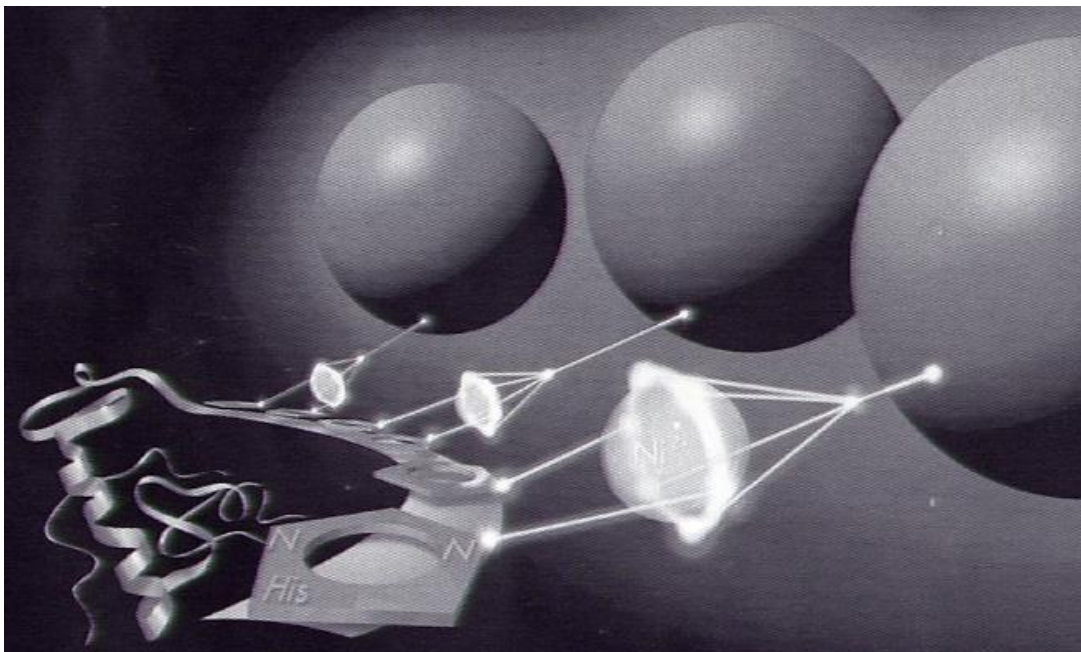


## Biochemisches Praktikum 2020/2021

UNIVERSITÄT  
DUISBURG  
ESSEN

# Biotechnologie (Molekularbiologie & Biochemie)

Bachelor: Water Science



## Inhaltsverzeichnis

Zeitplan 2020 .....	1
Vorwort .....	2
Ziel des Praktikums .....	5
Transformation, Kolonie-PCR, Agarose-Gelelektrophorese, Inokulation von Übernacht-Kulturen .....	7
Plasmidpräparation, Kontroll-Restriktion, Agarose-Gelelektrophorese, Vorkulturen von <i>E. coli</i> BL21 (DE3) pET19b:: <i>EstCE</i> .....	20
Rekombinante Expression des Esterasegens .....	25
Zellaufschluss, Proteinreinigung, Bradford-Proteinbestimmung, Indikatorplattentest	31
Biochemische Proteincharakterisierung.....	42
SDS-PAGE, Western Blot und Immunodetektion .....	54
Versuchswiederholung & Laborreinigung .....	63
Anhang .....	64
Dokumentation der Versuche (Versuchsprotokoll) .....	70



---

# PRAKTIKUM BIOCHEMIE, WS 2020/21

## AG PROF. SIEBERS

### VORWORT

Das Praktikum findet vom 26.10.-13.11.2020 jeweils von 8:00 Uhr bis ca. 18:00 Uhr statt. Dabei werden Sie als Studierende in zwei Gruppen eingeteilt. Gruppe 1 beginnt am 26.10 und beendet das Praktikum voraussichtlich am 03.11.2020. Gruppe 2 startet am 04.11 und beendet das Praktikum am 12.11.2020. Die genauen Praktikumszeiten werden in den täglichen Vorbesprechungen bekannt gegeben und passen sich an Ihren Vorlesungsplan an! **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 der 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 Laboratorien unbedingt beachten. Über diese Vorschriften wurden/werden Sie im Rahmen

---

der Sicherheitsunterweisung informiert und verpflichten sich damit diese zu beachten. Zusätzlich 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 den Betreuern 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. Sollte 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!

Für das Praktikum werden Kittel und Schutzbrille benötigt. Ein Mund-Nase-Schutz für das Praktikum selbst wird bereitgestellt. Dennoch ist ein eigener Mund-Nase-Schutz für die Räume außerhalb des Labors wie Flur, Mensa etc. obligatorisch und selbst mitzubringen!

Die Vorbereitungs- und Sicherheitsunterweisung für dieses Praktikum findet am

**23.10.2020 um 10:00 Uhr c.t. als Zoom-Meeting statt.**

Diese Veranstaltung ist für alle teilnehmenden Studierenden obligatorisch. (Ohne Teilnahme an der Sicherheitsbelehrung ist keine Teilnahme am Praktikum möglich!)

---

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

**PROTOKOLLABGABE BIS SPÄTESTENS 02.12.2020  
(GRUPPE 1), 11.12.2020 (GRUPPE 2) UM 12 UHR**

**KORRIGIERTE PROTOKOLLE KÖNNEN AM 18.12.2020 BIS  
14 UHR WERDEN**

**ABGABE EVTL. ÜBERARBEITETER PROTOKOLLE BIS  
SPÄTESTENS 08.01.2021 UM 15 UHR**

**ABGABE IN RAUM: S03 V03 F38**

---

## 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. Es wird unterschieden 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 1000 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 Herstellung von Proteinen in *Escherichia coli* sowie über die Reinigung und biochemische Charakterisierung von Proteinen zu vermitteln. Dies soll am Beispiel einer **Esterase** gezeigt werden. Um ein Protein gezielt untersuchen zu können, wird dieses in großen Mengen und in möglichst reiner Form benötigt. Dies wird in der Regel dadurch erzielt, dass i) das kodierende Gen in einen Expressionsvektor kloniert wird und das daraus resultierende Expressionsplasmid ii) zur Proteinproduktion in einem Expressionsstamm verwendet wird. Daher werden Sie zunächst das für die Proteinproduktion in *E. coli* benötigte Expressionsplasmid klonieren und dieses hinsichtlich der erfolgreichen Konstruktion analysieren (Amplifikation des Esterase-Gens über Kolonie-PCR, Restriktion der Plasmid-DNA). Es folgt die Herstellung kompetenter Zellen des Expressionsstamms *E. coli* BL21 (DE3), dessen Transformation mit Ihrem Expressionsplasmid und die Kultivierung zur Produktion der Esterase. Anschließend wird das His-Tag-Zielprotein gereinigt sowie dessen Aktivität untersucht.

---

Die einzelnen Arbeitsschritte bis zur Fertigstellung eines Überexpressionsstammes zur Produktion des rekombinanten Proteins sind damit zusammenfassend die Folgenden:

1. Amplifikation des Zielgens aus einer DNA Probe mittels PCR
2. Isolierung und Verdau des Vektors (Expressionsplasmid)
3. Klonierung des Gens in den Vektor
4. Transformation des Wirtsstammes mit dem Plasmid → Gewinnung des Expressionsstammes
6. Anzucht der Expressionszellen
7. Induktion der Expression
8. Aufschluss der Zellen
9. Isolierung & Reinigung des Proteins
10. Charakterisierung des Proteins

Ihr Ziel ist die Gewinnung des Zielproteins in möglichst hoher Konzentration und möglichst reiner Form für die nachfolgende Charakterisierung.

---

## 1. TAG

### TRANSFORMATION, KOLONIE-PCR, AGAROSE-GELELEKTROPHORESE, INOKULATION VON ÜBERNACHT-KULTUREN

Machen Sie sich an diesem Tag mit den Gegebenheiten des Labors (Einrichtung des Arbeitsplatzes, 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 im Umgang mit Zellen das Arbeiten am Brenner vorgesehen!

#### **TRANSFORMATION KOMPETENTER *E. COLI* BL21(DE3)-ZELLEN**

Zellen, die in der Lage sind freie DNA aus ihrer Umgebung aufzunehmen, werden „kompetente“ Zellen genannt. *E. coli*-Zellen sind normalerweise nicht kompetent und werden erst durch Behandlung mit  $\text{CaCl}_2$  kompetent gemacht. Anschließend werden die Zellen schockgefroren und bei  $-80\text{ °C}$  gelagert. Während des sogenannten Hitzeschocks kommt es zur Aufnahme der Plasmid-DNA, die Zellen werden transformiert.

#### Material:

- 100  $\mu\text{l}$  kompetente Zellen *E. coli* BL21(DE3)
- 2  $\mu\text{l}$  Plasmid-DNA (pET19b::*EstCE*)
- 400  $\mu\text{l}$  LB-Medium (ohne Ampicillin)
- LB-Agar-Platte (mit Ampicillin)

