

Praktikum Biochemie

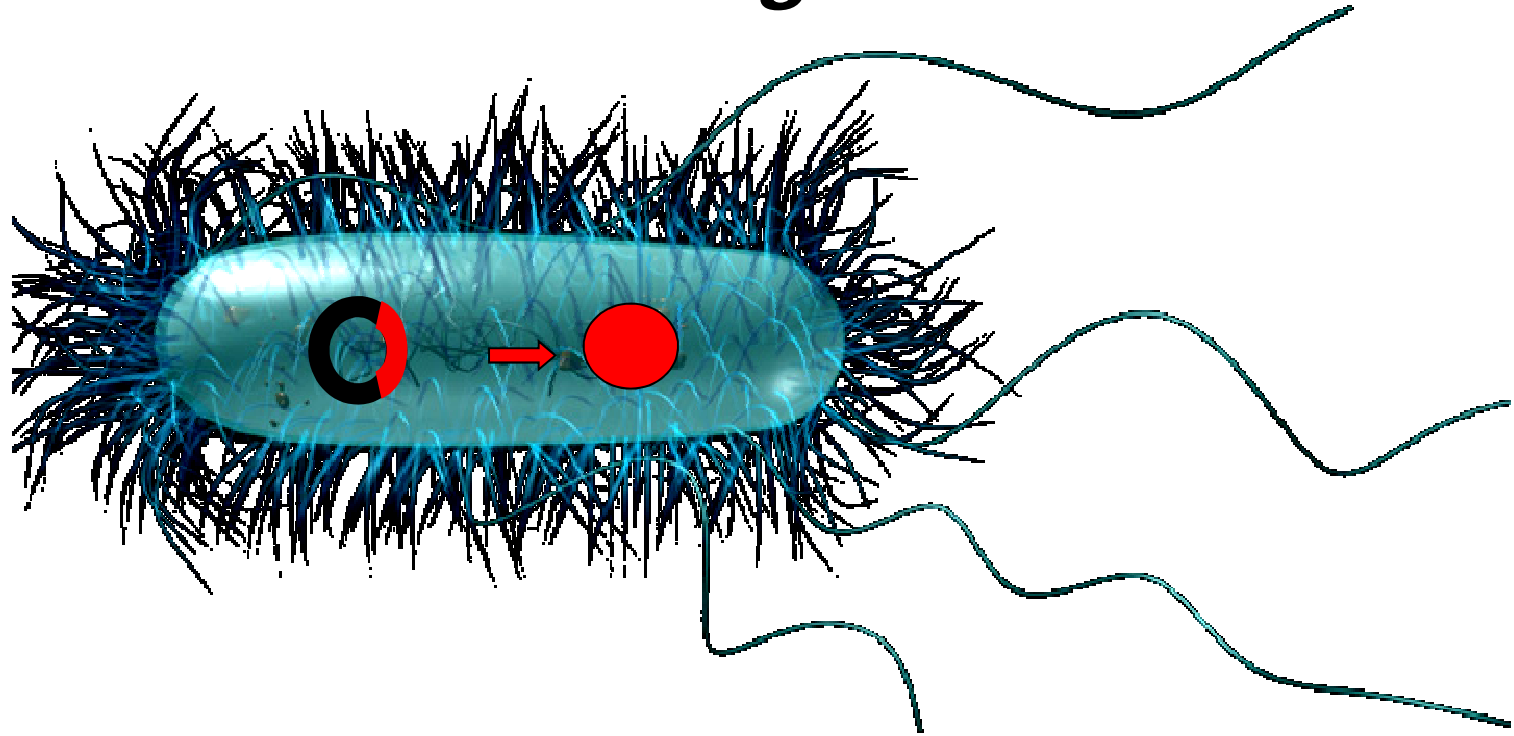
„Einführung in die Molekularbiologie“

Bettina Siebers

(4) Rekombinante Expression

einer Esterase aus

Pseudomonas aeruginosa in *E. coli*



Proteinreinigung

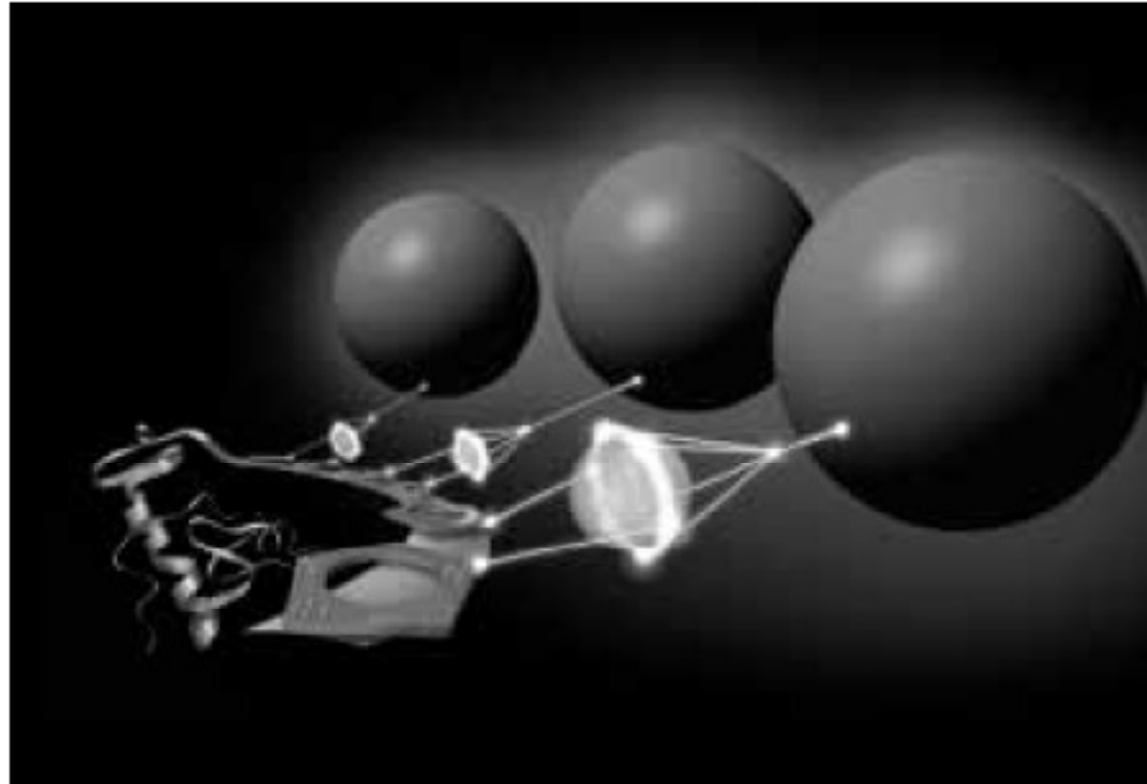


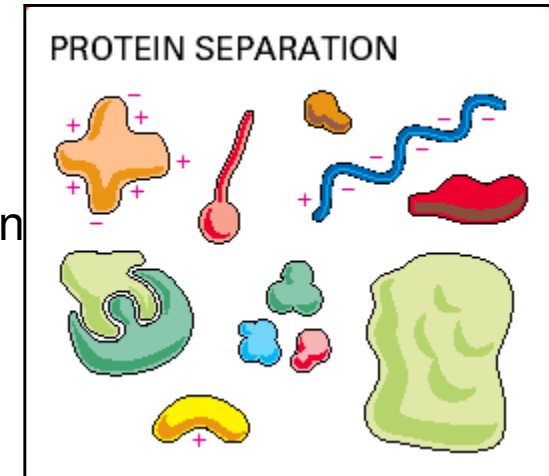
Figure 1. Interaction between NiNTA and a 6xHistagged protein

Techniken & Methoden der Proteinreinigung

- Protein Chemie

-Isolation und Reinigung von Proteinen hängt von den physiologischen Eigenschaften des Proteins ab:

-Größe, Form, Ladung, Löslichkeit, Affinität zu Liganden



- Zell- und Gewebeaufschluß

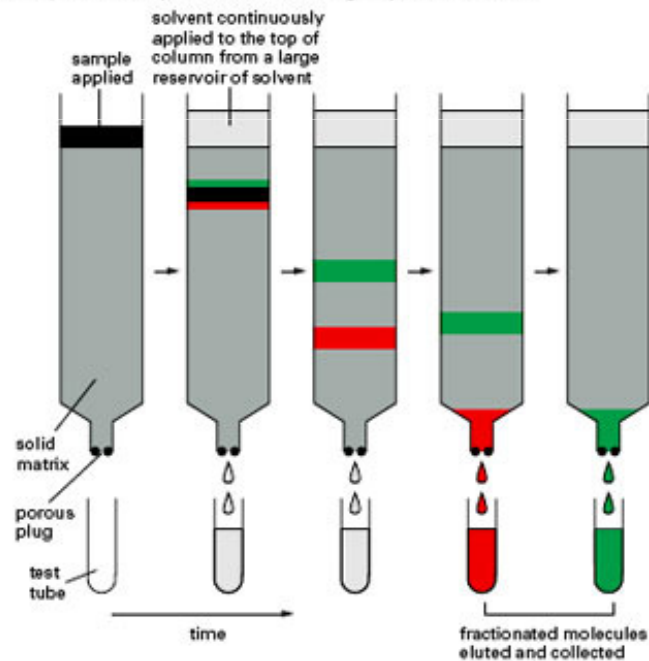
-Mörser, Mixer, Ultraschall
Detergenzien, Enzyme
(Lysozym) etc.



