

**M-MODUL 4407**

**Evolution und Biochemie**

**der Organellen**

**Teil 2**

**Grundlegende Methoden**  
**der Molekularbiologie**



**Institut für Molekulare Evolution**

**Wintersemester 2011/2012**

**13.02.2012 bis 23.03.2012**



## Zielsetzung des Praktikums

In den durchgeführten Experimenten zur Zellfraktionierung, Reinigung von Organellen und 2D-Gelelektrophorese im ersten Teil des B-Moduls 4205 wurden einige Methoden angewandt, die zur analytischen und präparativen Reinigung von Proteinen verwendet werden. Sind Proteine gereinigt (chromatographisch oder z.B. durch 2D-Elektrophorese), kann die Aminosäuresequenz von Peptidfragmenten des Proteins bestimmt werden und durch Vergleiche mit anderen Sequenzen das Protein einer Proteinfamilie zugeordnet werden. Ist die Nukleotidsequenz eines Proteins bekannt, kann der umgekehrte Weg gewählt werden und das Gen in anderen Organismen exprimiert werden, die in der Regel einfacher und schneller zu kultivieren sind, als der Organismus, aus dem das Protein ursprünglich stammt.

In diesem Praktikumsversuch sollen zwei unterschiedliche Proteine in *Escherichia coli* und ein Protein in *Saccharomyces cerevisiae* exprimiert werden. Aus dem Cyanobakterium *Synechocystis sp6803* wird eine  $\beta$ -Ketoreduktase durch PCR und Klonierung heterolog in *E. coli* exprimiert. Aus dem Flagellaten *Euglena gracilis* soll eine putative Thiolase heterolog in *E. coli* und *S. cerevisiae* exprimiert werden. Anschließend sollen die exprimierten Proteine über den durch die Expressionsvektoren vermittelten His-Tag affinitätschromatographisch gereinigt und mittels SDS-Gelelektrophorese, Western Blot und Immunodetektion identifiziert werden.

## 1. WOCHE

- Donnerstag:** PCR (Seite 23)  
Gießen von Agarosegelen (Seite 26)
- Freitag:** Medien ansetzen und AIX-Platten gießen (Seite 79)  
Agarose-Gelelektrophorese (Seite 26)  
Gießen von Agarosegelen (Seite 26)  
Elution von DNA aus Agarosegelen (Seite 27)
- Montag:** Phosphorylierung und Auffüllen (Glätten) von DNA-Fragmenten (Seite 28)  
Ligation mit SK(+) (Seite 31)  
Transformation von *E. coli* XL1-Blue (Seite 32)  
Hefe und *E. coli* BL21(DE3) auf Platte ausstreichen (Seite 43 und 44)
- Dienstag:** Lösungen ansetzen  
Platten gießen (LB-Kanamycin und SC) (Seite 79)  
*E. coli* BL21(DE3) für kompetente Zellen animpfen (Seite 43)  
Hefe-Vorkulturen (kompetente Zellen) animpfen (Seite 44)
- Mittwoch:** Herstellung chemisch kompetenter *E. coli* BL21(DE3)-Zellen (Seite 44)  
Minis animpfen (mit Kolonien aus der Transformation von *E. coli* XL1-Blue)
- Donnerstag:** Plasmid-Präparation (Seite 33)  
Testrestriktion und Agarose-Gelelektrophorese (Seite 35 und 26)
- Freitag:** großer Spaltungsansatz (Seite 39)  
Agarose-Gelelektrophorese (Seite 26)  
Elution von DNA aus Agarosegelen (Seite 27)  
Ligation mit pET28a und pYES2/CT (Seite 39 ff.)  
Transformation von *E. coli* XL1-Blue (Seite 32)  
Hefe-Vorkulturen (kompetente Zellen) animpfen (Seite 44)
- Samstag:** Platten aus dem Brutschrank holen (Betreuer)
- Sonntag:** Minis animpfen (Betreuer)

## 2. WOCHE

- Montag:** Plasmid-Präparation (Seite 33)  
Testrestriktion und Agarose-Gelelektrophorese (Seite 35 und 37)  
Transformation von *E. coli* BL21(DE3) (Seite 45)
- Dienstag:** Herstellung chemisch kompetenter Hefezellen (Seite 44)  
Transformation von Hefe (Seite 46)  
Minis animpfen (*E. coli* BL21(DE3))  
Lösungen für Zellaufschlüsse, Ni-NTA und Inclusion Bodies ansetzen
- Mittwoch:** Induktion der Expression in *E. coli* BL21(DE3) (Seite 47)  
Zellaufschluss von *E. coli*-Zellen (nativ und denaturierend) (Seite 49 und 52)  
Bestimmung der Proteinkonzentration nach Bradford (Seite 54)  
Gießen von SDS-Gelen (Seite 56)  
SEMINAR

**Donnerstag:** Ni-NTA-Affinitätschromatographie  
SDS-Gelelektrophorese und Western Blot (Ni-NTA-Reinigung) (Seite 58, 65)  
Reinigung von Inclusion Bodies (Seite 53)  
Bestimmung der Proteinkonzentration nach Bradford (Seite 54)

**Freitag:** Fortsetzung des Western Blots (Ni-NTA-Reinigung) (Seite 67)  
Gießen von SDS-Gelen (Seite 56)  
Lösungen für die Isolation von Mitochondrien ansetzen (Seite 70)  
Hefen animpfen

### **3. WOCHE**

**Montag:** Hefen induzieren (Seite 69)  
SDS-Gelelektrophorese (Inclusion Bodies) (Seite 58)  
Western Blot (Inclusion Bodies) (Seite 65, 67)  
Gießen von SDS-Gelen (Seite 56)

**Dienstag:** Zellaufschluss von Hefe-Zellen (Seite 70)  
Isolation von Mitochondrien (Seite 70)  
Bestimmung der Proteinkonzentration nach Bradford (Seite 54)  
SDS-Gelelektrophorese (Mitos) ÜN (Seite 58)

**Mittwoch:** Western Blot (Seite 65)  
Coomassie-Färbung der SDS-Gele (Seite 64)  
SEMINAR

**Donnerstag:** Fortsetzung des Western Blots (Seite 67)  
SEMINAR  
Aufräumen und Besprechung der Ergebnisse

**Freitag:** FREI

# INHALTSVERZEICHNIS

<b>1. THEORETISCHER TEIL</b> .....	<b>6</b>
1.1 Heterologe Expression zweier Proteine .....	6
1.1.1 $\beta$ -Ketoreduktase .....	6
1.1.2 Putative Thiolase (T_2493) .....	7
1.2 Molekularbiologische Grundlagen .....	8
1.2.1 Polymerase-Kettenreaktion (PCR) .....	8
1.2.2 Agarose-Gelelektrophorese .....	10
1.2.3 Extraktion von DNA aus Agarosegelen .....	10
1.2.4 Photometrische Bestimmung der Nukleinsäure-Konzentration .....	10
1.2.5 Klonierungen .....	12
1.2.6 Restriktion .....	13
1.2.7 Ligation .....	15
1.2.8 Transformation .....	16
1.2.9 Blau-Weiß-Selektion .....	16
1.2.10 Isolation von Plasmid-DNA .....	17
1.2.11 Sequenzierung von DNA .....	18
1.2.12 Überexpression .....	19
1.2.13 Expressionssysteme in <i>Escherichia coli</i> .....	20
1.2.14 Proteinbestimmung nach Bradford .....	21
1.2.15 SDS-PAGE (Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese) .....	21
1.2.16 Immunodetektion von Proteinen im Western Blot .....	22
<b>2. PRAKTISCHER TEIL</b> .....	<b>23</b>
2.1 Polymerase-Kettenreaktion (PCR) .....	23
2.2 Agarose-Gelelektrophorese.....	26
2.3 Extraktion von DNA aus Agarosegelen .....	27
2.4 Vorbereitung der Amplifikate für die Klonierung .....	28
2.5 Photometrische Bestimmung der Nukleinsäure-Konzentration .....	30
2.6 Ligation der Amplifikate mit der Vektor-DNA .....	31
2.7 Transformation ultra-kompetenter <i>E. coli</i> XL1-Blue-Zellen .....	32
2.8 Isolation von Plasmid-DNA .....	33
2.9 Kontrolle der Insertion durch Restriktion .....	35
2.10 Sequenzierung.....	37
2.11 BLAST .....	38

2.12	Vorbereitungen für die Expressionen .....	39
2.13	Heterologe Expression der putativen Thiolase T_2493 aus dem Flagellaten <i>Euglena gracilis</i> in <i>Escherichia coli</i> und der Bäckerhefe <i>Saccharomyces cerevisiae</i> und heterologe Expression der $\beta$ -Ketoreduktase aus dem Cyanobakterium <i>Synechocystis sp.</i> 6803 in <i>Escherichia coli</i> .....	41
2.14	Herstellung chemisch kompetenter <i>E. coli</i> BL21(DE3)-Zellen .....	43
2.15	Herstellung kompetenter Hefezellen (INVSc1) .....	44
2.16	Transformation von <i>Escherichia coli</i> BL21(DE3) mit den Plasmiden pET28a, pET28a/Thiolase und pET28a/ $\beta$ -KR.....	45
2.17	Transformation von Hefe mit den Vektoren pYES2/CT und pYES2/CT/Thiolase y ...	46
2.18	IPTG-induzierte Expression von Proteinen in <i>E. coli</i> BL21(DE3) .....	47
2.19	Nativer Zellaufschluss der <i>E. coli</i> BL21(DE3)-Kulturen .....	49
2.20	Reinigung der exprimierten Proteine mittels Affinitätschromatographie .....	50
2.21	Denaturierender Zellaufschluss der <i>E. coli</i> BL21(DE3)-Kulturen .....	52
2.22	Reinigung von Inclusion Bodies .....	53
2.23	Proteinbestimmung nach Bradford .....	54
2.24	Sodiumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) .....	56
2.24.1	Gießen der Gele .....	56
2.24.2	Auftragen der Proben .....	58
2.25	Proteingel-Färbung mit Coomassie R350.....	64
2.26	Western Blot.....	65
2.27	Immunodetektion mit einem Anti-His Antikörper .....	67
2.28	Galaktose-induzierte Expression von Proteinen in Hefe.....	69
2.29	Reinigung der exprimierten putative Thiolase T_2493 aus <i>S. cerevisiae</i> .....	70
2.30	Isolation von Mitochondrien aus Hefe .....	70
<b>3.</b>	<b>ANHANG</b> .....	<b>72</b>
3.1	Verwendete Vektoren und Stämme .....	73
3.2	Lösungen und Chemikalien .....	30
3.3	Bakterien-Medien .....	30
3.4	Hefe-Medien .....	30

# 1. THEORETISCHER TEIL

## 1.1 Heterologe Expression zweier Proteine

### 1.1.1 $\beta$ -Ketoreduktase

Die  $\beta$ -Ketoreduktase aus dem Cyanobakterium *Synechocystis* sp. 6803 ist ein NAD(P)H-abhängiges Enzym und katalysiert eine stereospezifische Reaktion, durch die Acetoacetyl-CoA zu R-3-Hydroxybutyryl-CoA reduziert wird.

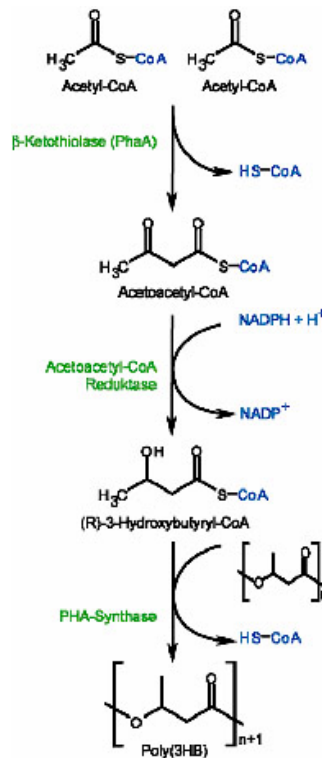


Abbildung 1: Polyhydroxyalkanoat Biosynthese



*Synechocystis* ist ein Cyanobakterium, das im Süßwasser vorkommt. Im Licht betreibt es zur Energiegewinnung Photosynthese; im Dunklen gewinnt es Energie durch Glykolyse und oxidative Phosphorylierung.

### 1.1.2 Putative Thiolase (T\_2493)

Die putative Thiolase (T\_2493) aus dem Flagellaten *Euglena gracilis* katalysiert in den Mitochondrien bei der fermentativen Wachsesterbiosynthese die Kondensation von zwei Acetyl-CoA-Einheiten bzw. einer Acetyl-CoA- und einer Propionyl-CoA-Einheit.