---

### Durchführung:

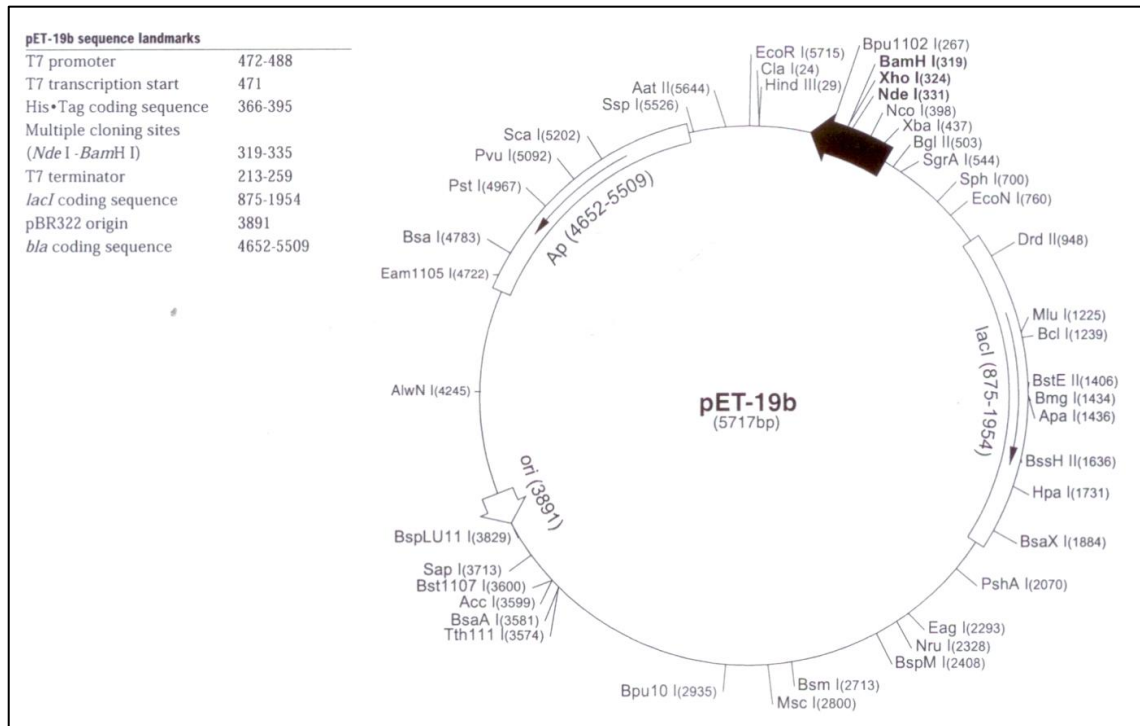
- Steriles Arbeiten am Brenner
- Chemisch kompetente Zellen (*E. coli* BL21(DE3); vom Betreuer gestellt) werden mit 2 µl Plasmid-DNA (pET19b::*EstCE*) versetzt und für 30 min auf Eis inkubiert.
- Dann folgt ein Hitzeschock für 80 sec bei 42 °C (Heizblock) und ein kurzes Abkühlen im Eis (5 min)
- Die Regeneration der Zellen erfolgt durch die Zugabe von 400 µl LB-Medium und eine Inkubation für 45 min bei 37 °C / 180 rpm (Inkubator).
- Anschließend werden 100 µl der Zellsuspension auf eine LB-Agar-Platte (Ampicillin) ausplattiert, der Rest der Suspension wird für 3 min bei 4.000 rpm und Raumtemperatur (RT) zentrifugiert und der Überstand bis auf ca. 100 µl abgenommen. Das Zellpellet wird vorsichtig in den verbliebenen 100 µl LB-Medium resuspendiert und ebenfalls ausplattiert. Die zwei Platten werden über Nacht bei 37 °C inkubiert.

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

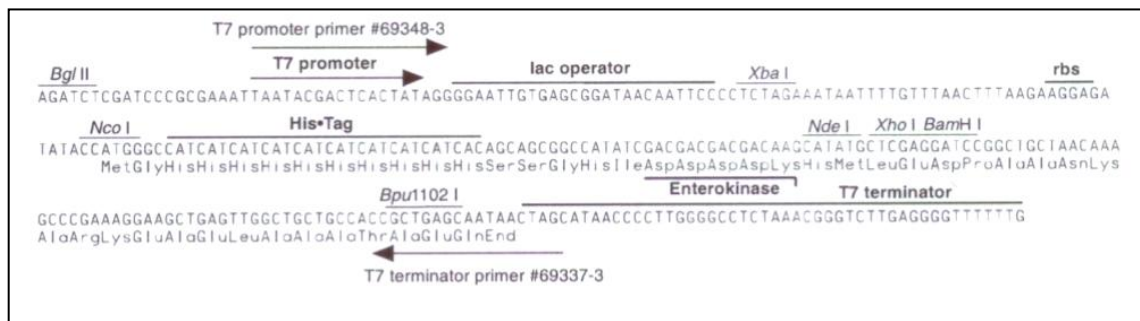
### **ÜBERPRÜFUNG DES EXPRESSIONSSTAMMES DURCH KOLONIE-PCR**

Die **Polymerasekettenreaktion (PCR)** dient der Amplifikation ( $\triangleq$ Vervielfältigung) ausgewählter DNA-Bereiche (z.B. genomischer DNA oder Plasmid-DNA). Vor Beginn des Praktikums wurde das Esterase-Gen *EstCE* in den Vektor pET19b kloniert. Die Vektorkarte vom pET19b ist in der folgenden Abbildung 1 gezeigt. Um ein Gen in einen Vektor zu klonieren, wird zunächst das Gen aus der genomischen DNA mit einer **Polymerasekettenreaktion (PCR)** vervielfältigt. Dabei werden am 5' und am 3'-Ende des Gens Schnittstellen für die sogenannten Restriktionsenzyme (auch Endonucleasen) eingebaut, die die DNA an den jeweiligen Stellen schneiden können. Der Vektor besitzt innerhalb seiner **Multiple Cloning Site (MCS)** (Abbildung 2) ebenfalls einige verschiedene Restriktionsschnittstellen, an denen der Vektor geschnitten werden kann. Damit ein gezielter, spezifischer Einbau des Esterase-Gens in den Vektor pET19b erfolgen kann, müssen die gleichen Restriktionsenzyme für

Plasmid und Gen verwendet werden. Anschließend kann das Gen (Insert) mithilfe der DNA-Ligase in den Vektor eingebaut werden, diesen Vorgang nennt man Ligation. Der ligierte Vektor wird anschließend zur Transformation kompetenter *E.coli* Zellen verwendet. LB-Agarplatten mit Klonen von *E. coli* BL21(DE3) pET19b::*EstCE* werden Ihnen gestellt. Sie sollen im Folgenden überprüfen, ob diese das Plasmid mit dem inserierten Esterase Gen enthalten.

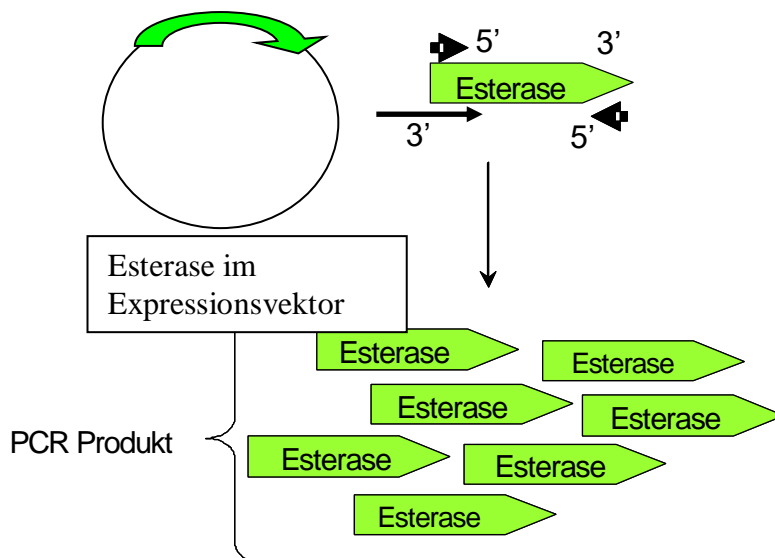


**Abbildung 1: Expressionsvektor pET19b.**Die pET19b Vektorkarte mit allen Restriktionsschnittstellen sowie die “multiple cloning site” (MCS; schwarzer Pfeil) sind gezeigt.



**Abbildung 2: Multiple Klonierungs- (MCS) und Expressionsregion des Vektors pET19b.**

Hier nutzen wir die sog. **Kolonie-PCR** als Wachstums-unabhängige schnelle Methode, um Einzelkolonien des Expressionsstammes (*E. coli* BL21(DE3)) auf die Präsenz des Plasmides mit dem entsprechenden Insert (Esterase-Gen) zu überprüfen.



**Abbildung 3: PCR-Amplifikation des Esterase-Gens ausgehend von Plasmid-DNA.**

#### Material:

- 1 LB-Agar-Platte (+ Ampicillin) mit Einzelkolonien
- 5 PCR-Cups
- Tris-Puffer (10 mM Tris/HCl, pH 7,0)
- 4 Reagenzgläser mit 5 ml LB-Medium + 100 µg/ml Ampicillin (Ampicillinzugabe erfolgt frisch)
- 1 LB-Agar-Platte (+ Ampicillin) als Sicherungsplatte

#### Durchführung:

- Aufteilung des Tris-Puffers auf 4x 1,5 ml Reaktionsgefäße (50 µl pro 1,5 ml Reaktionsgefäß)
- Vorbereitung der LB-Agar-Platte: Platte in 4 Felder einteilen
- Vorbereitung des 5 ml LB-Mediums: Ampicillin zugeben (Endkonzentration: 100 µg/ml)

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

**!! Alle Arbeiten sind steril in der Nähe des Bunsenbrenners auszuführen !!**

Bitte beachten Sie die entsprechende Nummerierung der Reaktionsgefäße 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 Reaktionsgefäße 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 Zellyse inkubiert.
- Zentrifugation des Zellysats für 1 min bei 13.000 rpm (Raumtemperatur).
- Nehmen Sie 35 µl des Überstandes in ein neues 1,5 mL-Reaktionsgefäß ab. 5 µl dieser Überstandslösung werden gleich als Template-DNA (Matrize) in die PCR eingesetzt.

Die PCR wird verwendet, um die Präsenz des Expressionsplasmids in den ausgewählten *E. coli* Kolonien zu überprüfen. Positive Klone werden über die Agarose Gelelektrophorese identifiziert.

Die Sequenzen der beiden verwendeten Esterase-sequenzspezifischen Primer können der Tabelle 1 entnommen werden. Die PCR wird mit der Phusion-Polymerase durchgeführt.