Säulenchromatography

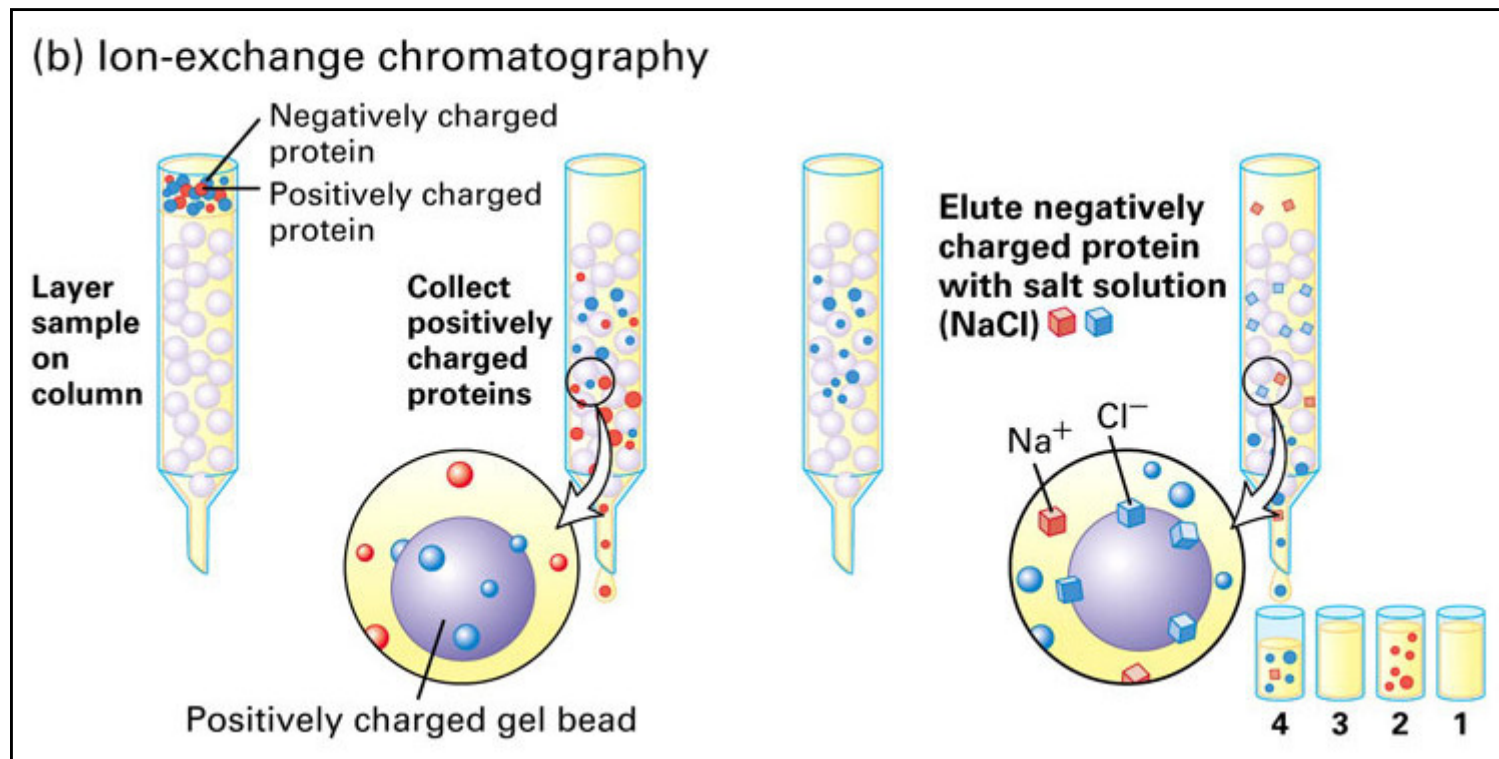
COLUMN CHROMATOGRAPHY

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

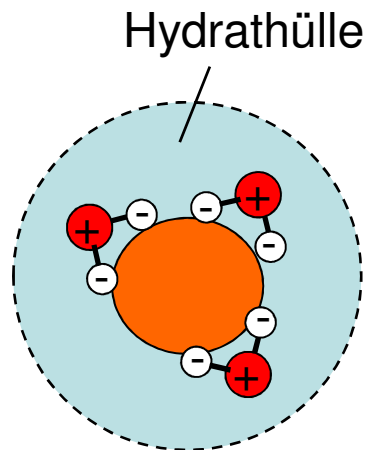


Ionenaustausch Chromatographie

- Trennung nach der Ladung
- Kationen- und Anionen-Tauscher
- Ausnutzung der Ladungsunterschiede (basische/saure Reste)
- Beeinflussung der Trennung durch pH-Wahl, Zugabe von Konkurrenz-Ionen
- Elution: Salz (Kationen-Tauscher z.B. Cl^-)



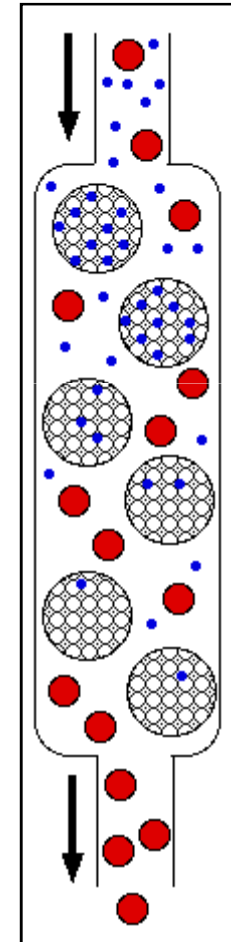
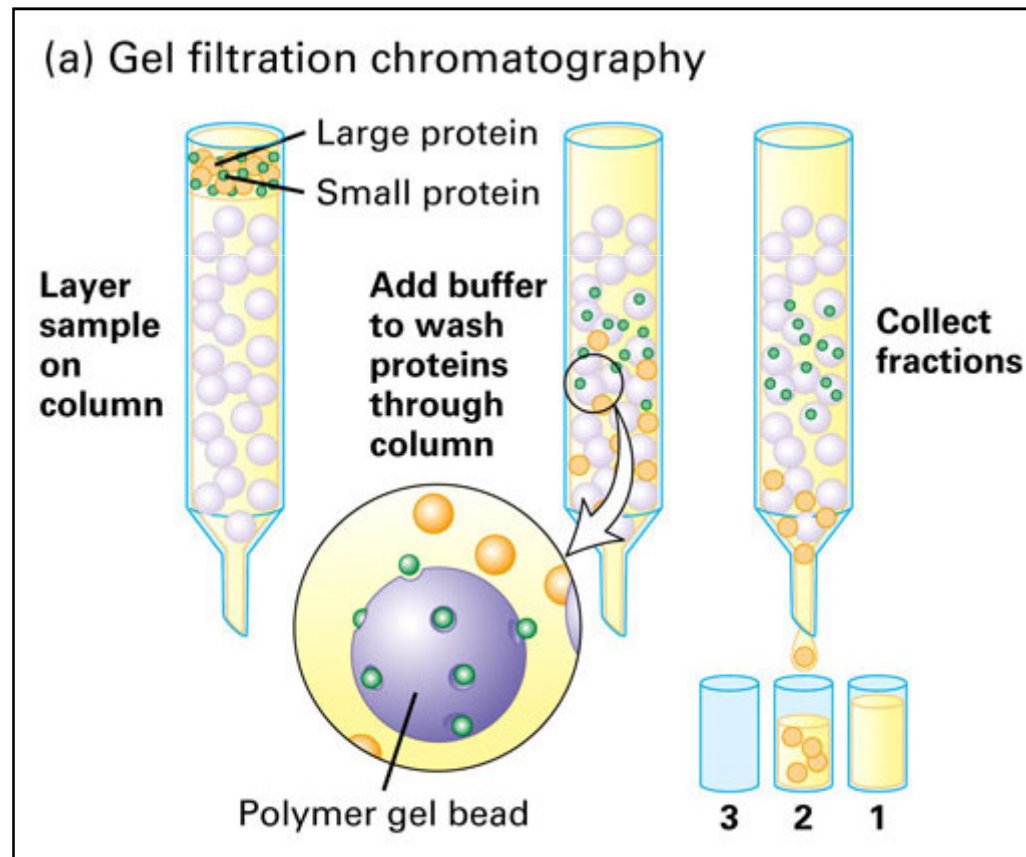
Hydrophobe Interaktions Chromatographie



- Hydratisierung des Proteins hängt von der Ladung ab
- NH_4SO_4 Ionen konkurrieren mit H_2O Ionen
- Fraktionierte Ammoniumsulfat-Fällung
- HIC: Sepharose mit hydrophoben Resten (Butyl, Phenyl)
- Probenauftrag in Hochsalz (z.B. 3 M NH_4SO_4)
- Elution mit abnehmender Ionenstärke

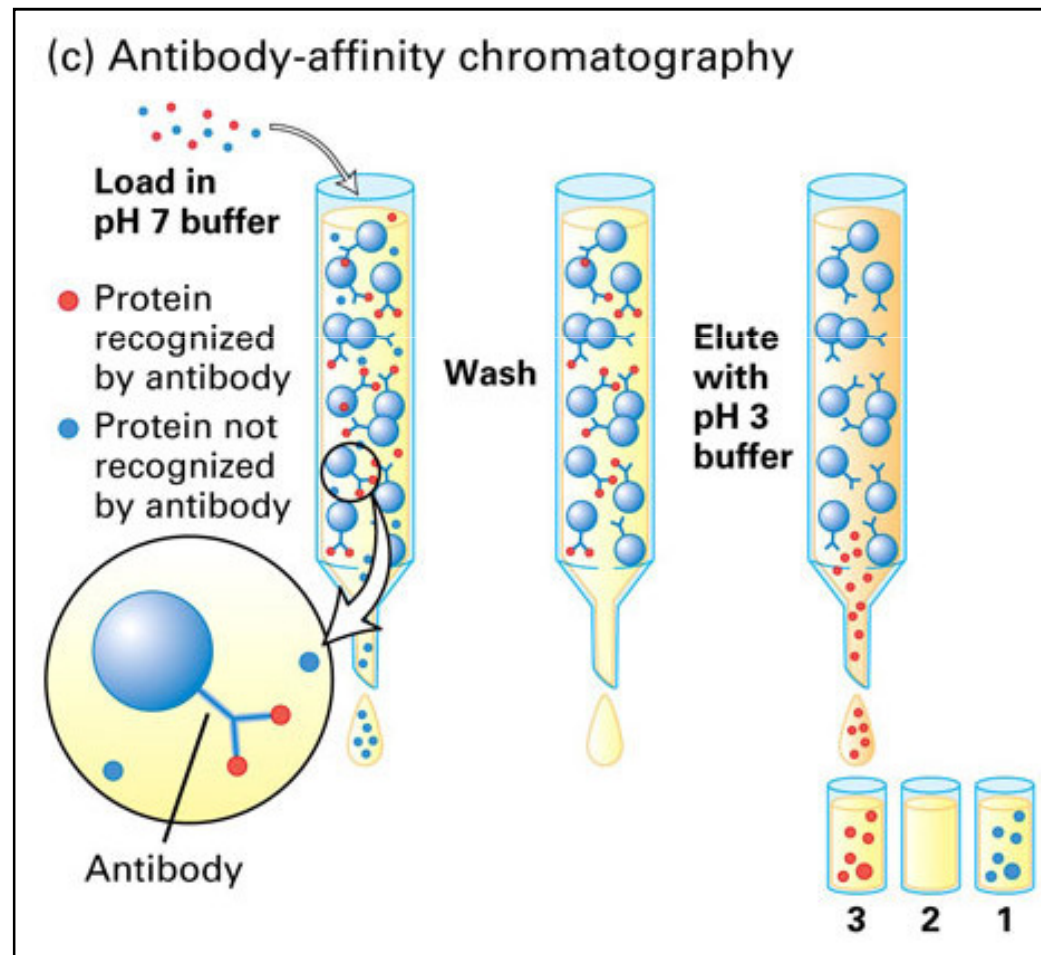
Gelfiltration „Molekularsieb“

Auftrennung allein nach der Größe (Form)