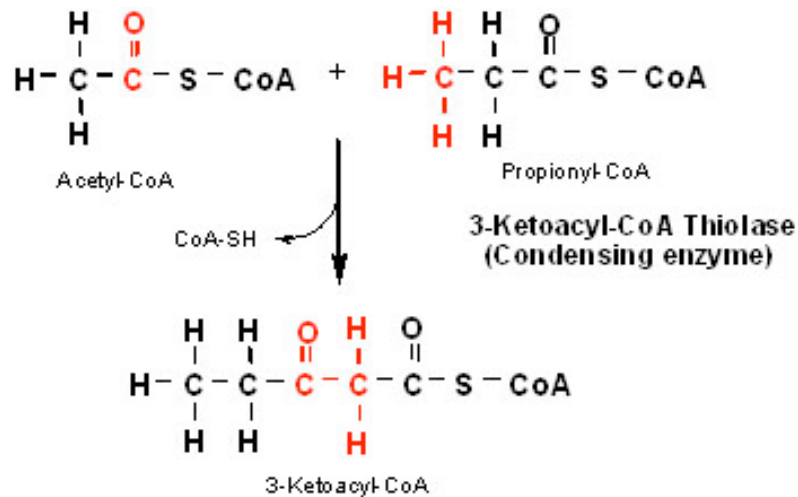


Abbildung 2: Funktion der putativen Thiolase T\_2493

Der Protist *Euglena gracilis* lebt im Süßwasser. Er besitzt ein einzelnes Mitochondrium, das als Retikulum die gesamte Zelle durchzieht. Das Mitochondrium ist ein fakultativ anaerobes Organell, das sowohl unter aeroben als auch unter anaeroben Bedingungen ATP produziert. Bei dem anaeroben Energiestoffwechsel kommt es zu einer Synthese von Fettsäuren und einer Fermentation von Wachsestern.

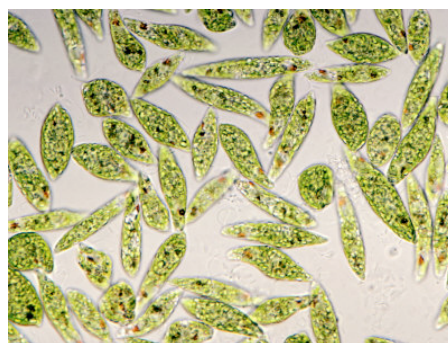


Abbildung 3: *Euglena gracilis*

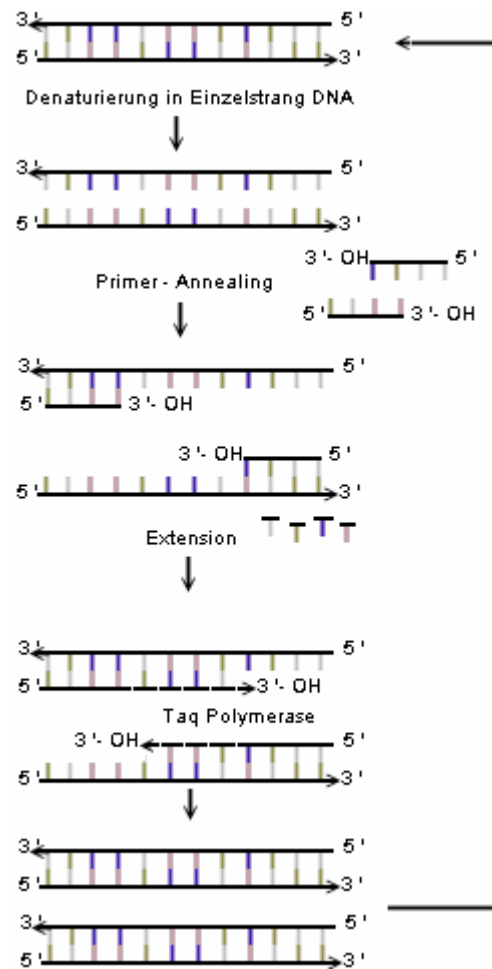
## 1.2 Molekularbiologische Grundlagen

### 1.2.1 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die Polymerasekettenreaktion (PCR) ist eine *in vitro* Methode zur enzymatischen Synthese spezifischer DNA-Sequenzen. Sie ermöglicht es unter anderem durch die Wahl geeigneter Oligonukleotide, aus einem Gemisch von Nucleinsäuren gezielt Sequenzabschnitte zu amplifizieren. Die auch Primer genannten Oligonukleotide sind synthetische DNA-Fragmente, welche mit den flankierenden Bereichen der beiden komplementären Stränge der Ziel-DNA hybridisieren. Durch Einsatz von hitzestabilen DNA-Polymerasen werden ausgehend von diesen Primern in einer wiederholten zyklischen Sequenz von Denaturierung der DNA, Hybridisierung der Primer (Annealing) und Elongation, die zwischen den Primern liegenden DNA-Sequenzen synthetisiert.

Liegen keine hohen Anforderungen an die Genauigkeit der Polymerase-Reaktion vor, so wird oft die thermostabile *Taq*-Polymerase aus dem Organismus *Thermus aquaticus* verwendet. Diese Polymerase hat eine hohe Prozessivität (mehr als 1000 bp/min) und verfügt neben der 5'-3'-Polymeraseaktivität noch über eine schwache 5'-3'-Exonukleaseaktivität, jedoch nicht über eine 3'-5'-Exonukleaseaktivität. Auf Grund des Fehlens einer 3'-5'-Exonukleaseaktivität kann dieses Enzym falsch eingebaute Nucleotide nicht entfernen (korrigieren). Sie hat also keine „proofreading“-Aktivität.

Für Amplifikate (Gene), die zur Expression von Proteinen eingesetzt werden sollen, ist eine hohe Genauigkeit der Polymerase-Reaktion notwendig. Fehler können ansonsten zur Entstehung eines Kodons führen, das für eine andere Aminosäure kodiert, oder im schlimmsten Fall zu einem Stopp-Kodon oder einer Leserasterverschiebung. Für die Amplifikation solcher Sequenzen wird eine Polymerase mit einer „proofreading“-Aktivität verwendet, wie zum Beispiel die *Pfu*-Polymerase aus dem Organismus *Pyrococcus furiosus*. Die *Pfu*-Polymerase besitzt allerdings eine erniedrigte Prozessivität (500 bp/min), weshalb häufig die *Pfx*-Polymerase aus *Pyrococcus sp.* verwendet wird, die trotz der „proofreading“-Aktivität eine ähnliche Prozessivität wie die *Taq*-Polymerase besitzt.



**Abbildung 4:** Prinzip der Polymerase-Kettenreaktion

Bei der Konzeption von Primern sind einige Faustregeln zu beachten:

- sie sollten 18-30 bp lang sein und einen (GC)-Gehalt von 60% haben
- sie sollten nicht mehr als vier gleiche Basen nacheinander enthalten, um Fehlhybridisierungen und Leserasterverschiebungen zu vermeiden
- die Schmelztemperatur ( $T_m$ ) sollte 55-80°C betragen, um eine ausreichend hohe Annealingtemperatur zu erlauben
- am 3'-Ende sollten ein bis zwei G oder C sitzen (aber höchstens drei), um eine bessere Bindung und Elongation zu erreichen
- sie sollten sehr spezifisch für das gewünschte Produkt sein
- sie dürfen keine internen Sekundärstrukturen bilden oder miteinander hybridisieren

Die Annealingtemperatur von Oligonukleotiden lässt sich über die folgende Formel abschätzen:

$$T_m = 4 \times (G+C) + 2 \times (A+T).$$

### **1.2.2 Agarose-Gelelektrophorese**

Die Agarose-Gelelektrophorese ist eine Standardmethode zur Trennung, Identifikation oder Isolierung von DNA-Fragmenten. DNA-Moleküle enthalten in jedem Nukleotid eine Phosphatgruppe und sind daher negativ geladen. Deswegen wandern sie in einem elektrischen Feld zur Anode. Bei der Agarose-Gelelektrophorese wandert die DNA durch eine Gelmatrix und wird dadurch ihrer Größe nach getrennt. Die Wanderungsgeschwindigkeit ist u.a. abhängig von der Größe und Konformation der DNA, von der Agarose-Konzentration in dem Agarosegel und von dem verwendeten Laufpuffer. Die Fragment-Größen werden über den Vergleich mit einem Standard ermittelt, der DNA-Fragmente definierter Größen enthält (z.B. GeneRuler™ DNA Ladder Mix von MBI Fermentas). Zum Nachweis der Nukleinsäuren kann der Fluoreszenzfarbstoff Ethidiumbromid verwendet werden. Ethidiumbromid interkaliert aufgrund seiner planaren Struktur zwischen den Basenpaaren. Dabei verändert sich das Absorptionsspektrum des Farbstoffs. Während das Emissionsspektrum weitgehend unverändert bleibt, nimmt die Intensität der Fluoreszenz-Emission um den Faktor 50-100 zu. Daher lässt sich interkaliertes Ethidiumbromid bei einer Wellenlänge von 254 bis 366 nm (UV-Bereich) anregen, so dass der Farbstoff sichtbar wird.

### **1.2.3 Extraktion von DNA aus Agarosegelen**

Zur Reinigung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen wird die gewünschte DNA-Bande unter UV-Licht aus dem Gel ausgeschnitten und aus dem Gel eluiert. Die DNA kann z.B. mithilfe des „QIAquick Gel Extraction Kits“ von Qiagen aus dem Agarosegel extrahiert werden. Die Reinigung erfolgt durch eine reversible Bindung der DNA-Moleküle an eine Silikagel-Matrix in Gegenwart hoher Konzentrationen an chaotropen Salzen und einem pH-Wert kleiner/gleich 7,5, während Kontaminationen die Säule passieren. Die gereinigte DNA wird zum Schluss mit Tris-Puffer oder Wasser eluiert.

### **1.2.4 Photometrische Bestimmung der Nukleinsäure-Konzentration**

Der Reinheitsgrad isolierter Nukleinsäuren kann anhand photometrischer Messungen bestimmt werden. Dazu wird die optische Dichte (OD) der Probe bei 230, 260 und 280 nm ermittelt. Bei der Messung der OD bei 230 nm, wird die Absorption der in der Probe vorhandenen Polysaccharide gemessen. Noch vorhandene Proteine weisen bei 280 nm ein Absorptionsmaximum auf. Bei 260 nm absorbieren Nukleinsäuren. Aus dem Verhältnis der  $OD_{230}$ ,  $OD_{260}$  und der  $OD_{280}$  lässt sich eine Aussage über die Reinheit der Nukleinsäure-Probe und der Protein- und Polysaccharidkontamination in der Lösung treffen. Eine Nukleinsäure-Probe wird als rein angesehen, wenn folgendes Verhältnis gilt:

$$OD_{230} : OD_{260} : OD_{280} = 1 : 2 : 1$$

Außerdem sollte der Quotient  $OD_{260}/OD_{280}$  zwischen 1,7 und 2,0 liegen. Liegt das Verhältnis von  $OD_{260}$  zu  $OD_{280}$  zwischen 1,7 und 2,0, so enthält die Probe keine Kontamination durch Proteine oder Phenole. Ist das Verhältnis von  $OD_{260}$  zu  $OD_{230}$  kleiner als 2, so ist das ein Zeichen für eine Polysaccharid-Kontamination.

Die Konzentration von Nukleinsäure-Lösungen wird über eine Messung der optischen Dichte (OD) mittels Absorptionsspektrometrie bei einer Wellenlänge von 260 nm ermittelt. Die Messungen werden an einem Photometer durchgeführt. Das Lambert-Beersche-Gesetz gibt dabei einen Zusammenhang zwischen der Konzentration einer gelösten Substanz und deren Absorption von Licht an:

$$E = \log [I_0/I] \leftrightarrow E = \epsilon \times c \times d$$

mit:

- E Extinktion [dimensionslos]; wird als optische Dichte (OD) bezeichnet
- $I_0$  Intensität des einstrahlenden Lichtes
- I Intensität des aus der Probe austretenden Lichtes
- $\epsilon$  molarer Extinktionskoeffizient der in der Probe gelösten Substanz [ $l \cdot M^{-1} \cdot cm^{-1}$ ]
- c Konzentration der Probenlösung [mol/l]
- d Schichtdicke der Probe [cm] = Schichtdicke der Küvette [cm]

Jede Substanz zeichnet sich durch ein für sie charakteristisches Absorptionsspektrum aus. Dabei ist die jeweilige Molekülstruktur maßgebend, in welchen Wellenlängenbereichen die Absorption Maxima und Minima aufweist. Absorptionsmaxima werden dadurch hervorgerufen, dass durch die Molekülstruktur bestimmte Wellenlängen stärker absorbiert werden als andere. Die Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren beruht auf dem Absorptionsmaximum der heteroaromatischen Basen bei 260 nm. Dabei wird die Absorption von der Konzentration der gelösten Nukleinsäuren und der Schichtdicke der Probe beeinflusst (siehe Lambert-Beersches-Gesetz).

