

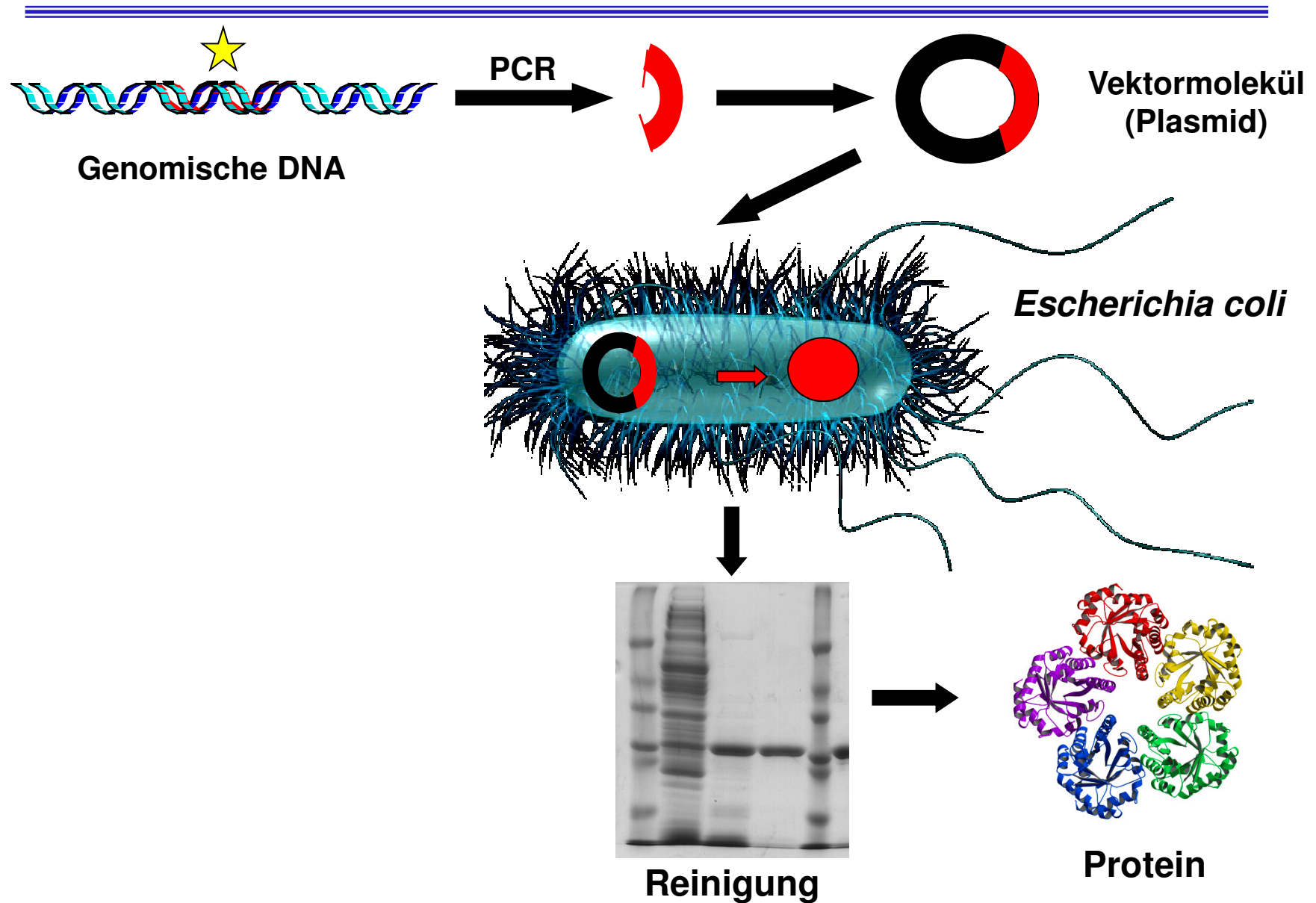
Praktikum Biochemie

„Biotechnologie“

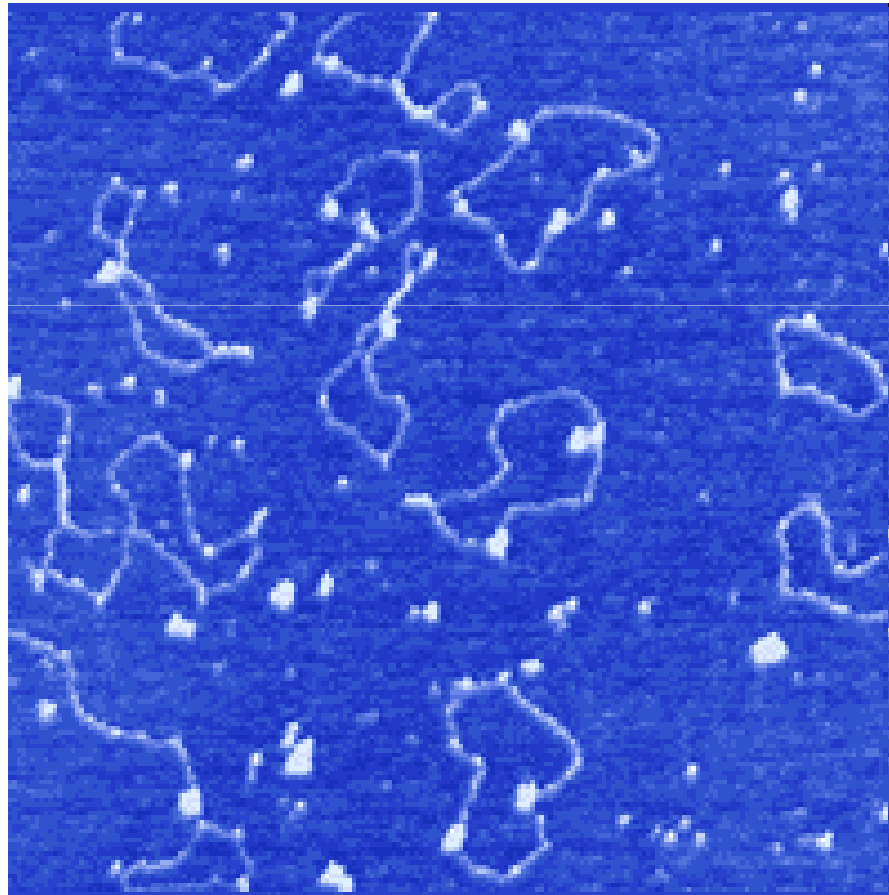
(Molekularbiologie & Biochemie)

Bettina Siebers

Protein Expression



(1) Plasmidpräparation & Restriktion

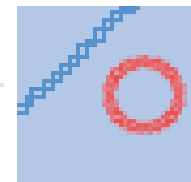


Plasmidpräparation

Alkaline Lysis Procedure

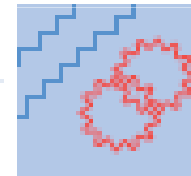
1. Resuspension

E. coli cell



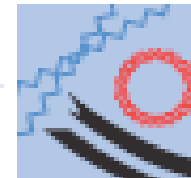
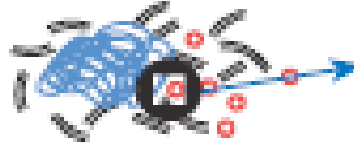
2. Lysis

