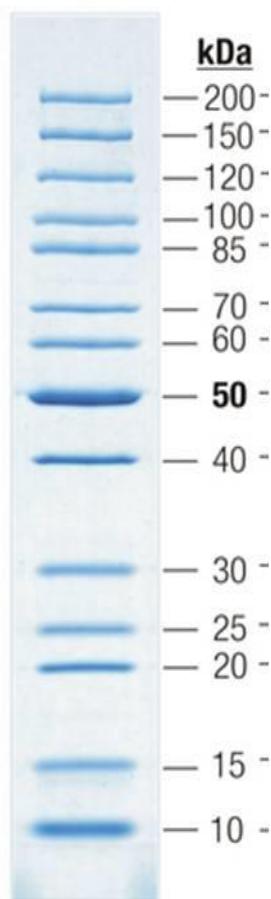


Abbildung 10: Bandenmuster des Protein-Größenstandards (Protein Molecular Weight Marker“ der Firma Fermentas)

ZUSATZINFO

Nachweis von Proteinen in Gelen

Vor dem Färben müssen die Proteine im Gel fixiert werden, d.h. denaturiert und ausgefällt. Fixiert wird meistens mit Ethanol/Essigsäure/Wasser-Mischungen. Bei Proteinmengen oberhalb 200 ng/Bande empfiehlt sich die **Coomassie-Färbung**, darunter die **Silberfärbung**, deren Nachweisgrenze bei 0,1 bis 5 ng Protein liegt. Allerdings ist die Silberfärbung umständlicher, schwierig zu reproduzieren und nicht ohne weiteres quantifizierbar, da verschiedene Proteine mit unterschiedlicher Intensität anfärben. Deshalb wird überwiegend die Coomassie-Färbung verwendet, deren Nachweisgrenze normalerweise bei 200-400 ng Protein liegt.

BRADFORD - PROTEINBESTIMMUNG

Es gibt verschiedene Methoden Proteinbestimmungen vorzunehmen und leider unterliegen die verschiedenen Tests einer gewissen Unschärfe. Die gleiche Proteinlösung gibt mit Test A ein anderes Ergebnis als mit Test B und zudem sind die Testwerte abhängig vom gewählten Vergleichsprotein, sowie störanfällig für Detergentien oder bestimmte Ionen. Es ist daher gute Sitte, zum ermittelten Konzentrationswert auch den verwendeten Test und das Vergleichsprotein anzugeben. Nachfolgend werden zwei Tests kurz vorgestellt, von denen einer im Rahmen dieses Praktikums durchgeführt wird.

1) Proteinbestimmung nach Lowry

Die Proteinbestimmung nach Lowry basiert auf der Biuret-Reaktion. Bei der Biuret-Reaktion bildet ein Cu^{2+} -Ion mit zwei Peptidbindungen einen gefärbten Komplex (s. Abbildung 11).

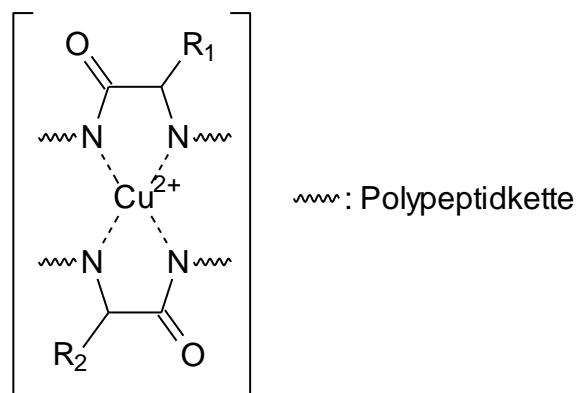


Abbildung 11: Protein-Kupferkomplex der Biuret-Reaktion (nach Lottspeich und Zorbas 1989)

Die Absorption dieses Komplexes steht in linearem Zusammenhang zu der Proteinkonzentration und ermöglicht so die Proteinbestimmung. Allerdings ist der Test nicht sehr empfindlich. Durch die Testmodifizierung von Lowry *et al.* (1951) wird die Empfindlichkeit erhöht. Durch die Testmodifizierung von Lowry *et al.* (1951) wird die Empfindlichkeit erhöht. Bei diesem Test handelt es sich um eine Kombination der Biuret-Reaktion mit einem Folin-Ciocalteau-Phenol-Reagenz. In alkalischer Lösung bildet sich zunächst der schon erwähnte Kupfer-Protein-Komplex. Durch den Zusatz des Reagenzes, bestehend aus Molybdat und Wolframat Heteropolyphosphor-säuren, wird vermutlich das Cu²⁺-Ion im Kupfer-Protein-Komplex zu Cu⁺ reduziert. Die resultierende, tiefblaue Färbung kann bei einer Wellenlänge von 750, 650 oder 540 nm vermessen werden.

2) Proteinbestimmung nach Bradford

Das Testprinzip beruht auf einer Verschiebung des Absorptionsmaximums von *Coomassie brilliant blue G-250* in saurer Lösung von 465 nm zu 595 nm durch Bindung an Proteine (Bradford, 1976). Der Farbstoff *Coomassie brilliant blue G-250* kommt in drei Zuständen vor, die jeweils bei unterschiedlichen Wellenlängen absorbieren.



Durch die Bindung der Farbstoffanionen an das Protein wird die rotbraune Leuko-Form in die intensiv blau gefärbte Form des Farbstoffes überführt, dessen Absorptionsmaximum bei 595 nm liegt. Die Zunahme der Absorption bei 595 nm ist ein Maß für die Proteinkonzentration in der Lösung.

In diesem Praktikum werden wir eine Proteinbestimmung modifiziert nach BRADFORD durchführen [BRADFORD, 1976].

(Bradford MM (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72, 248-254)

Die Bestimmung des Proteingehaltes wird mit Hilfe des BioRad Protein-Assays gemäß den Angaben des Herstellers durchgeführt. Als Standardprotein wird Rinderserumalbumin (BSA) eingesetzt.

Material:

- BioRad Reagenz
- BSA – Stammlösung (0,2 µg/µL) (Bovine-Serum-Albumin, Fa. Sigma)
- H₂O dest.
- Halb-Mirkoküvetten

Durchführung:

Handschuhe tragen!!!!

Kalibriergerade und die Proben werden zeitgleich angesetzt und vermessen!