Die Nukleinsäurekonzentration errechnet sich aus der OD bei 260 nm (= der Extinktion bei 260 nm), dem Verdünnungsfaktor (VF) und einem für die Nukleinsäure spezifischen Multiplikationsfaktor. Es resultiert daraus folgende Gleichung:

$$c [\mu g/ml] = OD_{260} \times VF \times MF$$

Der für die Nukleinsäuren spezifische Multiplikationsfaktor ist folgender:

für ssDNA: 40  $\mu g/ml$  (da 1  $OD_{260}$  = 40  $\mu g/ml$ )

für dsDNA: 50  $\mu g/ml$  (da 1  $OD_{260}$  = 50  $\mu g/ml$ )

für ssRNA: 33  $\mu g/ml$  (da 1  $OD_{260}$  = 33  $\mu g/ml$ ).

### 1.2.5 Klonierungen

Klonierungen werden zur Gewinnung oder Vervielfältigung von DNA verwendet. Alternativ werden Klonierungen dazu verwendet, Zellen so zu manipulieren, dass sie ein bestimmtes Genprodukt (Protein) rekombinant exprimieren. Dazu wird das Gen von Interesse in einen (Expressions-)Vektor oder Plasmid integriert. Die Verknüpfung von Gen und Vektor wird Ligation genannt. Das Gen wird also mit dem Vektor ligiert. Der durch die Ligation erstellte (Expressions-)Vektor wird dann in einen bestimmten Organismus eingebracht, der das Plasmid vervielfältigt oder das entsprechende Genprodukt exprimiert. Als Organismen werden oft Bakterienstämme (wie *Escherichia coli*) aber auch einzellige Algen oder Pilze (Hefe) verwendet. Das Einbringen der fremden DNA in den Wirtsorganismus wird als Transformation bezeichnet; der Organismus wird transformiert. Es handelt sich also um eine Transformation von z.B. *E. coli*. Die Wirtszellen vermehren sich dann durch Zellteilung, wobei auch identische Kopien des Vektors/Plasmids hergestellt werden. So ergibt sich eine Population von Zellen, die alle einen Klon des gewünschten DNA-Fragments enthalten.

Um einen Organismus zu transformieren, muß zunächst der Vektor mit dem gewünschten DNA-Fragment ligiert werden. Das gewünschte DNA-Fragment wird zumeist mittels PCR gewonnen. Bei der PCR können den DNA-Fragmenten mithilfe der Oligonukleotide Schnittstellen bestimmter Restriktionsenzyme angehängen werden. Bei der Plasmidklonierung wird dann ein Plasmid mithilfe derselben Restriktionsenzyme behandelt, so dass überhängende Enden („sticky ends“) entstehen. Die Ziel-DNA, die als Insert in den Vektor integriert werden soll, wird mit denselben Restriktionsenzymen geschnitten, so dass komplementäre Enden an Vektor- und Ziel-DNA entstehen. Die überhängenden Enden von Vektor und Ziel-DNA hybridisieren dann miteinander. In der nachfolgenden Ligation, die durch die DNA-Ligase katalysiert wird, werden die Enden der Einzelstränge miteinander kovalent verbunden.

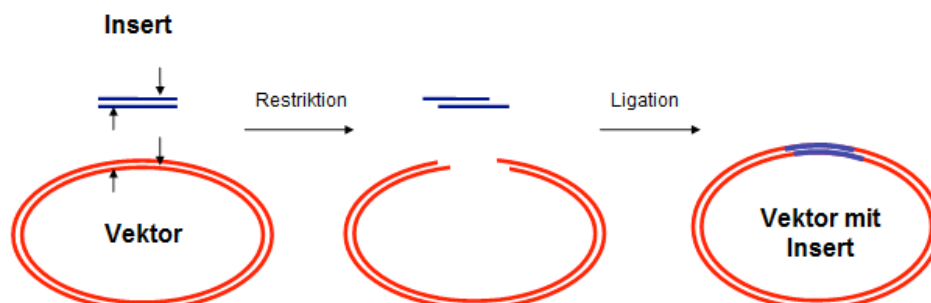


Abbildung 5: Prinzip von Klonierungen ([www.wikipedia.de](http://www.wikipedia.de))

## 1.2.6 Restriktion

Die Restriktionsanalyse dient sowohl der Herstellung der zur Klonierung verwendeten DNA-Fragmente als auch zur Identifikation der entstehenden Klonierungsprodukte. Grundlage aller Restriktionen ist die Aktivität von Restriktionsenzymen, die an spezifischen Erkennungsstellen doppelsträngiger DNA-Moleküle binden und diese spalten. Restriktionsenzyme sind Endonukleasen bakteriellen Ursprungs. Der Ursprung findet sich meist in dem Namen des Restriktionsenzym wieder. So hat das Enzym *EcoRI* seinen Ursprung in *Escherichia coli* RY13. Die „I“ bedeutet, dass es sich um das erste aus diesem Stamm isolierte Restriktionsenzym handelt. Restriktionsenzyme spalten die Phosphodiesterbindungen beider Stränge eines DNA-Moleküls hydrolytisch und unterscheiden sich in ihrer Erkennungssequenz, ihrer Spaltstelle und ihrem Ursprungsorganismus. In der Zelle haben Restriktionsenzyme die Funktion, in den Organismus eingedrungene Fremd-DNA (z.B. Phagen-DNA) zu zerkleinern und so zu inaktivieren. Eigene DNA wird durch Modifikationen (meist Methylierungen) vor dem Angriff der Restriktionsenzyme geschützt.

Restriktionsenzyme werden in drei Gruppen eingeteilt: Typ I, Typ II und Typ III. Enzyme des Typs I weisen eine Restriktions- und Methylierungsaktivität auf. Daher wird DNA von ihnen nicht gespalten, wenn beide komplementären Stränge der Erkennungsstelle methyliert sind. Wenn nur einer der beiden Stränge methyliert ist, wird dies erkannt und der nicht-methylierte ebenfalls methyliert. Ist kein Strang methyliert, wird die DNA unspezifisch etwa 1000 bp von der Erkennungsstelle entfernt gespalten.

Am häufigsten kommen Restriktionsenzyme des Typs II zum Einsatz. Sie besitzen nur eine Restriktionsaktivität und erkennen und schneiden spezifische, meist palindromische, Tetra- oder Hexanukleotidsequenzen innerhalb doppelsträngiger DNA, so dass DNA-Fragmente mit definierter Länge und definierten Enden entstehen. Die Erkennungssequenzen sind in der Regel 4 bis 8 Nukleotide lang und meist palindromisch. Die Spaltstelle liegt in der Regel innerhalb der Erkennungsstelle. Bei der Spaltung von DNA mit Restriktionsenzymen können stumpfe enden (*blunt ends*) oder kohäsive Enden (*sticky ends*) entstehen. Bei den kohäsiven Enden kommt es zu einem Überhang entweder am 5'- oder am 3'-Ende des entstehenden DNA-Fragments. In der Regel tragen die DNA-Fragmente nach der Spaltung an ihrem 3'-Ende eine Hydroxy- und an ihrem 5'-Ende eine Phosphatgruppe.

Restriktionsenzyme des Typs III besitzen sowohl eine Restriktions- als auch eine Methylierungsaktivität. Sie spalten DNA an einer Stelle, die durch den Abstand zur spezifischen Erkennungsstelle definiert ist; es resultieren Fragmente mit definierten Längen und variablen Enden.

Restriktionsenzyme des Typs II benötigen zur hydrolytischen Spaltung Magnesium-Ionen als Cofaktoren, die in den Puffern vorliegen, welche für den optimalen pH-Wert sorgen

(meist zwischen pH 7,5 und pH 8,0). Das Temperaturoptimum für einen Restriktionsansatz liegt meist bei 37°C. Die Menge an Restriktionsenzymen wird in Einheiten angegeben: Dabei entspricht eine Einheit eines Restriktionsenzym der Menge, die benötigt wird, um ein Mikrogramm DNA unter optimalen Bedingungen innerhalb einer Stunde zu spalten. Für die Definition wird in der Regel DNA des Bakteriophagen Lambda verwendet.

**Tabelle 1:** Auflistung einiger Restriktionsenzyme des Typs II

<b>Restriktionsenzym</b>	<b>Spaltstelle</b>	<b>Ursprungsorganismus</b>
<i>AccI</i>	GT <sup>^</sup> CGAC / GT <sup>^</sup> ATAC	<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>
<i>ApaI</i>	GGGCC <sup>^</sup> C	<i>Acetobacter pasteurianus</i>
<i>BamHI</i>	G <sup>^</sup> GATCC	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> H
<i>BstXI</i>	CCANNNNN <sup>^</sup> NTGG	<i>Bacillus stearothermophilus</i> X
<i>Clal</i>	AT <sup>^</sup> CGAT	<i>Caryophanon latum</i>
<i>EcoRI</i>	G <sup>^</sup> AATTC	<i>Escherichia coli</i> RY13
<i>EcoRV</i>	GAT <sup>^</sup> ATC	<i>Escherichia coli</i> RY13
<i>HincIII</i>	GTY <sup>^</sup> RAC	<i>Haemophilus influenzae</i> R <sub>c</sub>
<i>HindIII</i>	A <sup>^</sup> AGCTT	<i>Haemophilus influenzae</i> R <sub>d</sub>
<i>KpnI</i>	GGTAC <sup>^</sup> C	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
<i>NotI</i>	C <sup>^</sup> GGCCG	<i>Nocardia otitidiscaviarum</i>
<i>SacI</i>	GAGCT <sup>^</sup> C	<i>Streptomyces achromogenes</i>
<i>SacII</i>	CCGC <sup>^</sup> GG	<i>Streptomyces achromogenes</i>
<i>SalI</i>	G <sup>^</sup> TCGAC	<i>Streptomyces albus</i>
<i>SmaI</i>	CCC <sup>^</sup> GGG	<i>Serratia marcescens</i> Sb
<i>SpeI</i>	A <sup>^</sup> CTAGT	<i>Sphaerotilus</i> species
<i>PstI</i>	GTGCA <sup>^</sup> G	<i>Providencia stuartii</i>
<i>XbaI</i>	T <sup>^</sup> CTAGA	<i>Xanthomonas badrii</i>
<i>XhoI</i>	C <sup>^</sup> TCGAG	<i>Xanthomonas holcicola</i>

## 1.2.7 Ligation

Ligationen werden durch DNA-Ligasen katalysiert. DNA-Ligasen sind *in vivo* am Aufbau der Replikationsgabel (Verknüpfung der Okazaki-Fragmente) und bei Reparaturmechanismen beteiligt. Bakterien besitzen eine, Eukaryoten-Zellen mindestens zwei verschiedene DNA-Ligasen. Der Unterschied zwischen ihnen ist, dass das Bakterienenzym NAD (Nicotinamid-Adenin-Dinucleotid) und die Eukaryoten-Enzyme ATP als Cofaktoren benötigen. Eine Ligation zweier DNA-Moleküle erfolgt anhand einer Phosphodiesterbindung zwischen einer 5'-Phosphatgruppe an einem DNA-Ende und einer 3'-OH-Gruppe an dem anderen DNA-Ende, die durch die DNA-Ligase geknüpft wird. Die DNA-Ligase benötigt somit ein nicht phosphoryliertes Ende (3') und ein phosphoryliertes Ende (5') doppelsträngiger DNA. Das phosphorylierte Ende befindet sich an dem DNA-Fragment, welches mit einem geschnittenen, dephosphorylierten Vektor ligiert werden soll. Bei dem DNA-Fragment handelt es sich zumeist um Amplifikate aus einer PCR, die mithilfe von synthetischen Oligonukleotiden amplifiziert wurden. Synthetisch hergestellte Oligonukleotide tragen an ihrem 5'-Ende keinen Phosphatrest und somit auch die amplifizierte DNA nicht. Zur Klonierung müssen diese Proben daher zunächst phosphoryliert werden. Zur Phosphorylierung kann die T4-Polynukleotid Kinase verwendet werden, die 5'-Enden von DNA und RNA durch Übertragung des  $\gamma$ -Phosphatrests von ATP auf das 5'-Ende der Nukleinsäure phosphoryliert. Für die Ligase-Reaktion wird ebenfalls ATP als Energielieferant benötigt. An die  $\beta$ -Aminogruppe eines Lysin-Restes des Enzyms bindet über eine Phosphoramidbindung aktiviertes AMP des ATPs. Dabei wird der Pyrophosphatteil des ATPs freigesetzt. Das Enzym überträgt dann den AMP-Rest auf das phosphorylierte 5'-Ende der DNA. Es folgt ein nukleophiler Angriff der 3'-OH-Gruppe auf den Sauerstoff der durch AMP aktivierten 5'-Phosphatgruppe. Dadurch entsteht eine Phosphodiesterbindung und AMP wird freigesetzt.