NaOH/SDS



3. Neutralization

KAc



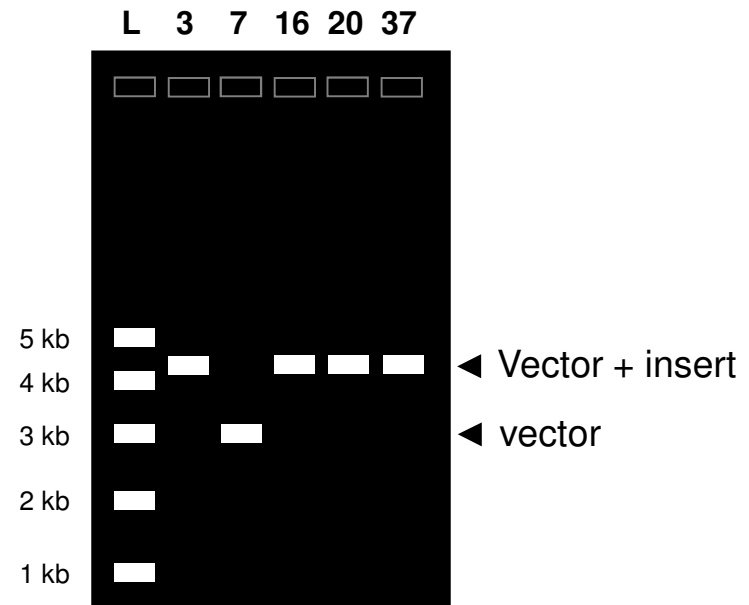
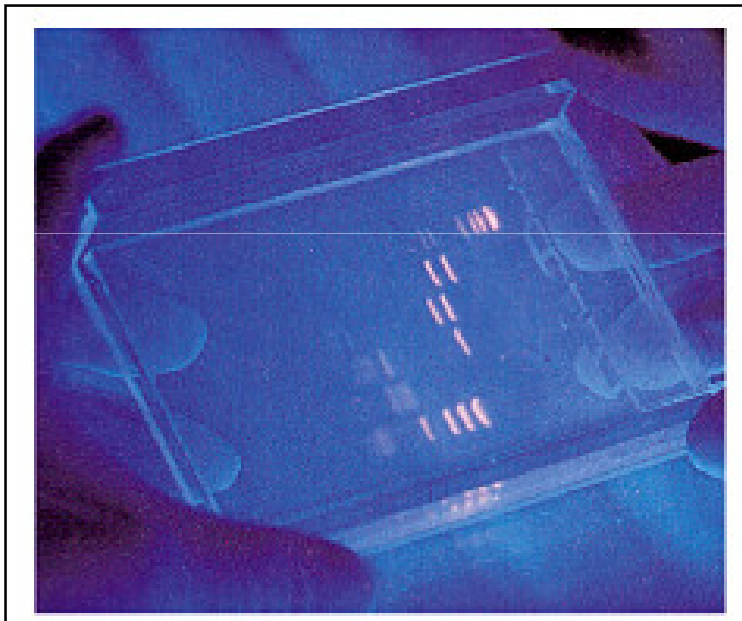
4. Clearing of lysates



Restriktionsanalyse

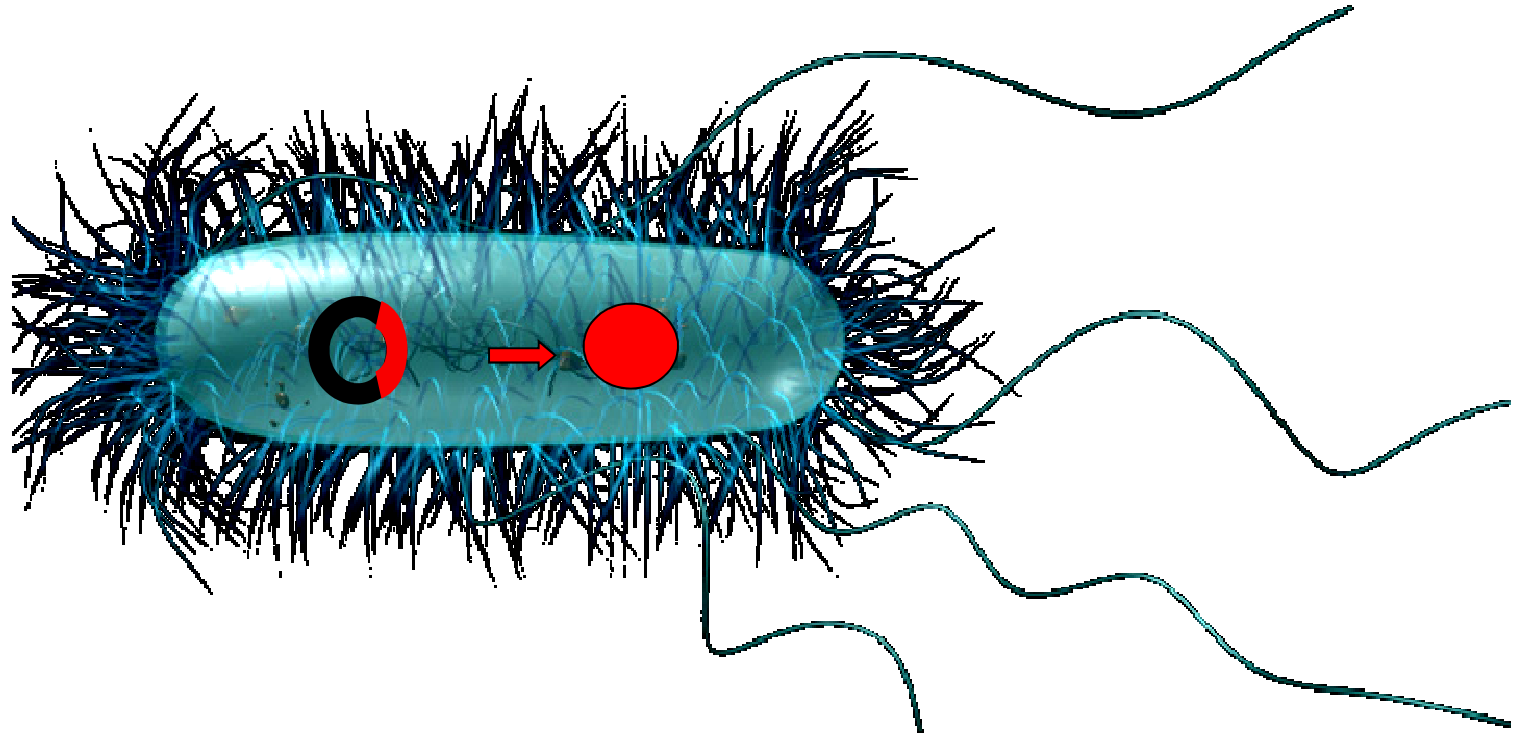
- 17.5 μ l DNA
- 2.0 μ l Restriktions Puffer
- 0.5 μ l *Bam*HI Restriktions-Enzym
- Vorsichtig mischen und kurz an zentrifugieren
- Inkubation für 2h bei 37°C (ÜN)
- Abstoppen der Enzymreaktion durch 10-minütige Inkubation bei 70°C
- Die Proben können entweder direkt mittels **Agarose-Gelelektrophorese** analysiert werden oder aber bei 4°C/-20°C gelagert werden (Morgen)

