

Praktikum Biochemie

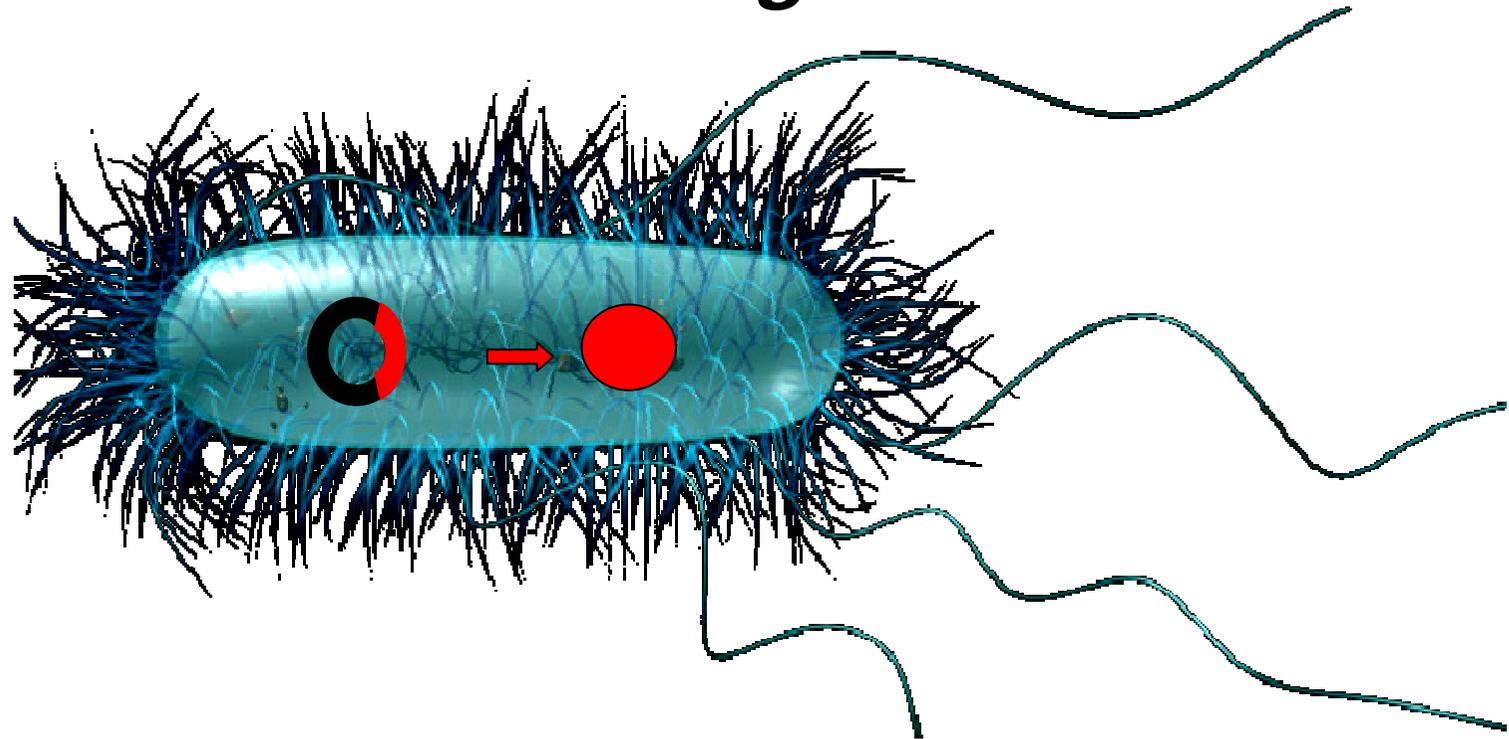
„Einführung in die Molekularbiologie“

Bettina Siebers

Rekombinante Expression

einer Esterase aus

Pseudomonas aeruginosa in *E. coli*



Polyacrylamide Gelelektrophorese

(PAGE)



Denaturierende SDS PAGE

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

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

SDS

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

single subunit protein

HEATED WITH SDS AND MERCAPTOETHANOL

POLYACRYLAMIDE-GEL ELECTROPHORESIS

slab of polyacrylamide gel

$$\text{H}_3\text{C}-(\text{CH}_2)_{11}-\text{O}-\text{S}(=\text{O})_2-\text{O}^- \text{Na}^+$$

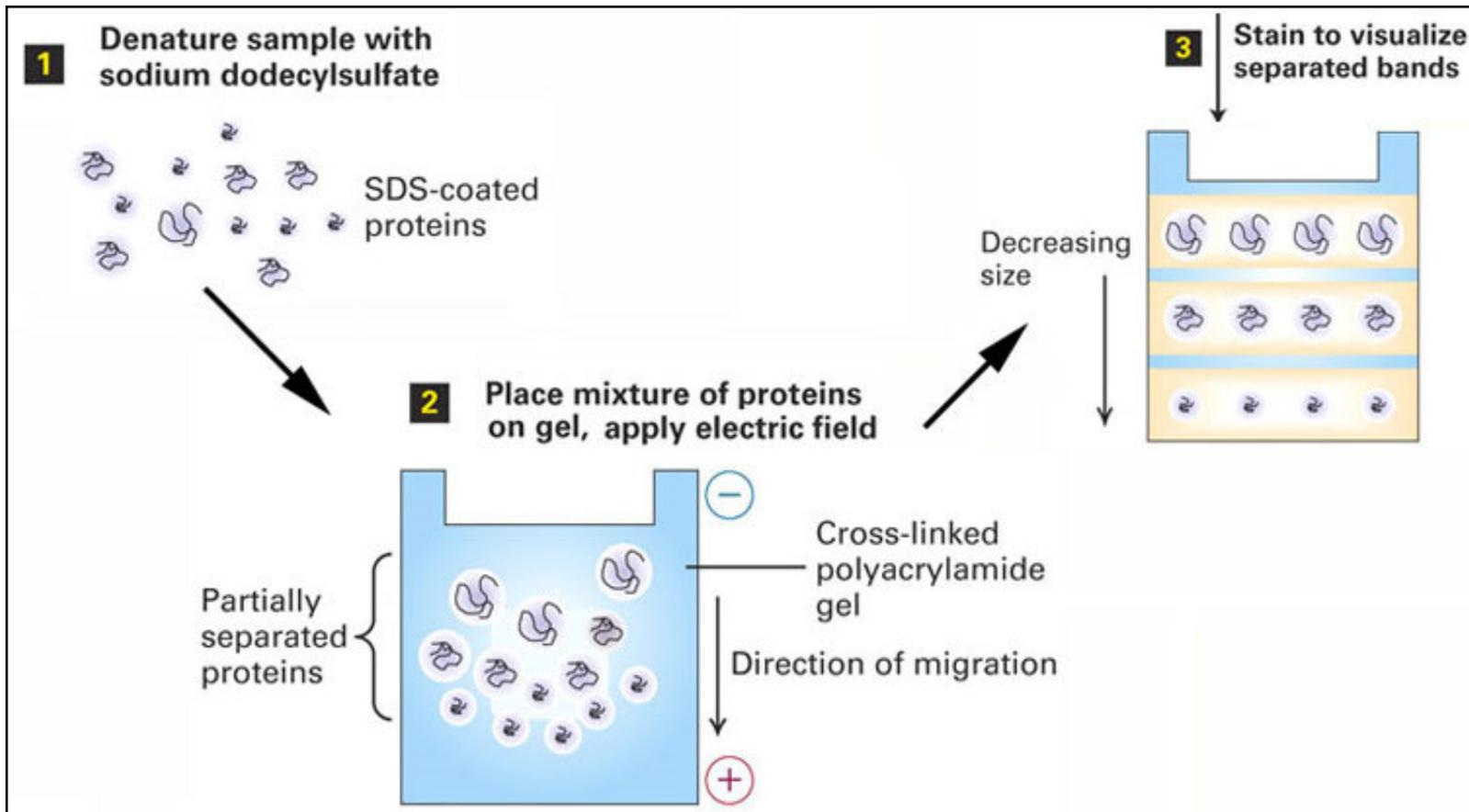
Ionisches Detergenz
Sodium dodecylsulfate (SDS)