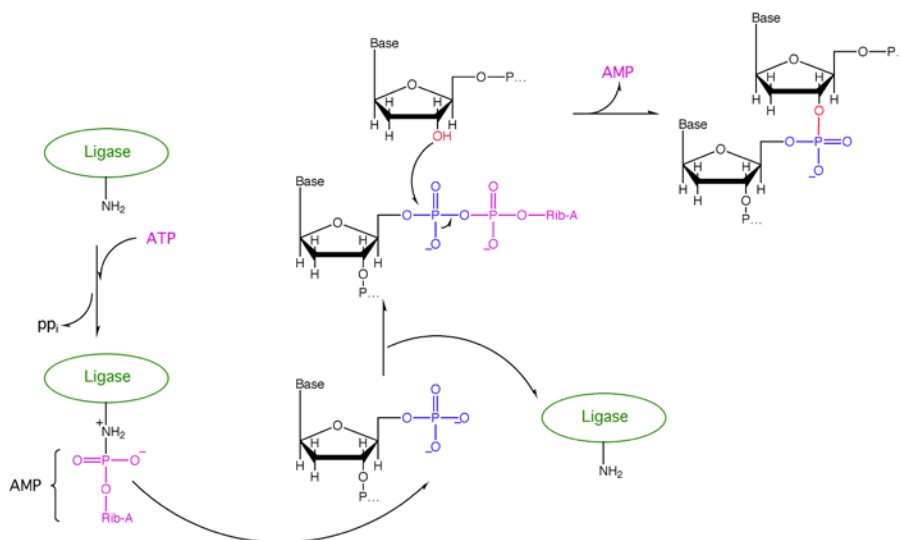


Abbildung 4: Reaktionsmechanismus der Ligase

### 1.2.8 Transformation

Unter Transformation wird das nicht-virale Einschleusen freier DNA in Organismen verstanden. Dabei kann es sich um kompetente Bakterienzellen sowie Pilze, Algen, Hefen, Pflanzen und andere Eukaryoten handeln. Eine DNA-Insertion in eukaryotische Tierzellen wird als Transfektion bezeichnet. Bei der freien DNA handelt es sich im Normalfall um ein Plasmid, welches zu dem zu transformierenden Organismus gegeben wird, der die DNA bei geeigneter Behandlung aufnehmen kann. Die Fähigkeit, DNA aufnehmen zu können, wird als Kompetenz bezeichnet. Bei einigen Bakterien, etwa *Escherichia coli*, besteht jedoch keine natürliche Kompetenz. Sie muss zunächst künstlich erzeugt werden. Bakterienzellen werden dazu z.B. mit Calciumchlorid behandelt, so dass zwischen der negativ geladenen DNA und der negativ geladenen Zellmembran weniger abstoßende Kräfte bestehen. Die Transformation des Organismus erfolgt dann meist mithilfe eines Hitzeschocks, bei dem Poren in der Zellmembran entstehen, durch die DNA in die Zelle gelangen kann.

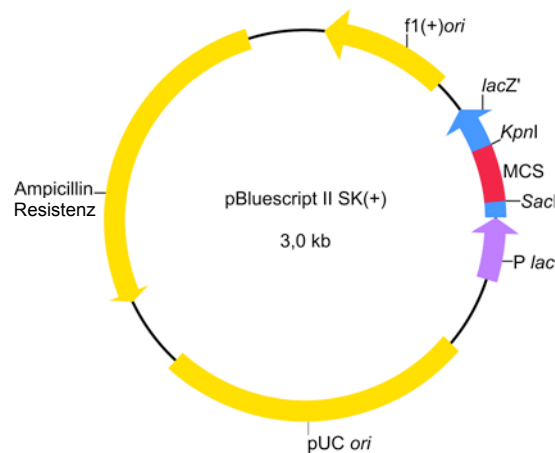
Zumeist wird die Transformation von Bakterien dazu verwendet, einen Vektor, in den ein DNA-Fragment von Interesse durch Ligation eingebracht wurde, zu vervielfältigen. Eine gute Erfolgskontrolle der Ligation ist die „Blau-Weiß-Selektion“ transformierter Bakterienzellen.

### 1.2.9 Blau-Weiß-Selektion

Durch einen zur Blau-Weiß-Selektion fähigen Vektor kann, nachdem mit diesem Bakterien transformiert wurden, ermittelt werden, ob der Vektor ein gewünschtes Fragment bei einer Ligation aufgenommen hat. Die MCS (*multiple cloning site*) des Vektors liegt innerhalb des 5'-Abschnitts des *lacZ*-Gens. Dieser Abschnitt kodiert den aminoterminalen Teil der  $\beta$ -Galaktosidase. Bakterienkolonien, die einen Vektor beinhalten, in dem das *lacZ*-Gen durch Insertion eines DNA-Fragmentes zerstört ist, besitzen keine aktive  $\beta$ -Galaktosidase und erscheinen deswegen farblos. Kolonien ohne Insertion besitzen eine aktive  $\beta$ -Galaktosidase und erscheinen blau. Um dieses Selektionssystem ausnutzen zu können, müssen jedoch passende Bakterienstämme verwendet werden, die in ihrem Genom den 3'-Abschnitt des *lacZ*-Gens besitzen (z.B. *E. coli* XL1-Blue). Dieser Abschnitt kodiert den carboxyterminalen Teil der  $\beta$ -Galaktosidase. Erst mit der funktionstüchtigen  $\beta$ -Galaktosidase wird X-Gal (5-Brom-4-Chlor-3-Indolyl- $\beta$ -D-Galaktosid) enzymatisch zu Galaktose und dem blauen Farbstoff 5-Bromo-4-Chloro-3-Indol umgesetzt. Der Einbau eines Fragments in die MCS zerstört das Leseraster des *lacZ*-Gens, so dass keine funktionsfähige  $\beta$ -Galaktosidase gebildet werden kann. Betreffende Bakterien-Kolonien bleiben in Gegenwart von X-Gal farblos (weiß). IPTG (Isopropylthiogalaktosid) dient als Induktor für die  $\beta$ -Galaktosidase, wird jedoch nicht durch die  $\beta$ -Galaktosidase zersetzt. Sind die Zellkolonien durch X-Gal blau gefärbt, ist die  $\beta$ -Galaktosidase noch funktionsfähig, d.h. es wurde bei der Ligation keine Fremd-DNA in den Vektor

eingebaut. Sind die Zellkolonien nicht gefärbt, so ist die  $\beta$ -Galaktosidase nicht funktionsfähig, d.h. es wurde Fremd-DNA in den Vektor eingebaut und dadurch das Gen für die  $\beta$ -Galaktosidase zerstört. Dieses gentechnische Verfahren wird auch als Blau-Weiß-Selektion oder  $\alpha$ -Komplementation bezeichnet.

Vektoren enthält zusätzlich ein Antibiotika-Resistenzgen. Meistens handelt es sich dabei um Ampicillin. So auch bei einem in diesem Praktikum zum Einsatz kommenden Vektor (pBluescript SK(+)). Der Vektor verleiht Bakterienzellen eine Resistenz gegenüber Ampicillin. Werden Bakterienzellen, die den Vektor aufgenommen haben, auf Nährböden herangezogen, die Ampicillin enthalten, können nur die Bakterien Kolonien bilden, welche durch Transformation den Vektor mit dem *amp<sup>R</sup>*-Gen erhalten haben. Besitzen Vektoren ein Antibiotika-Resistenzgen und sind zur Blau-Weiß-Selektion fähig (so wie pBluescript SK(+)) ermöglicht dies eine doppelte Selektion positiv transformierter Zellen.



**Abbildung 3:** Schematische Darstellung des Vektors pBluescript SK(+) für die Blau-Weiß-Selektion

### 1.2.10 Isolation von Plasmid-DNA

Plasmide werden durch die alkalische Lyse von Bakterienzellen gewonnen. Dabei werden die Plasmide nicht mittels Filtration gereinigt (so wie es bei Verwendung von Kits der Falls ist) sondern durch eine Isopropanol-Fällung. Die Zellen einer Bakterienkultur, aus der die Plasmide isoliert werden sollen, muss dazu zunächst pelletiert und in Puffer resuspendiert werden. Das in dem Puffer enthaltene EDTA, welches zweiwertige Kationen ( $Mg^{2+}$ ,  $Ca^{2+}$ ) der Zellwand komplexiert, löst eine Zellwanddestabilisierung aus. So kann dann die Lyse der Zellen durch Zugabe einer alkalischen Lösung (Mischung aus NaOH und SDS) erfolgen. Der basische pH-Wert bewirkt zudem, dass Proteine und chromosomale DNA denaturiert werden. SDS löst als Detergenz die Phospholipide und Proteinkomponenten der Zellwände.

Nach Abstoppen der Lyse und Zugabe einer sauren Kaliumacetat-Lösung (Neutralisation), bilden denaturierte Proteine, hochmolekulare Nukleinsäuren (genomische DNA, RNA) und Zelltrümmer mit den Kaliumsalzen unlösliche Komplexe, die mittels Zentrifugation entfernt werden können. Die kleineren Plasmidmoleküle bleiben dagegen in Lösung und wurden durch die Neutralisation wieder renaturiert. Danach werden durch Zugabe von Ammoniumacetat noch vorhandene Proteine ausgesalzt und durch Zentrifugation entfernt. Die Plasmide können dann durch eine Isopropanol-Fällung präzipitiert werden.

### **1.2.11 Sequenzierung von DNA**

Obwohl es zur heutigen Zeit modernste Techniken zur Sequenzierung von DNA gibt, ist die wohl heute noch am häufigsten angewandte Methode die Sequenzierung von DNA nach dem „cycle-sequencing“-Verfahren nach Sanger (1977). Bei dem Verfahren nach Sanger handelt es sich um ein Terminationsverfahren, bei dem, ausgehend von einer einzelsträngigen DNA-Matrize, ein neuer DNA-Strang mittels PCR gebildet wird. Die Synthese des komplementären DNA-Strangs startet am 3'-Ende eines Oligonukleotides. Die Reaktion gleicht dem Prinzip einer PCR. Es werden jedoch neben den Desoxy-Nukleotiden (dNTPs) auch Didesoxy-Nukleotide (ddNTPs) hinzugefügt. Den ddNTPs fehlt die 3'-OH-Gruppe, so dass nach dem Einbau eines ddNTPs keine weiteren Kettenverlängerungen stattfinden können, da die Polymerase die nächste Phosphodiesterbindung nicht knüpfen kann – die Reaktion ist terminiert. Die ddNTPs werden in geringer Konzentration eingesetzt, um nur seltene Kettenabbrüche und eine gewisse Länge der entstandenen Fragmente zu erreichen. Durch Verwendung von vier verschiedenen ddNTPs in vier separaten Reaktionen, entsteht eine Population von verlängerten Oligonukleotidsträngen. All diese Stränge haben ein festgelegtes 5'-Ende, das durch das Oligonukleotid terminiert ist, und ein variables 3'-Ende, das an einem spezifischen Didesoxy-Nukleotid (Adenin, Cytosin, Guanin oder Thymin) terminiert ist. Die Sequenzinformation wird durch den Vergleich der Längen des durch die spezifischen Basen terminierten Strangs erlangt. Die Sequenzierung wird in vier Ansätzen, von denen sich jeder im jeweiligen ddNTP unterscheidet, gefahren. So produziert ein Ansatz beispielsweise nur DNA-Fragmente, die mit einem Adenin enden. Die zyklische Sequenzierung ist mit einer Signalverstärkung (durch PCR) kombiniert. So wird durch das zyklische Wiederholen der Reaktion das Reaktionsprodukt exponentiell vervielfältigt. Für die Sequenzierung werden fluoreszenzmarkierte Oligonukleotide verwendet. Während der Elektrophorese wird der Fluoreszenzfarbstoff mittels Lasern angeregt und gemessen.