*Bam*HI Restriktionsanalyse



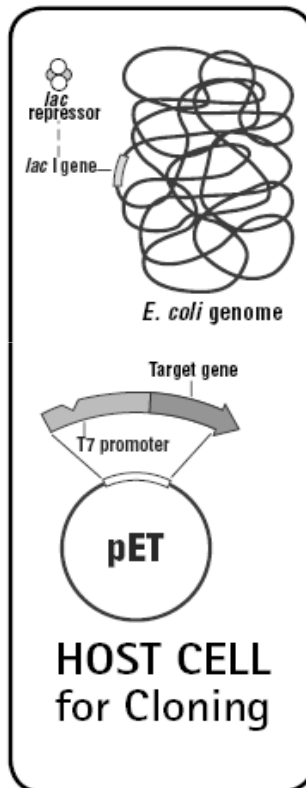
(2) Rekombinante Expression

einer Esterase in *E. coli*

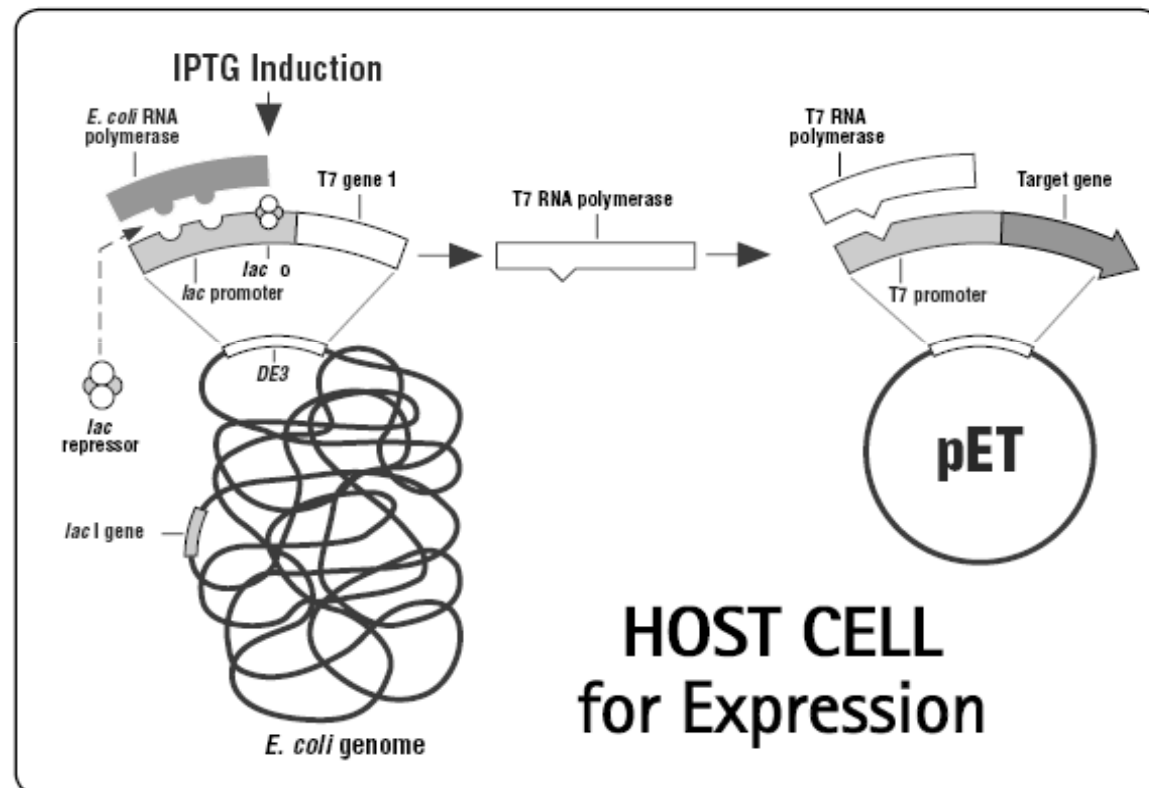


pET Expressions System

Hosts for cloning



Hosts for expression



Novagen-pET System Manual-11th edition

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

Expressionsvektor: pET-System

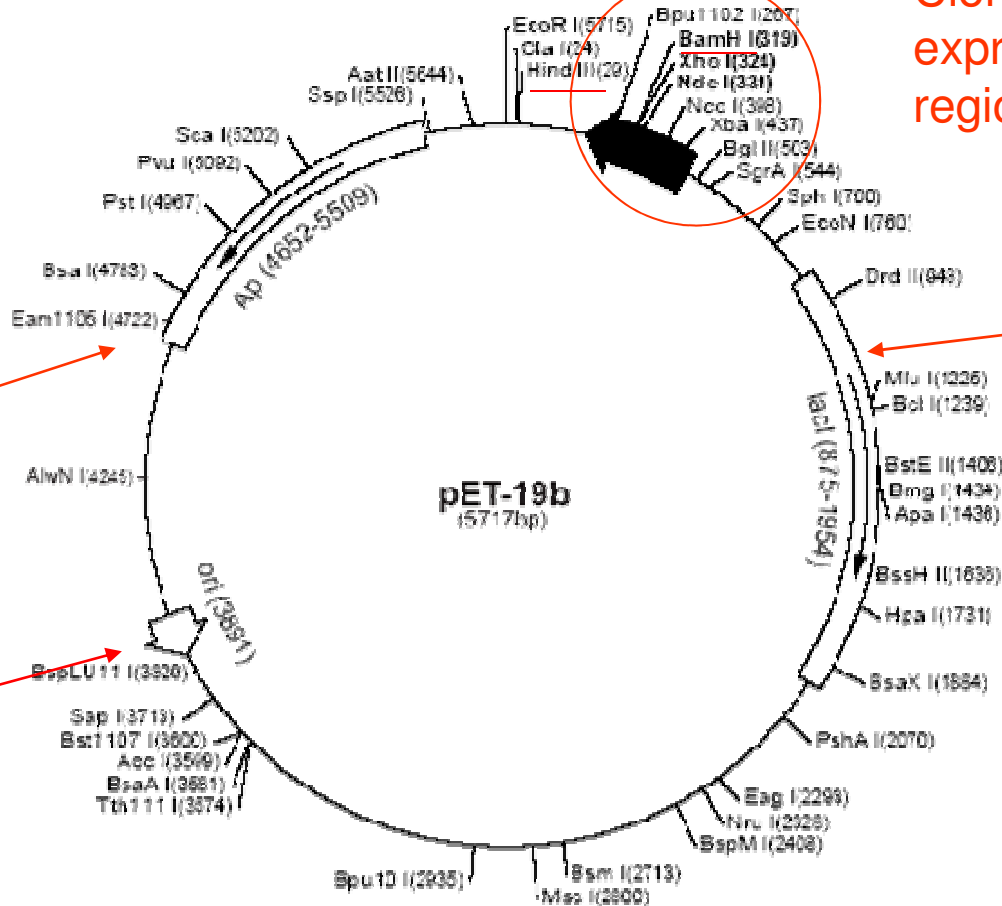
pET-19b sequence landmarks	
T7 promoter	472-488
T7 transcription start	471
His*Tag coding sequence	366-395
Multiple cloning sites (<i>Nde</i> I- <i>Bam</i> HI)	319-335
T7 terminator	213-250
<i>lacI</i> coding sequence	875-1954
pBR322 origin	3891
<i>bla</i> coding sequence	4652-5509