SDS polyacrylamide-gel electrophoresis (SDS-PAGE)

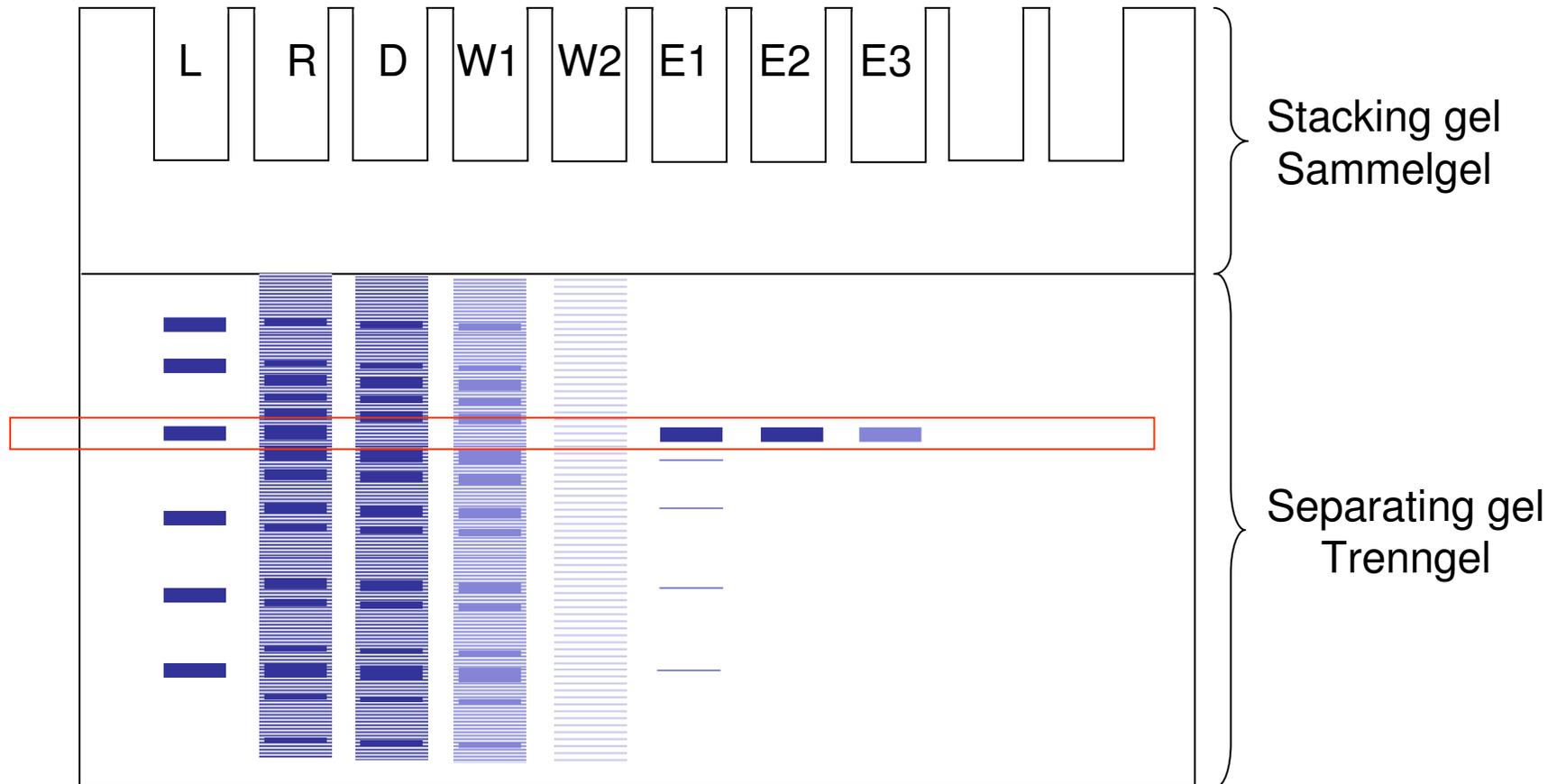
Individual polypeptide chains form a complex with negatively charged molecules of sodium dodecyl sulfate (SDS) and therefore migrate as a negatively charged SDS-protein complex through a slab of porous polyacrylamide gel. The apparatus used for this electrophoresis technique is shown above (left). A 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