**Tabelle 1: Esterase-sequenzspezifische Primer**

Primer	Sequenz 5' – 3'
EstCE-FW	GG <b>CAT ATG</b> TCG ATA GCG GAT CAG TCA
EstCE-REV	<b>GGA TCC TTA</b> 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 (= Zellysat)
- H<sub>2</sub>O (DNase/RNase frei; bitte nicht entsorgen, wird während des gesamten Praktikums benötigt)
- Phusion-Polymerase

Durchführung:

- Arbeiten auf Eis!
- Beschriften sie 4 PCR-Cups (Klon 1-4, Gruppennummer)

Zu jedem PCR-Ansatz gehört eine Negativkontrolle; d.h. statt der DNA (5 µl Zelllysat) wird H<sub>2</sub>O eingesetzt. Beschriften Sie ein 5. PCR-Cup für die Negativkontrolle. Berechnen Sie anhand der unten aufgeführten Tabelle (Pipettierschema) die Volumina, welche pro PCR von den jeweils vorhandenen Vorratslösungen eingesetzt werden müssen. Berechnen Sie dann die entsprechenden Volumina für einen Mastermix für 6 Reaktionen. Pipettierschema für eine Reaktion:

**Tabelle 2: Pipettierschema der Kolonie-PCR**

Konzentration der Vorratslösung.	Endkonzentration	Ansatz Vol. [µl]	Mastermix Vol. [µl]
Phusion-Puffer (5x)	1X		
§ dNTPs (2 mM)	0,2 mM		
§ EstCE-FW (10 µM)	0,5 µM		
§ EstCE-REV (10 µM)	0,5 µM		
# Phusion Polymerase (2.5U/µl)	2,5 U		
DNA template/H <sub>2</sub> O	/	5	/
H <sub>2</sub> O (PCR clean*)			
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

- Pipettieren Sie einen Mastermix für 6 Reaktionen in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß, beginnend mit dem größten Volumen (hier H<sub>2</sub>O) 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.
- Programmieren Sie die PCR-Maschine  
(PCR-Bedingungen s.u.; die Programmierung der PCR-Maschine erfolgt unter Anleitung der Betreuer)

**Tabelle 3: PCR-Bedingungen**

Schritt	Temperatur	Dauer	Zyklen
1. Initiale Denaturierung	98°C	5 min	1
2. Denaturierung	98°C	10 s	
3. Annealing	59°C	30 s	31
4. Elongation	72°C	40 s	
5. Finale Elongation	72°C	10 min	1
6. Lagerung	15°C	∞	1
Zyklus	1.	2 - 31	32
Denaturation	98°C, 30 sec	98°C, 10s	
Annealing		57°C, 30s	
Elongation		72°C, 40s	72°C, 10 min

## Zusätzliche Informationen zur 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 eine 3'-5'-Exonuklease-Aktivität. Dadurch können fehlerhaft eingebaute Nukleotide entfernt und dafür die richtigen, zum Template-Strang komplementären Nukleotide eingesetzt werden. Diese sogenannte Proof-Reading-Aktivität ermöglicht eine 10-12 Mal genauere (fehlerfreie) Amplifikation der Ziel-DNA. Die Phusion-Polymerase besitzt eine solche Proof-Reading-Aktivität.

### **AGAROSE-GELELEKTROPHORESE**

Die Agarose-Gelelektrophorese ist ein Verfahren zur 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, doppelsträngige 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 Auftrennung 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 wird bei ca. 50-100 ng DNA erhalten.

---

**Welche Agarosekonzentration ist zur 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 können folgende Fragen beantwortet werden:

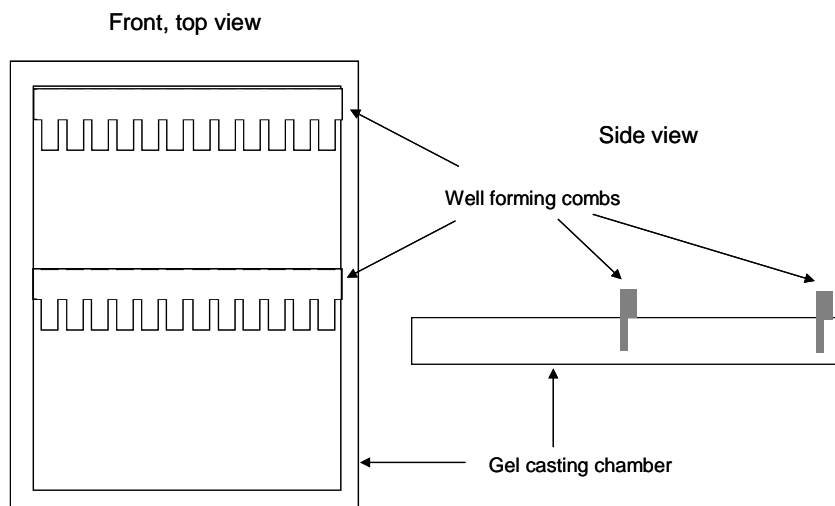
- Ist ein einzelnes PCR-Produkt entstanden?
- Entspricht die Größe des PCR-Produktes den Erwartungen? (Ist es das richtige Produkt?)
- Ist in der Negativ-Kontrolle (Wasser) ein PCR-Produkt zu sehen?

Es werden ein 1%-iges Agarose-Gel und 1x 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 (Lagerung bei 60 °C) in die Kammer gegossen. Dabei Bläschenbildung vermeiden.

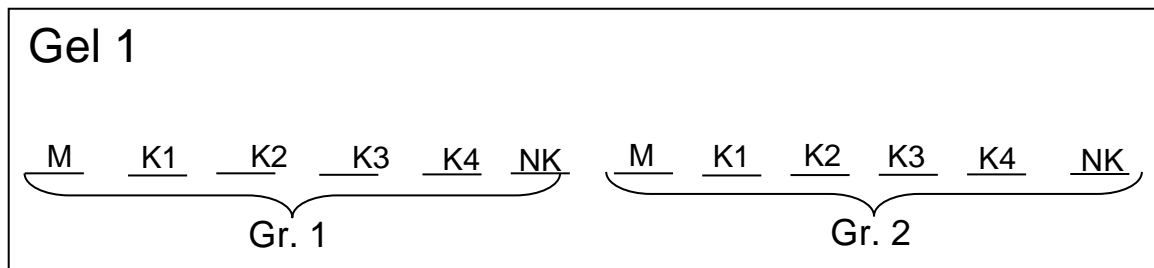
[Gelkammer und Kämme müssen sauber und trocken sein!](#)



**Abbildung 4: Aufbau der Gelkammer, Position des Kammes, Gießen und Beladen des Gels. Ein Kamm wird ca. 1 cm vor dem oberen Ende des Gels platziert (12 Probestaschen).**

- Es werden je 10  $\mu\text{l}$  „Loading Dye“-Probenpuffer (6x) zu den 50  $\mu\text{l}$  PCR-Ansätzen gegeben.
- Pipette auf 60  $\mu\text{l}$  einstellen, Probenpuffer und DNA mit der Pipette mischen (durch Aufnehmen und Entlassen)
- Nach ca. 15-30 min (abhängig von der Dicke des Gels) ist die Agarose erstarrt. Nun wird die Kammer mit 1x TAE-Puffer gefüllt (bis das Gel vollständig bedeckt ist). Die Kämmen werden entfernt und die Proben können entsprechend des Belegungsschemas (s. Abbildung 5) aufgetragen werden

- Jede Gruppe trägt jeweils 5 µl Probe (Kolonie-PCR Klon 1-4) und 5 µl Negativ-Kontrolle in den vorgesehenen Geltaschen auf.
- Vom DNA-Größenstandard „Gene Ruler 1 kb DNA-Ladder“ werden 5 µl pro Spur aufgetragen.

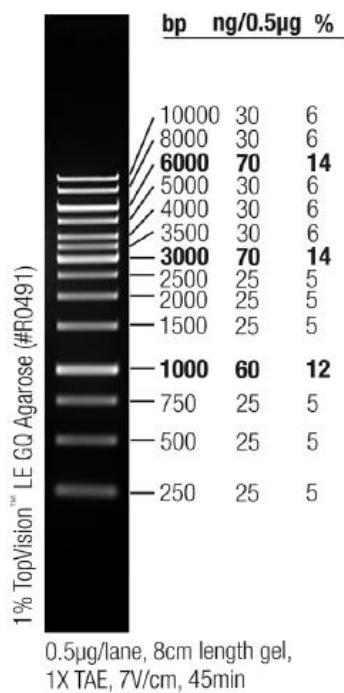


**Abbildung 5: Beladung der Agarosegele mit den PCR-Proben;  
M: Größenstandard (1 kb Marker), NK: Negativ-Kontrolle**

**Elektrophorese:** Die Gele laufen mit 100 V/ 400 mA Spannung ca. 50 Minuten

- Die negativ geladene DNA wandert zu der positiven Elektrode (Anode). Überzeugen Sie sich, dass die Kontakte richtig angeschlossen sind!
- Das Gel wird durch Gel Red gefärbt und unter UV-Licht (GelDoc, BioRad) auf Banden überprüft (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 6).



**Abbildung 6: Bandenmuster des Markers Gene Ruler 1 kb DNA-Ladder der Firma Fermentas**

Im Protokoll soll das Bild des Gels gezeigt werden und die Größe des PCR-Produktes (Esterase-Gen) bestimmt werden.

---

## 2. TAG

### PLASMIDPRÄPARATION, KONTROLL-RESTRIKTION, AGAROSE-GELELEKTROPHORESE, VORKULTUREN VON *E. COLI* BL21 (DE3) PET19B::*EstCE*

#### ÜBERPRÜFUNG DER TRANSFORMANDEN DURCH PLASMIDPRÄPARATION UND RESTRIKTION

Neben der Wachstums-unabhängigen Methode, der Kolonie-PCR, wird zur Überprüfung der Klonierung im Organismus auch die Plasmid-Präparation und anschließende Restriktionsanalyse als zweite Wachstums-abhängige Methode eingesetzt. Die Kolonie-PCR ist die schnellere, aber nicht immer zuverlässigere Methode. Daher werden in der Molekularbiologie oftmals beide Methoden gleichzeitig zur Kontrolle/Überprüfung von Klonierungen eingesetzt. Diese sollten übereinstimmende Ergebnisse liefern.

Das erste Ziel ist heute die Isolation der Plasmid-DNA (Expressionsplasmid) aus den Übernachtskulturen (5 ml, 4 Klone je Gruppe). Anschließend wird die Plasmid-DNA mit den Restriktionsenzymen *NdeI* und *BamHI*, welche bereits für die Klonierung der Esterase in den Expressionsvektor verwendet wurden, geschnitten (= restringiert) (vgl. 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.

Die Plasmid-DNA (pET19b::*EstCE*) aus den Übernachtskulturen (5 ml, *E. coli* BL21(DE3)) wird heute aus den Zellen isoliert. 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 Übernachtskultur pelletiert, dazu ~1,5 ml in ein 1,5 ml Eppendorf Cup pipettieren, 2 min zentrifugieren (13.000 rpm, RT), Überstand verwerfen (S1 Abfallflasche), und ~1,5 ml der Übernachtskultur im selben E-Cup zentrifugieren, nochmals wiederholen, Überstand verwerfen.
- Resuspendieren des Zellpellets in 250 µl **Resuspensionspuffer** (bis das Zellpellet komplett gelöst ist).
- **Ab hier bitte Handschuhe tragen!** 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 nochmals 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. Das Eluat enthält die isolierte Plasmid-DNA (pET19b::*EstCE*), Lagerung bei -20 °C üN.