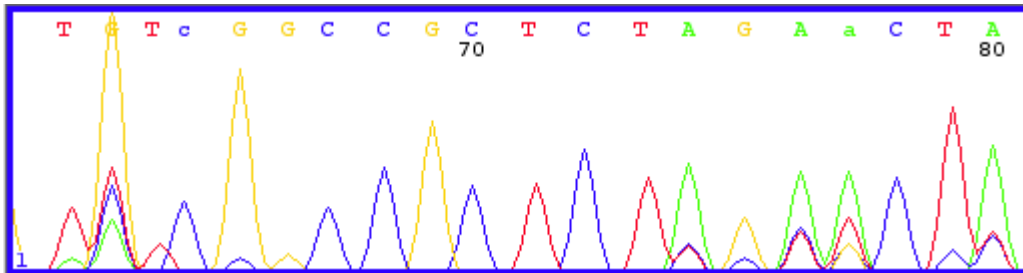


Abbildung 5: Beispiel einer Sequenzierung (Fluoreszenzspektrum)

### 1.2.12 Überexpression

Durch die Überexpression von Genen kann die Konzentration der jeweiligen Proteine in der Zelle weit über ihren natürlichen Wert hinaus erhöht werden. Es kommt also zu einer erhöhten Expressions- und Transkriptionsrate. Die Überexpression kann in demselben Organismus oder in einem fremden Wirtssystem erfolgen. Sie wird entsprechend als homologe oder heterologe Genexpression bzw. Überexpression bezeichnet. Bei dieser künstlich erzeugten Überexpression werden meistens regulierbare Promotoren für die Erhöhung der Genexpression verwendet. Diese Systeme können sowohl induzierbar als auch konstitutiv sein.

Die rekombinante Überexpression nativer Proteine ist in vielen Fällen problematisch. So führt z.B. eine hohe Überexpression hydrophober Proteine häufig zur Aggregatbildung. Diese Aggregate oder *Inclusion Bodies* können in Bakterien und Eukaryoten auftreten. Sie bestehen vorwiegend aus dem rekombinanten Protein, das nicht in nativer Konformation vorliegt. Inclusion Bodies sind jedoch nur dann von Nachteil, wenn eine Renaturierung der Aggregate zu einem nativen Protein nicht möglich ist.

Durch die rekombinante DNA-Technologie ist es möglich, ganze Proteine oder Proteindomänen mit heterologen Proteinen zu fusionieren. So können dem Protein sogenannte *tags* angehängt werden, die eine effiziente Reinigung des Proteins mittels Affinitätschromatographie erlauben. Ein weithin gebräuchlicher Tag ist der His-Tag, der zumeist aus sechs Histidin-Resten besteht. Die Reinigung His-Tag-markierter Proteine erfolgt nach Zellaufschluss mittels Metall-Chelatchromatographie über Ni-NTA (Nickel-Nitrilotriessigsäure)-Säulenmaterial, durch das Histidin-Reste über Nickel-Ionen gebunden werden. Die Elution erfolgt durch Zugabe von Imidazol, welches das Histidin enthaltene Protein kompetitiv aus dem Komplex verdrängt.

### 1.2.13 Expressionssysteme in *Escherichia coli*

Von entscheidender Bedeutung bei der Überexpression heterologer Proteine ist die Wahl eines effizienten Expressionssystems mit starken konstitutiven oder induzierbaren Promotoren. Da eine hohe konstitutive Expressionsrate häufig den Zellstoffwechsel beeinträchtigen und somit den Zelltod auslösen kann, kommen in der Regel induzierbare Expressionssysteme zum Einsatz. In Abhängigkeit vom Promotor-Operator-System erfolgt die Induktion der Genexpression durch Metabolitzugabe, Entfernen bestimmter Kohlenstoffquellen oder Temperaturveränderung. Eine sehr hohe Transkriptionseffizienz vermittelt der T7-Promotor (aus dem Bakteriophagen T7), der von der T7-RNA-Polymerase erkannt wird. Der Bakteriophage T7 besitzt starke Promotoren, die von der phageneigenen RNA-Polymerase erkannt werden. Das T7-Expressionssystem ist bei einer Vielzahl von Vektoren vorhanden. So auch bei den pET-Vektoren (*plasmid for expression by T7 RNA-polymerase*). Häufig wird dabei der *E. coli* Wirtstamm BL21(DE3) verwendet, bei dem das Gen der T7-Phagen-RNA-Polymerase unter der Kontrolle des *lacUV5*-Promotors im Chromosom integriert ist. Nach Zugabe von IPTG wird die T7-Phagen-RNA-Polymerase synthetisiert und transkribiert die heterologen Gene, die unter der Kontrolle des T7-Promotors liegen.

**Tabelle 2:** Promotoren zur Expression in *E. coli*

<b>Promotor</b>	<b>Induktion durch</b>
<i>araB</i>	Arabinose
<i>lac</i>	IPTG
T7	IPTG
<i>tac</i>	IPTG
<i>trp</i>	Tryptophan-Mangel

#### 1.2.14 Proteinbestimmung nach Bradford

Die Methode der Proteinbestimmung nach Bradford beruht auf der Anfärbbarkeit von Proteinen mit dem Farbstoff Coomassie-Blue G250. Dieser Farbstoff besitzt eine negative Ladung, die mit den positiven Ladungen eines Proteins bindet. Coomassie-Blue G250 existiert in einer roten Form ( $A_{\max}= 465 \text{ nm}$ ) und einer blauen Form ( $A_{\max}= 595 \text{ nm}$ ). Die rote Form ist in Lösung die vorherrschende Form, wenn jedoch die negativen Ladungen des Farbstoffs an die positiven Ladungen der Proteine binden, erfolgt eine Verschiebung des Absorptionsmaximums von 465 nm nach 595 nm, gleichzeitig steigt die Absorption bei 595 nm an. Bei der Konzentrationsbestimmung wird diese Änderung photometrisch verfolgt.

#### 1.2.15 SDS-PAGE (Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese)

Zur Trennung von Proteinen wird häufig die diskontinuierliche SDS-PAGE mit einem Tris-HCl/Tris-Glycin-Puffersystem (Lämmli, 1970) verwendet. SDS ist ein anionisches Detergenz und überdeckt die Eigenladung von Proteinen sehr effektiv. Es entstehen Micellen mit konstanter negativer Ladung pro Masseneinheit; mit ungefähr 1,4 g SDS pro g Protein. Bei der Probenvorbereitung werden die Proben mit einem Überschuss an SDS auf 95°C erhitzt. Dabei werden die Tertiär- und Sekundärstrukturen durch Aufspalten der Wasserstoffbrücken und durch Streckung der Moleküle gelöst. Schwefelbrücken zwischen Cysteinen werden durch die Zugabe einer reduzierenden Thiolverbindung (DTT oder  $\beta$ -Mercaptoethanol) aufgespalten.

Ein SDS-Gel besteht aus zwei verschiedenen Gelen, die sich sowohl in ihrer Porengröße (unterschiedlicher Polyacrylamidanteil) als auch in ihrem pH-Wert voneinander unterscheiden. Dabei liegt ein Sammelgel einem Trenngel auf. Im Sammelgel werden die Proteine fokussiert und anschließend im Trenngel getrennt. Der pH-Wert des Sammelgels liegt nahe dem isoelektrischen Punkt des im Elektrophoresepuffer vorhandenen Glycins, was bei einer angelegten Spannung eine geringe Mobilität aufweist (Folge-Ion). Die Chloridionen des Gelpuffers haben aufgrund des geringen Reibungswiderstands im Gel eine hohe Beweglichkeit (Leit-Ionen). Die Mobilität der Proteine liegt zwischen der des Glycins und der der Chloridionen. Bei einem konstanten Stromfluss bewegen sich alle Ionen mit der gleichen Geschwindigkeit. Durch die unterschiedlichen Mobilitäten liegen die Proteine in einem Feldstärkegradienten und bilden einen Stapel in der Reihenfolge ihrer Feldstärke. Der Vorteil im Vorschalten eines Sammelgels liegt darin, dass die Proteine langsam in die Gelmatrix einwandern und dort nicht mehr aggregieren können. Des Weiteren werden die Proteine vor dem Eintritt ins Trenngel konzentriert. Beim Erreichen des Trenngels wird der Proteinstapel durch die engere Porengröße des Gels verzögert. Das niedermolekulare Glycin erhält durch den höheren pH-Wert im Trenngel eine höhere Nettoladung und überholt die Proteine, wodurch der Feldstärkegradient wegfällt. Die Proteine sortieren sich neu und wandern nun in

Abhängigkeit ihres Molekulargewichts. Durch das konstante Masse/Ladungsverhältnis ist die Wanderungsgeschwindigkeit bei einer konstanten Spannung proportional zum Logarithmus ( $\log_{10}$ ) des Molekulargewichts der Proteine.

### **1.2.16 Immunodetektion von Proteinen im Western Blot**

Beim Western-Transfer werden zuvor in einer SDS-PAGE getrennte Proteine zur späteren Immunodetektion auf Nitrozellulosemembranen übertragen. Dabei wird mittels Spannung eine Wanderung der geladenen Proteine auf die Membran induziert. Der Erfolg der Übertragung der Proteine auf die Nitrozellulosemembran kann durch eine Färbung mit Ponceau S überprüft werden. Der Farbstoff Ponceau S färbt Proteine reversibel an. Eine Färbung der einzelnen Proteinbanden wird bei einer Differenzierung der Färbung mit Wasser sichtbar. Die Färbung beeinträchtigt die anschließende Immunodetektion nicht. Mithilfe von Ponceau S lassen sich Proteinmengen von mehr als 50 ng/Bande nachweisen. Somit ist die Färbung mit Ponceau S empfindlicher als die Färbung eines SDS-Gels mit Coomassie.

Die Nitrozellulosemembran wird dann zunächst mit einem Blockingreagenz behandelt, das Stellen auf der Membran absättigt, an die kein Protein gebunden hat. Anschließend erfolgt eine Inkubation mit einem Erstantikörper (Anti-His). Dieser bindet spezifisch an den His-Tag. Danach wird die Membran mit einem Zweitantikörper inkubiert. Dieser bindet spezifisch an den Erstantikörper und ist mit einer Peroxidase verbunden. Die Peroxidase katalysiert die Oxidation von Luminol durch Wasserstoffperoxid in alkalischem Milieu. Luminol gerät durch die Reaktion in einen angeregten Zustand, welcher durch die Emission von Licht der Wellenlänge  $\lambda = 428 \text{ nm}$  abklingt. Das Maximum der Lichtemission kann über einen Film erfasst werden. Die geschwärzte Stelle auf dem Film entspricht der Position des gesuchten Proteins im Polyacrylamidgel.

## 2. PRAKTISCHER TEIL

### 2.1 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Es sollen die Gene der putativen Thiolase T\_2493 aus *Euglena gracilis* und der  $\beta$ -Ketoreduktase mittels PCR aus Plasmid-DNA amplifiziert werden. Dazu werden zwei Plasmide pET28a/T\_2493 (für die Thiolase) und pET28a/KR (für die  $\beta$ -Ketoreduktase), Primer, dNTPs, Taq-Polymerase und Puffer zur Verfügung gestellt. Anschließend werden die PCR-Produkte gelelektrophoretisch getrennt und gereinigt.

Zur Amplifikation des Gens der  $\beta$ -Ketoreduktase ( **$\beta$ -KR** (zur Expression in *E. coli*)) wird ein Ansatz mit Plasmid-DNA und ein Ansatz ohne Plasmid-DNA (H<sub>2</sub>O anstatt DNA; als Negativ-Kontrolle) angesetzt. Das Gen für die putative Thiolase T\_2493 wird in zwei getrennten PCRs jeweils einmal amplifiziert (**Thiolase** (zur Expression in *E. coli*) und **Thiolase y** (zur Expression in Hefe)). Dabei werden dem Gen der Thiolase bei jedem Primerpaar unterschiedliche Schnittstellen angehängen. Auch hier werden jeweils ein Ansatz mit Plasmid-DNA und ein Ansatz ohne Plasmid-DNA (H<sub>2</sub>O anstatt DNA; als Negativ-Kontrolle) angesetzt.