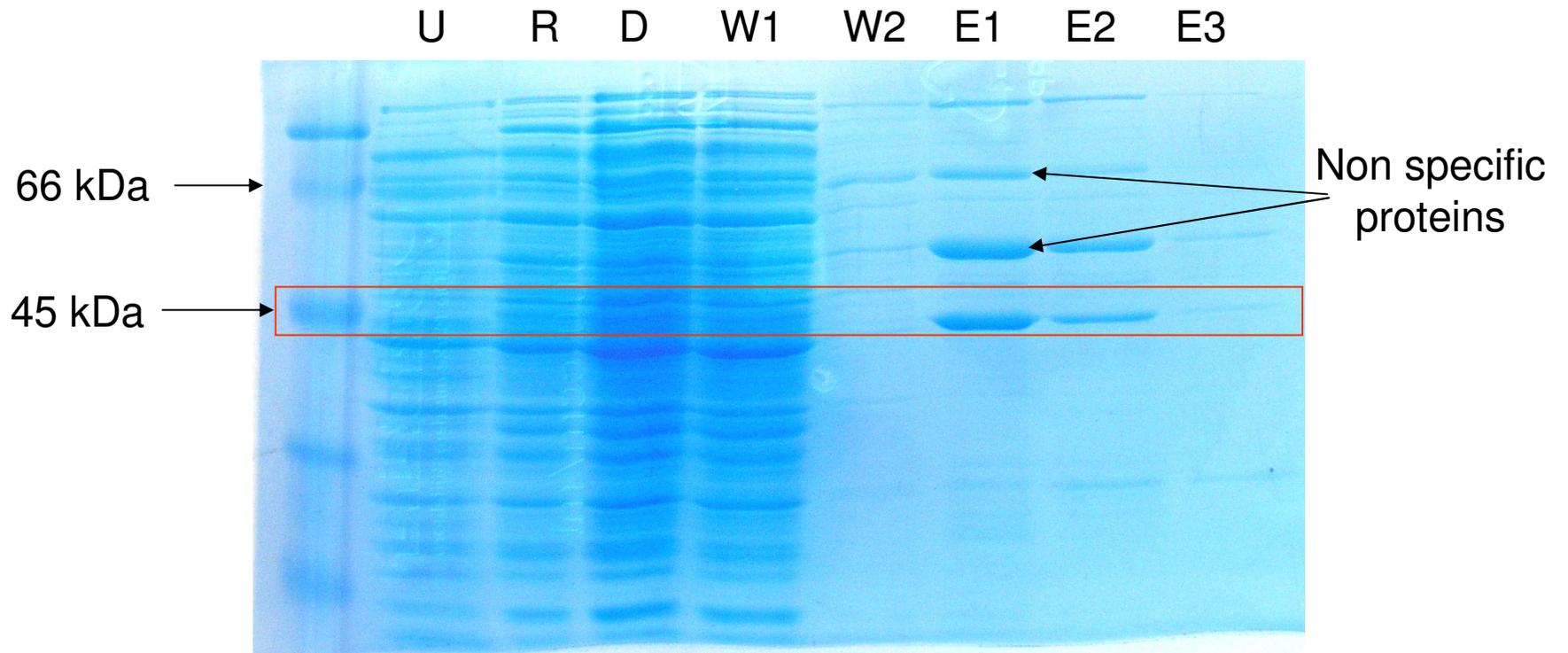
- Trennung der Proteine nur nach Größe
- Ladungsmäßige Uniformierung der Proteine (SDS)
- Dissoziation der Oligomere → nur Monomere