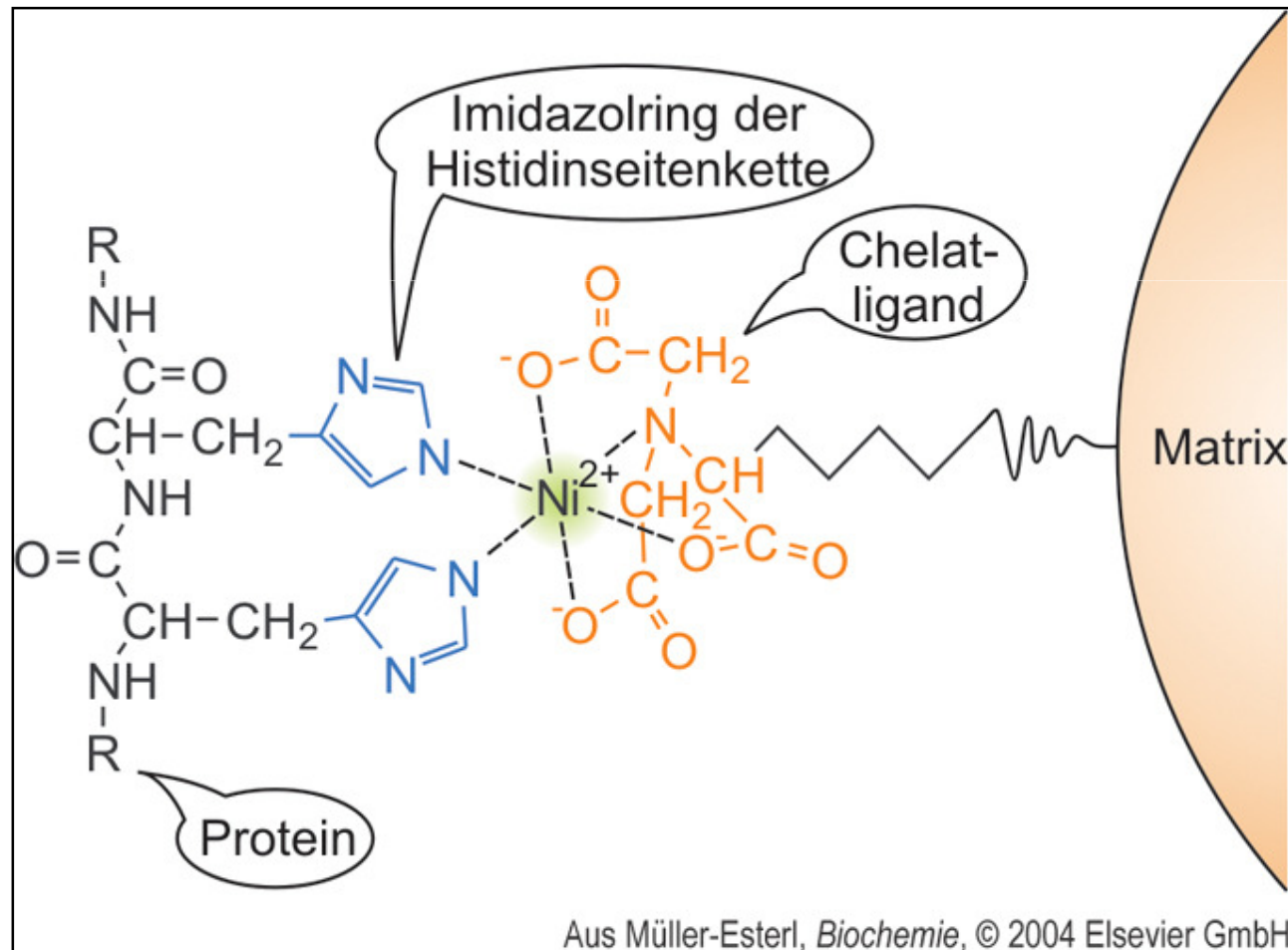
Affinitäts Chromatography

Trennung nach Affinität zum Liganden (z.B. Substrat, Antikörper)



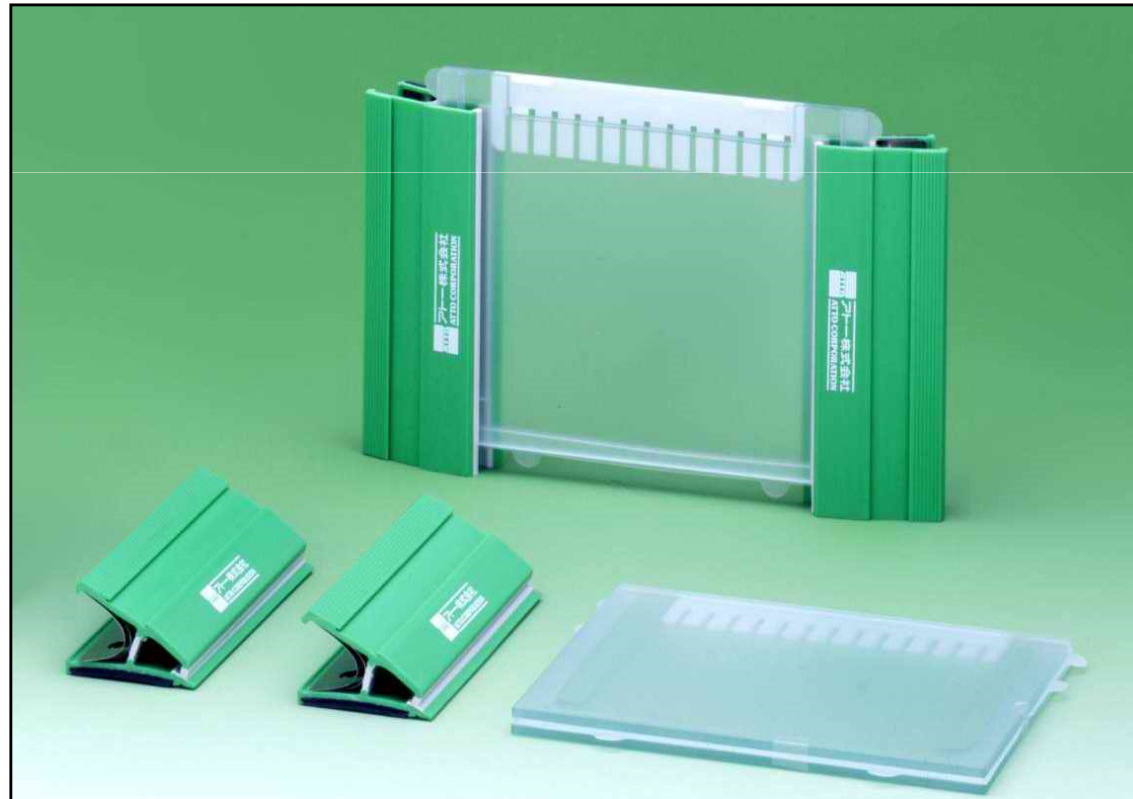
Affinitäts Chromatography: His-tag

Immobilized-metal affinity chromatography (IMAC)

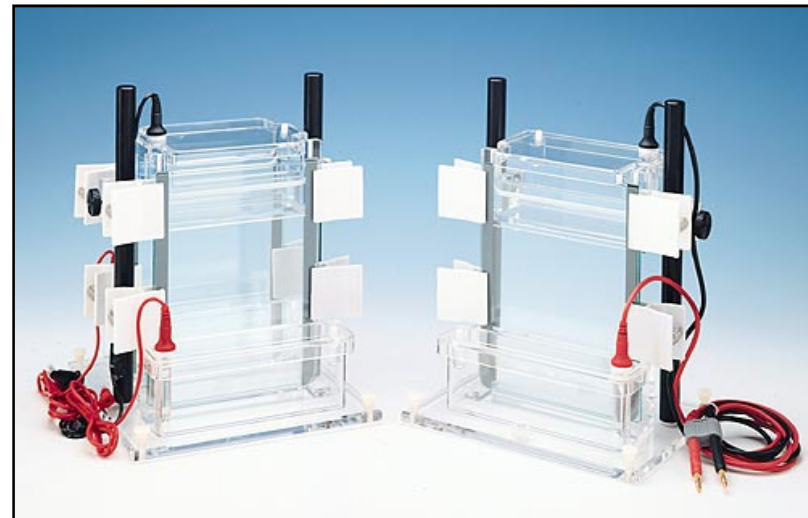
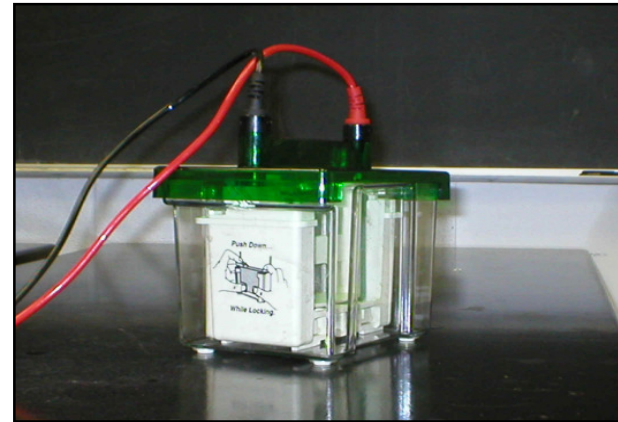