Erstellung der Kalibriergeraden:

- Als Standard wird eine BSA Lösung (0,2 µg/µl) verwendet
- Die Proben für die Kalibriergerade werden nach folgendem Pipettierschema in 1 ml Plastikküvetten angesetzt (Doppelbestimmung der Kalibriergeraden!):

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

- Als Blank verwenden sie die Probe mit 0 µg BSA
- 5 µl des Rohextraktes werden 1:50 mit 245 µl H₂O dest. verdünnt. Die gesammelten Elutionsfraktionen nach IMAC werden einzeln und unverdünnt eingesetzt.
- Von diesen 4 Proben (Rohextrakt-Verdünnung; 3x Elutionsfraktionen unverdünnt) werden jeweils 5, 10 und 20 µl für die Proteinbestimmung eingesetzt (ebenfalls in Küvetten, ad 600 µl dest. H₂O (vorgelegt)).
(Normalerweise würde hier eine Doppel-, bzw. Dreifachbestimmung durchgeführt. Wegen der geringen Mengen, die wir hier im Praktikum haben, machen Sie nur eine Einfachbestimmung der Proben.)

-
- ALLE Proben werden mit 400 µl Bradford Reagenz versetzt, welches mit Proteinen einen blauen Komplex bildet, der photometrisch erfasst werden kann.
 - Sofort mit der Pipettenspitze gut durchmischen und 5 min bei Raumtemperatur inkubieren.
 - Danach werden die Proben zusammen mit der Kalibriergeraden bei einer Wellenlänge von 595 nm vermessen.
 - Die mit Bradford Reagenz versetzten Proben werden in einem gesonderten Müllbehälter entsorgt
 - Herstellung der Kalibriergeraden: auf Millimeter-Papier oder mit Microsoft Exel die E_{595} (y-Achse) gegen die BSA Konzentration (x-Achse) auftragen.
 - Die Proteinkonzentration der Proben [mg/ml] aus der Kalibriergeraden ableiten. Hierbei ist zu beachten, dass nur Werte aus dem linearen Bereich der Kalibrierkurve zu berücksichtigen sind. Der Mittelwert aus der Doppelbestimmung wird gebildet.
 - Benutzen Sie diese Ergebnisse für die Auswertung von SDS-PAGE, Western Blot und Aktivitätstest.

**KALIBRIERGERADE IN EXCEL ANFERTIGEN UND BITTE AUSGEDRUCKT
(MIT DER DAZU GEHÖRIGEN GERADENGLEICHUNG) AM NÄCHSTEN
TAG MITBRINGEN!**

**DIE KALIBRIERGERADE UND DIE GENAUE ENZYMMENGE DER
EINZELNEN FRAKTIONEN WIRD FÜR DIE ENYZMKINETIK BENÖTIGT
(TAG 7/8)!**

WESTERN BLOTTING

Der Western Blot (bei nachfolgender Immunodetektion auch Immunoblot) ist eine Methode, bei der elektrophoretisch aufgetrennte Proteine aus einem Trenngel (SDS-Gel) auf einen geeigneten Träger (z.B. eine Membran aus Nitrocellulose oder Nylon) durch Kapillarwirkung oder Elektrophorese übertragen werden. Der Begriff „Blotting“ bezeichnet den Transfer der Proteine, wohingegen die Bezeichnung „Western“ auf Edwin Southern zurückzuführen ist, dem Erfinder des Blot-Verfahrens (Southern-Blotting: Transfer von DNA; Northern-Blotting:

Transfer von RNA). Die elektrophoretische Übertragung der Proteine findet mittels 2 verschiedener Systeme statt: I) das **Wet- oder Tank-Blot-System (im Praktikum)** und II) das **Semidry-Blot-System**. Hydrophobe Wechselwirkungen bedingen die Bindung der Proteine und somit deren Immobilisierung an der Membranoberfläche.

Western Blotting, d.h. die Fixierung von Proteinen zur weiteren Analyse wird in verschiedenen Bereichen eingesetzt z.B.:

- bei der Bestimmung der N-terminalen Aminosäure Sequenz zur Protein-Identifizierung,
- bei dem Nachweis von Proteinen mit Hilfe spezifischer Antikörper (AK, Immunodetektion) (**im Praktikum!**)
- bei dem Nachweis von Protein-Modifikationen, z.B. Phosphorylierungen.

Diese Methode hat eine wichtige Bedeutung in der medizinischen Diagnostik.

Das Prinzip der Immundetektion, welche von Ihnen zum Nachweis der in *E. coli* exprimierten Esterase mit Histidin-Tag durchgeführt werden soll, ist in Abbildung 13 dargestellt.

Material:

- Transfer-Puffer
- Wet-Blot-Kammer (Biometra)
- PVDF(Polyvinylidenfluorid)-Membranen
- Whatman-Papiere; auf Gelgröße zurechtgeschnitten

Alle benötigten Puffer werden von den Betreuern gestellt!

Durchführung:

Im Rahmen des Praktikums wird das Western Blotting für alle Gruppen gemeinsam durchgeführt.

SDS-PAGE

- Die SDS-Page wird wie oben beschrieben durchgeführt.
- ALLERDINGS: Jede Gruppe erhält nur eine Spur auf einem der SDS-Gele (12%ig)

-
- Je nach Ergebnis der SDS-PAGE nach Proteinaufreinigung werden 10 µl der E1, E2 oder E3 Fraktion mit 5 µl Probenpuffer vermischt, aufgekocht und auf das Gel aufgetragen (s. SDS Aufarbeitung)
 - Außerdem wird diesmal als Protein-Größenstandard ein sog. „Prestained-Marker“ verwendet (PageRuler, Fermentas, s. Abbildung 12). Dieser hat den Vorteil, dass die Proteinspezies gefärbt und somit während der SDS-PAGE und auch nach dem Transfer auf der Membran sichtbar sind.

TRANSFER

- Nach der SDS-PAGE werden die Gele, zusammen mit den Whatman-Papieren und den Schwämmen der Blot-Apparatur für 15 min in Transfer-Puffer bei RT auf einer Wippe inkubiert.
- Die PVDF-Membranen werden zunächst für 15 min in 100% Methanol (unter dem Abzug!!!), dann 2 min in H₂O und letztlich 5 min in Transfer-Puffer inkubiert (Wippe).
- Blot-Aufbau („Sandwich“) für ein Gel:
 - weiße Seite der Sandwich-Klammer (zeigt zum Plus-Pol)
 - Schwamm
 - 3 Whatman Papiere
 - Membran
 - Gel
 - 3 Whatman Papiere
 - Schwamm
 - schwarze Seite der Sandwich-Klammer (zeigt zum Minus-Pol)
- Achtung Luftblasen entfernen!
- Blots in die Kammer setzen und diese mit 1 L Transfer-Puffer auffüllen
- Das Blotting erfolgt über Nacht, bei 4°C und 15-20 V

7./8. Tag

(DI/MI, 14.11./15.11.2017)

IMMUNODETEKTION & BIOCHEMISCHE PROTEINCHARAKTERISIERUNG

IMMUNODETEKTION (Antigen-Antikörper-Bindungs-PRINZIP)

Im Praktikum wollen wir über die Methode der Immunodetektion die in *E. coli* exprimierte Esterase nachweisen. Der Nachweis beruht auf einem speziellen Antikörper (**Anti-His-Tag AK** (Firma Abcam)), der den His-Tag am exprimierten Protein als Antigen erkennt und in Kaninchen gewonnen wurde. Zusätzlich ist der Antikörper mit alkalischer Phosphatase gekoppelt, so dass kein sekundärer Antikörper mehr erforderlich ist (Abbildung 13).