Samples for gel



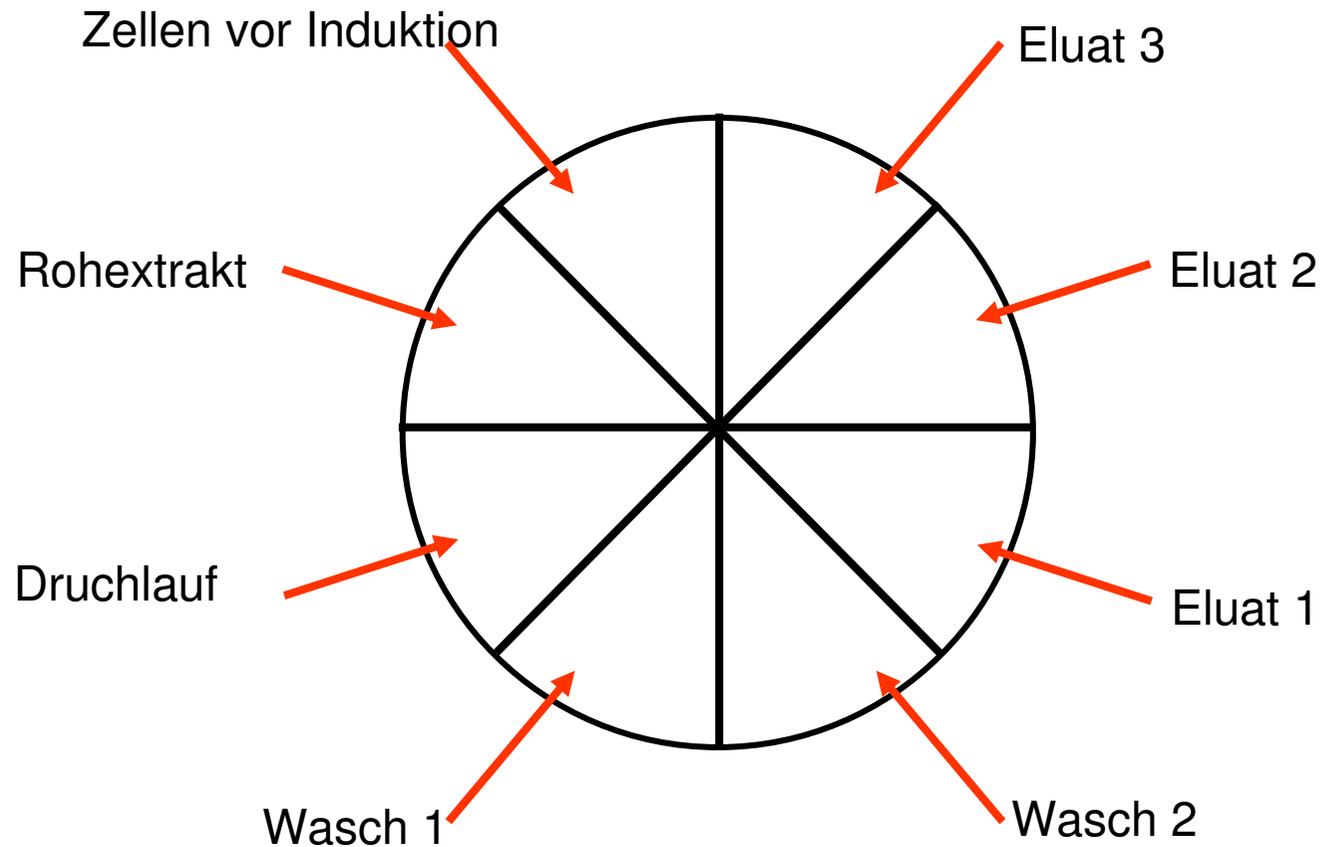
Gel



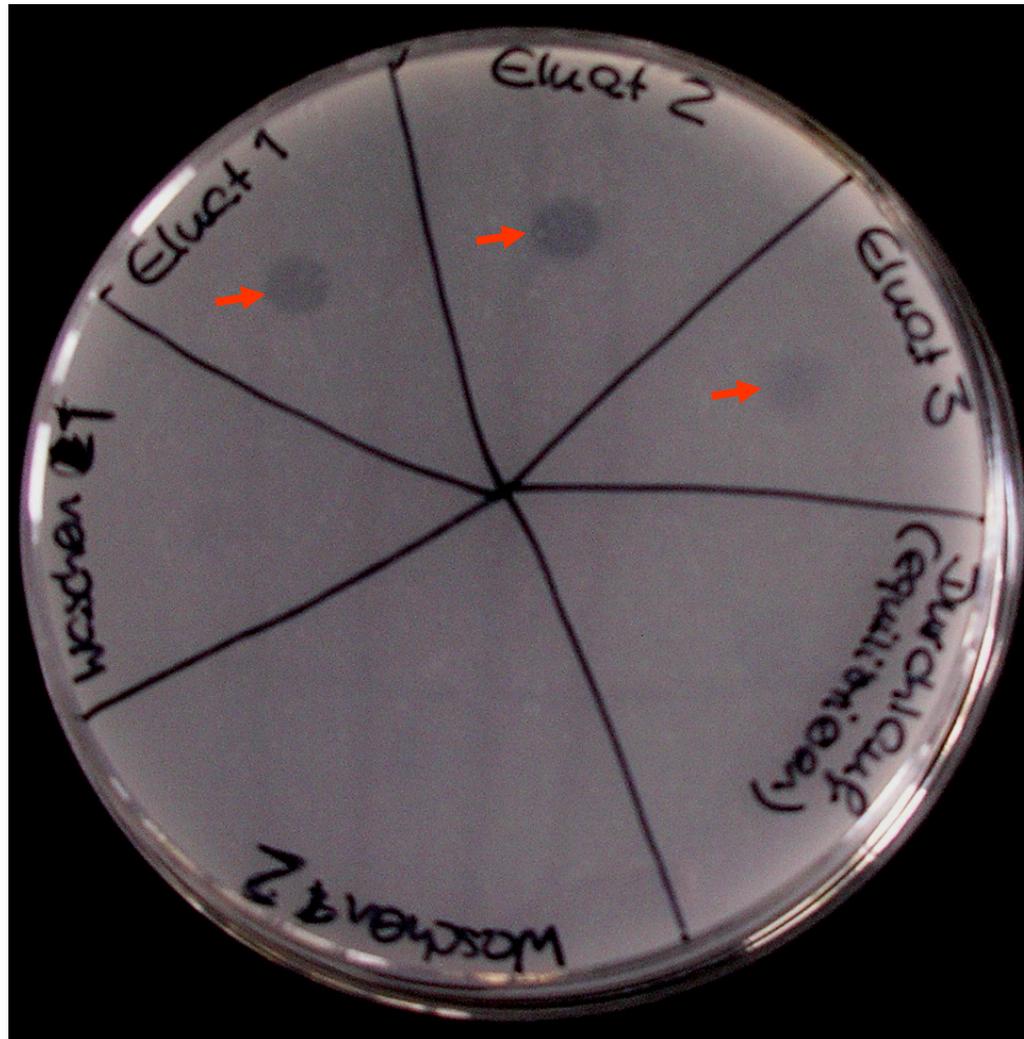
- Esterase (EstCE) ca. 45 kDa

Aktivitätstest

- Platte in 8 Teile unterteilen
- 10 μ l der verschiedenen Proben auftragen

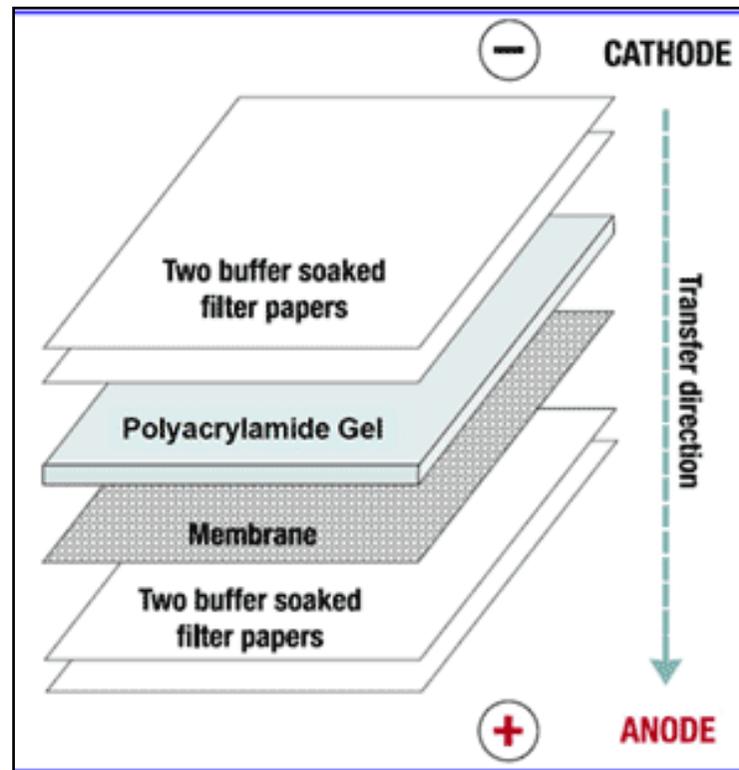


Protein activity testing

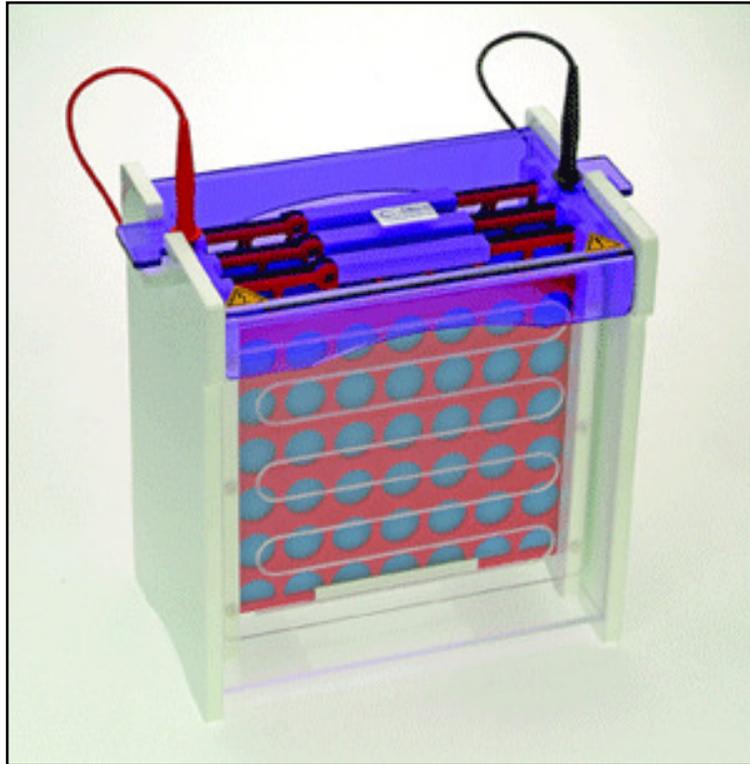


Westernblot

- Transfer von elektrophoretisch aufgetrennten Proteinen auf eine Träger-Membran



Blotting = Transfer



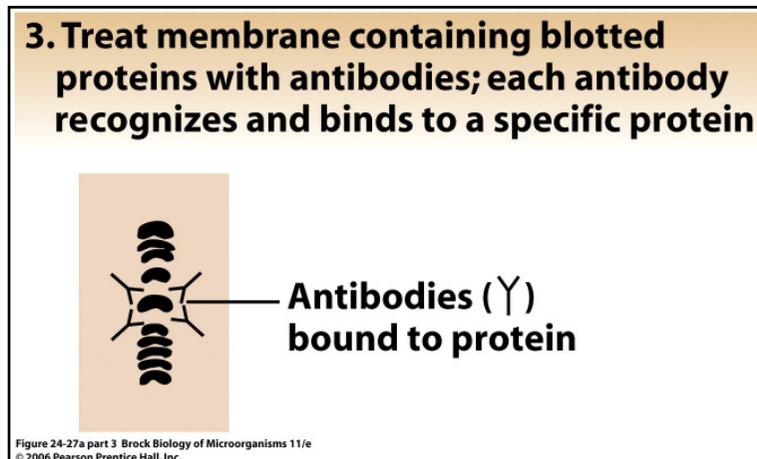
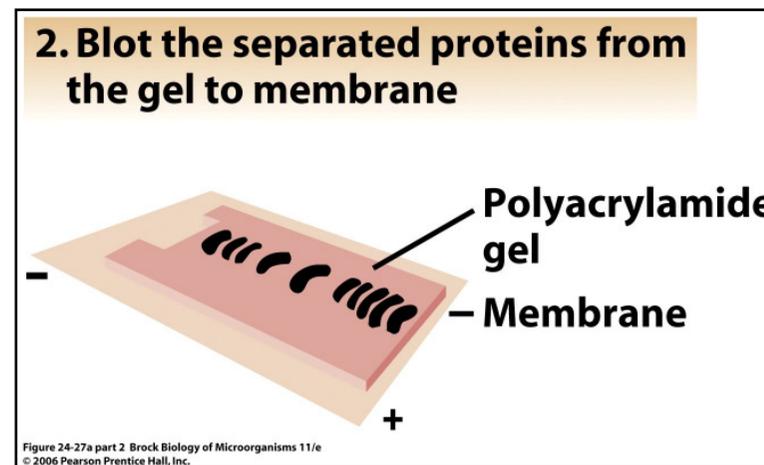
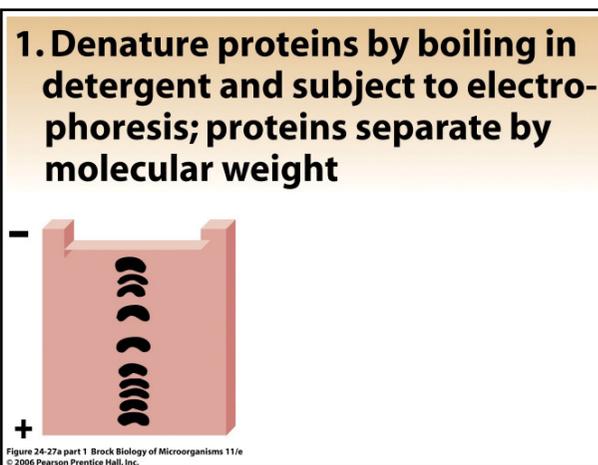
Wet-oder Tank-Blot-System



Semidry-Blot-System