(1) Polyacrylamide Gelelektrophorese

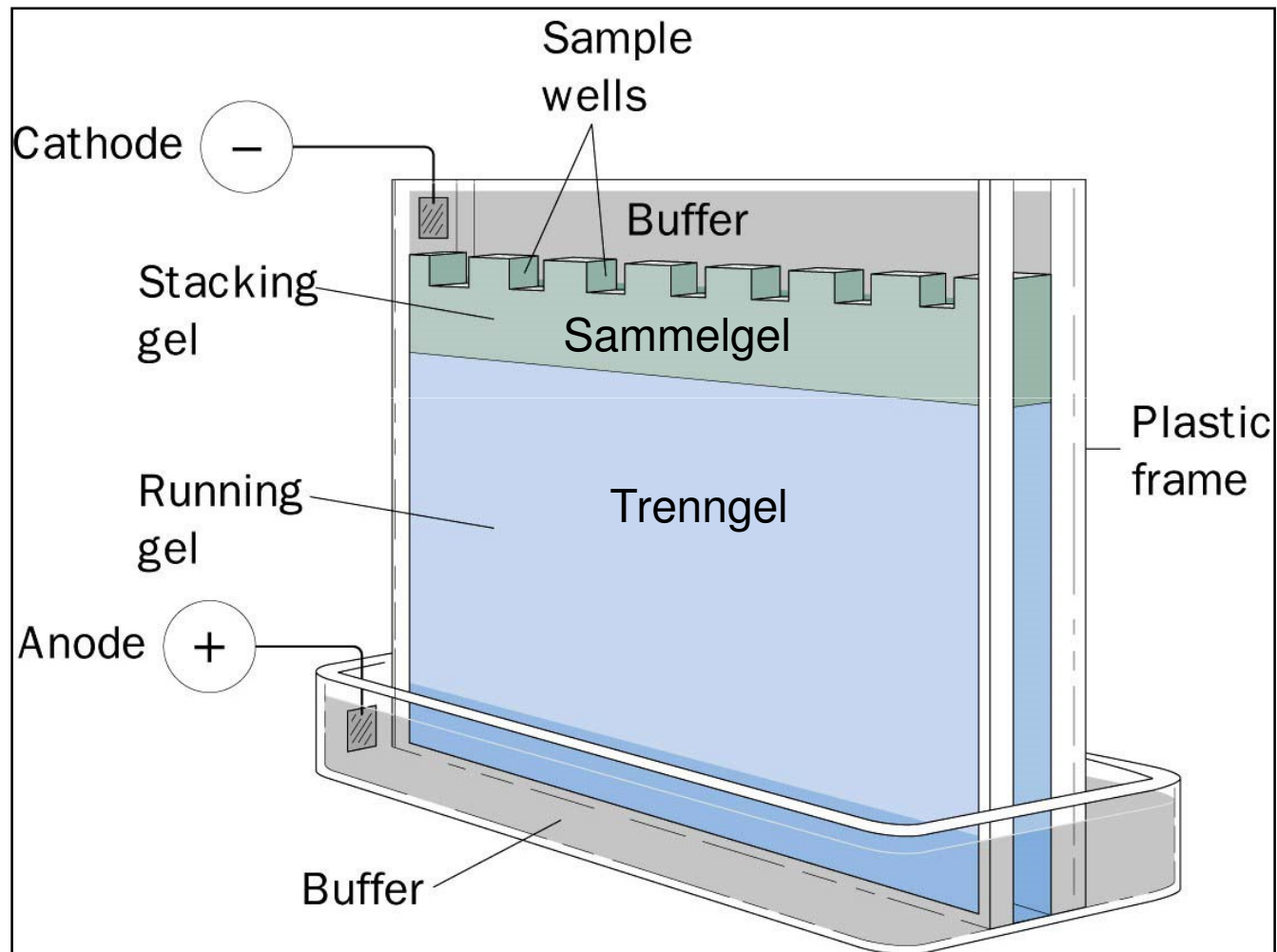
(PAGE)



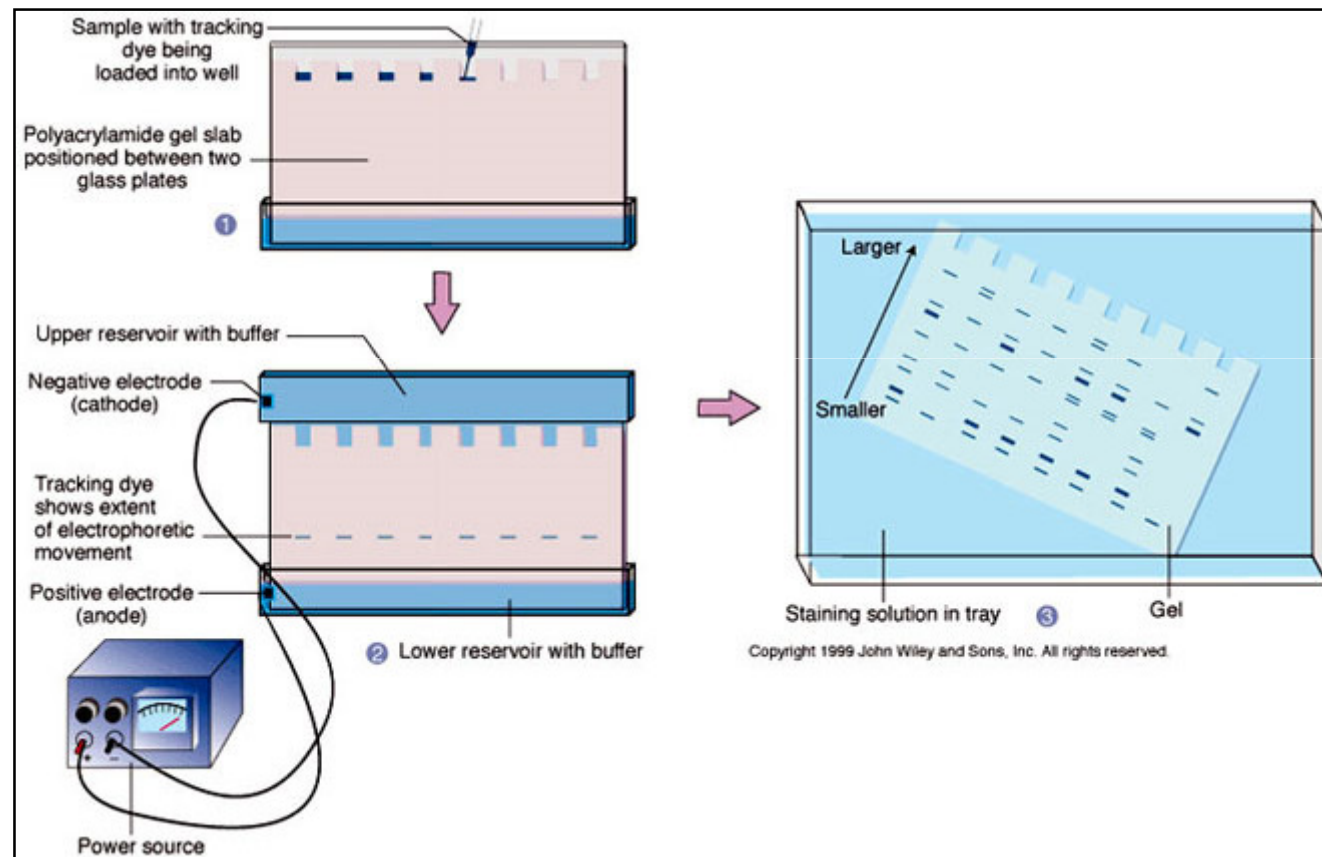
PAGE Apparatur



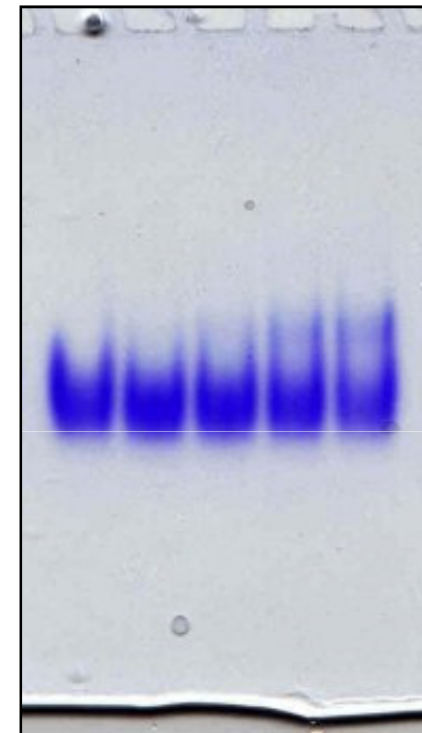
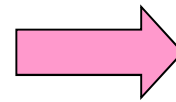
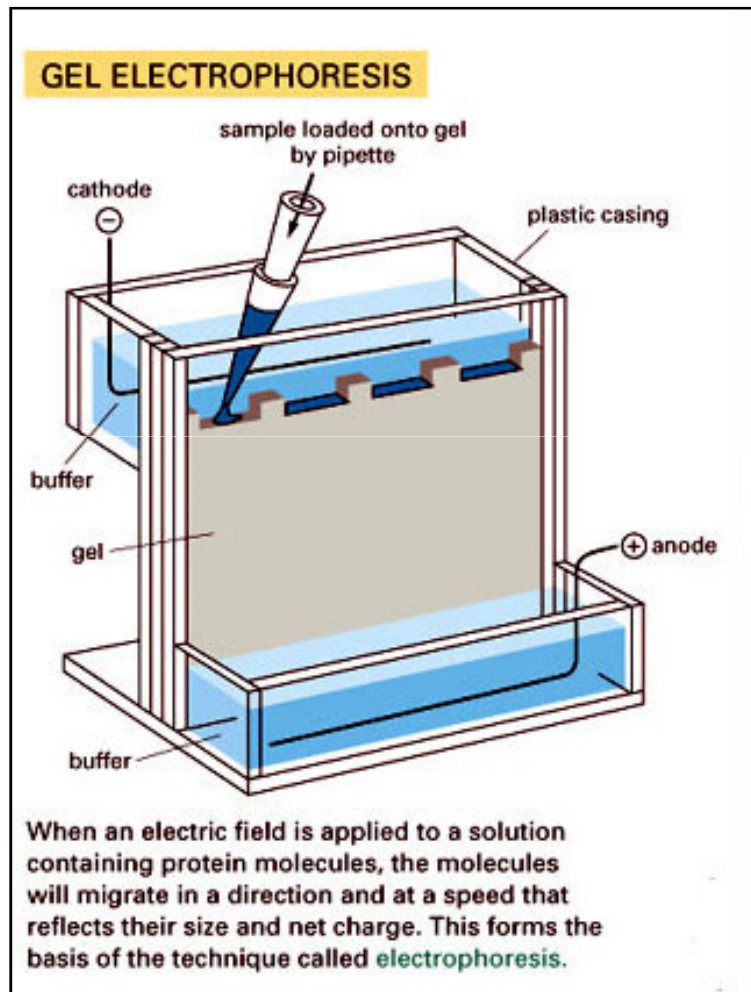
Diskontinuierliche PAGE