Material:

- TBST (Wasch-Puffer)
- TBST + 5 % Milchpulver (Blocking-Puffer)
- TBST + 5 % Milchpulver + Anti-His-Antikörper

Zusatzinfo

Milchpulver wird zum Blockieren der freien Bindestellen auf der Membran verwendet, um die unspezifische Bindung des AK zu verhindern. Die Milchpulverlösung ist eine für den AK nicht erkennbare Proteinlösung.

- Antikörper (AK):
 - o **Anti-His-Tag AK** mit gekoppelter alkalischer Phosphatase (AP) (Firma Abcam)
- Farbstoff CDP-Star = Substrat für die Alkalische Phosphatase

Alle benötigten Puffer werden von den Betreuern gestellt!

- Kontrolle des Transfers:
 - o Die Proteinbanden des Prestained-Markers sollten auf der Membran zu sehen sein.

- SDS-Gel in Coomassie Färbelösung überführen. Durch diese anschließende Färbung kann die Effizienz des Transfers abgeschätzt werden.

Alle folgenden Schritte werden bei RT von mehreren Gruppen und den Betreuern durchgeführt:

- **Blocken** der freien Bindestellen auf der Membran mit 50 ml TBST + 5% Milchpulver für 1 h auf der Wippe
- Inkubation mit **Anti-His-tag AK** 1:1000 (5 µl) in 50 ml TBST + 5 % Milchpulver
1 h auf der Wippe
- **Waschen**: 3 x mit je 30 ml TBST, je 15 min
- **Waschen**: 2 x mit 30 ml TBS, je 10 min
- **Entwickeln**: Blot in eine Klarsichthülle legen (mit EtOH vorher säubern) und mit ~ 1 ml CDP-Star überschichten (je nach Blotgröße!)
- Folie **blasenfrei!** schließen
- 5 min Inkubation
- **Detektion** der Chemilumineszens (VersaDoc, BioRad)

Der Farbstoff CDP-Star wird durch die mit dem Antikörper konjugierte Alkalische Phosphatase dephosphoryliert, was die Freisetzung von detektierbarem Licht zur Folge hat. Die Dokumentation erfolgt mit Hilfe des VersaDoc-Systems der Firma BioRad.

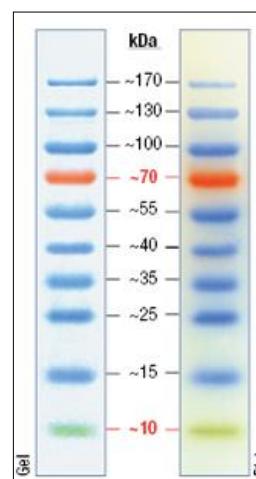


Abbildung 12: Bandenmuster des Prestained Protein-Größenstandards (PageRuler Prestained Protein Ladder (Fermentas)).

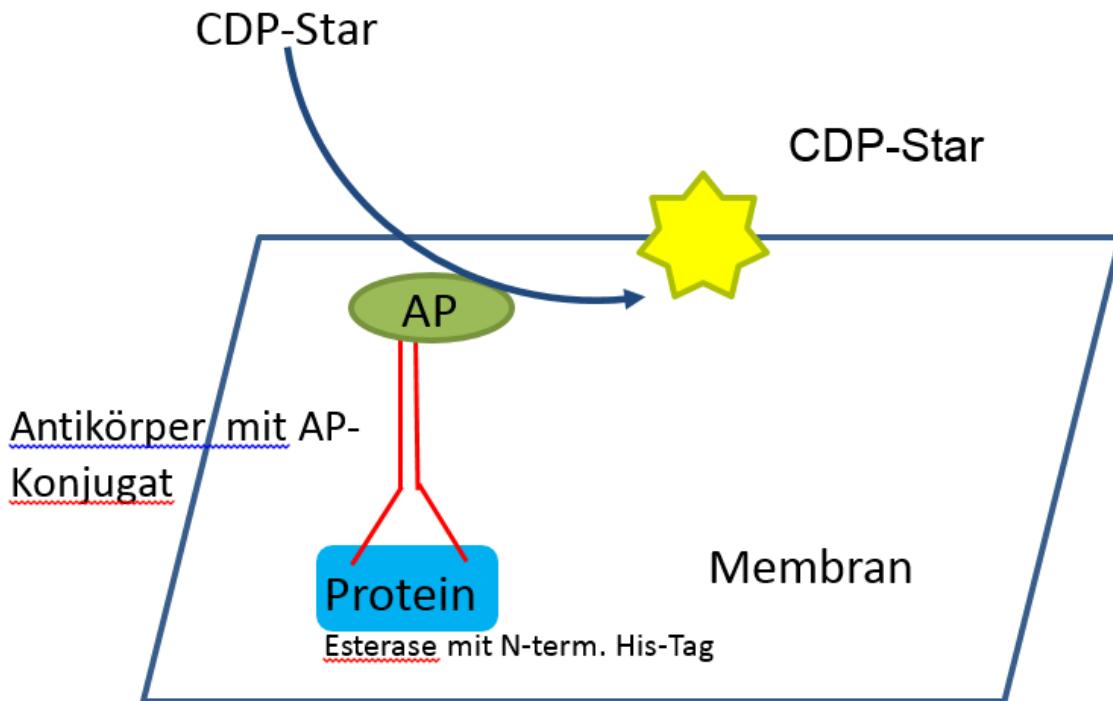


Abbildung 13: Prinzip der Immundetektion.