Folgende Primerpaare kommen zum Einsatz:

Thiolase y- <i>Bam</i> HI	5' TAT GGA TCC AAT GAA GGG AAT GCG GAA GGT T 3'
Thiolase y- <i>Xba</i> I	5' TAT TCT AGA GCA CAG CGT CAA CTC GGT CGC 3'
Thiolase- <i>Sac</i> I	5' TAT GAG CTC ATG AAG GGA ATG CGG AAG GTT 3'
Thiolase- <i>Xho</i> I	5' TAT CTC GAG CTA GCA CAG CGT CAA CTC GGT 3'
$\beta$ -KR- <i>Nde</i> I	5' TAT ACA TAT GTT AAG TCT TGG TTT GGA AGA T 3'
$\beta$ -KR- <i>Xho</i> I	5' TAT CTC GAG TTA GGT GTG GTG GGC CCC ATT TAC 3'

Es werden 6 verschiedene PCRs angesetzt:

	1	2	3	4	5	6
<b>Plasmid</b>	pET28/ Thiolase y	- (H <sub>2</sub> O)	pET28/ Thiolase	- (H <sub>2</sub> O)	phaB/Red	- (H <sub>2</sub> O)
<b>forward Primer</b>	Thiolase y- <i>Bam</i> HI	Thiolase y- <i>Bam</i> HI	Thiolase- <i>Sac</i> I	Thiolase- <i>Sac</i> I	$\beta$ -KR- <i>Nde</i> I	$\beta$ -KR- <i>Nde</i> I
<b>reverse Primer</b>	Thiolase y- <i>Xba</i> I	Thiolase y- <i>Xba</i> I	Thiolase- <i>Xho</i> I	Thiolase- <i>Xho</i> I	$\beta$ -KR- <i>Xho</i> I	$\beta$ -KR- <i>Xho</i> I

Die PCRs sind wie folgt anzusetzen (Ansätze mit einem Gesamtvolumen von **50 µl**):

zu pipettierendes Volumen	Substanz	Endkonzentration
µl	10fach Taq-Polymerase Puffer mit MgSO <sub>4</sub>	einfach konzentriert
µl	10 mM je dNTP (ATP, TTP, GTP, CTP)	0,2 mM
µl	10 pmol/µl Forward Primer	1 pmol/µl
µl	10 pmol/µl Reverse Primer	1 pmol/µl
µl	100 ng/µl Plasmid-DNA <b>ODER</b> H <sub>2</sub> O	100 ng
µl	5 U/µl Taq-Polymerase	2 U
µl	H <sub>2</sub> O (steril)	
Σ 50 µl		

**ACHTUNG:**

Bei den PCR-Ansätzen 1 und 2 (Thiolase y) wird die *Taq*-Polymerase erst nach dem ersten PCR-Schritt (15 min, 98°C) hinzupipettiert.

Bei jedem Arbeiten mit Enzymen gilt: Enzyme sind empfindlich! Deswegen bei jeden Arbeitsschritten mit Enzymen folgendes beachten:

ENZMYE IMMER AUF EIS HALTEN UND SCHNELL UND ÜBERLEGT ARBEITEN!

Danach wird folgendes Programm in einem Thermocycler gestartet (Dauer: ca. 2 h):

Schritt	Bedingungen	Phase
Step 1	15 min, 98°C	Denaturierung
Step 2	30 sec, 98 °C	Denaturierung
Step 3	30 sec, 65±5°C	Annaeling
Step 4	1:30 min, 72°C	Elongation
Step 5	gehe zu step 2	insgesamt 30 Zyklen
Step 6	5 min, 72°C	finale Elongation
Step 7	∞ 4°C	Kühlung

Die sechs PCR-Reaktionen werden dann in einem 1% TAE-Agarosegel untersucht (50 µl Probe mit 5 µl 10× Ladepuffer). Die erwarteten Größen der Amplifikate sind 723 bp für die β-Keto-reduktase und 1263 bp für die Thiolase und die Thiolase y.

Die DNA Proben werden vor dem Auftragen mit  $\frac{1}{10}$  Volumen 10× Ladepuffer versetzt. Durch den Ladepuffer wird verhindert, dass die Probe beim Auftragen aus der Tasche diffundiert. Desweiteren erleichtern die Farbstoffe Bromphenolblau (BP) und Xylencyanoblau (XC) die Orientierung, da sie in etwa auf gleicher Höhe wie ein 4 kb (XC) bzw. ein 300 bp Fragment (BP) laufen.

**10× Ladepuffer** (wird gestellt)

25% (w/v)	Ficoll 400
50 % (v/v)	EDTA pH 8,0
0,125% (w/v)	Bromphenolblau
0,125% (w/v)	Xylencyanoblau

## 2.2 Agarose-Gelelektrophorese

Es werden 1% Agarosegele verwendet.

Benötigte Lösung:

### 50× TAE-Puffer (10 ml)

2,42 g	Tris
571 µl	Eisessig
1 ml	0,5 M EDTA pH 8,0

Durchführung:

- Agarose abwiegen und mit **1×** TAE-Puffer auf das gewünschte Volumen bringen. (1% = 1 g auf 100 ml Puffer; Achtung: beachten, wieviel Volumen benötigt wird)
- Die Lösung in der Mikrowelle vorsichtig aufkochen, wobei der Deckel gelockert werden muss. Die Lösung muss vollkommen klar erscheinen.
- Lösung auf ca. 50°C abkühlen lassen
- unter dem Abzug  $\frac{1}{80.000}$  Volumen Ethidiumbromid [10 mg/ml] in die Flasche geben, und kurz schwenken, ohne Luftblasen zu erzeugen
- Gel in einen vorbereiteten Gelträger mit Kamm gießen (mit Tesafilm abgeklebt!).
- Nach dem Erhärten (ca. nach 1-2 Stunden) wird der Kamm aus dem Gel herausgezogen. Nun sind Taschen geformt, in welche die zu untersuchende DNA aufgetragen wird.
- PCR-Ansatz (50 µl) mit 5 µl 10× Ladepuffer versetzen
- Gel in die Gelkammer geben und die Kammer mit **1×** TAE-Puffer füllen, so dass das Gel bedeckt ist
- Proben auf das Gel auftragen
- Proben bei 3-5 Volt pro cm Elektrodenabstand trennen
- Nach der Trennung wird das Gel unter UV-Licht betrachtet und ein Photo gemacht.
- Bei erfolgreicher PCR werden die Produkte aus dem Gel ausgeschnitten und eluiert.

**ACHTUNG: Ethidiumbromid (EtBr) ist kanzerogen und teratogen.**



Bei Arbeiten mit dieser Substanz sind auch in Verdünnung oder wenn sie in der Gelmatrix vorliegt Nitril-Handschuhe (grün!) zu tragen. Mit Ethidiumbromid in Kontakt getretene Spitzen werden im EtBr-Festabfall entsorgt. Auch die Gele werden gesondert entsorgt.

### 2.3 Extraktion von DNA aus Agraosegelen

Um das PCR-Produkt mit der gewünschten Größe aus dem Gel zu reinigen, wird die DNA unter UV-Licht sichtbar gemacht und die Bande, die im Gel bei der erwarteten Größe vorhanden ist, mit einem Skalpell ausgeschnitten. Da UV-Licht DNA schädigt, sollte sie diesem nur so kurz wie möglich ausgesetzt werden. Die DNA wird dann aus der Gelmatrix gereinigt. Die Reinigung erfolgt mit dem „**QIAquick-Gel Extraction Kit**“ von Qiagen. Die Durchführung erfolgt nach Herstellerangaben (siehe Vorschrift). **Die DNA wird jedoch mit 50 µl H<sub>2</sub>O eluiert.**

Benötigte Lösung:

Isopropanol (wird gestellt)

Von der eluierten DNA werden jeweils 5 µl zur Kontrolle der Gelextraktion in einem 1%igen Agarosegel getrennt. Falls die Gelextraktion erfolgreich war, werden die Amplifikate für die Klonierungen vorbereitet.

## 2.4 Vorbereitung der Amplifikate für die Klonierung

Synthetisch hergestellte Primer, mit denen die DNA amplifiziert wurde, tragen an ihrem 5'-Ende keinen Phosphatrest und somit auch die amplifizierte und eluierte DNA nicht. Die zur Amplifikation verwendete *Taq*-Polymerase fügt ein bis zwei dAMP-Reste an das 3'-Ende der Amplifikate an. Die amplifizierte DNA hat deswegen einen A-Überhang am 3'-Ende.

Zur Klonierung werden die Proben daher zunächst **phosphoryliert** und anschließend die Enden des DNA-Stranges **geglättet** (blunt-ended). Zur Phosphorylierung wird die **T4-Polynukleotid Kinase** verwendet, die 5'-Enden von DNA und RNA durch Übertragung des  $\gamma$ -Phosphatrests von ATP auf das 5'-Ende der Nukleinsäure phosphoryliert. Zum **Glätten** wird das **Klenow-Fragment** verwendet. Dem Klenow-Fragment, der großen Untereinheit der DNA-Polymerase I aus *E. coli*, fehlt die 5'  $\rightarrow$  3'-Exonuklease-Aktivität, es besitzt jedoch die 5'  $\rightarrow$  3'-Polymerase-Aktivität und die 3'  $\rightarrow$  5'-Exonuklease-Aktivität. Es wird daher zum Glätten überstehender Stränge eines Doppelstrangs eingesetzt. Das Klenow-Fragment füllt 5'-überstehende, einzelsträngige DNA-Sequenzen auf und baut 3'-überstehende, einzelsträngige DNA-Sequenzen ab.

Es werden sowohl die Thiolase-Amplifikate als auch das  $\beta$ -Ketoreduktase-Amplifikat phosphoryliert und geglättet. Es sind somit 3 Proben.

Zur **Phosphorylierung** folgende Ansätze erstellen (Gesamtvolumen = **60  $\mu$ l**):

Volumen	Substanz
45 $\mu$ l	gereinigtes Amplifikat
6 $\mu$ l	10 $\times$ Kinase Puffer (PNK A) (wird gestellt)
0,6 $\mu$ l	100 mM ATP (wird gestellt)
2 $\mu$ l	T4 Polynukleotid Kinase (PNK, 10 U/ $\mu$ l) (wird gestellt)
6,4 $\mu$ l	H <sub>2</sub> O (steril)
$\Sigma$ 60 $\mu$ l	

Die Ansätze gut mischen und 30 min bei 37°C im Wasserbad inkubieren.

Zum **Glätten** folgende Ansätze erstellen:

<b>Volumen</b>	<b>Substanz</b>
60 µl	phosphoryliertes Amplifikat
3 µl	1 mM dNTPs (werden gestellt)
0,3 µl	Klenow-Fragment [10 U/µl] (wird gestellt)

Die Ansätze gut mischen und 30 min bei 37°C im Wasserbad inkubieren.

Dann das Enzym (Klenow-Fragment) mit 5 µl 0,5 M EDTA pH 8,0 inaktivieren.

Nun werden die Ansätze mittels jeweils einer **Nucleospin-Säule** von Macherey-Nagel von nicht eingebauten dNTPs und Enzymen **gereinigt**. Dazu wird nach den Angaben des Herstellers verfahren (siehe Vorschrift). Eluiert werden die phosphorylierten und geglätteten Amplifikate mit 15 µl Elutionspuffer.

Danach müssen die Konzentrationen an Nukleinsäure in den Eluaten bestimmt werden. Die Bestimmung erfolgt photometrisch (Kapitel 2.5).

## 2.5 Photometrische Bestimmung der Nukleinsäure-Konzentration

Mit einem Spektralphotometer wird die optische Dichte (OD) der DNA bei 230, 260 und 280 nm in einem Volumen von 0,1 ml bestimmt.

Dazu wird eine 1:100-Verdünnung angesetzt: 99 µl H<sub>2</sub>O und 1 µl Probe in eine Küvette pipettieren und gut mischen. Die Absorption wird gegen eine Blindprobe (100 µl H<sub>2</sub>O) gemessen. Es werden die Absorptionen bei 230 nm, 260 nm und 280 nm bestimmt.

Die Nukleinsäure-Konzentration wird dann mithilfe folgender Formel berechnet:

$$c [\mu\text{g/ml}] = \text{OD}_{260} \times \text{VF} \times \text{MF}$$

VF: Verdünnungsfaktor

MF: Multiplikationsfaktor (dsDNA: 50 µg/ml (da 1 OD<sub>260</sub> = 50 µg/ml))

Zudem wird die Reinheit der Proben bestimmt (rein, wenn das Verhältnis bei 1:2:1 liegt):

$$\text{OD}_{230} : \text{OD}_{260} : \text{OD}_{280}$$

## 2.6 Ligation der Amplifikate mit der Vektor-DNA

Der Vektor pBluescript SK(+) ermöglicht die Klonierung von PCR-Produkten zur späteren Sequenzierung. Für eine Expression ist dieser Vektor nicht geeignet, da er keinen induzierbaren Promotor enthält.

Der zur Verfügung gestellte pBluescript SK(+)-Vektor ist *EcoRI* gespalten, aufgefüllt („blunt-ended“) und dephosphoryliert. Hierdurch wird verhindert, dass der Vektor bei der Ligation rezirkularisiert. Für die Ligation mit diesem Vektor werden die geglätteten und phosphorylierten PCR-Produkte verwendet. Es sollen jeweils 300 ng geglättetes und phosphoryliertes Amplifikat eingesetzt werden: Volumina berechnen!

Zur **Ligation** folgende Ansätze erstellen (Gesamtvolumen = **21  $\mu$ l**):

Volumen	Substanz
x $\mu$ l	300 ng geglättetes und phosphoryliertes Amplifikat
y $\mu$ l	100 ng pBluescript SK(+) (3,0 kb) (wird gestellt)
n $\mu$ l	H <sub>2</sub> O
$\Sigma$ 10 $\mu$ l	
+ 10 $\mu$ l	2 $\times$ Quick Ligation Reaction Puffer (wird gestellt) mischen
+ 1 $\mu$ l	Quick T4 DNA Ligase (wird gestellt) gut mischen

Den Ligationsansatz vorsichtig zentrifugieren und 30 min bei 25°C (RT) inkubieren, dann auf Eis kühlen und transformieren. Wenn erst am nächsten Tag transformiert werden soll, dann bei -20°C wegfrieren.