Durchführung PAGE



Native PAGE



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

Denaturierende SDS PAGE

the detergent sodium dodecyl sulfate (SDS) is used to solubilize proteins for SDS polyacrylamide-gel electrophoresis

$$\begin{array}{c}
 \text{CH}_3 \\
 | \\
 \text{CH}_2 \\
 | \\
 \text{CH}_2 \\
 | \\
 \text{CH}_2 \\
 | \\
 \text{CH}_2 \\
 | \\
 \text{CH}_2 \\
 | \\
 \text{CH}_2 \\
 | \\
 \text{CH}_2 \\
 | \\
 \text{CH}_2 \\
 | \\
 \text{CH}_2 \\
 | \\
 \text{CH}_2 \\
 | \\
 \text{CH}_2 \\
 | \\
 \text{O} \\
 | \\
 \text{O}=\text{S}=\text{O} \\
 | \\
 \text{O}^- \text{Na}^+
 \end{array}$$

SDS

protein with two subunits, A and B, joined by a disulfide bridge

single subunit protein

HEATED WITH SDS AND MERCAPTOETHANOL

negatively charged SDS molecules

POLYACRYLAMIDE-GEL ELECTROPHORESIS

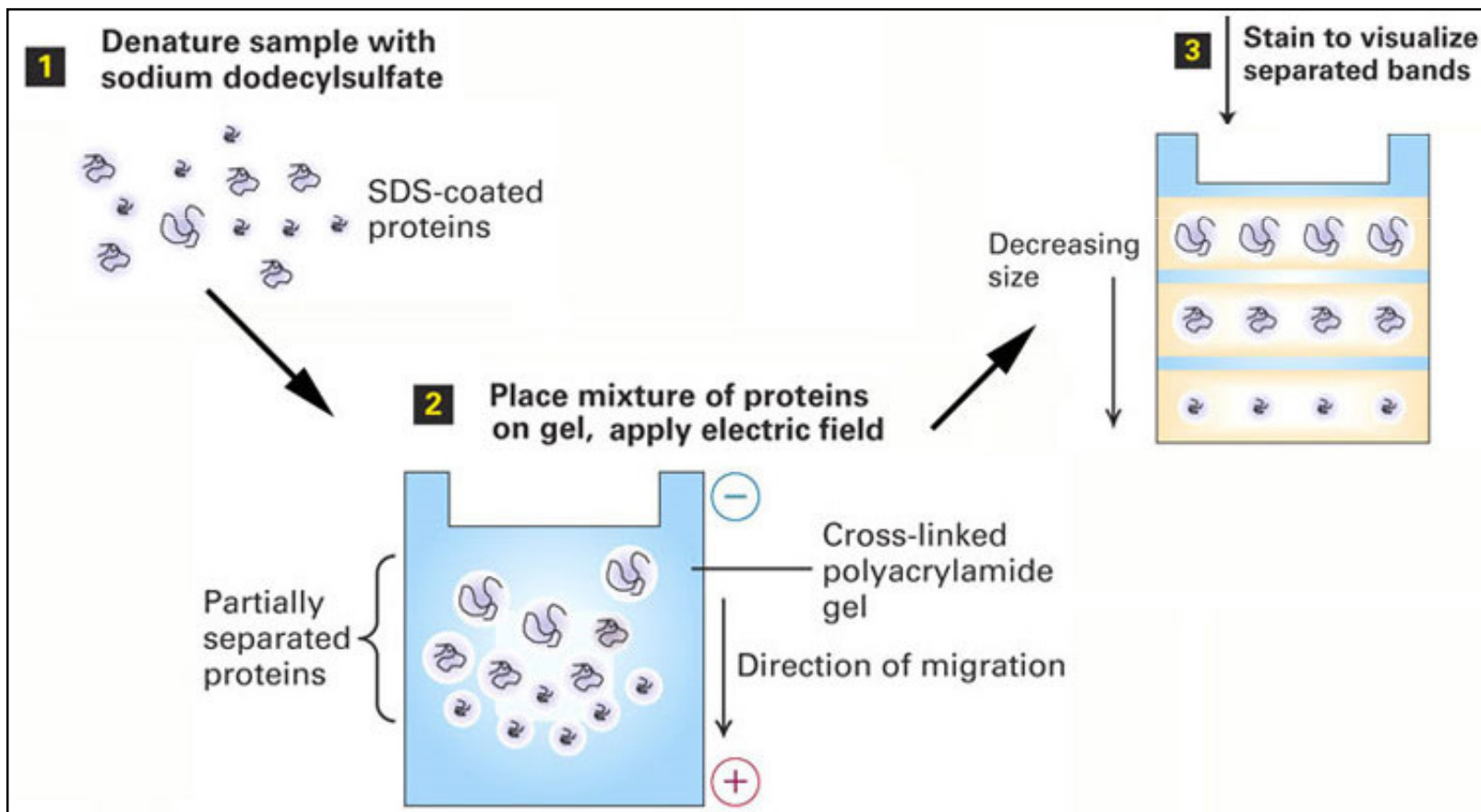
slab of polyacrylamide gel

Ionisches Detergenz
Sodium dodecylsulfate (SDS)

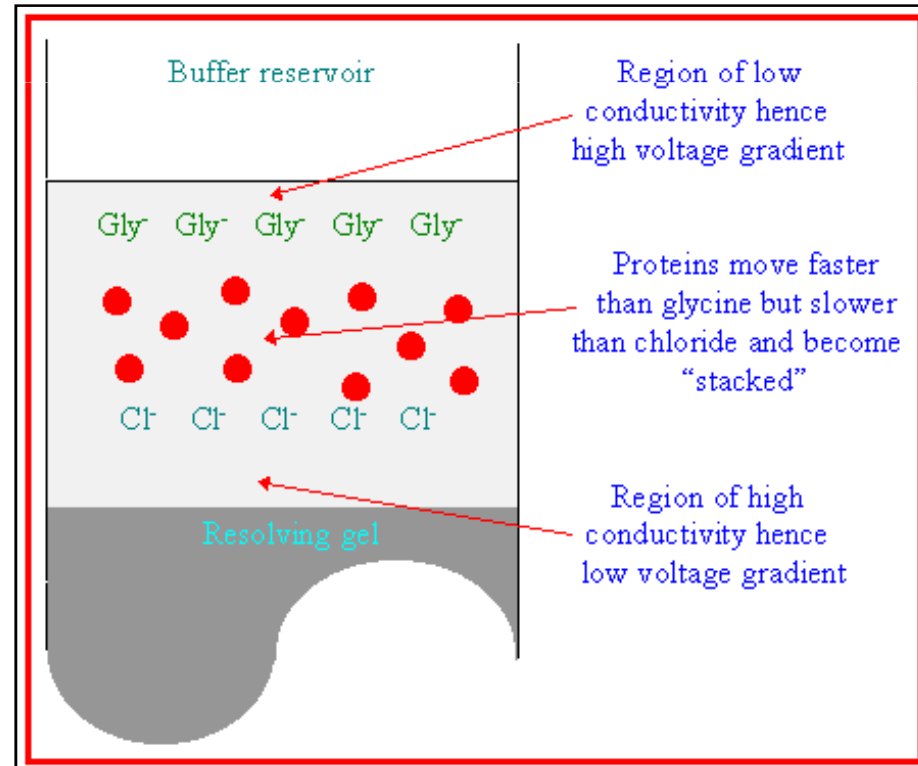
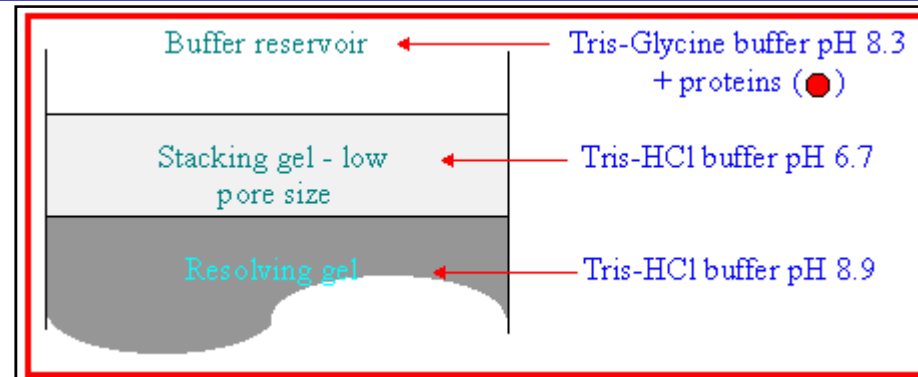
SDS polyacrylamide-gel electrophoresis (SDS-PAGE)
Individual polypeptide chains form a complex with negatively charged molecules of sodium dodecyl sulfate (SDS) and therefore migrate as a negatively charged SDS-protein complex through a slab of porous polyacrylamide gel. The apparatus used for this electrophoresis technique is shown above (left). A reducing agent (mercaptoethanol) is usually added to break any -S-S- linkages in or between proteins. Under these conditions, proteins migrate at a rate that reflects their molecular weight.