Immunodetektion

- Antigene werden über Elektrophorese getrennt, auf eine Membran transferiert und mit Antikörper inkubiert.



Immunodetektion

- Immun-Komplexe werden mit Enzym-markierten oder radioaktiven sekundären Antikörper visualisiert.
- Immunoblots sind extrem spezifisch, aber die Methode ist komplex und zeitraubend.

4. Add marker to bind to antigen-antibody complexes, either (left) radioactive *Staphylococcus* protein A- ^{125}I , or (right) antibody containing conjugated enzyme

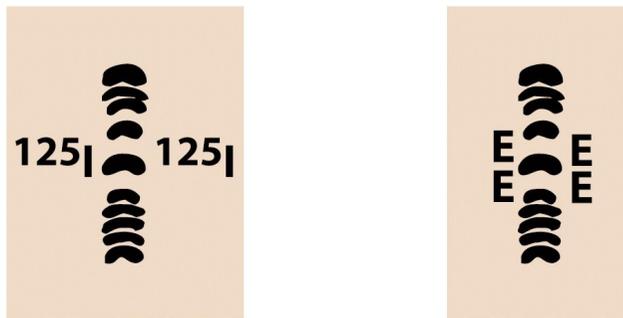


Figure 24-27a part 4 Brock Biology of Microorganisms 11/e
© 2006 Pearson Prentice Hall, Inc.