Anschließend werden ultra-kompetente *E. coli* XL1-Blue-Zellen mit den Vektoren (die jeweils eins der Amplifikate enthalten sollten) transformiert.

## 2.7 Transformation ultra-kompetenter *E. coli* XL1-Blue-Zellen

Die Vektoren SK(+), die durch die vorangegangene Ligation die Amplifikate enthalten sollten, sollen in *E. coli* XL1-Blue-Zellen eingeschleust werden. Dazu werden ultra-kompetente Zellen verwendet, bei deren Transformation kein Hitzeschock notwendig ist.

benötigte Materialien:

- Eisbad
- LB-AIX-Platten (37°C)
- ultra-kompetente *E. coli* XL1-Blue-Zellen (werden gestellt)

Durchführung:

- ein leeres 1,5 ml-Reaktionsgefäß auf Eis vorkühlen
- 200 µl ultra-kompetente *E. coli* XL1-Blue-Zellen (= 1 Reaktionsgefäß) auf Eis auftauen lassen
- 100 µl ultra-kompetente *E. coli* XL1-Blue-Zellen in das vorgekühlte Reaktionsgefäß pipettieren und auf Eis stellen
- zu jeweils 100 µl kompetenten *E. coli* XL1-Blue-Zellen werden auf Eis 5 µl Ligationsansatz (Kapitel 2.6) gegeben
- 25 min auf Eis inkubieren
- Ansatz auf vorgewärmte (37°C) LB-AIX-Platten ausplattieren
- Platten über Nacht bei 37°C inkubieren
- Die Platten werden am nächsten Tag ausgewertet.

## 2.8 Isolation von Plasmid-DNA

*E. coli* XL1-Blue-Zellen, die pBluescript SK(+)-Vektoren mit Insertion aufgenommen haben, erzeugen auf LB-AIX-Platten (Ampicillin-IPTG-X-Gal) weiße Kolonien, wohingegen die Kolonien von Zellen mit aufgenommenen, nicht-rekombinanten Plasmiden blau erscheinen.

Für die Plasmid-Isolation werden am Vortag zunächst pro Gruppe insgesamt 6 Reagenzgläser mit 5 ml LB-Ampicillin-Medium (100 µg/ml Endkonzentration) mit jeweils einer einzelnen weißen Kolonie angeimpft. Jeweils 2 Reagenzgläser pro Plasmid! Die Kulturen werden über Nacht bei 37°C schüttelnd (200 rpm) inkubiert.

Zur Isolation der Plasmid-DNA aus den transformierten *E. coli* XL1-Blue-Zellen wird das Prinzip der alkalischen Lyse angewendet. Die alkalische Lyse nutzt das unterschiedliche Verhalten von chromosomaler DNA und Plasmid-DNA aus. Während chromosomale DNA bei einem pH-Wert von 12 denaturiert, bleibt die zirkuläre Plasmid-DNA gelöst. Wird diese Lösung neutralisiert, so renaturiert die chromosomale DNA unvollständig und lässt sich als Präzipitat in einer Zentrifugation abtrennen.

benötigte Lösungen (pro Gruppe: 20 ml Lösung A, 20 ml Lösung B und 5 ml Lösung C):

<b>Lösung A (20 ml)</b>	<b>Lösung B (20 ml)</b>	<b>Lösung C (5 ml)</b>
25 mM Tris-HCl pH 8,0	200 mM NaOH	3 ml 5 M Kaliumacetat
10 mM EDTA pH 8,0	1% (w/v) SDS	575 µl konz. Essigsäure
50 mM Glukose		1,425 ml H <sub>2</sub> O

- 10 mM Tris-HCl pH 8,0 (100 ml für alle Gruppen)
- Isopropanol (wird gestellt)
- 70% (v/v) Ethanol (20 ml pro Gruppe)
- H<sub>2</sub>O + RNase (0,1 µg/µl Endkonzentration) (RNase wird gestellt)

#### Durchführung:

- ca. 1,5 ml *E. coli* XL1-Blue-Kultur in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführen
- Zellen 1 min bei 13.000 rpm pelletieren
- den Überstand vollständig abnehmen und das Pellet in 100 µl 10 mM Tris-HCl pH 8,0 waschen
- anschließend 3 min bei 13.000 rpm zentrifugieren
- den Überstand vollständig abnehmen und das Pellet in 200 µl Lösung A resuspendieren (mittels Vortexen)
- wenn das Zellpellet vollständig gelöst ist: 200 µl Lösung B (zum Lysieren) zugeben und sofort vorsichtig mischen (Reaktionsgefäß 6× invertieren),
- 3 min inkubieren
- 200 µl Lösung C zugeben (zur Neutralisation) und sofort vorsichtig mischen
- 20 min bei 13.000 rpm und 8°C zentrifugieren
- den Überstand in ein neues 1,5 ml-Reaktionsgefäß überführen
- 420 µl Isopropanol zugeben und mischen
- 15 min bei 13.000 rpm zentrifugieren (Isopropanol-Fällung)
- den Überstand vollständig abnehmen und das Pellet mit 0,5 ml 70% (v/v) Ethanol waschen (ACHTUNG: das Pellet nicht lösen!)
- 2 min bei 13.000 rpm zentrifugieren
- den Überstand vorsichtig abnehmen
- Pellet mit 0,5 ml 70% (v/v) Ethanol waschen (ACHTUNG: das Pellet nicht lösen!)
- 2 min bei 13.000 rpm zentrifugieren,
- den Überstand vorsichtig abnehmen und kurz zentrifugieren
- restliche Flüssigkeit vorsichtig abnehmen und das Pellet trocknen lassen (ggf. in der Vakuumzentrifuge)
- das Pellet in 50 µl H<sub>2</sub>O + RNase (0,1 µg/µl Endkonzentration) aufnehmen
- 5 min bei 37°C inkubieren, um das Pellet vollständig zu lösen
- photometrische Konzentrationsbestimmung der Nukleinsäuren (Kapitel 2.5)

## 2.9 Kontrolle der Insertion durch Restriktion

Zur Kontrolle der Insertion von Genen in Vektoren wird ein Aliquot der Plasmid-DNA mit einem oder mehreren Restriktionsenzymen gespalten, je nach Insertion und Vektor.

**Es sollen je 1 µg Plasmid-DNA geschnitten werden: Volumen berechnen!**

*Welche Enzyme halten Sie für geeignet, um die Plasmide auf erfolgreiche Insertion zu überprüfen und um die Orientierung der Insertion zu untersuchen?*

	Thiolase	Thiolase y	β-Ketoreduktase
<b>Enzym I</b>			
<b>Enzym II</b>			
<b>Puffer</b>			

*Welche Puffer müssen bei der Restriktion verwendet werden?*

*In der nachfolgenden Tabelle stehen Puffer für Restriktionen mit jeweils zwei Restriktionsenzymen. Bitte wählen Sie den richtigen Puffer.*

Enzym I	Enzym II	Puffer
<i>BamHI</i>	<i>XhoI</i>	Tango = yellow
<i>BamHI</i>	<i>SacI</i>	Tango = yellow
<i>BamHI</i>	<i>NdeI</i>	Tango = yellow
<i>BamHI</i>	<i>XbaI</i>	Tango = yellow
<i>SacI</i>	<i>XbaI</i>	Tango = yellow
<i>SacI</i>	<i>XhoI</i>	Tango = yellow
<i>SacI</i>	<i>NdeI</i>	Tango = yellow
<i>XhoI</i>	<i>XbaI</i>	Tango = yellow
<i>NdeI</i>	<i>XbaI</i>	Tango = yellow
<i>NdeI</i>	<i>XhoI</i>	Puffer R (red)

Zur **Restriktion** der Plasmide folgende Ansätze erstellen (Gesamtvolumen = **20 µl**):

<b>Volumen</b>	<b>Substanz</b>
x µl	Plasmid-DNA [1 µg]
3 U	Restriktionsenzym I (wird gestellt)
3 U	Restriktionsenzym II (wird gestellt)
2 µl	10× Puffer (wird gestellt)
n µl	H <sub>2</sub> O
Σ 20 µl	

Es werden 6 Restriktionen angesetzt. Jeweils zwei pro Plasmid.

Die Restriktionen werden 1 Stunde bei 37°C im Wasserbad inkubiert, anschließend mit  $\frac{1}{10}$  Volumen 10× Ladebuffer versetzt, in einem 1%igen TAE-Agarosegel getrennt und die Größe der Insertion untersucht. Sollte sich herausstellen, dass Sie positive Klone erhalten haben, also Plasmide isoliert haben, die ein Fragment mit der richtigen Größe beinhalten, so werden diese sequenziert, um zu überprüfen, ob es sich um die richtigen Sequenzen handelt.

## **2.10 Sequenzierung**

Die Sequenzierung von DNA-Fragmenten kann nach unterschiedlichen Methoden erfolgen. Unser Institut beauftragt in der Regel die Firma GATC (Konstanz) Sequenzierungen durchzuführen. GATC verwendet die sogenannte Kettenabbruch-Methode nach Sanger *et al.* (1977) auf einem 9× ABI 3730xl. Es werden pro Sequenzierung bis zu 1.100 Basen erreicht.

## 2.11 BLAST

Für die Analyse von DNA- und Proteinsequenzen sind im Internet viele frei zugängliche Datenbanken verfügbar. Die bedeutendsten sind *GenBank* des *National Center for Biotechnology Information* (NCBI, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) und die EMBL-Bank der *European Molecular Biology Organisation* (EMBO, <http://www.ebi.ac.uk>). Sie gleichen ihre Datenbestände mittlerweile täglich ab und können daher als gleichwertig angesehen werden. Weil die Suche nach homologen Sequenzen von Hand nicht mehr möglich ist, bieten diese Institutionen Suchprogramme für die Datenbanken an, auf die über das Internet zugegriffen werden kann.

Das **Basic Local Alignment Search Tool** (BLAST) wurde von Altschul *et al.* (1990) programmiert und beinhaltet heutzutage fünf verschiedene Programme, um alle Kombinationen zum Vergleich von Proteinsequenzen und Nukleotidsequenzen mit einer Suchsequenz zu ermöglichen. Das Ergebnis einer BLAST-Suche ist sehr komplex. Bei dem Online Tool am NCBI ist es eine graphische Darstellung, bei der die Scores (Bewertung des Alignments) mit verschiedenen Farben kodiert sind. Dann folgt eine Liste mit einer Kurzbeschreibung der einzelnen Treffer, welcher sich eine ausführliche Darstellung der einzelnen Alignments anschließt.

Aufgabe:

Sie erhalten die aus der Sequenzierung resultierenden DNA-Sequenzen im FASTA-Format. Identifizieren Sie diese durch einen BlastX beim NCBI.

(dazu auf die homepage des NCBI gehen (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) → BLAST auswählen → Translated blastx auswählen (tblastx) → Sequenz im FASTA-Format in das obere Feld eingeben „search“ (enter query sequence) → „BLAST“ drücken → „FORMAT“ drücken). Die Ergebnisse der BLAST-Suche sind zu diskutieren und als Anhang dem Protokoll beizufügen!

Fragen, die bei der Anfertigung des Protokolls zu berücksichtigen sind:

- *Welche Restriktionsenzyme haben Sie für die Kontrollrestriktion der Plasmide verwendet und warum diese? Was ist außerdem bei der Auswahl der Restriktionsenzyme zu beachten?*
- *Warum verhält sich ungeschnittene Plasmid-DNA in der Elektrophorese anders als geschnittene Plasmid-DNA?*

## 2.12 Vorbereitungen für die Expressionen

Falls die Sequenzierung und die anschließende BLAST-Analyse ergeben haben sollten, dass Ihre Plasmid Insertionen mit der richtigen Sequenz enthalten, müssen diese Konstrukte für die heterologe Expression in Hefe und *E. coli* vorbereitet werden. Bislang befinden sich die Gene der putativen Thiolase und der  $\beta$ -Ketoreduktase in dem Vektor pBluescript SK(+). Dieser eignet sich sehr gut für Sequenzierungen, ist jedoch kein Expressionsvektor. Für die Expression von Proteinen in *E. coli* wird in diesem Versuch der Vektor pET28a verwendet und für die Expression in dem eukaryotischen System (Hefe) der Vektor pYES2/CT. Die Gene müssen daher umkloniert werden (aus pBluescript SK(+) in pET28 bzw. pYES2/CT). Dazu wählen Sie positive Plasmide aus, setzen einen großen Restriktionsansatz an (zum Herausschneiden des Gens aus pBluescript SK(+)), trennen die Restriktion anschließend in einem 1%igen Agarosegel und eluieren die Gene aus dem Gel. Nach einer Konzentrationsbestimmung können die Gene mit den dafür vorgesehenen Expressionsvektoren ligiert werden, die Ihnen in geschnittener Form zur Verfügung gestellt werden.