BIOCHEMISCHE CHARAKTERISIERUNG DES PROTEINS

ENZYMAKTIVITÄT UNTER VERWENDUNG EINES KURZKETTIGEN SUBSTRATES

BESTIMMUNG DER ENZYMAKTIVITÄT BEI VERSCHIEDENEN TEMPERATUREN UND SUBSTRATKONZENTRATIONEN

Um nun die Aktivität des gereinigten Proteins zu bestimmen, wird in einem Test die Umsetzung eines kurzkettigen Fettsäureesters gemessen. Von dem Protein EstCE ist bekannt, dass es Ester kurzkettiger Fettsäuren (bis zu einer Kettenlänge von C6) umsetzen kann. Dies ist ein Merkmal, welches Esterasen von „echten“ Lipasen unterscheidet, die in der Regel nur längerkettige, wasserunlösliche Fettsäureester spalten können. Lipasen benötigen zur Umsetzung ihrer Substrate eine Grenzfläche aus hydrophiler und hydrophober Schicht, was sich durch ihren Reaktionsmechanismus erklärt. An dieser Interphase kommt es in Gegenwart des hydrophoben Substrates zu einer Konformationsänderung des Proteins, eine α -Helix, welche das katalytische Zentrum abschirmt, klappt wie ein Deckel („Lid“) um und ermöglicht so dem Substrat den Zugang zum aktiven Zentrum. Zusätzlich entsteht eine große hydrophobe Oberfläche, welche die Interaktion mit der lipidhaltigen Interphase

erleichtert. Die Hydrolyse des Substrats erfolgt durch einen nukleophilen Angriff des Sauerstoffatoms der Hydroxylgruppe des Serin-Rests auf den Carbonyl-Kohlenstoff der Esterbindung. Es entsteht ein sog. Acyl-Enzym-Komplex, in dem das Substrat kovalent an das Enzym gebunden ist und bei Fetten der Glycerinrest abgespalten wird. Durch einen erneuten nukleophilen Angriff auf den Acyl-Enzym-Komplex durch ein Wassermolekül wird der Komplex deacyliert, das Enzym dadurch regeneriert und die jeweilige Fettsäure freigesetzt. Der Mechanismus ist in Abbildung 14 gezeigt (Jäger et al., 1999; Schmid et al., 2001). Esterasen hingegen benötigen diese Grenzflächenaktivierung nicht, da sie auch wasserlösliche Substrate umsetzen können. Der Reaktionsmechanismus entspricht jedoch dem der Lipasen.

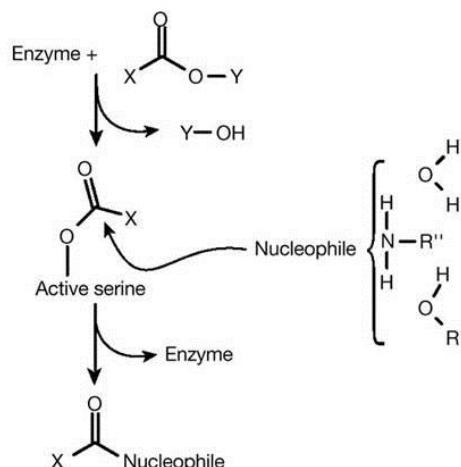


Abbildung 14. Reaktionsmechanismus der enzymatischen Esterspaltung. Durch einen nukleophilen Angriff des Sauerstoffs der Serin-Seitenkette auf den Carbonyl-Kohlenstoff des Esters wird das Substrat kovalent an das Enzym gebunden, es entsteht ein Acyl-Enzym-Komplex. Der tetraedrische Übergangszustand (hier nicht gezeigt) wird durch Wasserstoffbrücken stabilisiert. Ein erneuter nukleophiler Angriff eines Wassermoleküls (oder eines anderen Nukleophils des Lösungsmittels) sorgt für die Deacylierung des Enzyms und die Abspaltung der freien Fettsäure. Die Reaktion ist komplett reversibel. (Aus Schmid et al., 2001)

Im Praktikum wird das Substrat para-Nitrophenol-Butyrat (kurz pNP-Butyrat) benutzt. Für viele dieser Fettsäuresubstrate und die Fettsäuren selber werden häufig Trivialnamen gebraucht, die sich oft vom natürlichen Vorkommen der Stoffe ableiten. So z.B. die Buttersäure (Butansäure) welche beim ranzig werden von Butter entsteht oder die in Muskatnussbutter vorkommende Myristinsäure (Tetradecansäure, Muskatnuss, lat. *Myristica fragrans*).

Das Substrat pNP-Butyrat wird hydrolytisch gespalten und es entstehen Butansäure (farblos) und para-Nitrophenol (gelb), dessen Bildung photometrisch

bei 410 nm bestimmt werden kann. Im Versuch soll die Abhängigkeit der Enzymaktivität von der Temperatur ermittelt werden, d.h. es werden Aktivitätsmessungen über einen Temperaturbereich von Raumtemperatur bis 60°C durchgeführt um die optimale Reaktionstemperatur des Enzyms zu ermitteln.

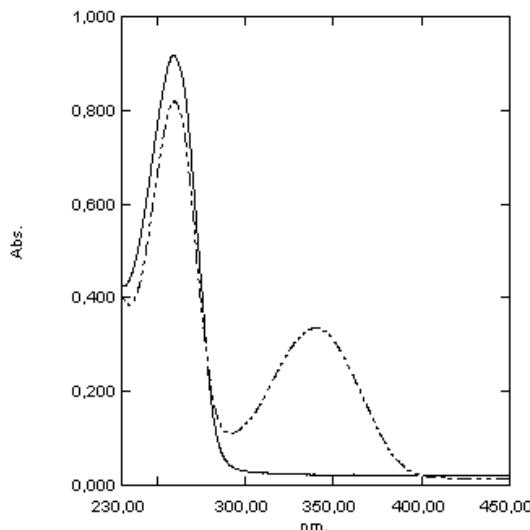
Literatur:

K. E. Jäger, B. W. Dijkstra und M. T. Reetz (1999): Bacterial biocatalysts: molecular biology, three-dimensional structures, and biotechnological applications of lipases. *Annu Rev Microbiol.* **53**:315-51.

A. Schmid, J. S. Dordick, B. Hauer, A. Kiener, M. Wubbolts und B. Witholt (2001): Industrial biocatalysis today and tomorrow. *Nature* **409**: 258-268.

ENZYMKINETIK NACH MICHAELIS-MENTEN

Enzymreaktionen gehören zu den grundlegenden biochemischen Vorgängen. Die extrem hohe Substratspezifität und die katalytischen Eigenschaften der Enzyme erlauben überhaupt erst auf Grund der Beschleunigung der Umsätze die komplexe Abfolge von physiologischen Prozessen in einem lebenden Organismus. Aufbauend auf der durch Michaelis und Menten aufgestellten Beziehung (vergegenwärtigen Sie sich anhand der Lehrbücher die kinetische Behandlung von Enzymreaktionen und die typischen Enzymreaktionen bzw. die wichtigsten Enzymklassen) lassen sich viele Enzymreaktionen relativ einfach halbquantitativ erfassen und veranschaulichen, insbesondere wenn z.B. eine in stöchiometrischem Verhältnis zur Enzymreaktion stattfindende Absorptionsänderung abläuft. Dies ist in einfacher Weise gewährleistet z.B. bei Redoxreaktionen, an denen als Cofaktor (= Coenzym) Nikotinsäureamid-Adenin-Dinukleotid (NAD⁺) beteiligt ist. Dieses wird je nach Reaktionsführung oxidiert oder reduziert, wobei sich sein Absorptionsspektrum ändert. Man bezeichnet derartige Verfahren als sog. optischen Test. Da pro enzymatischem Oxidationsschritt auch jeweils ein Molekül NAD⁺ reduziert (bzw. in Reduktionsreaktionen ein Molekül NADH oxidiert) wird, lässt sich die Enzymaktivität spektroskopisch verfolgen.