Ampicillin resistance

Origin of replication

Cloning and expression region

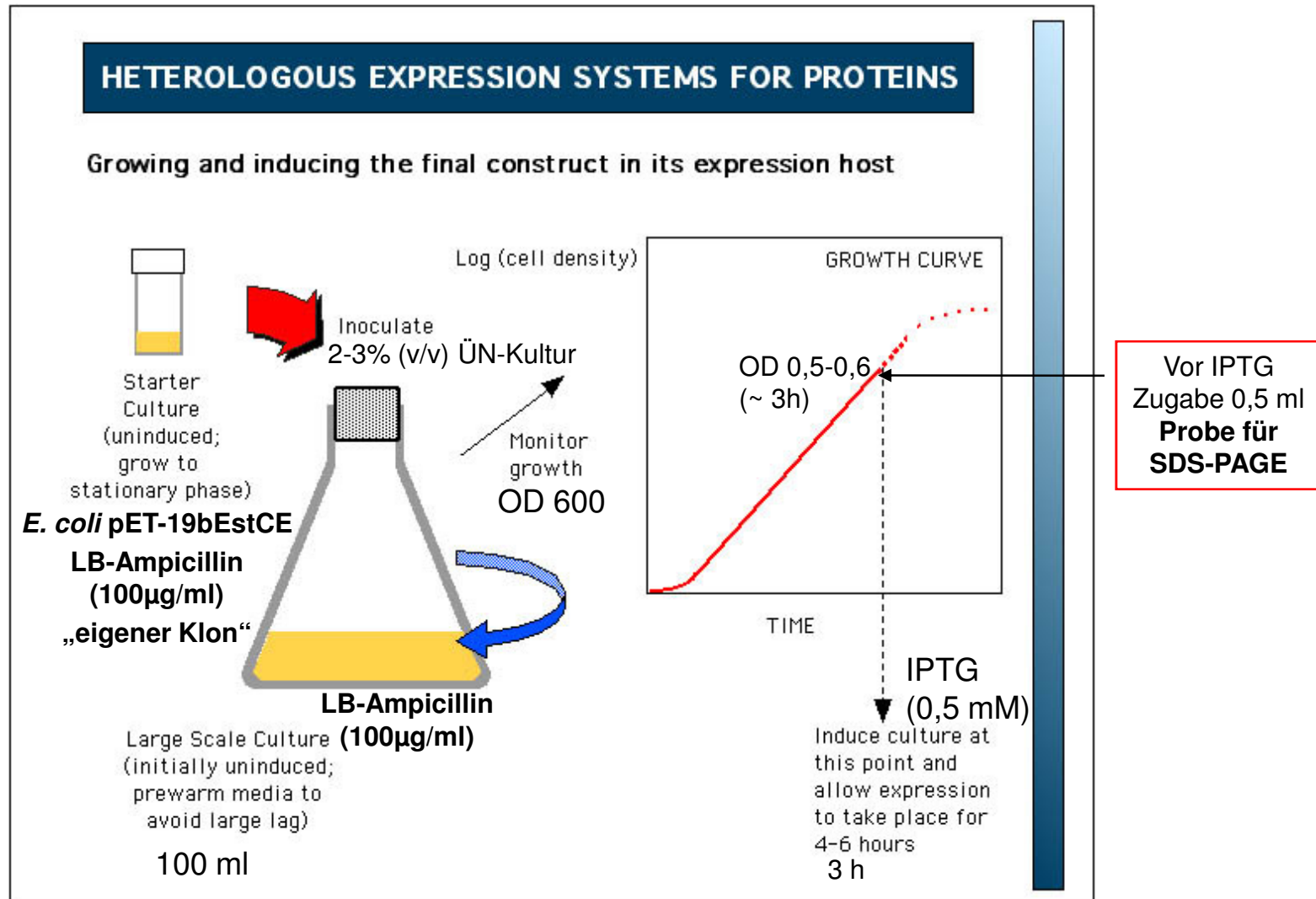
Produces inhibitor of *lac* operator



- Expression vector for production of proteins with an N-terminal His-tag

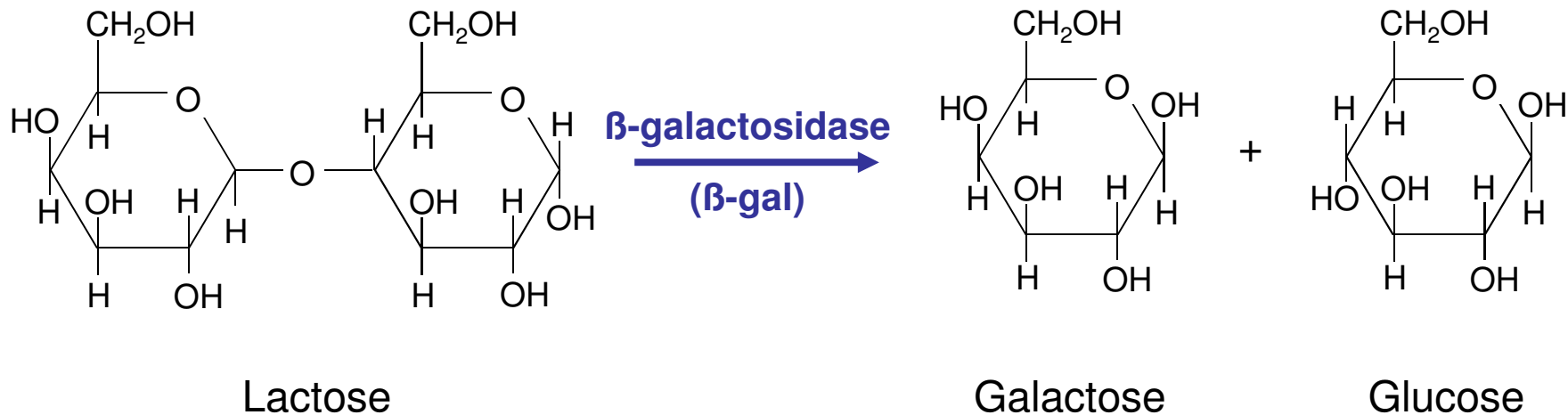
Heterologe Expression in *E. coli*

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



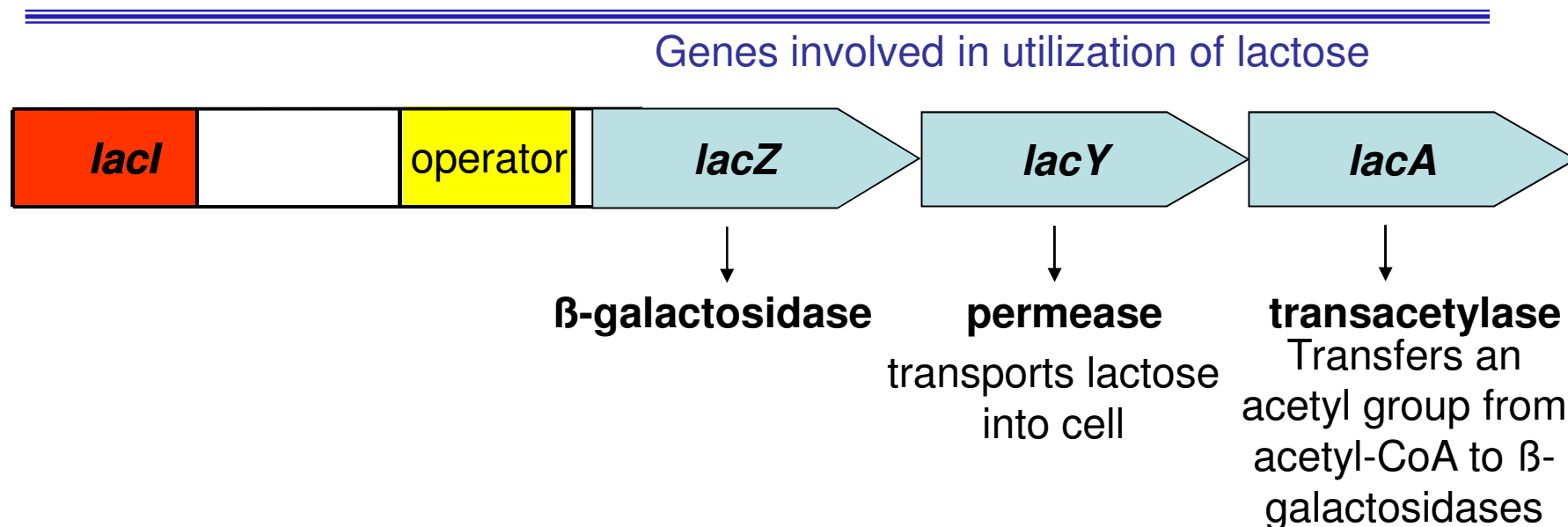
Jacob and Monod 1961

- They were investigating bacterial growth on different carbon sources.



- Lactose switches on the gene (*lacZ*) which encodes β -gal.
- Lactose is the **INDUCER**.

The *lac* operon



- The *lac* operon is made up of 3 genes encoding related products which are under the control of the same **OPERATOR**.
- Lactose regulates (induces) the expression of the *lac* operon
- The *lacI* gene produces an inhibitor which keeps the *lac* operon switched off (negative regulation).
- The inhibitor is called a **REPRESSOR**.