---

Die 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 pro Probe 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. Beginnen Sie dabei mit dem größten Volumen (in diesem Fall Wasser) und pipettieren Sie dann nacheinander die kleineren Volumina in die Lösung.
- Geben Sie 4x je 16 µl des Mastermixes in 1,5 ml Reaktionsgefäße und geben Sie dann die Plasmid-DNA (je 4 µl) dazu
- Vorsichtig mischen und kurz an zentrifugieren („Short Spin“ Taste der Tischzentrifuge kurz gedrückt halten).
- Inkubation für 25 min bei 37 °C.

Zur Kontrolle des Expressionsvektors wird die Größe der entstandenen DNA-Fragmente über Agarose-Gelelektrophorese bestimmt. Die Durchführung erfolgt wie am vorherigen Tag (s.o.). Es werden 6 µL auf das Agarose-Gel aufgetragen. (Marker nur 5 µl).

Zum Vergleich des Verhaltens von linearer und zirkulärer DNA-Moleküle bei der Agarose-Gelelektrophorese sollen zusätzlich 5 µL des pET19b::*EstCE* Plasmids aufgetragen werden, welcher nicht mit den Restriktionsenzymen inkubiert wurde. Es reicht, wenn auf jedem Gel eine Probe des zirkulären Plasmids aufgetragen wird, demnach soll jede zweite Gruppe eine Probe anfertigen.

---

Sprechen Sie sich dafür mit der Gruppe ab, mit der Sie sich ein Agarose-Gel teilen!

- Geben Sie 5  $\mu\text{L}$  Plasmid-DNA (pET19b::*EstCE*) in ein neues E-Cup. Pipettieren Sie 2  $\mu\text{L}$  „Loading Dye“-Probenpuffer (6x) hinzu und tragen Sie die Probe mit auf das Agarose-Gel auf.

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 Vektorkarte abgelesen werden. Des Weiteren soll das Laufverhalten zirkulärer und linearer DNA-Fragmente erläutert werden.

---

## HERSTELLUNG VON VORKULTUREN: *E. COLI* BL21(DE3) pET19b::*EstCE*

Mittels Kolonie-PCR und Plasmidanalytik haben wir nachgewiesen, welche *E. coli* BL21(DE3) Klone das korrekte, Esterase-kodierende Plasmid tragen. Um die Esterase morgen in einer Expressionskultur mikrobiell herstellen zu lassen, benötigen wir die Vorkultur (Flüssigkultur) eines als positiv nachgewiesenen *E. coli* BL21(DE3) pET19b::*EstCE* Klons.

→ Welcher Klon ist bei Ihnen positiv? Welchen Klon können Sie daher zur Inokulation des Flüssigmediums nutzen? **Absprache mit den Betreuern!** Zur Inokulation des Mediums nutzen Sie die Sicherungsplatte vom Vortag.

### Material:

- LB-Sicherungsplatte der *E. coli* BL21 (DE3) pET19b::*EstCE* Klone (1-4)
- 5 mL LB-Medium (mit Ampicillin)

### Durchführung:

- Steriles Arbeiten am Brenner
- 5 mL LB-Medium werden mit Ampicillin versetzt (Zielkonz.: 100 µg/ml)
- Die Sicherungsplatte wird steril (an der Flamme) geöffnet. Ein positiver *E. coli* BL21 (DE3) pET19b::*EstCE* Klon wird (nach Absprache mit den Betreuern) zur Inokulation des Mediums verwendet:
- Einige Zellen des Klons werden mit einer sterilen Spitze von der Platte abgekratzt, die Spitze wird dann in das Medium abgeworfen.
- Die Kulturen werden über Nacht bei 37 °C und 180 rpm inkubiert.

---

## 3. TAG

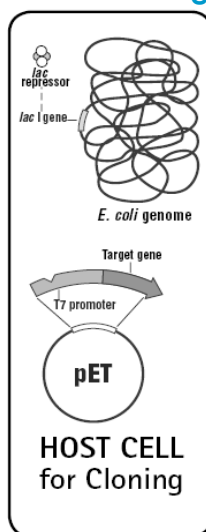
### REKOMBINANTE EXPRESSION DES ESTERASEGENS

#### Theorie zur heterologen Überexpression

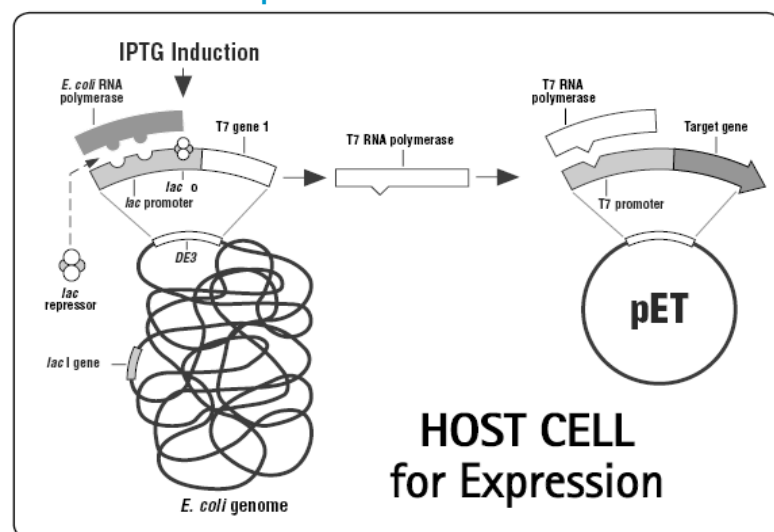
Zur Aufklärung der Funktion eines unbekanntes Proteins aus einem bestimmten Organismus ist es oft notwendig über ausreichende Proteinmengen zu verfügen. Damit können dann z.B. enzymatische Tests, Bindungsstudien, immunologische Versuche u.v.m. durchgeführt werden. Oft kann das Protein allerdings nicht 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. Abbildung 1, Abbildung 7, Abbildung 8), 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.

Die Expression eines Gens in *E. coli* ist nicht immer unproblematisch. Oft neigen rekombinant hergestellte 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 Herstellung von rekombinanten Membranproteinen ist oft problematisch, da der Einbau solcher Proteine in die *E. coli*-Membran meistens toxisch ist. Dies gilt übrigens auch für die übermäßige Herstellung von *E. coli*-eigenen rekombinanten Membranproteinen. Die Herstellung von rekombinanten löslichen bakteriellen Proteinen liefert in der Regel aber sehr hohe Ausbeuten.

#### Hosts for cloning



#### Hosts for expression



Novagen-pET System Manual-11th

**Abbildung 7: Das Prinzip des pET-Expressionssystem in *E. coli*. Zur (heterologen) Überexpression in den speziellen *E. coli* DE3-Stämmen werden verschiedene T7-Expressionvektoren wie z.B. pET19b verwendet.**

---

## ZELLANZUCHT UND INDUKTION DER GENEXPRESSION

Bei der Auswahl des Substrates und der Wachstumsbedingungen zur heterologen Genexpression in einem Modellorganismus muss als erstes gewährleistet sein, dass der gewünschte Promotor induziert und das entsprechende Gen 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 des Esterase-Expressionsstammes *E. coli* BL21 (DE3) pET19b::*EstCE*
- 1 steriles Kulturgefäß mit 100 ml LB-Medium
- 1 x 50 ml Falcon-Tube pro Gruppe
- Küvetten
- Eppendorf Cups
- IPTG-Stammlösung (1 M)
- Ampicillin-Stammlösung (Stock-Konz.:100 mg/ml; Endkonz.: 100µg/ml )
- LB-Medium (als Referenz und zum Verdünnen)
- Falcon-Tube-Ständer

---

Durchführung:

- Sie benutzen die entsprechende Übernachtskultur (vom Vortag). 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.  $\text{Ni}^{2+}$ ), kann der His-Tag zur Reinigung des Proteins genutzt werden.

Die Übernachtskultur dient als Vorkultur für die Zellanzucht. Die aus der heutigen Expressionskultur gewonnenen Zellen dienen anschließend der Isolierung des Proteins.

- **Die Inokulation (Animpfen) der Kultur erfolgt in der Regel VOR der Praktikums-Vorbesprechung**

Für Ihre Expressionskultur impfen Sie pro Gruppe 100 ml LB-Medium an:

- Hierzu pipettieren Sie die **Ampicillin-Stammlösung (Endkonzentration 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ )** in das Kulturgefäß und überführen 1 ml LB-Medium in eine Halb-Mikroküvette (als Blank für die  $\text{OD}_{600}$ -Messungen, dieser wird als Referenz beibehalten und auf dem Platz stehen gelassen)
- Pipettieren Sie aus der Vorkultur des ausgewählten Klons unter sterilen Bedingungen 2 ml in die 100 mL LB-Ampicillin-Medium (entspricht einer Inokulation von 2% (v/v)).
- Start  $\text{OD}_{600}$  nach Inokulation bestimmen (R: Referenz=Blank, T:Transmission=Messung)
- Die Kulturen werden dann im Schüttler bei 37°C und 180 rpm inkubiert.
- Überprüfen Sie die  $\text{OD}_{600}$  alle 30 min (nach der Vorbesprechung).
- Sobald eine  $\text{OD}_{600}$  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 13.000 rpm, 1 min, RT. Der Überstand wird verworfen) → das Pellet wird als Probe für die SDS-PAGE („vor Induktion“) weggefroren
- Geben Sie IPTG in den Kolben: Die Protein Expression wird durch die Zugabe von **1 mM** Isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactopyranosid (IPTG) –Lösung (Stock-Lösung hat die Konzentration 1 M IPTG) in die 100 ml Kultur

---

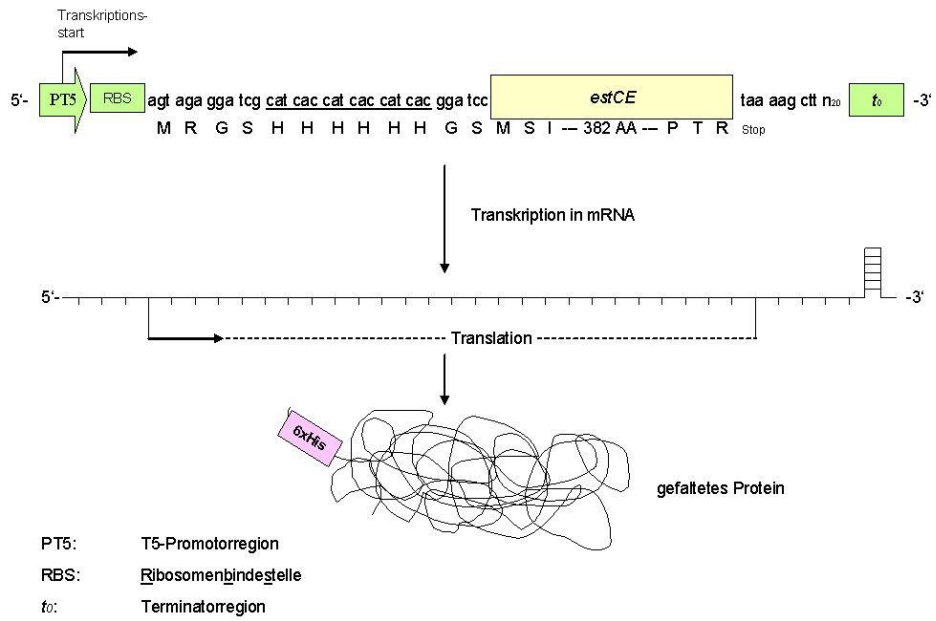
induziert. Die Lösung enthält somit eine IPTG-Endkonzentration von 1 mM.