Die abgebildeten Spektren, jeweils aufgenommen für 0.05 mM Lösungen, $d = 1\text{ cm}$, geben die Absorptionskurven der beiden Formen des Coenzyms wieder (NADH = gepunktete Linie; NAD⁺ = durchgehende Linie). Unter Anwendung des Lambert-Beerschen Gesetzes lässt sich die Geschwindigkeit der enzymatischen Reaktion unter Beobachtung der Absorptionsänderung von NAD⁺ bestimmen:

ZUSAMMENFASSUNG DER MATHEMATISCHEN ZUSAMMENHÄNGE:

Die Kinetik befasst sich mit dem zeitlichen Ablauf chemischer Reaktionen, d.h. dem Verbrauch von Substraten (S) und der Bildung von Produkten (P) in Abhängigkeit von der Zeit (t). Bei einer Reaktion erster Ordnung, hierbei entsteht aus einem Substrat ein Produkt, ist die Geschwindigkeit, mit der die Substratkonzentration abnimmt proportional.

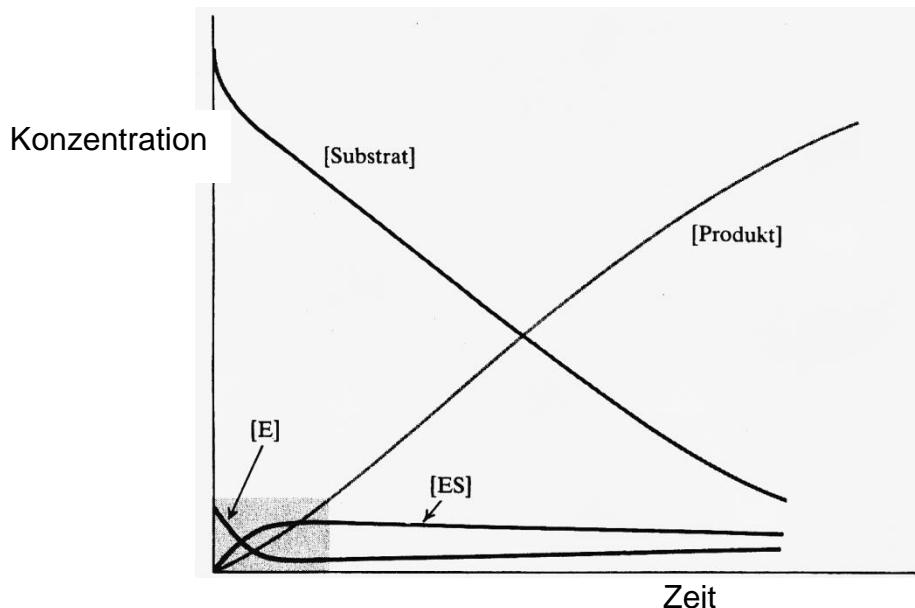
$$v = -\frac{d[S]}{dt} = \frac{d[P]}{dt} = k_1 \cdot [S]$$

k_1 ist der Proportionalitätsfaktor, die sogenannte Geschwindigkeitskonstante. Wird ein Produkt (P) aus zwei Substraten (S_1 und S_2) gebildet, so verläuft die Reaktion oft zweiter Ordnung und es gilt:

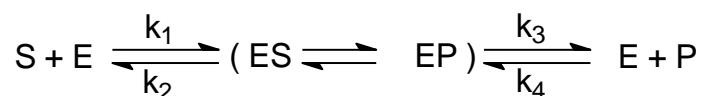
$$v = -\frac{d[S_1]}{dt} = -\frac{d[S_2]}{dt} = k_1 \cdot [S_1] \cdot [S_2]$$

dies bedeutet, dass je größer die Konzentrationen der Substrate desto schneller ist die Reaktion.

Misst man bei gegebener Enzymkonzentration die Abhängigkeit der Reaktionsgeschwindigkeit von der Substratkonzentration, so erhält man einen „hyperbolischen“ Kurvenverlauf (siehe Abbildung).



Bei niedriger Substratkonzentration findet die Reaktion erster Ordnung statt, d.h. die Geschwindigkeit ist annähernd proportional zur Substratkonzentration. Bei hohen Substratkonzentrationen ist die Reaktionsgeschwindigkeit unabhängig von dieser, d.h. die Reaktion verläuft nullter Ordnung, das Enzym ist jetzt substratgesättigt. Alle Enzyme zeigen diesen Saturierungseffekt unterscheiden sich aber oft sehr in der Substratsättigungskonzentration. Dieser experimentelle Befund lässt sich durch die Anwendung der Reaktionskinetik auf das folgende Reaktionsschema erklären.



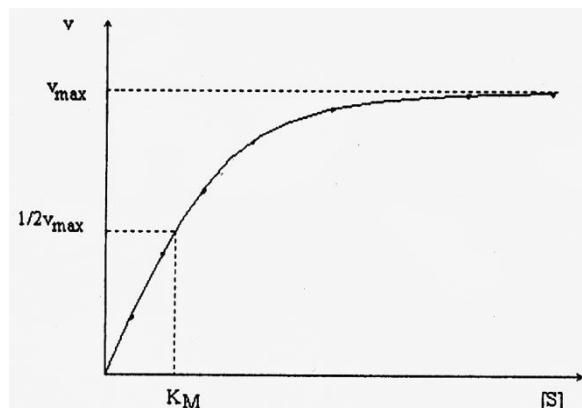
Ein Enzym E kann mit seinem Substrat reversibel den Enzym-Substrat-Komplex ES bilden. In diesem Komplex liegt das Substrat in aktiver Form vor. Der Komplex geht in den EP-Komplex über und zerfällt dann in Produkt P und freies Enzym.

Für diesen Fall, also enzymkatalysierte Reaktionen, die ein einziges Substrat haben entwickelten 1913 L. Michaelis und M. L. Menten eine Geschwindigkeitsgleichung, die sogenannte Michaelis-Menten-Gleichung. Diese

Gleichung drückt die mathematische Beziehung zwischen der Anfangsgeschwindigkeit einer enzymkatalysierten Reaktion, der Substratkonzentration und bestimmte Charakteristika des Enzyms aus. (Die Ableitung dieser Gleichung, Grundlagen über Enzyme und ihre Reaktionen sowie der Kinetik lesen Sie bitte in Lehrbüchern nach.)