Regulation of the lactose operon

„Negative control: Induction“

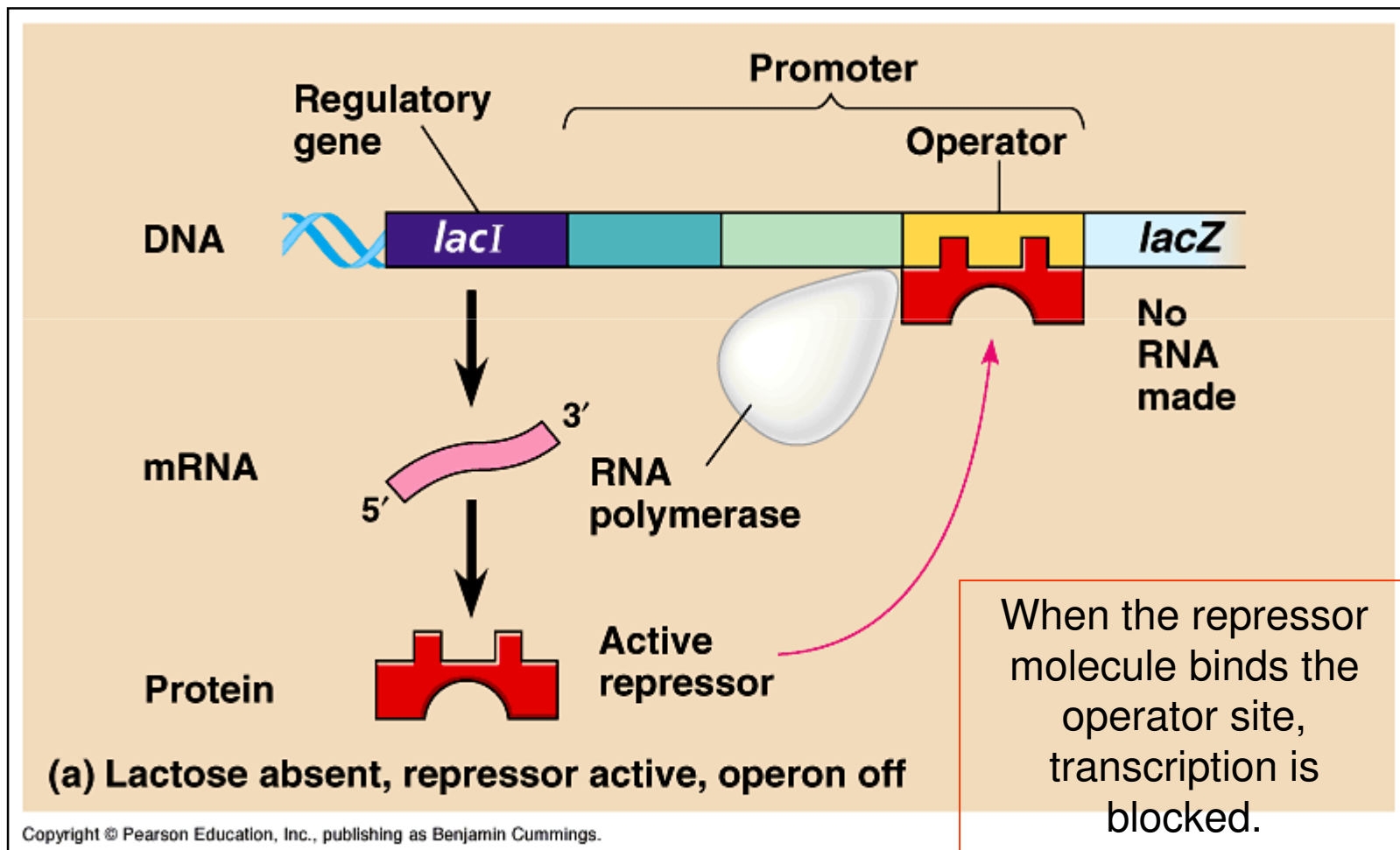


FIGURE 18.21 Biology 6/e

Regulation of the lactose operon

„Negative control: Induction“

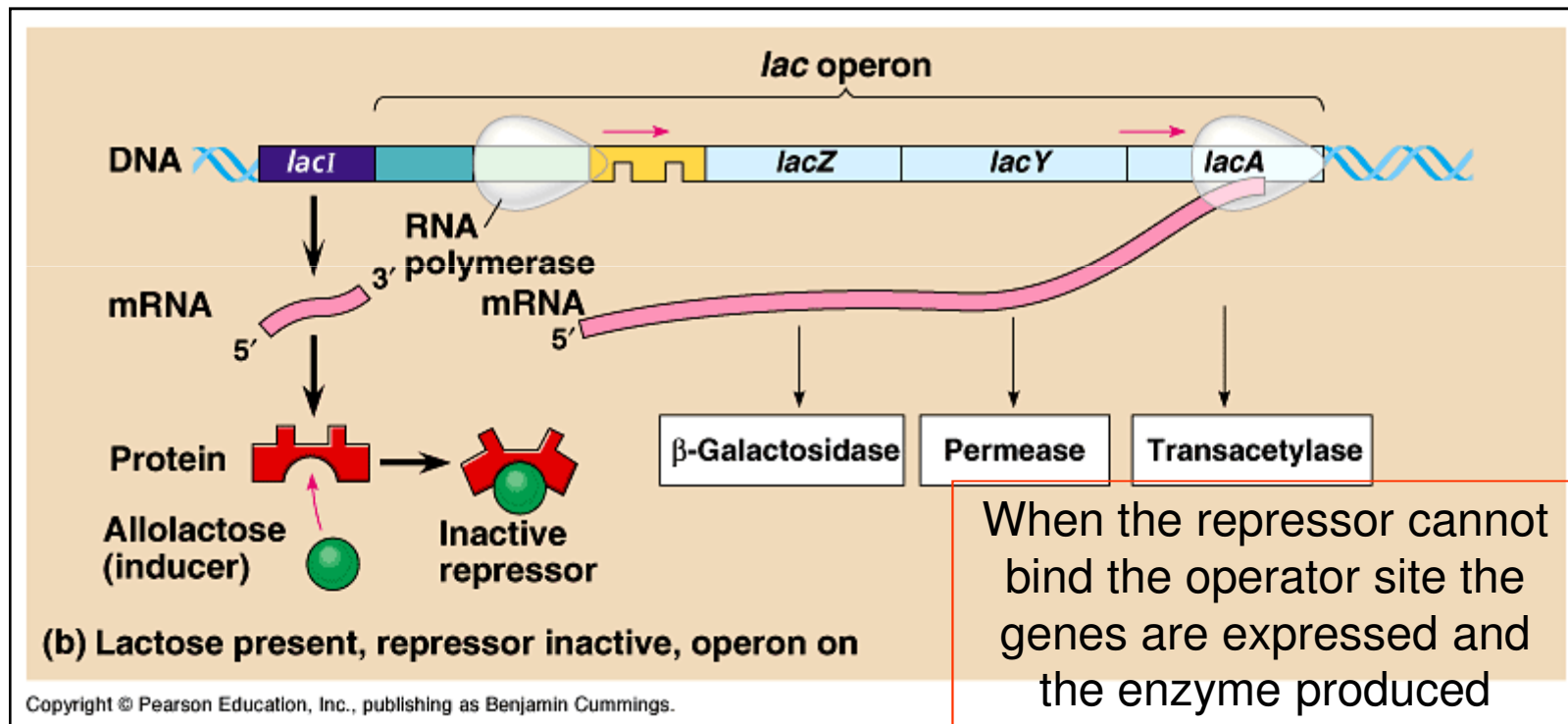
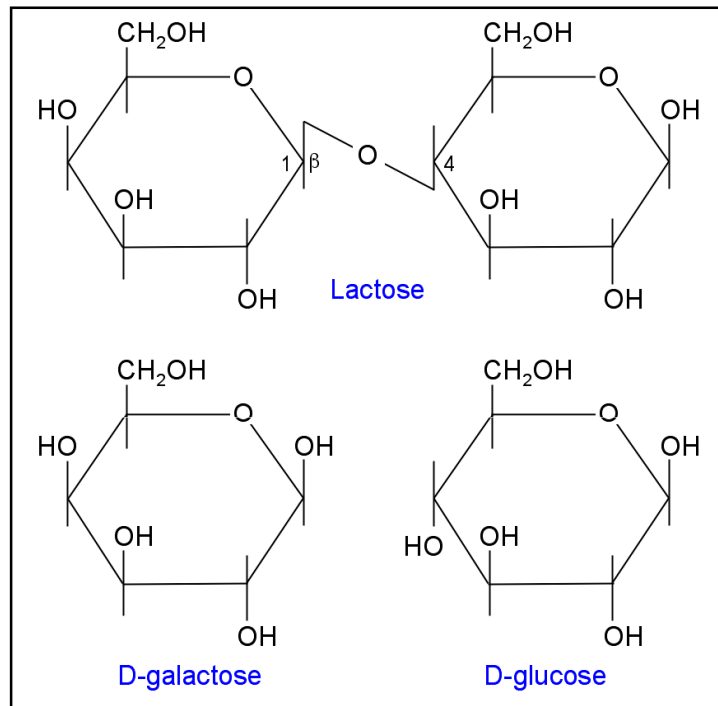