Denaturierende SDS PAGE

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



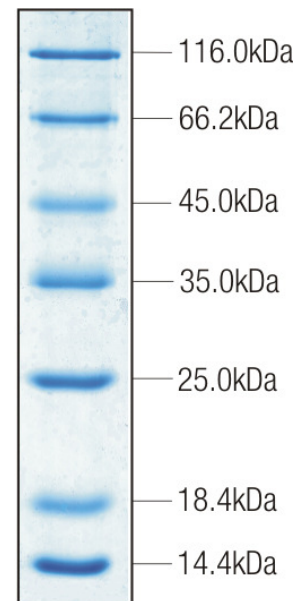
Diskontinuierliche PAGE



Bestimmung der Molekülgröße

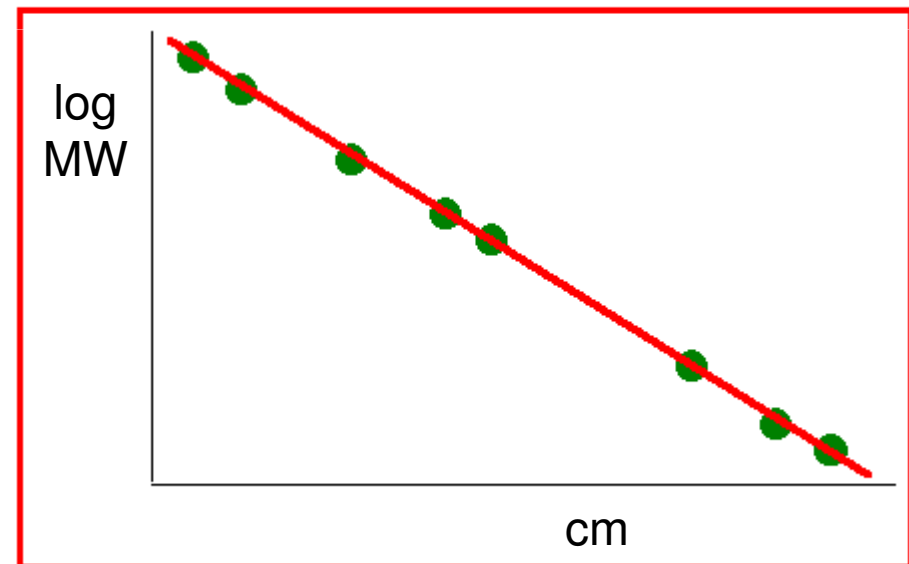
Molekulargewicht (MW):

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



12%SDS-PAGE

Marker
(Fermentas)



Herstellen der Gele

Achtung: nicht-polymerisierte Acrylamidlösungen sind toxisch.

Beim Umgang Handschuhe tragen

- 2 kleine und 2 große **Glasplatten** mit **96 % Ethanol reinigen** und zusammen in den Gießstand einsetzen.
- **12 %iges Trenngel** (siehe Pipettierschema) zusammenpipettieren und bis 1,5 cm unter den Rand der kleinen Glasplatte zwischen die Glasplatten pipettieren/gießen. Vorsicht mit Zugabe von TEMED beginnt die Polymerisation.
- Vorsichtig bis zum Rand mit **Wasser (oder Isopropanol) überschichten** und etwa **30 min polymerisieren** lassen, bis eine scharfe Grenze zwischen Wasser und Gel sichtbar ist.
- Wasser abgießen, **Sammelgel** (siehe Pipettierschema) einfüllen und den **Kamm** für die Geltaschen luftblasenfrei einsetzen.
- Sammelgel etwa **30 min polymerisieren** lassen.
- Das Gel ist nun bereit für die Elektrophorese

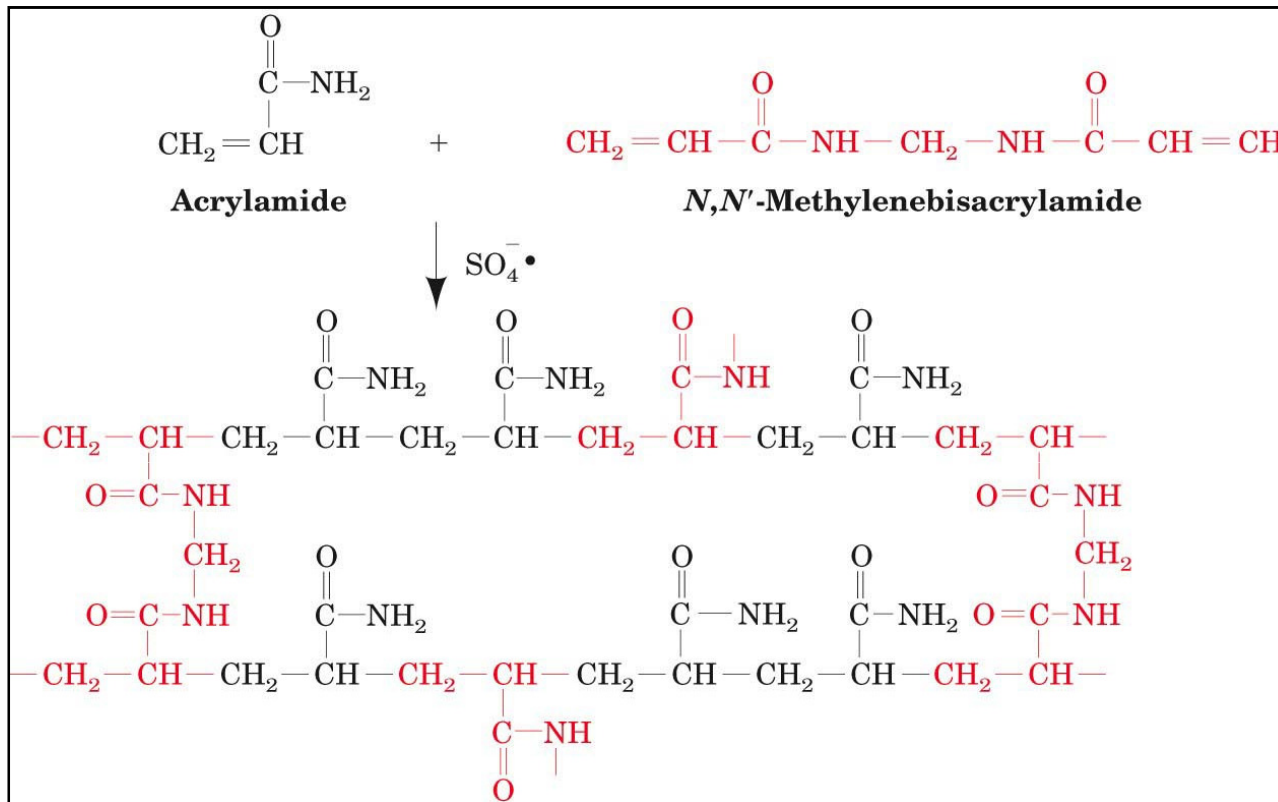
Herstellen der Gele

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

Pipettierschema:

	Trenngel 12 %		Sammelgel 4 %	
	1 Gel	2 Gele	1 Gel	2 Gele
Trenngelpuffer	1 ml	2 ml	/	/
Sammelgelpuffer	/	/	0,48 ml	0,96 ml
H ₂ O	1,8 ml	3,6 ml	1,32 ml	2,64 ml
AA (40 %)	1,2 ml	2,4 ml	0,2 ml	0,4 ml
APS (10 %)	30 µl	60 µl	15 µl	30 µl
TEMED	3 µl	6 µl	2 µl	4 µl

Lösungen



T

Giftig

(Nervengift)

Sensibilisierend

R45- Krebszerzeugend

R46- Erbgutverändernd

R62- Fortpflanzungsgefährdend

PAA/BAA Konzentration:
 4% Sammelgel
 8-16% (i.d.R. 10-12%) Trenngel

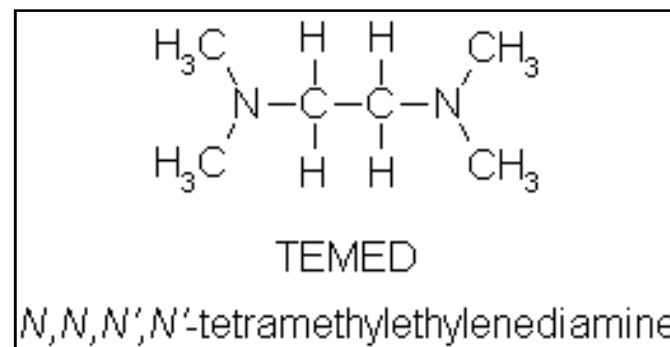
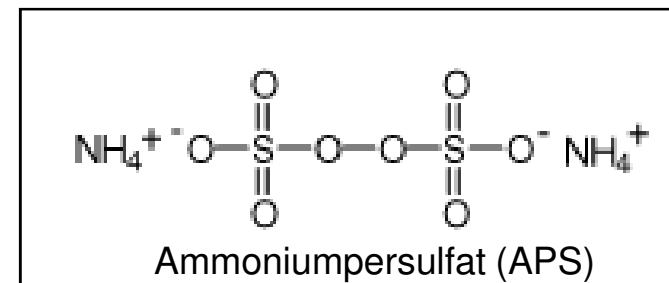
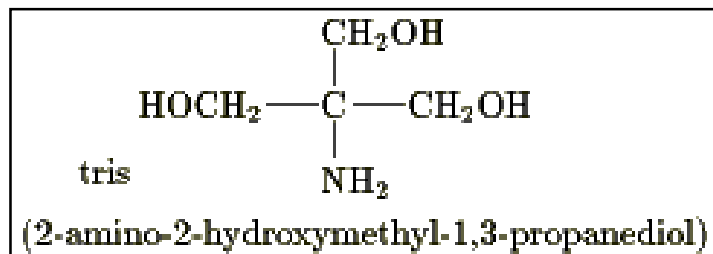
% Acrylamide	Separation range (kDa)
5	25 - 200
10	15 - 70
15	12 - 45

Lösungen

TRIS: Puffer (pH-Stabilität)