Unter Berücksichtigung, dass es sich um einen stationären Zustand der Enzymkatalyse handelt und da die Anfangsgeschwindigkeiten der Reaktion bestimmt werden, wird folgendes Ergebnis erhalten:

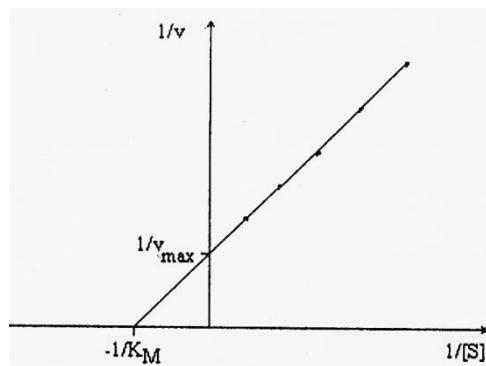
$$v = \frac{v_{\max} \cdot [S]}{K_M + [S]}$$



Bei $K_M = [S]$ beträgt die Reaktionsgeschwindigkeit $\frac{1}{2} v_{\max}$. Der K_M -Wert gibt also die Konzentration an, bei der die Geschwindigkeit gleich der halben Maximalgeschwindigkeit ist. K_M wird Michaeliskonstante genannt. Sie ist ein Maß für die Affinität eines Substrats zu dem Enzym.

Zur genauen graphischen Bestimmung von K_M und v_{\max} wird die Michaelis-Menten-Gleichung in der reziproken Form benutzt. (Doppelt reziproke Darstellung nach Lineweaver-Burk).

$$\frac{1}{v} = \frac{K_M}{v_{\max}} \cdot \frac{1}{[S]} + \frac{1}{v_{\max}}$$



Unter Anwendung des Lambert-Beerschen Gesetzes lässt sich die Geschwindigkeit der enzymatischen Reaktion unter Beobachtung der Absorptionsänderung eines Lösungsbestandteiles bei einer bestimmten Wellenlänge bestimmen:

$$v = dc/dt = 1/(\varepsilon \cdot d) \cdot dE/dt$$

E = Extinktion, ε = molarer Extinktionskoeffizient, d = Lichtweg (= Schichtdicke der Küvette), häufig 1 cm.

Material:

- 100 mM Acetatpuffer, pH 6,5
- Substratlösung (10 mM pNP-Butyrat in Isopropanol)
(auf Eis lagern!!!)
- E-Cups
- Enzym (auf Eis lagern!!!)
- Küvetten
- Stoppuhr

Durchführung –Esteraseaktivität in Abhängigkeit der Temperatur:

- Reaktionsvolumen: 1 ml (Einfachbestimmung) in 1ml Küvetten
0,25 µg Enzym (im Referenzansatz entsprechendes Volumen an Acetat-Puffer einsetzen)
100 µl pNP-Substrat (Stock 10 mM)
mit Acetatpuffer auf 1 ml auffüllen

Zuerst Acetatpuffer und Enzym in einem 1,5 ml E-Cup mischen und bei der zu messenden Temperatur 2 min vorwärmen. Anschließend die Reaktion durch Zugabe des Substrates starten (**mischen!**).

- 10 min bei der jeweiligen Temperatur inkubieren, während dieser Zeit die Lösungen 2x (also nach ca.3 min und 6 min) durch kurzes Schwenken

mischen und anschließend auf Eis zwischen lagern um die Reaktion zu stoppen.

- Den Ansatz für 5 min bei 4°C und 13000 rpm zentrifugieren.
- Den Überstand in Küvetten überführen.
- Extinktion bei $\lambda = 410$ nm gegen die Referenz bestimmen.
- Jede Extinktionsmessung mit einem Wert über 0,6 wird verdünnt

Berechnung der spezifischen Esteraseaktivität

Zunächst wird mit Hilfe des Extinktioniskoeffizienten von pNP und der gemessenen Extinktion die gebildete Produktkonzentration an pNP berechnet. Es gilt nach dem Lambert-Beer'schen Gesetz zur Berechnung der Extinktion:

$$(1) \quad E = \varepsilon \cdot c \cdot d$$

wobei

E = Extinktion

ε = molarer Extinktionskoeffizient

c = Konzentration der Probe (pNP)

d = Schichtdicke der Küvette

Gegeben sind die gemessene Extinktion, die Schichtdicke der Küvette (1 cm) sowie der molare Extinktionskoeffizient von pNP ($1.200 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$).

Die spezifische Aktivität ist definiert als die Menge Enzym, die pro Minute ein μmol pNP freisetzt und wird wie folgt berechnet:

$$(2) \quad \text{Spezifische Aktivität} \left[\frac{U}{mg} \right] = \frac{\text{Produkt} [\mu\text{mol}]}{\text{Enzym} [mg] \cdot \text{Reaktionszeit} [\text{min}]}$$

Berechnen Sie anhand Formel (1) zunächst die gebildete Produktkonzentration im Ansatz. Hieraus wird die gebildete Stoffmenge pNP in μmol errechnet, bezogen auf 1 ml Reaktionsvolumen.

Aus diesen Angaben kann nun anhand Formel (2) unter Berücksichtigung der eingesetzten Enzymmenge (siehe Proteinbestimmung) die spezifische Enzymaktivität errechnet werden. Die Einheit U ist als $\mu\text{mol}/\text{min}$ definiert, die spezifische Aktivität wird auf die Enzymmenge (Proteinbestimmung) bezogen und in U/mg Protein angegeben.

Berechnen Sie die spezifische Aktivität des Proteins bei jeder gemessenen Temperatur und stellen Sie graphisch die spezifische Aktivität in Abhängigkeit von der Temperatur dar.

Enzymaktivitäten EstCE mit pNP-Butyrat als Substrat (Einfachbestimmung,

Blank für jede Temperatur einzeln bestimmen!!)

Substrat	Temp. [°C]	E ₄₁₀	Konzentration pNP [µMol]	Stoffmenge pNP [µmol]	Spez. Aktivität [U/mg]
pNP- Butyrat	RT				
	40				
	60				

Durchführung –Esteraseaktivität in Abhängigkeit der Substratkonzentration:

Anhand der ermittelten Werte entscheiden Sie sich nun für eine optimale Temperatur, um die Enzymaktivität in Abhängigkeit der Substratkonzentration zu bestimmen.

Die Durchführung erfolgt in 1 ml Reaktionsvolumen (0,5 µg Enzym bzw. Referenz!), nur dass verschiedene Substratmengen eingesetzt werden (**Test: Zweifachbestimmung**).

Substrat [µM]	E ₄₁₀	Konzentration pNP [µMol]	Stoffmenge pNP [µMol]	Spez. Aktivität [U/mg]
20				
50				
100				
200				
500				
1000				
2000				

Berechnen Sie die spezifische Aktivität des Proteins für jede eingesetzte Substratkonzentration und stellen Sie graphisch die spezifische Aktivität in Abhängigkeit von der Substratkonzentration dar.