FIGURE 18.21 Biology 6/e

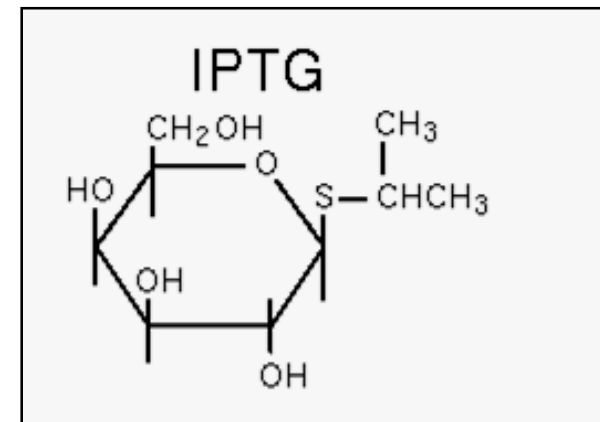
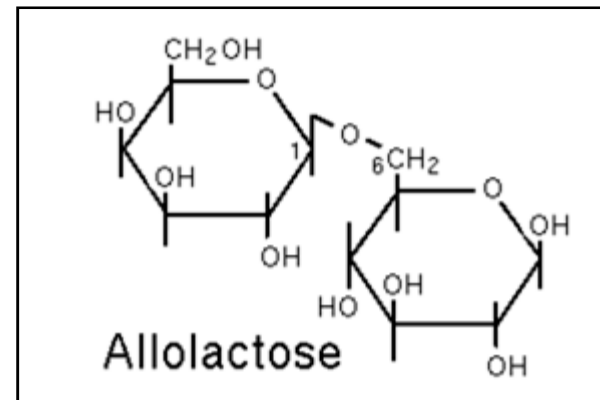
Inducer „Allolactose“



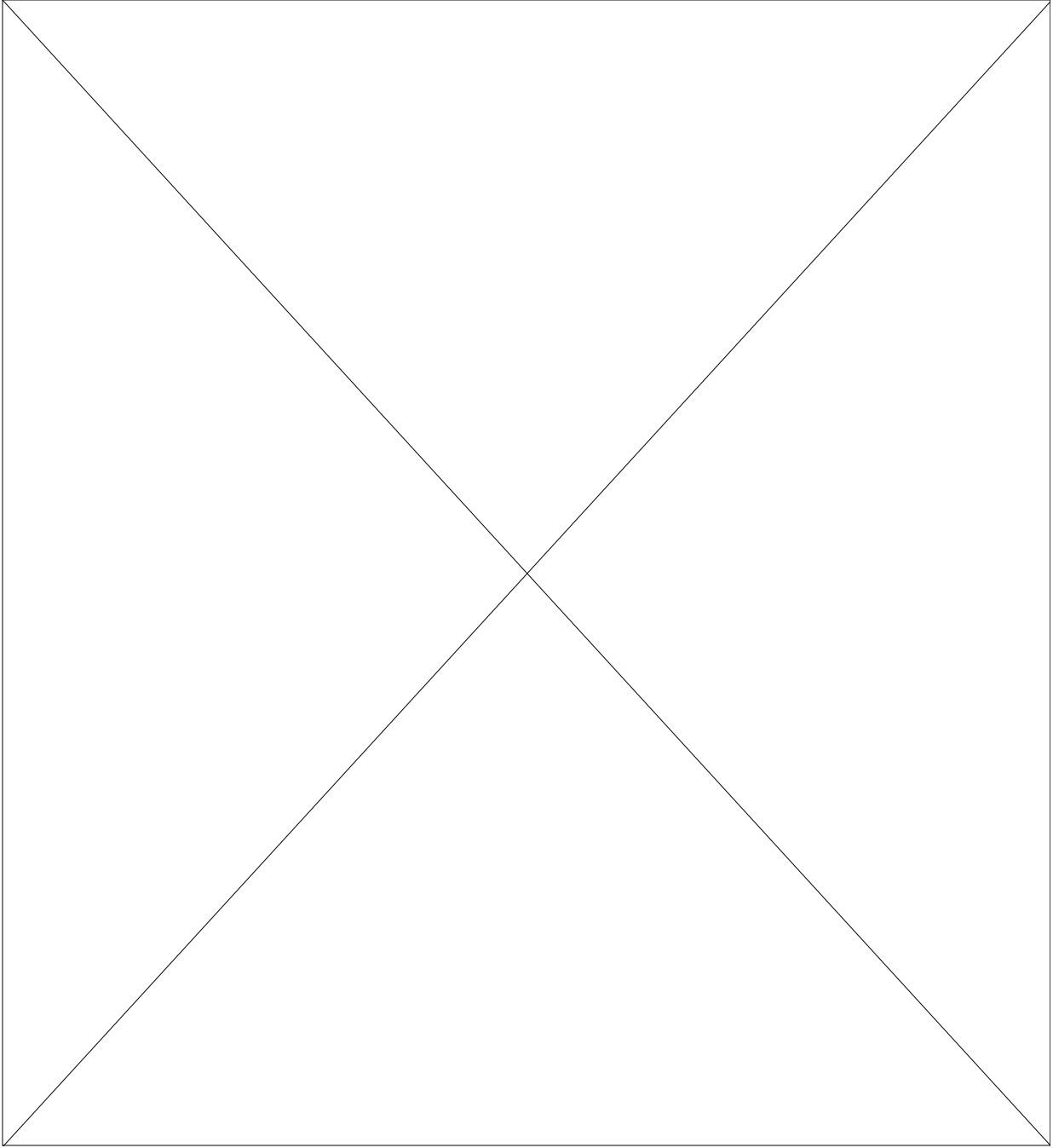
Lactose: β 1 \rightarrow 4

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

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



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



Zellernte & Zellaufschluss

Zellernte

- Zentrifugation (4500 rpm, 20 min, 4 °C)
- Lagerung der Zellen ÜN bei -20 °C

Zellaufschluss

- Zellpellet auftauen
- Zellen werden in Lysis Puffer resuspendieren (5 ml pro Gramm Feuchtgewicht; **1,5 ml**).
- 100 µl f. Aktivitätstest & SDS-PAGE (Zellpellet)
- 5 min Ultraschall unter Eiskühlung (50% Amplitude, Cycle 0,5). **Das Ultraschallgerät darf nicht ohne Betreuer bedient werden!!!!**
- Zentrifugation Lysat 30 min bei 13000 x rpm (4 °C)
- Der Überstand (Rohextrakt) in ein neues Zentrifugenröhrchen,
- 100 µl f. Aktivitätstest & SDS-PAGE (Rohextrakt)
- **Sterilfiltrieren**
- Den Zellaufschluss bei 4 °C im Kühlschrank oder auf Eis lagern
- **Jede Gruppe erhält ca. 1,5 ml Rohextrakt**