- Anschließend inkubieren Sie für 3 Stunden bei 37 °C und 180 rpm.

#### 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, Überstand werfen, ... (s.o.))!!! Das Pellet wird als Probe für die SDS-PAGE („nach Induktion“) weggefroren.
- 50 mL Falcon-Tubes im Leerzustand abwägen! (Diese werden für die Ernte der Kultur verwendet. Um später das Nassgewicht des Zellpellets bestimmen zu können, benötigen Sie das Leergewicht des Falcons.)
- Messen Sie erneut die OD<sub>600</sub> (ggf. Verdünnung der Proben zur Detektion am Photometer notwendig!)
- Füllen Sie 50 ml Kultur in ein steriles 50 ml Falcon-Tube und suchen Sie sich eine 2. Gruppe zur Zentrifugation, um beide Gefäße gegeneinander auszutariieren (**Genauigkeit +/-10 mg**).
- Zentrifugieren der Zellen bei 4.500 rpm in der Biofuge für 10 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 (S1-Abfallflasche)!
- Anschließend geben Sie erneut 50 ml der Kultur in dasselbe Falcon Tube und wiederholen die Zentrifugation.
- Anschließend wird der Überstand verworfen (S1-Abfallflasche)
- Falcon-Tubes erneut wiegen und das Nassgewicht bestimmen.
- Das Zellpellet wird bei -80°C gelagert.



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

---

## 4. TAG

### **ZELLAUFSCHLUSS, PROTEINREINIGUNG, BRADFORD- PROTEINBESTIMMUNG, INDIKATORPLATTENTEST**

#### **ZELLAUFSCHLUSS UND PROTEINREINIGUNG**

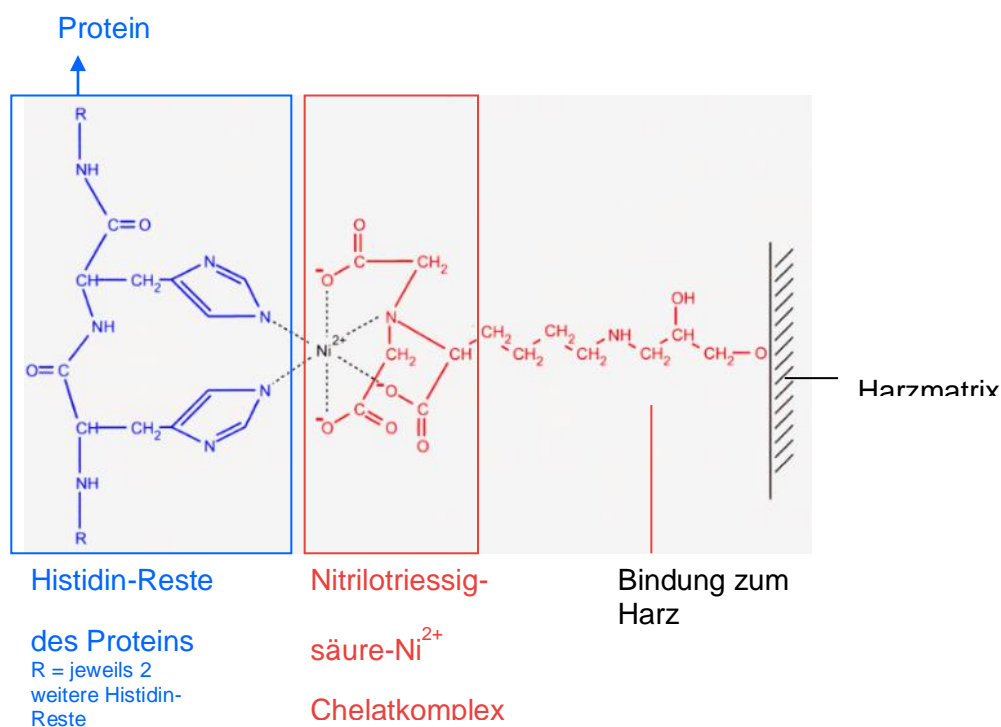
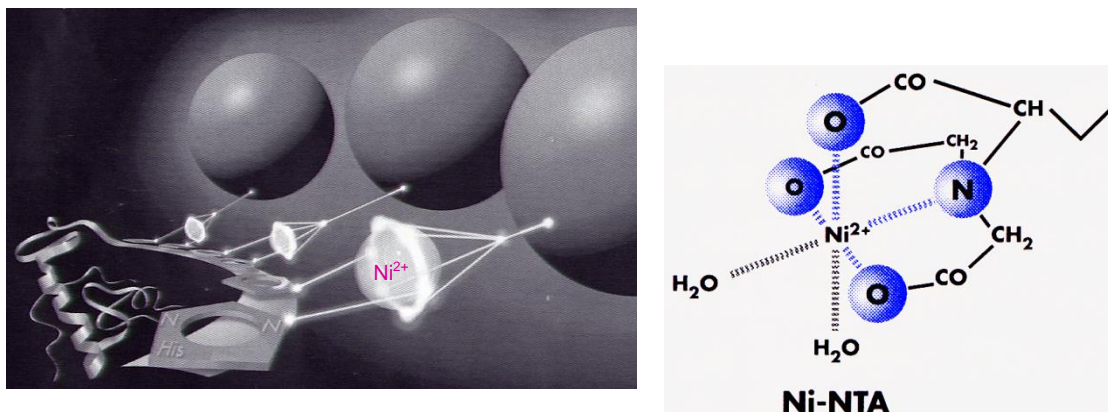
Proteinreinigung bezeichnet den Vorgang aus einer Lösung, die mehrere Proteine enthält, eines oder mehrere dieser Proteine zu isolieren. Meistens wird die Trennung auf biochemischem Wege (z.B. Fällung) und unter Verwendung chromatographischer Systeme (FPLC) ausgeführt.

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, um 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 wird zwischen Methoden der enzymatischen Lyse und der mechanischen Lyse unterschieden. 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 Zellyse beinhalten Verfahren des Schüttelns mit gleichzeitiger Schürfung und Verfahren der Scherung. Am häufigsten wird das „French pressure cell“-Verfahren verwendet, 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 wird von zellfreiem Rohextrakt gesprochen.

## PROTEINREINIGUNG EINER ESTERASE MITTELS 6XHis-TAG:

### ZELLAUFSCHLUSS

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

#### Material:

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

#### Durchführung:

- Das Zellpellet wird mit 1x LEW Puffer versetzt (3 ml pro 1 g Pellet)  
Der LEW 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 Waschschritten 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 3x 5 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!!!).
  - Das Zellpellet wird verworfen
  - Den Rohextrakt auf Eis lagern
  - Außerdem werden 100 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!**

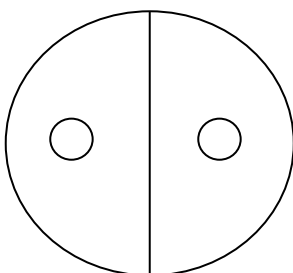
#### **Material:**

- 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). In der Mitte jeder Hälfte wird ein Loch in die Platte „gestanzt“. Hierzu verwenden Sie blaue abgeschnittene Pipettenspitzen.



- Es werden 30  $\mu\text{L}$  des Rohextraktes auf eine Hälfte der Tributyrin-Indikatorplatte getropft.
- Auf die andere Hälfte wird dieselbe Menge einer Negativkontrolle (Wasser) getropft.
- Daran schließt sich eine Inkubation von mind. 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 auf Eis 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)

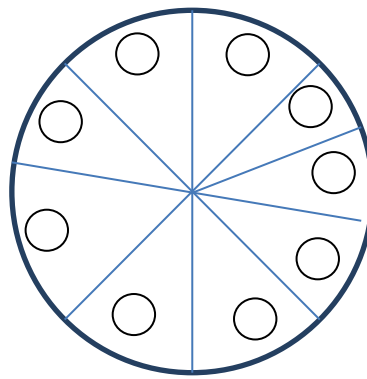
## INDIKATORPLATTENTEST II

### **Anmerkung:**

**Die benötigten Platten werden Ihnen fertig vorbereitet gestellt!**

Tributylin-Indikator-Plattentests zur Bestimmung der Esterase-Aktivität in den Fraktionen.

- Der Boden der Indikator-Platte wird in 9 gleich große Felder unterteilt (siehe Schablone) und entsprechend kleine Löcher in den Agar „gestanzt“ (s.o.).



- Es werden in jeweils einem Feld 30  $\mu\text{L}$  des Zellpellets vor und nach Induktion aufgetragen (die Pellets werden in 50  $\mu\text{l}$  Wasser gelöst), dasselbe gilt für den Rohextrakt, den Durchlauf, die beiden Wasch- und die drei Elutions-Fractionen (je 30  $\mu\text{L}$ )
- Die Indikatorplatte wird bei 37  $^{\circ}\text{C}$  für 1h inkubiert.

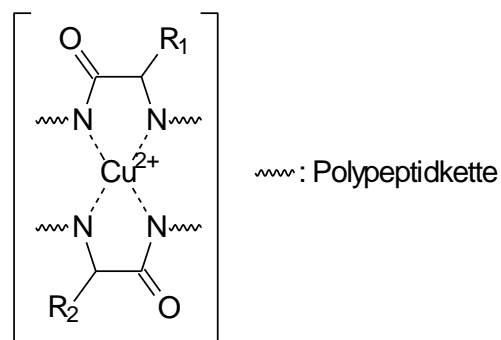
Wenn nötig werden die Tributyrin-Platten länger bei 37  $^{\circ}\text{C}$  inkubiert!