APS: bildet Radikale durch photochemischen Abbau
„Starter“

TEMED: -komplexiert Me^{2+} , verhindert Wegfangen der
Radikale



SDS-PAGE

- Probenvorbereitung
 - 1) 2 μ l Zellpellet + 8 μ l Wasser + 5 μ l Probenpuffer
 - 2) 2 μ l Rohextrakt + 8 μ l Wasser + 5 μ l Probenpuffer
 - 3) 5 μ l Durchlauf + 5 μ l Wasser + 5 μ l Probenpuffer
 - 4) 10 μ l Waschen 1 + 5 μ l Probenpuffer
 - 5) 10 μ l Waschen 2 + 5 μ l Probenpuffer
 - 6) 10 μ l Eluat 1 + 5 μ l Probenpuffer
 - 7) 10 μ l Eluat 2 + 5 μ l Probenpuffer
 - 8) 10 μ l Eluat 3 + 5 μ l Probenpuffer

- Inkubation 5 min 95 °C

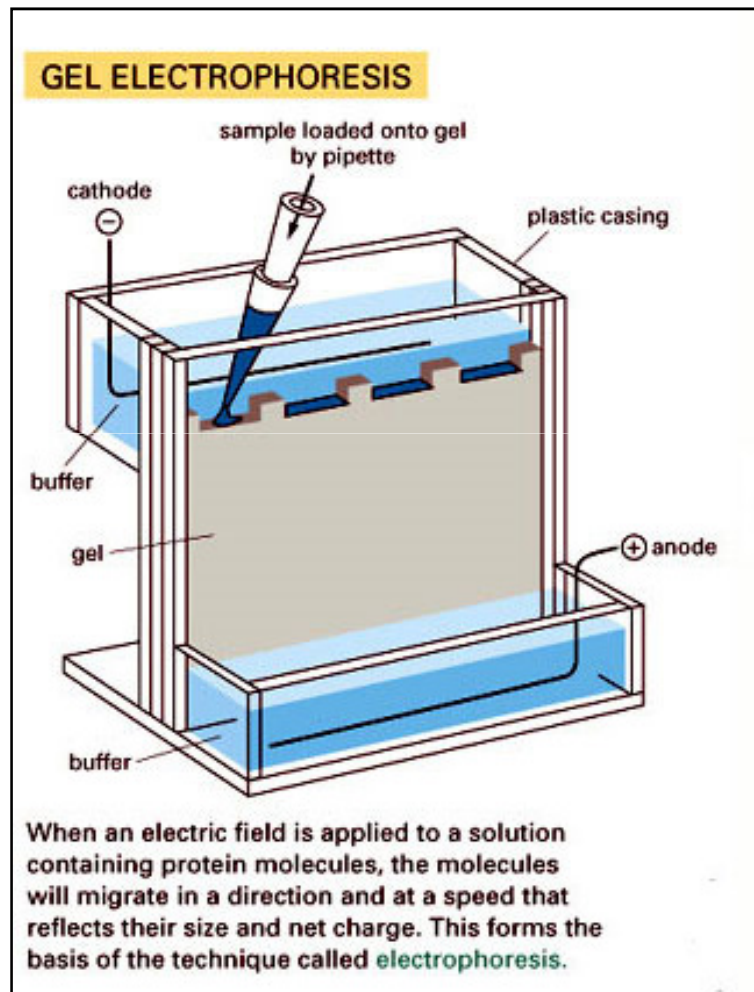
- Gelkammern vorbereiten (Gel einsetzen, Elektrophoresepuffer einfüllen (1:10 verd.))

- Probenauftrag auf das vorbereitete Gel (15 μ l), Marker (5 μ l)

- Elektrophorese (erst 40 mA) 60 mA (für 2 Gele)

- Entfernen des Gels (Vorsichtig!)

Probenauftrag SDS-PAGE



Laufpuffer:

-TRIS, Glycine, SDS

Probenpuffer (2x Laemmli):

-Mercaptoethanol „Reduktionsmittel“

-Glycerin „Beschweren der Probe“

-Bromphenolblau „Farbstoff, läuft an der Front“

-Puffer „stabiler pH-Wert“

-SDS „Detergenz“

-Proteinlösung (ca. 1-20 µg)

Hitze-Inkubation: **5 min 95°C**

Färben & Entfärben des Gels

- Entfernen des Gels (Vorsichtig!)