5. Expose to film (^{125}I) or enzyme substrate and develop to reveal antibody-labeled protein

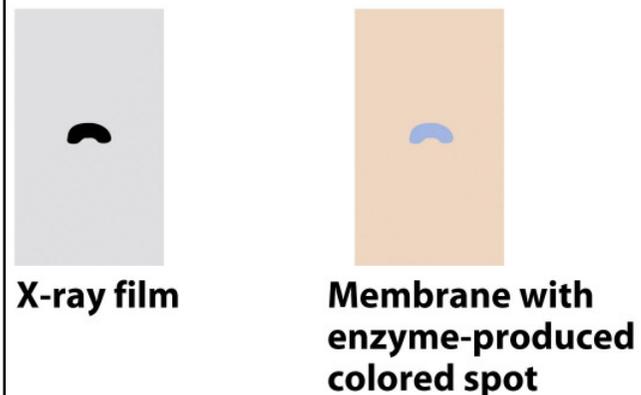
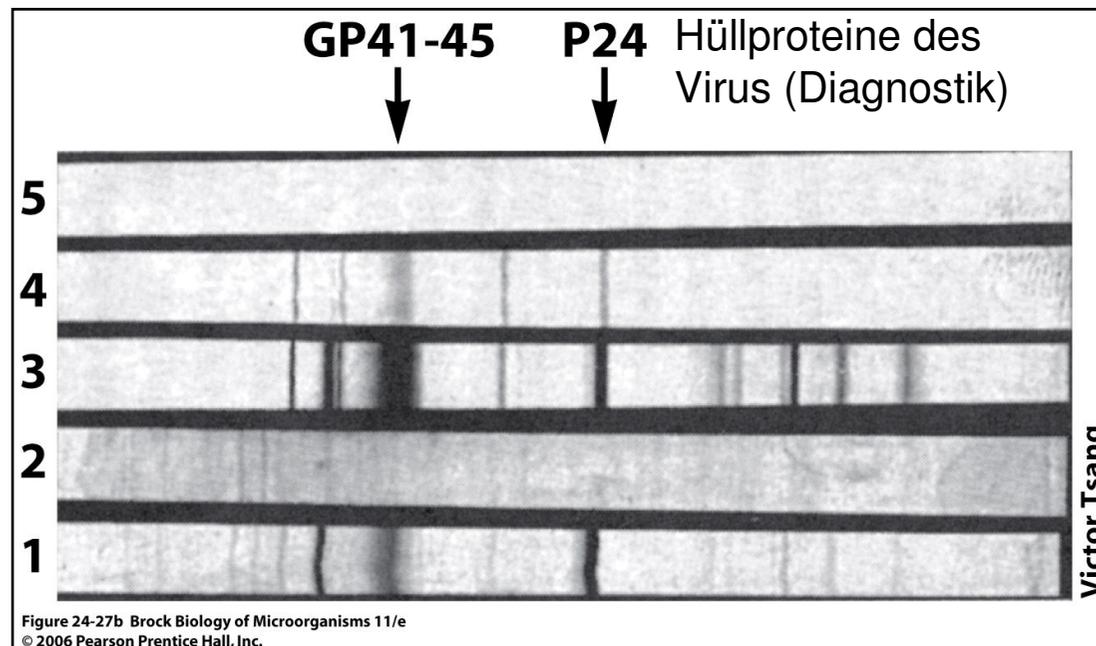


Figure 24-27a part 5 Brock Biology of Microorganisms 11/e
© 2006 Pearson Prentice Hall, Inc.