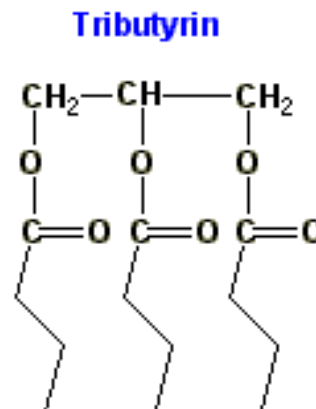
Aktivitätstest

Esterase (EC 3.1.1.1):

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

Tributyryn (Glyceryltributyrat):

- Triester aus Glycerin und Butansäure (Buttersäure) C₃H₇COOH (Öl)
- opake Platten



Aktivitätstest

Esterase-Assay:

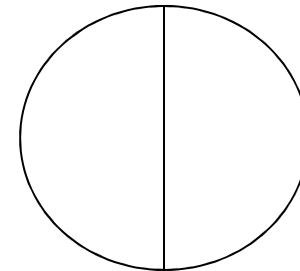
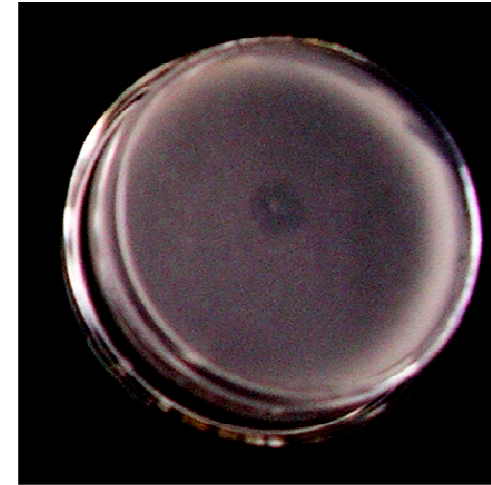
- Proteinexpression?
- Aktives Protein?

-Tributyrin Indikatorplatten

Probe: Rohextrakt

Negativkontrolle: Wasser

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



(5) Proteinreinigung

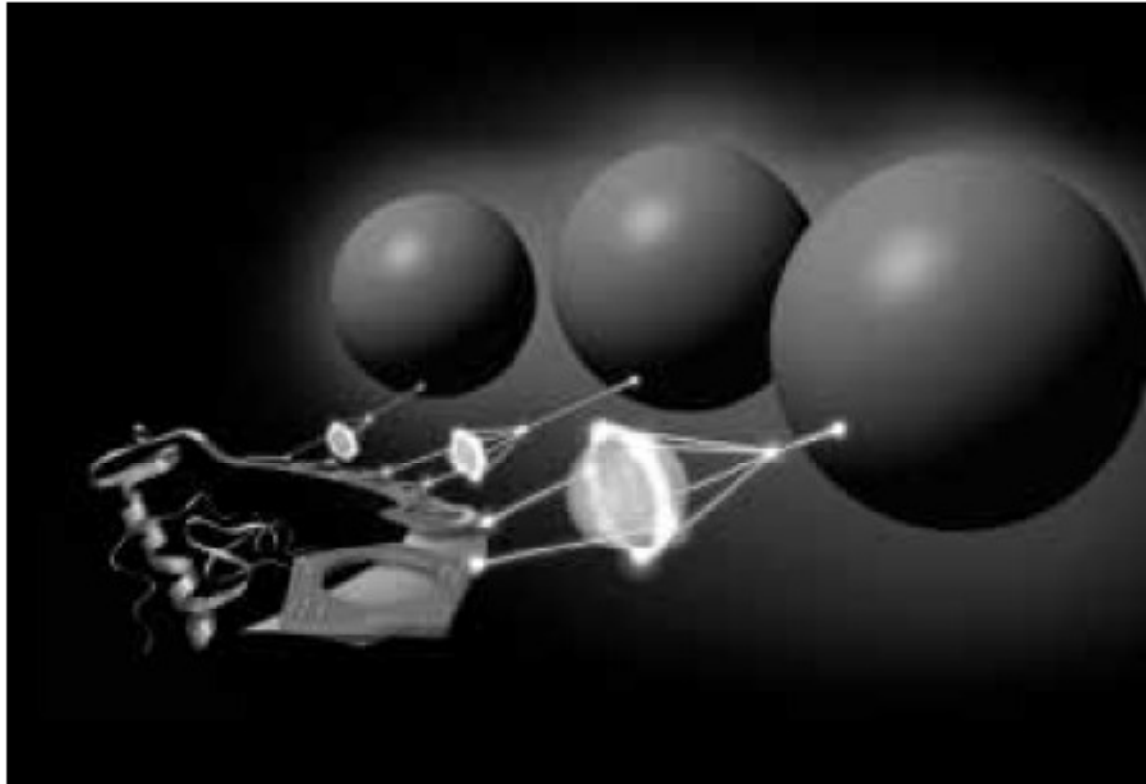
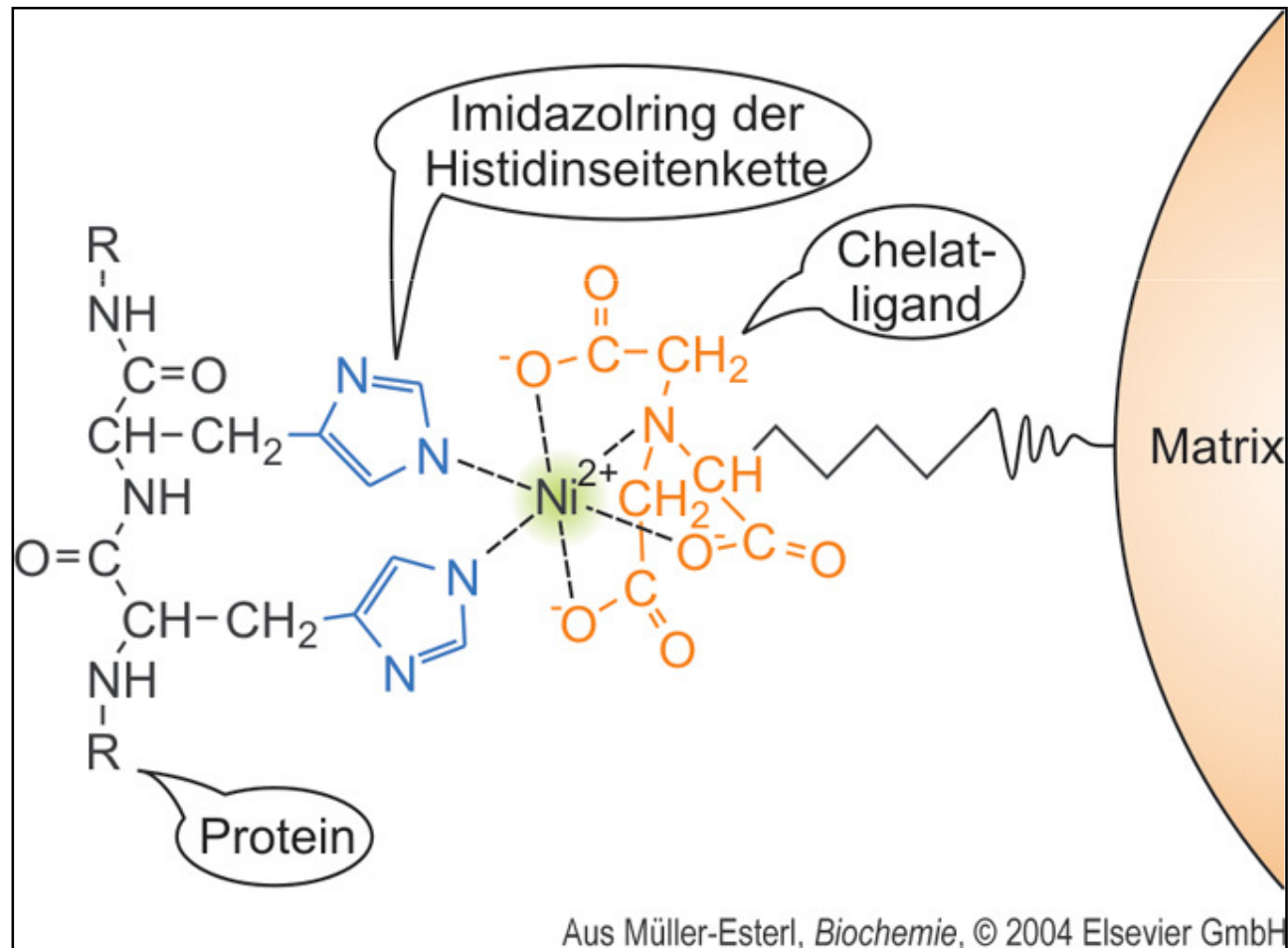