## 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 Detergenzien 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  $\text{Cu}^{2+}$ -Ion mit zwei Peptidbindungen einen gefärbten Komplex (s. Abbildung 11).

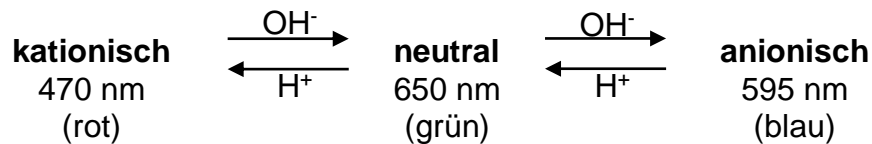


**Abbildung 10: Protein-Kupferkomplex der Biuret-Reaktion (nach Lottspeich und Zorbas 1989)**

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. Bei diesem Test handelt es sich um eine Kombination der Biuret-Reaktion mit einem Folin-Ciocalteu-Phenol-Reagenz. In alkalischer Lösung bildet sich zunächst der schon erwähnte Kupfer-Protein-Komplex. Durch den Zusatz des Reagenzes, bestehend aus Molybdat und Wolframat Heteropolyphosphorsäuren, wird vermutlich das  $\text{Cu}^{2+}$ -Ion im Kupfer-Protein-Komplex zu  $\text{Cu}^+$  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 der Angaben des Herstellers durchgeführt. Als Standardprotein wird Rinderserumalbumin (BSA) eingesetzt.

#### Material:

- BioRad Reagenz
- BSA - Stammlösung (0,2 µg/µL) (Bovine-Serum-Albumin, Fa. Sigma)
- H<sub>2</sub>O bidest.
- Halb-Mikroküvetten

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, diese muss **vollständig aufgetaut sein!**
- Die Proben für die Kalibriergerade werden nach folgendem Pipettierschema in 1 ml Plastikküvetten angesetzt (Doppelbestimmung der Kalibriergeraden!): Achten Sie dabei darauf immer das größte Volumen zuerst zu pipettieren und anschließend das kleinere Volumen in die vorgelegte Lösung hinein zu pipettieren. So bleibt der Pipettierfehler möglichst gering! Erst zuletzt wird das Bradford-Reagenz hinzugegeben, achten Sie hierbei darauf bei jeder Probe eine neue Spitze zu nehmen und die Blasenbildung zu vermeiden!

**Tabelle 4: Pipettierschema BSA-Kalibriergerade**

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

- Als Blank verwenden Sie die Probe mit 0 µg BSA
- 5 µl des Rohextraktes werden 1:50 mit 245 µl H<sub>2</sub>O 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. H<sub>2</sub>O (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: mit Microsoft Excel die  $E_{595}$  (y-Achse) gegen die BSA-**Konzentration** (x-Achse; muss berechnet werden!) auftragen. Die Gerade geht durch den Nullpunkt!
  - 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 AUSGEDRUKT MITBRINGEN!  
DIE KALIBRIERGERADE UND DIE GENAUE ENZYMMEGE DER  
EINZELNEN FRAKTIONEN WIRD FÜR DIE ENZYMKINETIK BENÖTIGT  
(TAG 5)!**

---

## 5. TAG

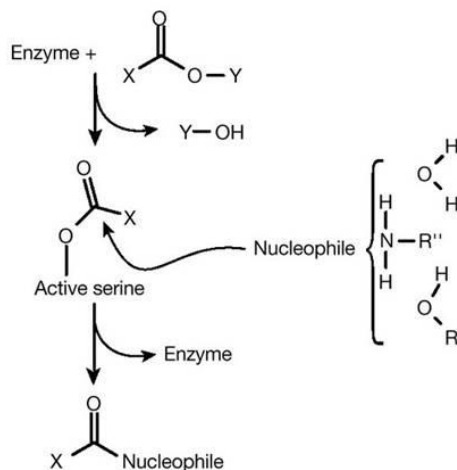
### **BIOCHEMISCHE PROTEINCHARAKTERISIERUNG**

#### **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  $\alpha$ -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 11 gezeigt (Jäger et al., 1999; Schmid et al., 2001). Esterasen hingegen benötigen die bei Lipasen erforderliche Grenzflächenaktivierung nicht, da sie auch wasserlösliche Substrate umsetzen können. Der Reaktionsmechanismus entspricht jedoch dem der Lipasen.



**Abbildung 11: 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 Nucleophils 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 *p*NP-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 *p*NP-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:

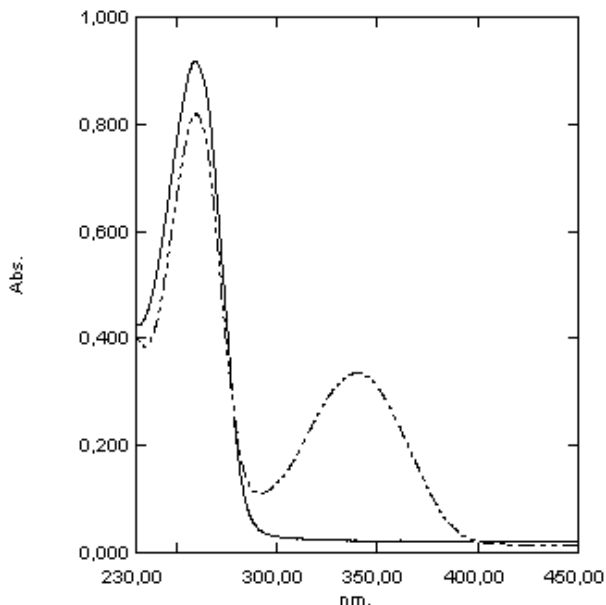
K. E. Jäger, B. W. Dijkstra und M. T. Reetz (1999): Bacterial biocatalysts: molecular biology, three-dimensional structures, and biotechnological applications of lipases. *Annu Rev Microbiol.* **53**:315-51.

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 aufgrund 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<sup>+</sup>) beteiligt ist. Dieses wird je nach Reaktionsführung oxidiert oder reduziert, wobei sich sein Absorptionsspektrum ändert. Derartige Verfahren werden als sog. optische Tests bezeichnet. Da pro enzymatischem Oxidationsschritt auch jeweils ein Molekül NAD<sup>+</sup> reduziert (bzw. in Reduktionsreaktionen ein Molekül NADH oxidiert) wird, lässt sich die Enzymaktivität spektroskopisch verfolgen.



**Abbildung 12: Absorptionsspektren NAD<sup>+</sup> und NADH**

Die abgebildeten Spektren, jeweils aufgenommen für 0.05 mM Lösungen,  $d=1\text{cm}$ , geben die Absorptionskurven der beiden Formen des Coenzym wieder (NADH = gepunktete Linie; NAD<sup>+</sup> = durchgehende Linie). Unter Anwendung des Lambert-Beer'schen Gesetzes lässt sich die Geschwindigkeit der enzymatischen Reaktion unter Beobachtung der Absorptions-änderung von NAD<sup>+</sup> 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.

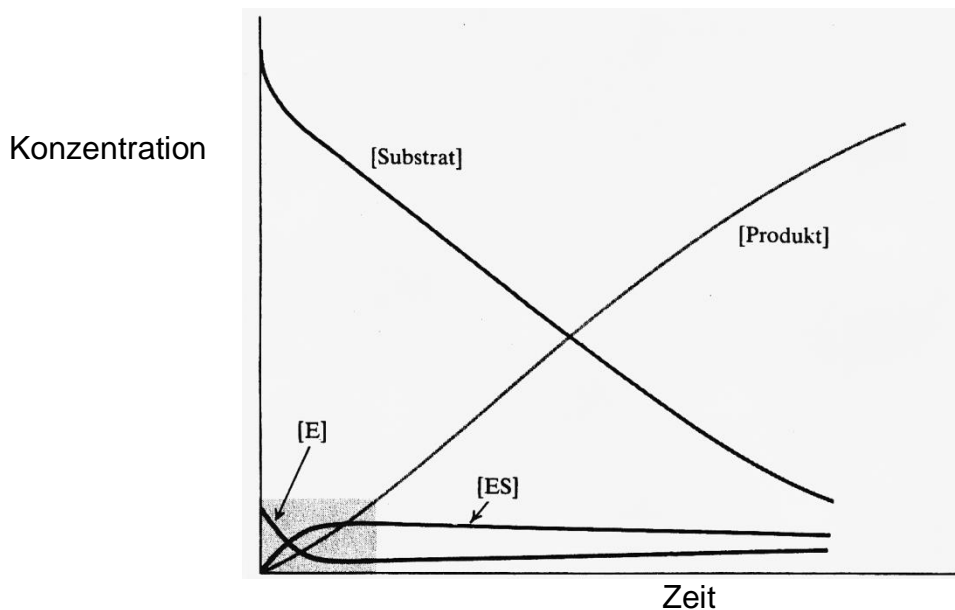
$$v = -\frac{d[S]}{dt} = \frac{d[P]}{dt} = k_1 \cdot [S]$$

$k_1$  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:

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

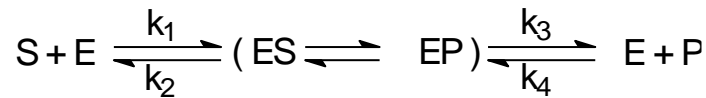
Dies bedeutet, dass je größer die Konzentrationen der Substrate, desto schneller ist die Reaktion.

Wird bei gegebener Enzymkonzentration die Abhängigkeit der Reaktionsgeschwindigkeit von der Substratkonzentration gemessen, so ergibt sich ein „hyperbolischer“ Kurvenverlauf (siehe Abbildung).



**Abbildung 13: Konzentrationsänderungen von Substrat [Substrat], Enzym [E], Enzymsubstratkomplex [ES] und Produkt [Produkt] in Abhängigkeit von der Zeit**

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 Sättigungseffekt, unterscheiden sich aber oft sehr in der Substratsättigungskonzentration. Dieser experimentelle Befund lässt sich durch die Anwendung der Reaktionskinetik auf das folgende Reaktionsschema erklären.