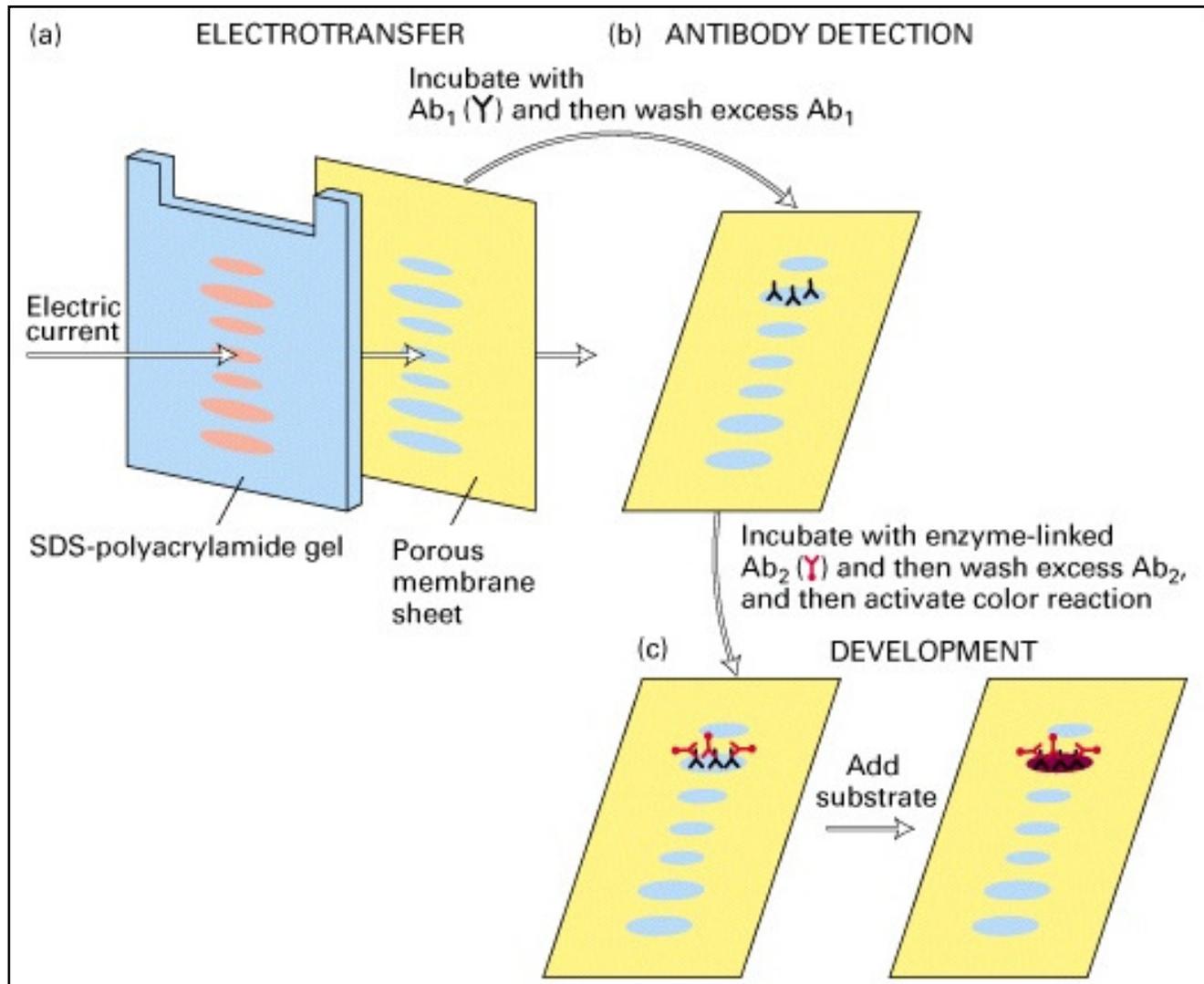
Immunodetektion

➤ Human immunodeficiency detection (HIV)

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



Immunodetektion



Immunodetektion

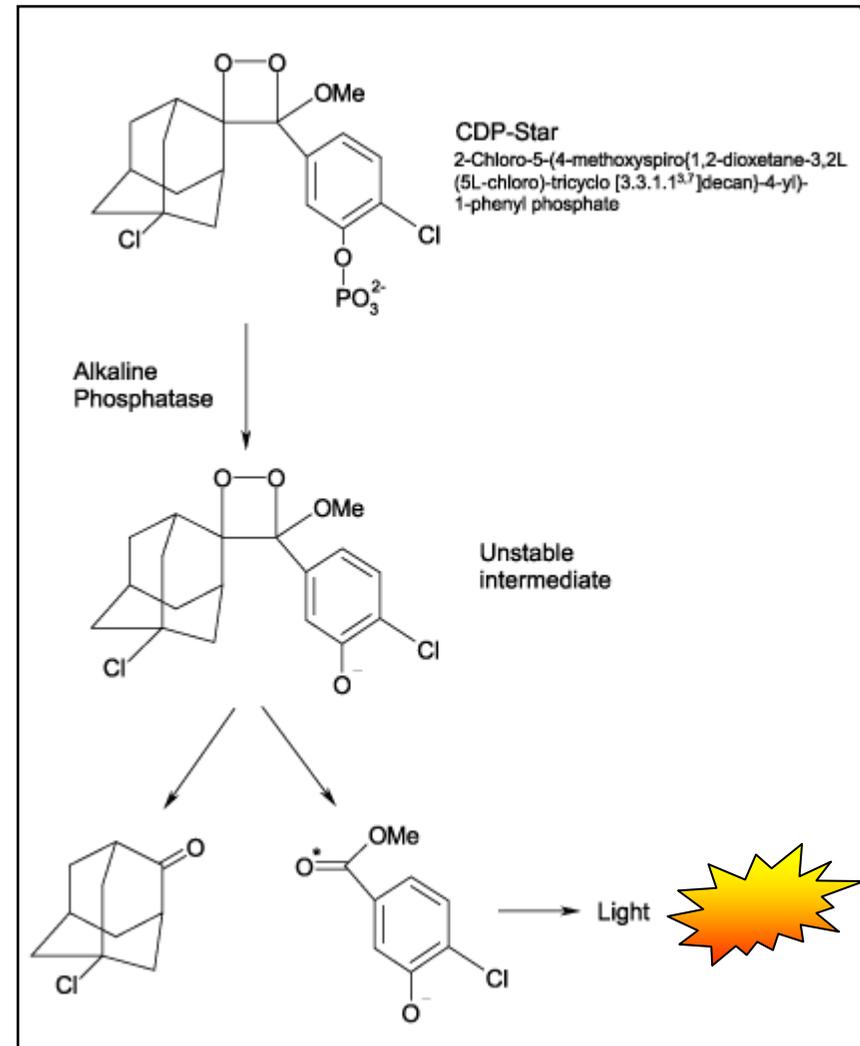
- Membran lufttrocknen (Plastikbehälter)
- Kontrolle des Transfers
 - Prestained-Marker sichtbar?
 - Nach dem Färben des Gels noch Banden?
- **Immundetektion (Antigen-Antikörper-Bindungs-Prinzip)**
- Alle Schritte: RT, Wippe:
- 5 min 20 % Methanol
- **Waschen:** 3 x 5 min in PBST-Puffer (1x PBS + 0,3% Tween-20; ca. 10-20 ml)
- **Blocken** der freien Bindestellen auf der Membran: Membran 1 h in 20 ml PBST + 5 % Milchpulver
- **Waschen:** 2 x 10 min in PBST + 2,5 % Milchpulver
- Inkubation mit **Anti-His-tag AK** 1:1000 (10 µl in 10 ml) in PBST + 2,5 % Milchpulver, 1 h 30 min
- **Waschen:** 6 x 5 min PBST + 2,5 %