Figure 1. Interaction between NiNTA and a 6xHis-tagged protein

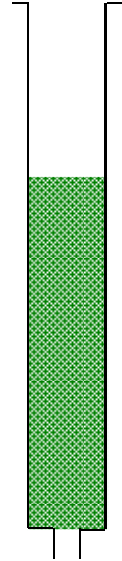
Ni-NTA Säulen

Immobilized-metal affinity chromatography (IMAC)



Protein Reinigung

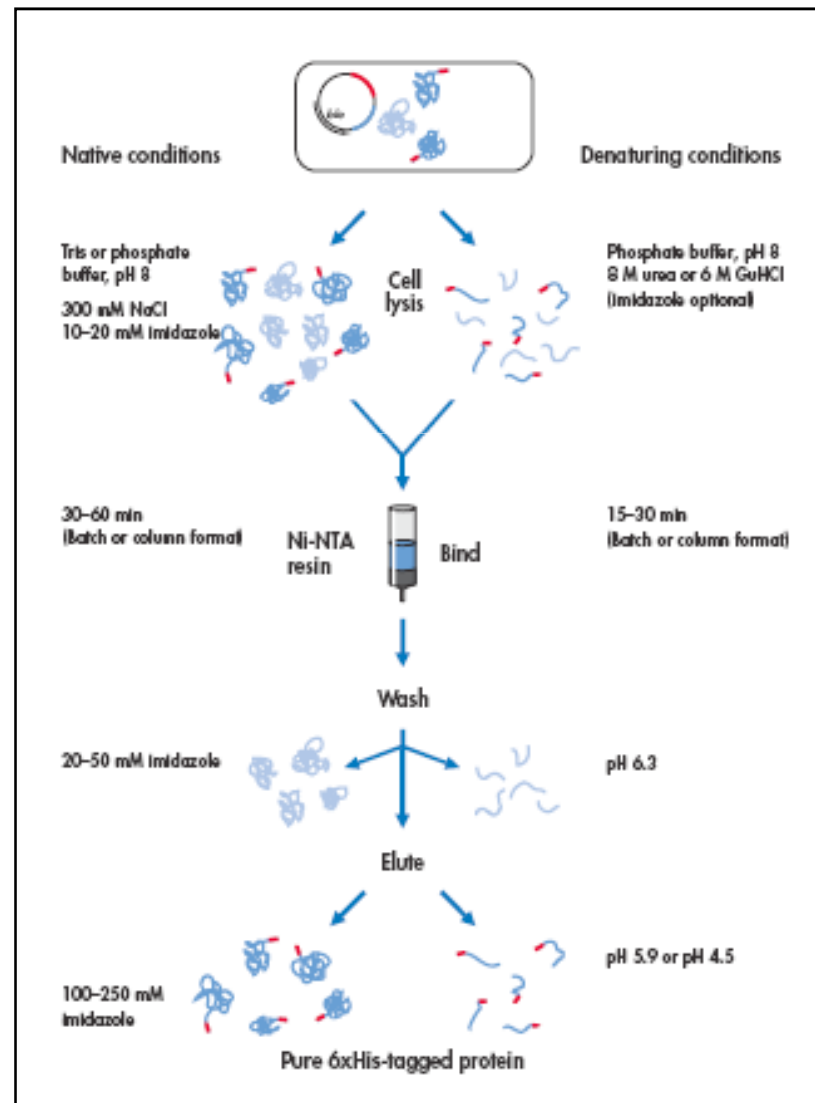
- Äquilibrierung der Säule
 - 320 µl LEW Puffer (Durchlauf verwerfen)
- Probenauftrag/Proteinbindung
 - 1200 µl Rohextrakt
 - **Durchlauf sammeln (D, SDS PAGE & Aktivität)**
 - Esterase bindet an die Säule (His-tag) andere *E. coli* Proteine laufen durch, Fraktion ohne Esterase Aktivität
- Waschen (Entfernen ungebundener Proteine)
 - 320 µl LEW Puffer
 - **Durchlauf sammeln, Waschen 1, (W1, SDS PAGE & Aktivität)**
 - 320 µl LEW Puffer
 - **Durchlauf sammeln, Waschen 2, (W2, SDS PAGE & Aktivität)**
 - Ungebundene Proteine sind entfernt, Fraktion ohne Esterase Aktivität



Protein Purification

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

IMAC



IMAC

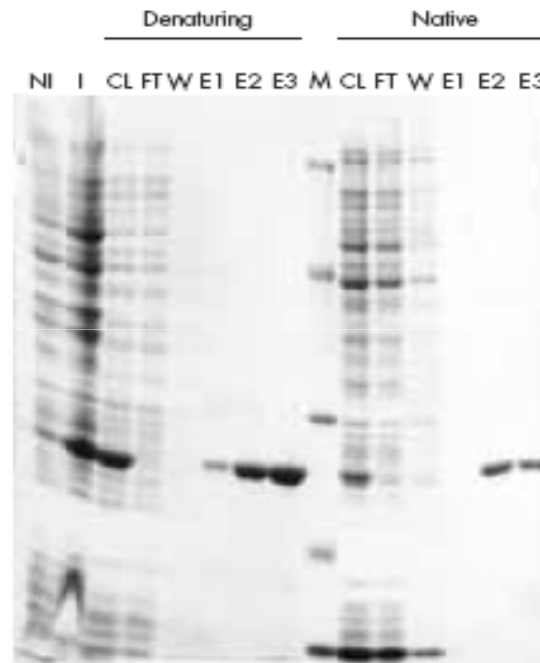
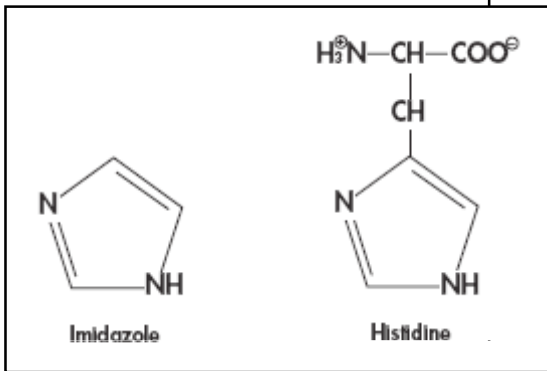


Figure 22. Denaturing and native purification of heterologously expressed DHFR. NI: noninduced cells; I: cells induced with IPTG; CL: cleared lysate; FT: flow-through; W: wash; E1-E3: eluates. 10% of DHFR is present in soluble form, which can be effectively purified under native conditions.

Protein Proben

- **Proben für SDS-Page und Aktivitätstests:**
 1. Zellpellet (Z)
 2. Rohextrakt (R)
 3. Durchlauf (D)
 4. Waschen 1 (W1)
 5. Waschen 2 (W2)
 6. Eluat 1 (E1)
 7. Eluat 2 (E2)
 8. Eluat 3 (E3)

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