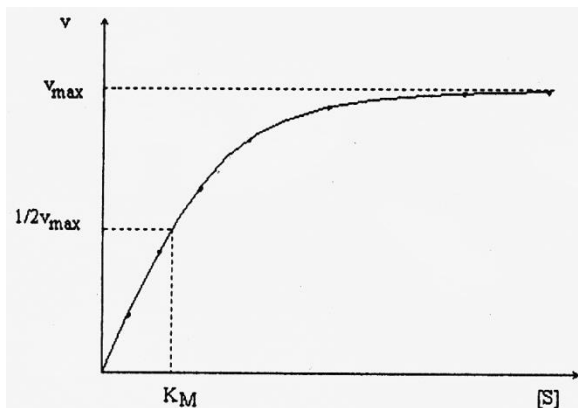


Ein Enzym E kann mit seinem Substrat reversibel den Enzym-Substrat-Komplex ES bilden. In diesem Komplex liegt das Substrat in aktivierter Form vor. Der Komplex geht in den EP-Komplex über und zerfällt dann in Produkt P und freies Enzym.

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:

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

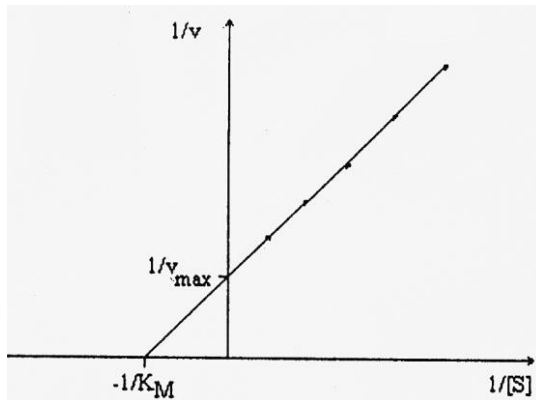


**Abbildung 14: Reaktionsgeschwindigkeit in Abhängigkeit von der Substratkonzentration. Gekennzeichnet sind hier die maximale Reaktionsgeschwindigkeit ( $v_{\max}$ ), die Halbmaximale Reaktionsgeschwindigkeit ( $1/2 v_{\max}$ ), sowie die Michaeliskonstante ( $K_M$ )**

Bei  $K_M = [S]$  beträgt die Reaktionsgeschwindigkeit  $1/2 v_{\max}$ . 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).

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



**Abbildung 15: Lineweaver-Burk Darstellung zur Bestimmung der Michaelis-Menten Parameter**

Unter Anwendung des Lambert-Beer'schen 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,  $\varepsilon$  = molarer Extinktionskoeffizient,  $d$  = Lichtweg (= Schichtdicke der Küvette), häufig 1 cm.

---

Material:

- 100 mM Acetatpuffer, pH 6,5
- Substratlösung (10 mM pNP-Butyrat in Isopropanol)  
**Bitte informieren Sie sich im Vorhinein über die H- und P-Sätze sowie die Entsorgung von para-Nitrophenol-butytrat!**
- (auf Eis lagern!!!)
- E-Cups
- Enzym (auf Eis lagern!!!)
- Küvetten
- Stoppuhr

**Durchführung: Esteraseaktivität in Abhängigkeit der Temperatur:**

- Reaktionsvolumen: 1 ml (Einfachbestimmung) in 1 ml Küvetten  
**0,25 µg Enzym (sinnvolle Verdünnung)**
- Anhand der Bestimmung der Proteinkonzentration Ihrer Eluat-Fraktion am 7. Praktikumstag (Bestimmung der Proteinkonzentration nach Bradford), können Sie berechnen, welches Volumen [µl] ihres Eluats sie pro enzymatische Reaktion einsetzen müssen, um 0,25 µg des Enzyms darin vorliegen zu haben.
- Das von Ihnen berechnete, erforderliche Volumen an Eluat sollte relativ gering sein. Durch das Pipettieren geringer Volumina wird allerdings ein größerer experimenteller Fehler erzeugt und das Ergebnis Ihrer Messungen folglich verfälscht. Daher sollen Sie im nächsten Schritt überlegen, welche Verdünnung des Eluats sinnvoll ist, um ein größeres Volumen des Enzyms pro Reaktion zu verwenden (sie sollen weiterhin 0,25 µg Enzym pro Reaktion einsetzen!). Verdünnen Sie das Eluat mit Reaktionspuffer so, dass sie ein Volumen zwischen 10 und 50 µL zur Reaktion hinzugeben müssen.
- Zunächst sollen 4 Reaktionen vorbereitet werden (Referenz, RT, 40 °C und 60 °C).

- Berechnen Sie die in Ihren Reaktionen erforderlichen Volumina an Enzym (x-fache Verdünnung) und des Reaktionspuffers (Acetatpuffer) aus. In einem Gesamtreaktionsvolumen von 1 mL werden zuletzt 100 µl pNP-Substrat (Stock: 10 mM) zugegeben (siehe unten).  
→ fertigen Sie hierzu eine Tabelle in Ihrem Laborjournal an
- im Referenzansatz wird ein entsprechendes Volumen an Acetat-Puffer eingesetzt

Zuerst wird der Acetatpuffer und das Enzym in einem 1,5 ml E-Cup gemischt und bei der zu messenden Temperatur 2 min vorgewärmt. Der Referenzansatz wird bei RT gehalten. Anschließend die Reaktion durch Zugabe des Substrates (100 µl der 10 mM Stock-Lösung) 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 nach den 10 min auf Eis zwischenlagern, 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 Extinktionskoeffizienten von pNP und der gemessenen Extinktion die gebildete Produktkonzentration an pNP berechnet. Es gilt nach dem Lambert-Beer'schen-Gesetz zur Berechnung der Extinktion:

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

wobei

- E = Extinktion
- $\varepsilon$  = 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  $\mu\text{mol}$  pNP freisetzt und wird wie folgt berechnet:

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

Berechnen Sie anhand Formel (1) zunächst die gebildete Produktkonzentration im Ansatz. Hieraus wird die gebildete Stoffmenge pNP in  $\mu\text{mol}$  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 behalten, wird für die Substratabhängigkeit noch benötigt!**)

**Tabelle 5: Berechnung der spezifischen Aktivität der Esterase**

Substrat	Temp. [°C]	$E_{410}$	Konzentration pNP [ $\mu\text{M}$ ]	Stoffmenge pNP [ $\mu\text{mol}$ ]	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 (diesmal mit **0,5 µg Enzym**) entsprechend der zuvor durchgeführten Aktivitätsmessungen, nur dass verschiedene Substratmengen eingesetzt werden (**Test: Zweifachbestimmung**). Bitte berechnen Sie, welche Volumina der 10 mM Substrat-Stocklösung Sie pro zu testender Substratkonzentration einsetzen müssen. Passen Sie entsprechend die zu pipettierenden Volumina an Acetatpuffer an. → Tabelle im Laborjournal

**Tabelle 6: Berechnung der spezifischen Aktivität der Esterase bei unterschiedlichen Substrat-Konzentrationen**

<b>Substrat [<math>\mu\text{M}</math>]</b>	<b><math>E_{410}</math></b>	<b>Konzentration <math>p\text{NP}</math> [<math>\mu\text{M}</math>]</b>	<b>Stoffmenge <math>p\text{NP}</math> [<math>\mu\text{mol}</math>]</b>	<b>Spez. Aktivität [U/mg]</b>
20				
50				
100				
200				
500				
1000				
2000				
4000				
6000				

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

---

## 6.TAG

### SDS-PAGE, WESTERN BLOT UND IMMUNODETEKTION

#### SDS-PAGE

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

Bei der **Nativ-Polyacrylamidgelelektrophorese** erfolgt die Trennung 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-Polyacrylamidgelelektrophorese** 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 liegenden Sammelgel bestehen, was zu einer besseren Trennung der Protein-Untereinheiten führt. Es gibt verschiedene Puffersysteme, die je nach Trennproblem spezifische Vorteile 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.**

**In diesem Praktikum werden ausschließlich vorbereitete SDS-PAGE-Gele verwendet!**

---

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 sie im Praktikum verwendet wird, ca. 1.500 Euro kostet. Also bitte mit Vorsicht behandeln.

### ELEKTROPHORESE

Die gekauften Gele werden nun mit den unten aufgeführten Proben beladen. Zusätzlich werden alle Gruppen eine Elutions-Probe (je nach Testergebnis der Tributyrin-Indikator-Platten) auf ein gesondertes SDS-Gel auftragen. Dieses dient der Untersuchung mittels Antikörpern (siehe unten unter „Western Blotting“, anschließend „Immundetektion“).

#### Durchführung:

Mischen Sie die unten angegebenen Mengen der einzelnen Proben jeweils mit Wasser und Probenpuffer (2 Teile der Proteinprobe mit 1 Teil Probenpuffer) Die Zellpellets vor und nach Induktion sollten bereits in 50 µl H<sub>2</sub>O gelöst sein. Bereiten Sie parallel auch die Proben für die SDS-PAGE des Western Blots vor!

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. 2 µl Durchlauf + 8 µl Wasser + 5 µl Probenpuffer
6. 5 µl Waschen 1 + 5 µl Wasser + 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

→ Probenpuffer nur mit Handschuhen unter dem Abzug pipettieren!

- 
- Erhitzen Sie alle Proben für 5 min bei 94 °C (Denaturierung) im bereitgestellten Heizblock. Stellen Sie sicher, dass die E-Cups richtig verschlossen sind!
  - Zentrifugieren Sie alle Proben bei 13.000 rpm für 30 Sekunden
  - Unter Anleitung der Betreuer wird die Apparatur für die SDS-PAGE aufgebaut. Dabei werden die Gele (Kamm vorher entfernen) in die Elektrophoreseapparatur eingesetzt (Luftblasen unter dem Gel entfernen) und das obere Pufferreservoir mit 10fach verdünnten Elektrophoresepuffer befüllt. Das untere Pufferreservoir wird mit 10fach verdünnten Elektrophoresepuffer gefüllt.
  - 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.

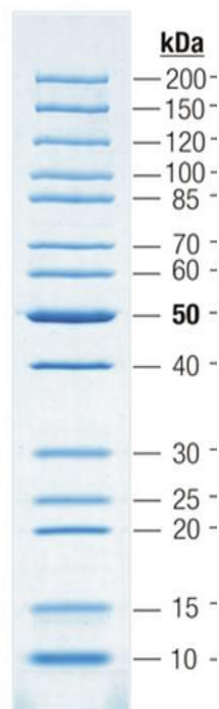
## FÄRBEN

Nur das SDS-Gel mit den Reinigungsfraktionen und dem Unstained Ruler färben! Das SDS-Gel für den Western Blot (Prestained Ruler) nicht färben! Dieses wird zunächst in der Apparatur belassen.