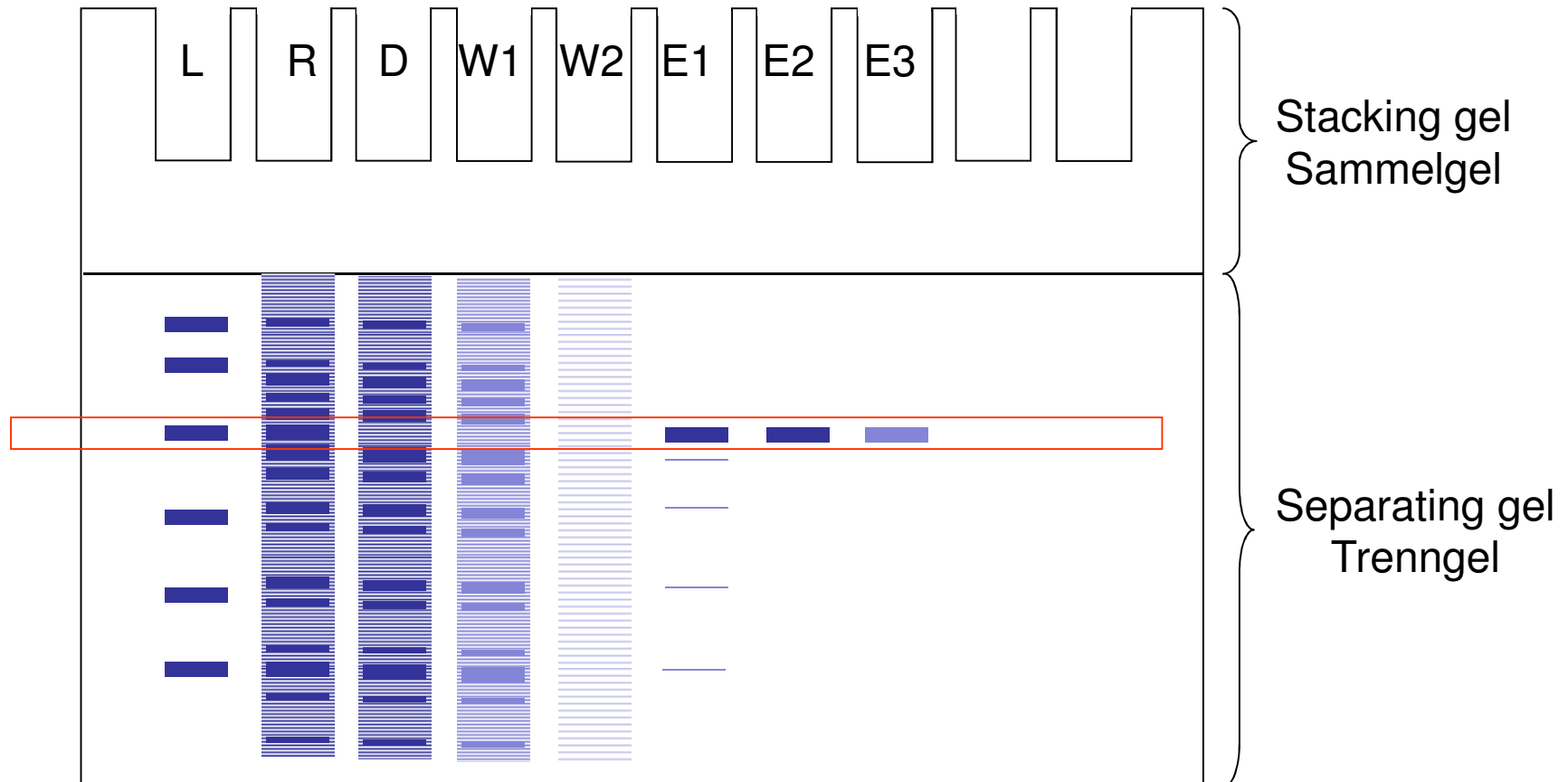
Färbung des Gels

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

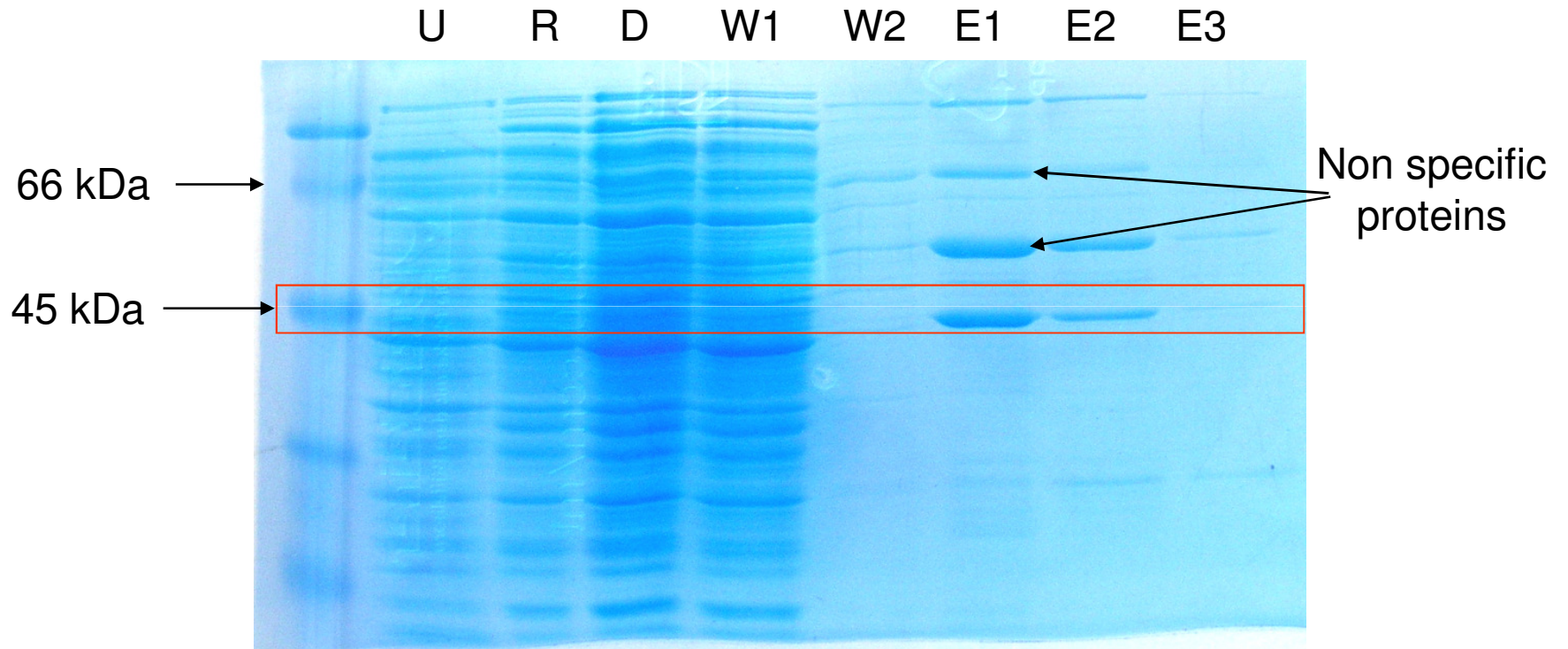
Entfärben des Gels

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

Samples for gel



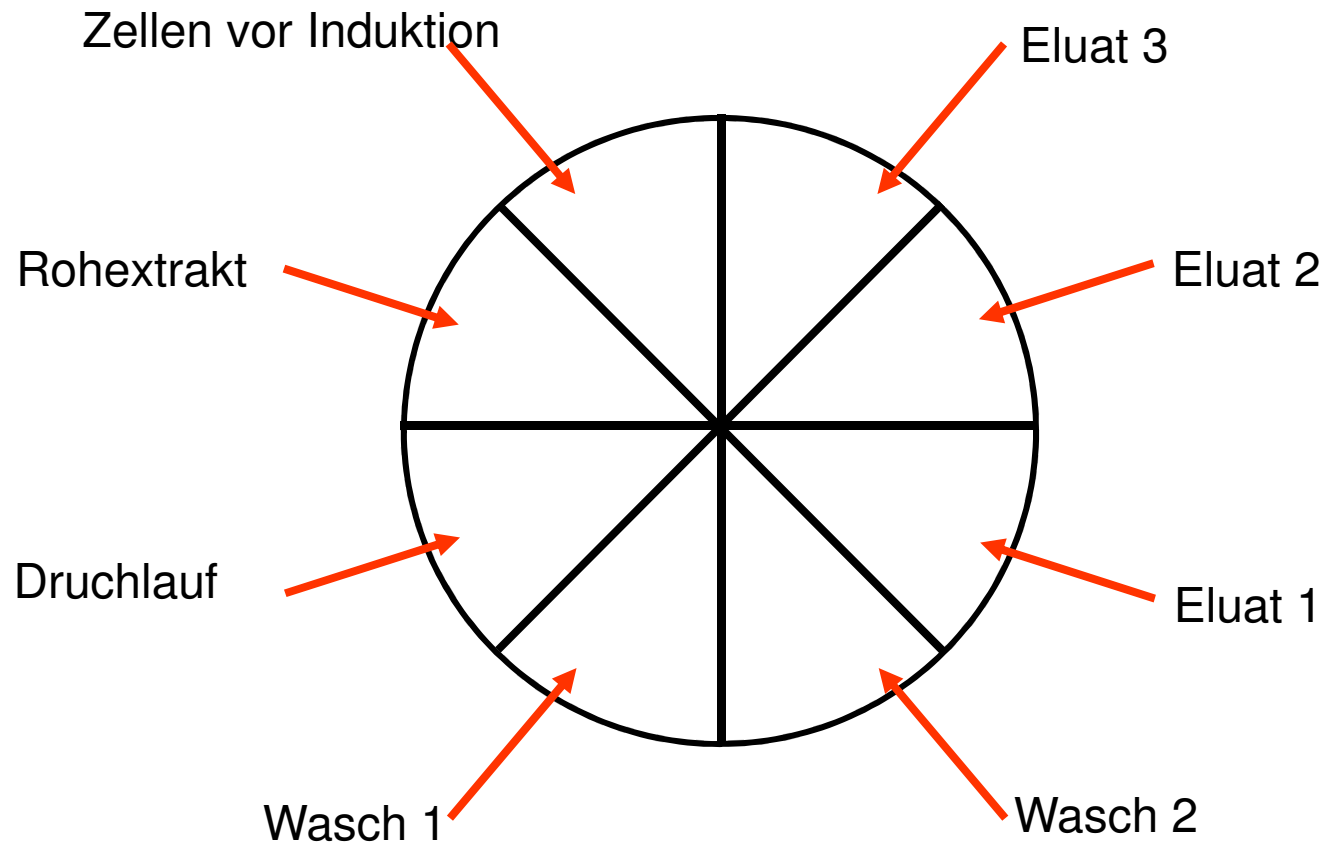
Gel



- Esterase (EstCE) ca. 45 kDa

(2) Aktivitätstest

- Platte in 8 Teile unterteilen
- 10 µl der verschiedenen Proben auftragen

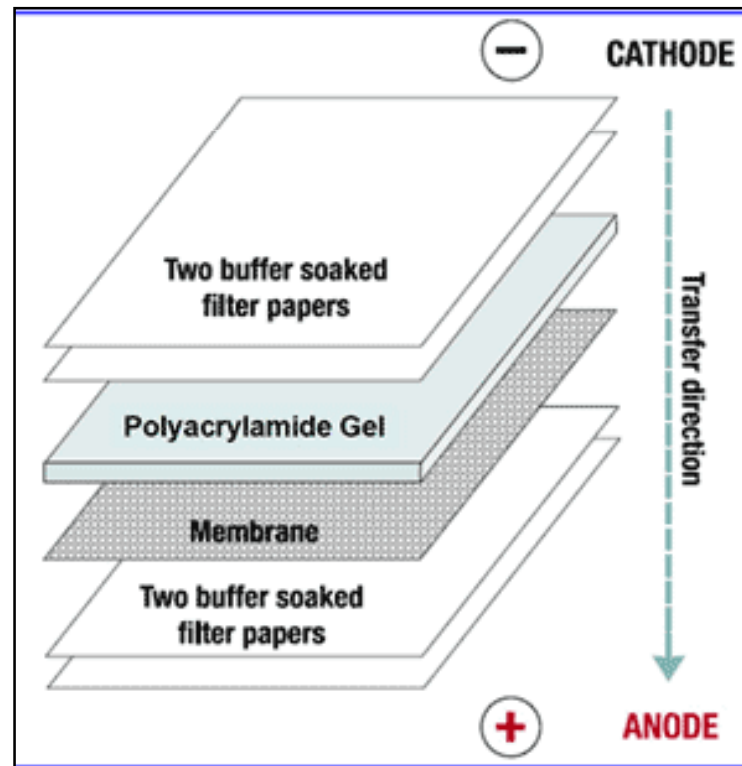


Protein activity testing

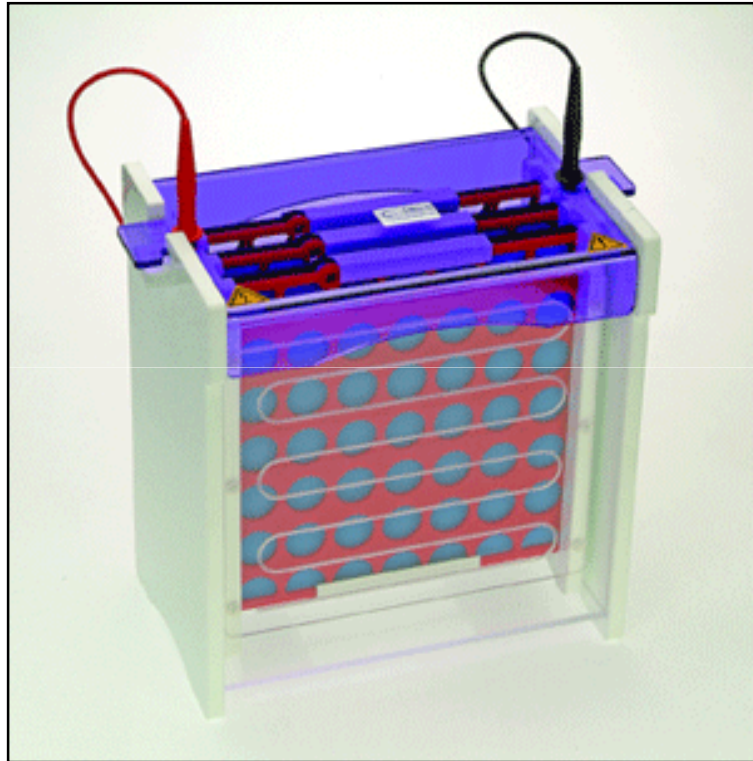


(3) Westernblot

- Transfer von elektrophoretisch aufgetrennten Proteinen auf eine Träger-Membran



Blotting = Transfer



Wet-oder Tank-Blot-System



Semidry-Blot-System

Westernblot

- **SDS-PAGE**
- Jede Gruppe eine Spur (zwei SDS-Gele, 12%ig)
- Elutionsfraktion
 - **10 µl der E1, E2 oder E3 Fraktion** (je nach Ergebnis der 1. PAGE) + **5 µl Probenpuffer** (mischen, kochen, auftragen)
 - „**Prestained-Marker**“ (PageRuler, Fermentas). Dieser hat den Vorteil, dass die Proteinspezies gefärbt und somit **während der PAGE und auch nach dem Transfer auf der Membran sichtbar** sind.

Westernblot

- **Transfer (nach SDS PAGE)**
- Beide Gele für **15 min in Transfer-Puffer bei RT inkubiert (Wippe)**
- **Nylon-Membranen, Whatman-Papiere und Schwämme** mit Transfer-Puffer **angefeuchten**
- Blot-Aufbau („**Sandwich**“) für ein Gel:
 - Schwamm
 - 2 Whatman Papiere
 - Membran
 - Gel
 - 2 Whatman Papiere
 - Schwamm
- Achtung **Luftblasen** mit Glaspipette entfernen
- Beide Blots in **Kammer**, mit 1 l **Transfer-Puffer** auffüllen
- Blotting **über Nacht, bei 4°C und 12 V**