9./10. Tag
(Do/FR, 16.11./17.11.2017)

**FALLS NOTWENDIG VERSUCHSWIEDERHOLUNG &
LABORREINIGUNG**

ANHANG

Escherichia coli-Stamm

BL21 Stamm DE3 (Studier & Moffat, 1986); Novagen, Bioggio-Lugano (CH)

Eigenschaften:

T7-RNA-Polymerase Gen unter *lacUV5*-Promotor (IPTG induzierbar) F-
ompT hsdSB (rB-mB) gal dcm (DE3) *hsdS gal (λclts857 ind1 Sam7 nin5 lacUV5-T7 gene1)*

MEDIEN-/ LÖSUNGENREZEpte

1. PCR

Phusion-Puffer (5x)

Fertig gekaufter Puffer

Tris-Puffer (vorbereitet)

Tris (Tris-(hydroxymethyl)-aminomethanohydrochlorid)	10 mM
den pH-Wert auf 7,5 einstellen	

2. Agarose Gel

TAE – Puffer (50x) (vorbereitet)

Tris-Base	242 g
Eisessig	57,1 ml
0,5 M EDTA (pH=8,0)	100 ml
mit H ₂ O auf 1l auffüllen, dabei den pH-Wert auf ~ 8,5 einstellen	

1% Agarose Gel

1 % (w/v) Agarose in TAE – Puffer (1x)

“Loading-Dye”-DNA-Probenpuffer (6 x) (Fa. Thermoscientific)

20% (w/v) SDS (Endkonz. 1 % (v/v))	500 µl
Bromphenol-Blau (Endkonz. 0,1 % (w/v))	200 µl
0,5 M EDTA (Endkonz. 0,1 M)	2 ml
100 % (v/v) Glycerin (Endkonz. 50 % /v/v))	5 ml

3. Medien für die Zellanzucht

Ampicillin Vorratslösung (vorbereitet)

1 g/ 10 ml werden in H₂O gelöst und 100% EtOH (50:50)

bei –20°C gelagert

LB-Medium

LB-Broth (Sigma) 2 g
werden in 100 ml H₂O gelöst
die Lösung wird autoklaviert

Nach dem Abkühlen der Lösung auf etwa 50°C wird sie unter sterilen Bedingungen mit 1000 µl der Ampicillin Vorratslösung (Endkonzentration 100 µg/ml) versetzt und vorsichtig gerührt. Die Lösung kann bei 4°C gelagert werden.

LB-Agar-Platten

LB-Broth (Sigma) 2 g
Agar-Agar 1,5 g
werden in 100 ml H₂O gelöst
die Lösung wird autoklaviert

Nach dem Abkühlen der Lösung auf etwa 50°C wird sie unter sterilen Bedingungen mit 1000 µl der Ampicillin Vorratslösung (Endkonzentration 100 µg/ml) versetzt und vorsichtig gerührt.

Diese LB-Agar-Lösung wird unter sterilen Bedingungen gleichmäßig auf 4 Petrischalen verteilt. Nach erfolgter Polymerisation werden die Platten bei 4°C gelagert.

4. Lösungen für die Induktion

IPTG (1M) (vorbereitet)

238 mg/ml werden in H₂O gelöst,
steril filtriert und
portioniert bei –20°C gelagert

5. Lösungen für den Zellaufschluß und die Proteinreinigung

Lysis-Äquilibration-Wasch-Puffer (vorbereitet)

NaH₂PO₄ 50 mM
NaCl 300 mM

werden in Wasser gelöst, der pH-Wert wird mit NaOH auf 8,0 eingestellt und autoklaviert

Elutions Puffer (vorbereitet)

NaH₂PO₄ 50 mM
NaCl 300 mM
Imidazol 250 mM

werden in Wasser gelöst, der pH-Wert wird mit NaOH auf 8,0 eingestellt.

6. Medien für die Tributyrin-Indikatorplatten (vorbereitet)

LB-Agar

Trypton	10 g/l
Hefe Extrakt	5 g/l
NaCl	10 g/l
Agar-Agar	15 g/l
Tributyrin (99%) (1% (v/v) Endkonzentration)	10 ml
H ₂ O	

Ampicillin Vorratslösung

siehe Medien 3. Zellanzucht

7. Lösungen für die SDS-PAGE

Acrylamid- Stammlösung (AA) (gekauft)
Rotiphorese® Gel 30 (37,5:1)

Trenngelpuffer (vorbereitet)

Tris (Tris-(hydroxymethyl)-aminomethanohydrochlorid)	18,2 g
SDS (Natriumdodecylsulfat)	0,4 g
H ₂ O bidest ad 100 ml	
pH 8,8	

Sammelgelpuffer (vorbereitet)

Tris (Tris-(hydroxymethyl)-aminomethanohydrochlorid)	6,1 g
SDS (Natriumdodecylsulfat)	0,4 g
H ₂ O bidest ad 100 ml	
pH 6,8	

10 x Elektrophorese-Puffer (vorbereitet)

Tris (Tris-(hydroxymethyl)-aminomethanohydrochlorid)	30,3 g
Glycin	144,1 g
SDS	10,0 g
H ₂ O bidest ad 1000 ml	
pH 8,4	

4x SDS-PAGE Proben Puffer (vorbereitet)

Glycerin (1,2,3-Propantriol)	7,5 ml
β-Mercaptoethanol	2,5 ml
SDS (Natriumdodecylsulfat)	1,2 g
Bromphenolblau (2% (w/v))	0,5 ml
Tris (Tris-(hydroxymethyl)-aminomethanohydrochlorid)	0,4 g
H ₂ O bidest ad 50 ml	

Ammoniumpersulfat (APS) (vorbereitet)

10 % (w/v) in H₂O bidest

N,N,N',N'-Tetramethylendiamin (TEMED)

Fertig gekaufte Lösung

8. Proteinfärbung mit Coomassie R250

Färbelösung: (vorbereitet)

Coomassie Blue R-250: 1 g oder 2 Tabletten
Ethanol 100 % (v/v): 400 ml
Essigsäure 100 % (v/v): 100 ml
H₂O dest.: 500 ml

Entfärbelösung

H₂O deionisiert

Tris-Puffer (vorbereitet)

Tris (Tris-(hydroxymethyl)-aminomethanohydrochlorid)	10 mM
Den pH-Wert auf 7,5 einstellen.	

9. Lösungen zur Proteinbestimmung

BSA [200 µg/mL] (vorbereitet)

Es sollten mindestens 50 ml Lösung angesetzt werden, ansonsten ist keine sichere Einwaage möglich.