### Durchführung:

- Entnehmen Sie nach der Elektrophorese vorsichtig das Gel (samt Plastikplatten) aus der Kammer.
- Die Plastikplatten vorsichtig mit einem Spatel voneinander trennen (Niemals an den Ecken mit dem Spatel ansetzen, sonst brechen die Platten!!) und das Gel in den Färbebehälter mit etwas Coomassie-Blue-Färbelösung (bereitgestellt) 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
- Das zu erwartende Protein hat eine Größe von ca. 45 kDa



**Abbildung 16: Bandenmuster des Protein-Größenstandards (PAGE-Ruler Unstained der Firma Fermentas)**

---

## Zusätzliche Information

### 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.

## WESTERN BLOTTING

Der Western Blot (bei nachfolgender Immundetektion 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 und II) **das *Semidry-Blot-System* (im Praktikum)**. 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, Immundetektion) **(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 (S. 60).

Material:

- Transfer-Puffer
- Turbo-Blot-Kammer (Biorad)
- PVDF(Polyvinylidenfluorid)-Membranen
- Whatman-Papiere

**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 (vgl. S. 52 f.).
- ALLERDINGS: Jede Gruppe erhält nur eine Spur auf einem der SDS-Gele (12%ig)
- Je nach Ergebnis der SDS-PAGE nach Proteinreinigung werden 10 µl der E1, E2 oder E3 Fraktion mit 5 µl Probenpuffer vermischt, aufgekocht und auf das Gel aufgetragen
- 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 einige Minuten in TurboBlot-Transfer-Puffer bei RT inkubiert.
- Die PVDF-Membran wird zunächst in 100% Ethanol aktiviert dann einmal in den Transfer-Puffer getaucht.
  
- Blot-Aufbau („Sandwich“) für ein Gel:
  - Unterseite der Blot-Schublade (Plus-Pol)
  - 1 Whatman Papier
  - PVDF-Membran
  - SDS-Gel
  - 1 Whatman Papier
  - Deckel der Blot-Schublade (Minus-Pol)
  
- Achtung: Luftblasen entfernen! Nach jeder Schicht des „Sandwichs“ wird diese mit etwas Transfer-Puffer befeuchtet.
- Blots in die Kammer setzen
- Das Blotting erfolgt für 25 min bei 25V.

## IMMUNODETEKTION (Antigen-Antikörper-Bindungs-PRINZIP)

Im Praktikum wollen wir über die Methode der Immundetektion 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 rekombinant hergestellten Protein als Antigen erkennt und in Kaninchen gewonnen wurde. Zusätzlich ist der Antikörper mit alkalischer Phosphatase gekoppelt, sodass kein sekundärer Antikörper mehr erforderlich ist (Abbildung 13).

### Material:

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

---

### Zusätzliche Informationen

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):
  - **Anti-His-Tag AK** mit gekoppelter Horse-raddish peroxidase (HRP) (Firma Abcam)
- Farbstoff Clarity Western ECL Substrate = Substrat für die HRP
- Kontrolle des Transfers:
  - Die Proteinbanden des Prestained-Markers sollten auf der Membran zu sehen sein (Abbildung 17)

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** 1:10000 (2 µl) in 50 ml TBST + 5 % Milchpulver  
1 h auf der Wippe
- **Waschen:** 3 x mit je 30 ml TBST, je 5 min
- **Waschen:** 2 x mit 30 ml TBS, je 5 min
- **Entwickeln:** Blot in eine Klarsichthülle legen, Prestained Protein-Größenstandard mit fluoreszierendem Stift nachzeichnen und mit ~ 1 ml Clarity Western ECL Substrate überschichten (Je 0,5 mL der einzelnen Komponenten vorher mischen und dann auf die Membran geben) (je nach Blotgröße!)
- Folie **blasenfrei!** schließen
- 5 min Inkubation
- **Detektion** der Chemilumineszens (VersaDoc, BioRad)

Der Farbstoff Luminol wird durch die mit dem Antikörper konjugierte Horse Raddish Peroxidase oxidiert, was die Freisetzung von Chemilumineszenz zur Folge hat. Die Dokumentation erfolgt mit Hilfe des VersaDoc-Systems der Firma BioRad.

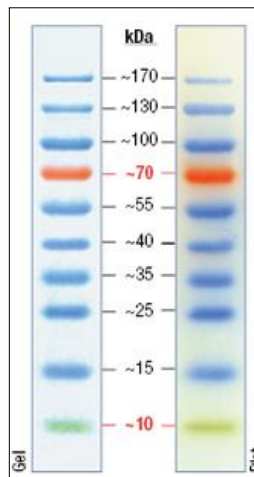


Abbildung 17: Bandenmuster des Prestained Protein-Größenstandards (PageRuler Prestained Protein Ladder (Fermentas)).

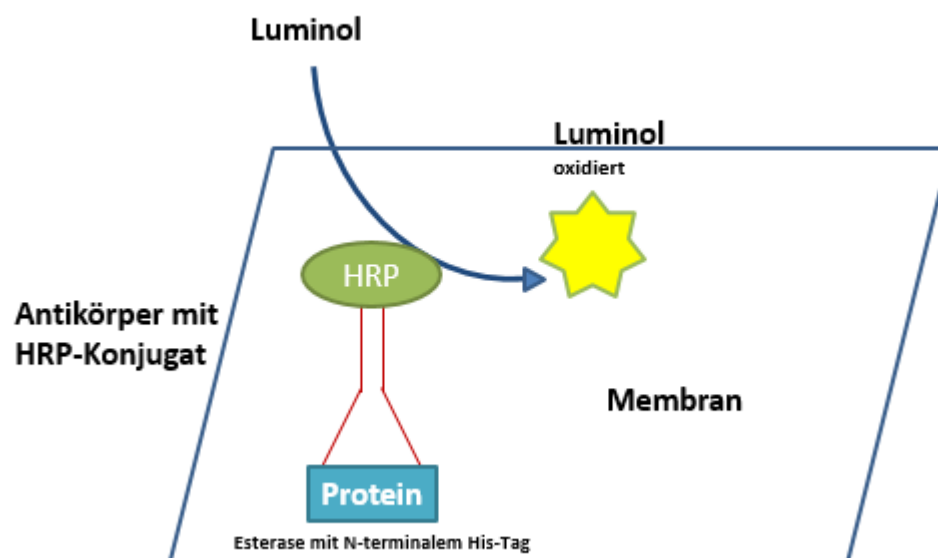


Abbildung 18: Prinzip der Immunodetektion

---

7. TAG

**VERSUCHSWIEDERHOLUNG & LABORREINIGUNG**

---

## ANHANG

### **VORBEREITUNG DER LABORMATERIALIEN (REZEPTE SIEHE ANHANG)**

- 100 ml LB-Medium für Expressionskultur (in 500 mL Kolben)
- 20 mL LB-Medium für die kompetenten Zellen (in 100 mL Kolben)
- LB-Agar gießen mit Ampicillin, Endkonz.: 100 µg/ml (Stammlsg.: 100 mg/ml, wird von den Betreuern gestellt)

#### **Agar am Morgen autoklavieren mit Fisch!**

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

- Reagenzgläser mit je 5 ml LB-Medium
- 1%-ige Agarose-Lösung mit 1x TAE-Puffer
- 1M IPTG ansetzen
- 5 L SDS-Tris-Glycin – Puffer (SDS: 1 %, TRIS: 0,25 M, Glycin: 1,92 M)
- 1 L TBS-Puffer (500 mM NaCl, 20 mM Tris-HCl, pH 7.5)
- 1 L TBST-Puffer (500 mM NaCl, 20 mM Tris-HCl, pH 7.5, 0,5 mL Tween 20)
- 1 L TurboBlot Transfer-Puffer (48 mM TRIS, 40 mM Glycine, 200 mL EtOH, 0,75 g SDS-Lösung)
- 1 L 100mM Acetatpuffer pH 6,5
- 100 mL TRIS-Puffer (10 mM TRIS/HCl, pH 7,0)

---

## 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 hsdS<sub>B</sub> (r<sub>B</sub><sup>-</sup>m<sub>B</sub><sup>-</sup>) gal dcm (DE3) hsdS gal (λ<sub>clts857</sub> ind1 Sam7 nin5 lacUV5-T7 gene1)*

## MEDIEN-/ LÖSUNGENREZEPTE

### CaCl<sub>2</sub> Puffer

PIPES	10 mM
CaCl <sub>2</sub>	60 mM
Glycerol	15%

### 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<sub>2</sub>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 H<sub>2</sub>O gelöst und 100% EtOH (50:50)  
bei -20°C gelagert

#### **LB-Medium**

LB-Broth (Sigma) 2 g  
werden in 100 ml H<sub>2</sub>O 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 H<sub>2</sub>O 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 H<sub>2</sub>O gelöst,  
steril filtriert und  
portioniert bei -20°C gelagert

### **5. Lösungen für den Zellaufschluß und die Proteinreinigung**

#### **Lysis-Äquilibration-Wasch- Puffer (vorbereitet)**

NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 50 mM  
NaCl 300 mM

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

#### **Elutions Puffer (vorbereitet)**

NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 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 <sub>2</sub> 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 <sub>2</sub> O bidest ad 100 ml	
pH 8,8	

**Sammelgelpuffer (vorbereitet)**

Tris (Tris-(hydroxymethyl)-aminomethanohydrochlorid)	6,1 g
SDS (Natriumdodecylsulfat)	0,4 g
H <sub>2</sub> 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 <sub>2</sub> 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 <sub>2</sub> O bidest ad 50 ml	

**Ammoniumpersulfat (APS) (vorbereitet)**10 % (w/v) in H<sub>2</sub>O bidest**N,N,N',N'-Tetramethyldiamin (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  
H<sub>2</sub>O dest.: 500 ml

### **Entfärbelösung**

H<sub>2</sub>O 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 Immundetektion**

### **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) Ethanol 200 ml  
add. 1 L H<sub>2</sub>O

### **10x TBS: (vorbereitet)**

500 mM Tris 60,57 g  
1,5 M NaCl 87,66 g  
add. 1 L H<sub>2</sub>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 Meerrettich Peroxidase (HRP) (anti-rabbit (Firma Abcam))

### **Clarity Western ECL Substrate (BioRad)**

---

## **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)**

**Mw = 209,2 g/mol**

**Dichte = 1,19 g/ml**

- 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 Versuchsprotokoll

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. Sie dürfen in Ihrem Protokoll weitestgehend auf das Skript verweisen. Beachten Sie allerdings unbedingt, mögliche Abänderungen der im Skript aufgeführten Durchführung 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 (Tabellenüberschriften, Abbildungsunterschriften) 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 wird die Gegenwartsform verwendet, 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).