Immunodetektion

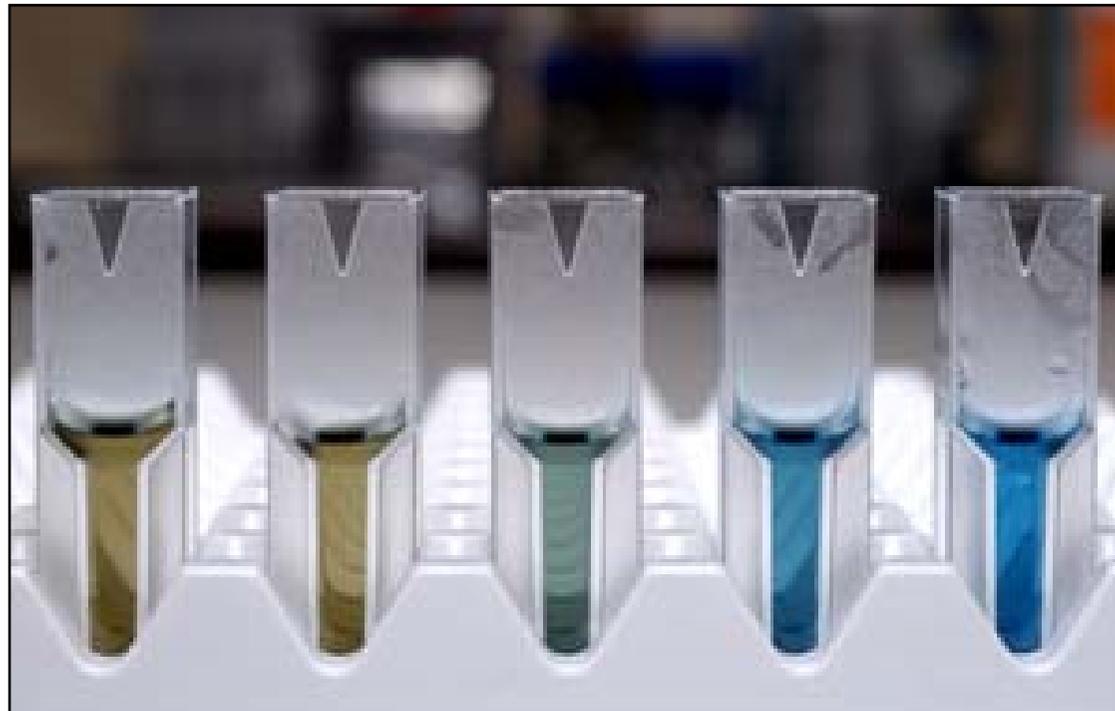
- Inkubation mit **sekundärem AK** 1:10.000 (2 µl in 20 ml
1h 30 min bei RT)
- **Waschen:** 8 x 5 min, RT, PBST-+ 2,5 % Milchpulver,
jeweils mit ca. 10-20 ml
- **Entwickeln:** 2 x 5 min mit Bidest.
- Alle nun folgenden Schritte werden bei 37 °C im Schüttler
durchgeführt:
- Inkubation Membran in 37 °C vorgewärmten 9 ml Bidest.
+ 1 ml CDP-Star
- 5 min Inkubation
- **Detektion** der Chemilumineszens VersaDoc (BioRad)
- Der Farbstoff CDP-Star wird durch die mit dem
sekundären Antikörper konjugierte Alkalische
Phosphatase dephosphoryliert, was die Freisetzung von
detektierbarem Licht zur Folge hat.
- Die **Dokumentation** erfolgt mit Hilfe des VersaDoc-
Systems der Firma BioRad.

Chemilumineszenz

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

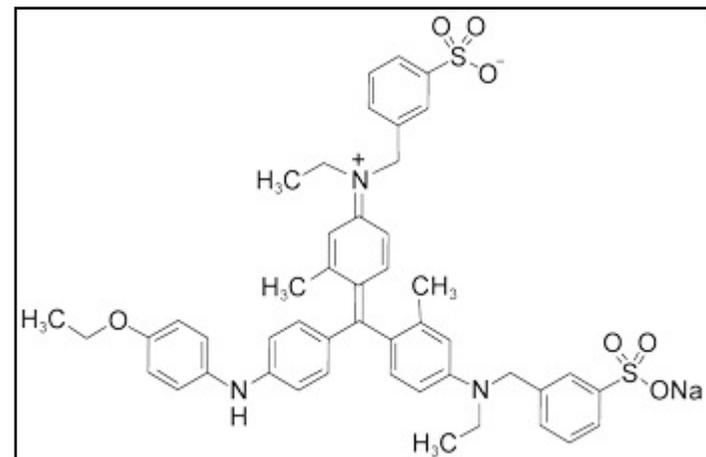
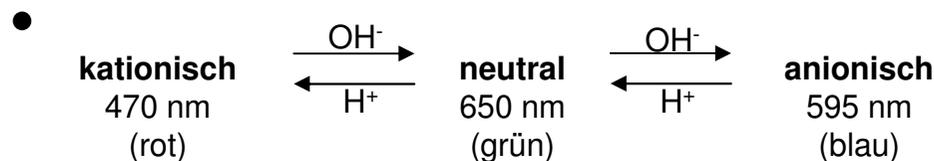


(2) Proteinbestimmung



Proteinbestimmung nach Bradford

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



Protein Bestimmung

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

Standard: 0,2 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$

μg BSA in der Küvette	0	2	4	6	8	10
μl BSA-Lösung	0	10	20	30	40	50
μl dest H_2O	600	590	580	570	560	750

Proben:

-1:100 Verdünnung (H_2O) Rohextrakt

-unverdünnt Elutions-Fraktion

-jeweils 10, 20, 40 μl einsetzen

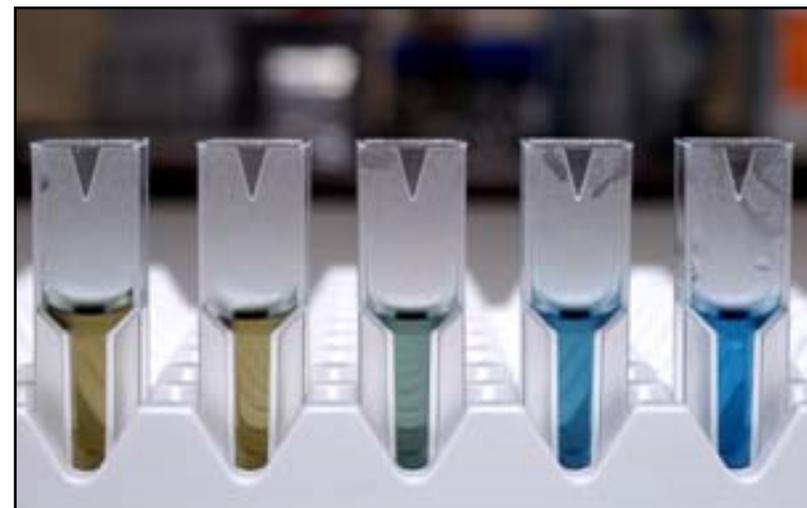
Doppelbestimmung !!

-Start: 400 μl Biorad-Reagenz

-Mischen, 15 min RT

-OD 595/600 nm

!! Parallel zur Eichkurve !!



Protein Bestimmung

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

Bsp: - Rohextrakt Verdünnung 1:100

- 20 μ l Probe / ml (Verdünnung 1:50),

- Gesamt Verdünnung 1:5000

-OD = 0,5

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