Bradford Reagenz

Fertig gekaufte Lösung der Firma Biorad

10. Lösungen für Westernblot und Immunodetektion

Transfer-Puffer: (vorbereitet)

50 mM Tris	6,057 g
380 mM Glycin	28,52 g
0,1 % (w/v) SDS	1 g
20 % (v/v) Methanol	200 ml
add. 1 L H ₂ O	

10x TBS: (vorbereitet)

500 mM Tris	60,57 g
1,5 M NaCl	87,66 g
add. 1 L H ₂ O	
autoklavieren	

TBST (Waschpuffer) (vorbereitet)

1 x TBS + 0,1% (v/v) Tween-20

Blocking-Puffer (vorbereitet)

TBST + 5 % (w/v) Milchpulver

Inkubations-Puffer (vorbereitet)

50 ml TBST + 5 % (w/v) Milchpulver + 5 µl Anti-His-Antikörper

Anti-His-Tag AK

mit gekoppelter Alkalischer Phosphatase (AP) (anti-rabbit (Firma Abcam))

CDP-Star (Tropix)

11. Bestimmung der Proteinaktivität

Acetatpuffer: (vorbereitet)

Na-Acetat	0,1M
Essigsäure	0,1M
pH 6,5	

Zum Ansetzen des Acetatpuffers werden 1M Na-Acetat und 1M Essigsäure getrennt hergestellt und bis zum Erreichen des gewünschten pH-Wertes gegeneinander titriert. Mit dieser Lösung wird eine 100 mM Arbeitslösung hergestellt.

pNP-Substrat-Lösung: (vorbereitet)

pNP-Butyrat 10 mM
in Isopropanol gelöst

DOKUMENTATION DER VERSUCHE (VERSUCHSPROTOKOLL)

1. Wissenschaftlich korrektes Verhalten

Wissenschaftliche Experimente müssen sorgfältig dokumentiert werden. Oberstes Kriterium ist die Wahrhaftigkeit. Unter keinen Umständen dürfen Messwerte erfunden, "geschönt" oder in anderer Weise verfälscht werden. Vergleichs- und Ergänzungsdaten dürfen bei der Interpretation der eigenen Werte genutzt werden, allerdings nur bei korrekter Angabe der Quelle.

Verstöße gegen diese Grundregeln wissenschaftlichen Arbeitens können mit dem Ausschluss vom Praktikum geahndet werden!!

2. Arten der Dokumentation

Die im Praktikum absolvierten Versuche werden dokumentiert durch:

- Ein Laborjournal
- Ein Versuchspraktikum

Nur wenn beides sorgfältig geführt bzw. erstellt wird, kann ein Versuch als bestanden gewertet werden.

3. Laborjournal

Zur Dokumentation des Versuchs dient das Laborjournal. Jede Gruppe führt ein (und nur ein) Laborjournal. Einzutragen ist für jeden Versuch:

Titel des Versuchs, Datum, Namen der Durchführenden bzw. Gruppennr., kurze (!) Darstellung der Theorie, Versuchsablauf mit Messergebnissen, Auswertung mit Rechnungen, Diagrammen etc, sonstige (auch unerwartete oder scheinbare unwichtige) Beobachtungen, Bemerkungen über Fehler, Diskussion der Ergebnisse.

Aus dem Laborjournal darf kein Blatt entfernt werden. Messergebnisse dürfen nicht auf losen Blättern protokolliert werden. Sollte dies aus organisatorischen Gründen geschehen (z.B. bei parallel Teilversuchen), so ist das gemeinsame Laborjournal umgehend zu komplettieren. Das Laborjournal hat jederzeit zugänglich zu sein.

4. Protokoll

4.1 Sinn eines Protokolls

Im Protokoll werden die im Laborjournal festgehaltenen Ergebnisse für fachkundige Leser dargestellt, nachdem sie aufgearbeitet und in einen wissenschaftlichen Rahmen gestellt wurden. Viele Details aus dem Laborjournal werden dabei weggelassen, umgekehrt kommen Hintergrundinformationen und Schlussfolgerungen hinzu. Es ist wünschenswert, Literaturquellen zu verwenden

und entsprechende Informationen einzufügen. Dies muss grundsätzlich unter korrekter Nennung der Quelle erfolgen!

4.2 Gliederung

Ihr Protokoll beginnt mit einem Deckblatt mit Titel des Praktikums, Gruppennummer und Datum. Es teilt sich in "Einleitung", "Material und Methoden", "Ergebnisse" und "Diskussion" auf.

- Die Einleitung

stellt den Sinn der Versuche dar und gibt den wissenschaftlichen Hintergrund der Versuche wider. Bemühen Sie sich um einen roten Faden und vermeiden Sie gedankliche Sprünge!

- Material und Methoden

wenden sich an einen bereits fachkundigen Leser. Vermeiden Sie daher weitgehende und unwichtige Einzelheiten. Geben Sie die Schlüsselinformationen so an, dass eine Wiederholung des Versuchs durch andere an Hand Ihrer Informationen möglich wäre. Beachten Sie unbedingt mögliche Abänderungen im Protokoll zu erwähnen!!

- Ergebnisse

umfassen die Darstellung der eigenen Ergebnisse! Geben Sie diese inhaltlich logisch oder chronologisch wieder. Rechnerische Auswertungen müssen erläutert werden. Die Ergebnisse sind am günstigsten in Form von Tabellen oder Abbildungen darzustellen. Beachten Sie, dass die Tabellenspalten bzw. die Abbildungsachsen sinnvoll beschriftet werden, dass korrekte Einheiten verwendet werden, dass Tabellen und Abbildungen mit Titel versehen werden und nummeriert werden und dass auf diese Nummern im Text korrekt zugegriffen wird (nicht "s. Abb.", sondern "s. Abb. 5a").

- Diskussion

Die Diskussion der Versuche oder Experimente stellt eine Bewertung der erhaltenen Ergebnisse dar. Sie werden damit in einen wissenschaftlichen Kontext eingebunden, um weitergehende Schlussfolgerungen ziehen zu können. Entsprechend sollen Sie Ihre eigenen Ergebnisse darstellen und, falls nötig und möglich, mit denen anderer Gruppen (Angabe der Quelle!) oder mit Literaturangaben vergleichen. Weiterhin sind die Ergebnisse zu werten ("entsprechen sie den Erwartungen oder Vorgaben?") und Schlussfolgerungen zu ziehen (Abwandlung der Versuche, Folgeversuche, Fehlerquellen, besondere Hinweise etc.).

Nehmen Sie abschließend den "roten Faden" Ihrer Einleitung wieder auf und führen Sie damit das Experiment zu Ende.

4.3 Sprache und Form

Beachten Sie folgende Regeln: Schreiben Sie ganze Sätze! Achten Sie auf korrekte Zeitenfolge! Bei Darstellung allgemeingültiger Inhalte verwendet man die Gegenwartsform, während die Präsentation eigener Ergebnisse besser in der Vergangenheit erfolgt. Bemühen Sie sich um eine lebendige Darstellung, ohne dabei auszuschweifen (Es handelt sich um keinen Prosa-, sondern einen Sachtext).