Insert	Restriktionsenzyme	Puffer
Thiolase (für <i>E. coli</i> )		
Thiolase y (für <i>S. cerevisiae</i> )		
$\beta$ -Ketoreduktase (für <i>E. coli</i> )		

Zur **Restriktion** folgende Ansätze erstellen (Gesamtvolumen = **50  $\mu$ l**):

Volumen	Substanz
x $\mu$ l	Plasmid-DNA [10 $\mu$ g]
1 $\mu$ l	Restriktionsenzym I (wird gestellt)
1 $\mu$ l	Restriktionsenzym II (wird gestellt)
5 $\mu$ l	10 $\times$ Puffer (wird gestellt)
n $\mu$ l	H <sub>2</sub> O
$\Sigma$ 50 $\mu$ l	

Die Restriktionen werden 1 Stunde bei 37°C im Wasserbad inkubiert, anschließend mit  $\frac{1}{10}$  Volumen 10× Ladepuffer versetzt, in einem 1%igen TAE-Agarosegel getrennt und die DNA aus dem Gel eluiert (Kapitel 2.3). Anschließend erfolgt die Ligation mit den Expressionsvektoren.

Insert	Expressionsvektor
Thiolase y ( <i>Bam</i> HI/ <i>Xba</i> I)	pYES2/CT ( <i>Bam</i> HI/ <i>Xba</i> I)
Thiolase ( <i>Sac</i> I/ <i>Xho</i> I)	pET28a ( <i>Sac</i> I/ <i>Xho</i> I)
β-Ketoreduktase( <i>Nde</i> I/ <i>Xho</i> I)	pET28a ( <i>Nde</i> I/ <i>Xho</i> I)

Zur **Ligation** folgenden Ansatz erstellen (Gesamtvolumen = **21 µl**):

Volumen	Substanz
x µl	300 ng eluierte DNA (= Insert)
y µl	100 ng Vektor
n µl	H <sub>2</sub> O
Σ 10 µl	
+ 10 µl	2× Quick Ligation Reaction Puffer (wird gestellt) mischen
+ 1 µl	Quick T4 DNA Ligase (wird gestellt) gut mischen

Den Ligationsansatz vorsichtig zentrifugieren und 30 min bei 25°C (RT) inkubieren, dann auf Eis kühlen. Anschließend werden ultra-kompetente *E. coli* XL1Blue-Zellen mit den Vektoren (die dann die Amplifikate enthalten sollten) transformiert (Kapitel 2.7). Dann erfolgt eine Isolation der Plasmid-DNA aus den transformierten Zellen (jeweils 2 Minis animpfen) (Kapitel 2.8), eine Testrestriktion (Kapitel 2.9) und eine Kontrolle der Restriktion auf einem 1% Agarosegel (Kapitel 2.2).

### **2.13 Heterologe Expression der putativen Thiolase T\_2493 aus dem Flagellaten *Euglena gracilis* in *Escherichia coli* und der Bäckerhefe *Saccharomyces cerevisiae* und heterologe Expression der $\beta$ -Ketoreduktase aus dem Cyanobakterium *Synechocystis sp. 6803* in *Escherichia coli***

Sie haben bisher gelernt, ein bestimmtes Gen durch PCR zu amplifizieren und es für die Klonierung in einen Expressionsvektor vorzubereiten. Im weiteren Verlauf sollen zwei Proteine – die putative Thiolase T\_2493 aus dem Flagellaten *Euglena gracilis* und die  $\beta$ -Ketoreduktase aus dem Cyanobakterium *Synechocystis sp. 6803*, deren Gene sie zuvor amplifiziert haben – sowohl in *Escherichia coli* als auch in der Bäckerhefe *Saccharomyces cerevisiae* exprimiert werden (heterologe Expression) [die  $\beta$ -Ketoreduktase nur in *E. coli*].

Die meisten Expressionsvektoren ermöglichen das Anhängen von Tags (Anhang), entweder am C- oder N-Terminus des Proteins. Die Tags sind kurze Proteinsequenzen, die in der Regel die Faltung und Funktion des zu exprimierenden Proteins nicht beeinflussen, andererseits jedoch eine einfache Reinigung des Proteins über Affinitätschromatographie und eine Immunodetektion mit Tag-spezifischen Antikörpern ermöglichen.

Für die Expression in *E. coli* wird der Vektor pET28a verwendet, welcher einen Tag, bestehend aus sechs Histidinen, an den N-Terminus der Proteine anhängt (His-Tag). Der Vektor für die Expression in Hefe pYES2/CT fügt diese Histidine am C-Terminus der Proteine an. Der Vorteil des His-Tags ist, dass die Histidine mit einer Ni-NTA (Nickel-Nitriloessigsäure)-Matrix interagieren können, was eine einfache und schnelle Reinigung ermöglicht. Außerdem kann mit spezifischen Anti-His Antikörpern eine Immunodetektion durchgeführt werden.

Nicht alle Proteine lassen sich gut in einem bestimmten Organismus exprimieren, und auch die Bedingungen für die Expression müssen für jedes Protein angepasst werden. Membranproteine sind in der Regel stark hydrophob und neigen außerhalb der Membran zur Aggregation. Wenn bei der Expression von Proteinen in *E. coli* hydrophobe Proteine aggregieren, werden diese Aggregate als „inclusion bodies“ (Einschlusskörperchen) bezeichnet.

Auch Proteine aus Organellen wie Mitochondrien oder Chloroplasten, die in Bakterien nicht verfügbar sind, sind häufig schwierig in bakteriellen Systemen so zu exprimieren, dass ihre Faltung und Funktion erhalten bleibt. Deswegen wird dann – obwohl die Expression in *E. coli* zeitsparender und auch effizienter ist – auf eukaryotische Organismen wie die Hefe ausgewichen.

Zum Vergleich sollen zwei Proteine – die lösliche  $\beta$ -Ketoreduktase in *E. coli* BL21(DE3) und das putative mitochondriale Membranprotein Thiolase in *E. coli* BL21(DE3) und Hefe – heterolog exprimiert und über den His-Tag gereinigt und im Immunoblot nachgewiesen werden.

Bevor mit der Expression der Proteine begonnen werden kann, müssen die Organismen (*E. coli* und Hefe) mit den Expressionsvektoren, die das Gen des jeweils zu exprimierenden Proteins enthalten, transformiert werden. Dazu müssen jedoch zuerst chemisch-kompetente Zellen hergestellt werden. Sowohl chemisch kompetente *E. coli* BL21(DE3)-Zellen als auch kompetente Hefezellen (INVSc1).

## 2.14 Herstellung chemisch-kompetenter *E. coli* BL21(DE3)-Zellen

Aus einem Glycerolstock *E. coli* BL21(DE3)-Zellen werden mit einer Impföse Zellen auf einer LB-Platte ausplattiert. Dazu die Impföse einmal in den Glycerolstock eintauchen und ein Gitter auf die Platte streichen. Die Platte wird dann im Brutschrank bei 37°C über Nacht inkubiert.

Von der LB-Platte mit *E. coli* BL21(DE3)-Zellen werden dann 6× 5 ml Übernachtskulturen (LB ohne Antibiotikum) angeimpft (1× für jede Gruppe). Dazu werden in Reagenzgläsern je 5 ml LB-Medium pipettiert, eine einzelne *E. coli* BL21(DE3)-Kolonie von der Platte mit einem Zahnstocher gepickt und in das LB-Medium gegeben. Die Kultivierung erfolgt schüttelnd bei 37°C über Nacht.

benötigte Lösung:

### FB (50 ml für jede Gruppe)

0,37 g KCl (= 100 mM)  
0,37 g CaCl<sub>2</sub>×2 H<sub>2</sub>O (= 50 mM)  
5 ml Glycerin (=10% (v/v))  
0,5 ml 1 M K-Acetat pH 7,5 (= 10 mM)

in ca. 30 ml H<sub>2</sub>O lösen, pH 6,4 mit HCl einstellen, auf 50 ml auffüllen und sterilfiltrieren

Herstellung der chemisch-kompetenten Zellen:

- 50 ml LB-Medium mit 1 ml der Übernachtskultur animpfen
- 2 bis 3 Stunden bei 37°C schüttelnd inkubieren bis OD<sub>600</sub> zwischen 0,4 und 0,6 liegt: dazu die optische Dichte (OD) bei 600 nm gegen eine Blindprobe (LB-Medium) nach 1,5 h und 2,5 h messen
- die Kultur im Eisbad abkühlen (10-**60** min)
- die Kultur in 50 ml-Röhrchen überführen
- die Zellen bei 3.000 rpm für 15 min bei 4°C in Untertischzentrifuge pellettieren
- den Überstand sorgfältig abgießen und das Pellet in  $\frac{1}{3}$  Volumen (ca. 16 ml) FB resuspendieren
- 10 min auf Eis inkubieren
- Suspension bei 3.000 rpm für 15 min bei 4°C zentrifugieren
- Überstand sorgfältig abgießen und das Zellpellet vorsichtig in  $\frac{1}{12,5}$  Volumen (ca. 4 ml) FB resuspendieren
- Zellen zu je 200 µl in 20 vorgekühlte 1,5 ml-Reaktionsgefäße aliquotieren
- Zellen in flüssigem Stickstoff schockgefrieren und bei -80°C aufbewahren

## 2.15 Herstellung kompetenter Hefezellen (INVSc1)

Aus einem Glycerolstock Hefezellen werden mit einer Impföse Zellen auf einer SC-Platte ausplattiert. Dazu die Impföse einmal in den Glycerolstock eintauchen und ein Gitter auf die Platte streichen. Die Platte wird dann im Brutschrank bei 30°C inkubiert.

Von der SC-Platte mit Hefezellen werden dann 6× 5 ml Übernachtskulturen (YPD ohne Antibiotikum) angeimpft (1× für jede Gruppe). Dazu werden in Reagenzgläsern je 5 ml YPD-Medium pipettiert, eine einzelne Hefe-Kolonie von der Platte mit einem Zahnstocher gepickt und in das SC-Medium gegeben. Die Kultivierung erfolgt schüttelnd bei 30°C über Nacht.

benötigte Lösung:

### **Puffer 1 (30 ml, für alle Gruppen zusammen)**

0,6 M      KCl  
10 mM     Bicin pH 8,35  
3% (w/v)   Ethylenglykol

Herstellung der kompetenten Zellen:

- 40 ml YPD-Medium mit 2 ml Vorkultur animpfen
- Kultur bis zu einer  $OD_{600} = 0,4$  waschen lassen
- Kultur in 50 ml-Röhrchen überführen
- Kultur 5 min bei 3000rpm zentrifugieren (Untertischzentrifuge)
- Überstand verwerfen und das Zellpellet in 2 ml Puffer 1 resuspendieren
- Aliquots á 200 µl erstellen (in 1,5 ml-Reaktionsgefäßen) und bei -80°C einfrieren

## 2.16 Transformation von *Escherichia coli* BL21(DE3) mit den Plasmiden pET28a, pET28a/Thiolase und pET28a/β-KR

Es werden Transformationen von *E. coli* BL21(DE3)-Zellen mit jeweils 0,5 µl der Plasmide pET28a, pET28a/T\_2493 und pET28a/β-KR durchgeführt. Es handelt sich um drei Transformationen! Ausplattiert wird auf LB-Kanamycin-Platten. Die Platten werden über Nacht bei 37°C inkubiert, am nächsten Tag mit Parafilm verschlossen und bei 4°C gelagert.

benötigte Materialien:

kompetente *E. coli* BL21(DE3)-Zellen

LB-Medium (RT)

Wasserbad (42°C)

Durchführung:

- ein leeres 1,5 ml-Reaktionsgefäß auf Eis vorkühlen
- 200 µl kompetente *E. coli* BL21(DE3)-Zellen (= 1 Reaktionsgefäß) auf Eis auftauen lassen
- 100 µl kompetente *E. coli* BL21(DE3)-Zellen in das vorgekühlte Reaktionsgefäß pipettieren und auf Eis stellen
- zu jeweils 100 µl kompetenten *E. coli* BL21(DE3)-Zellen werden auf Eis 0,5 µl Plasmid-DNA (wird gestellt) gegeben
- 20 min auf Eis inkubieren
- Hitzeschock: **genau** 45 sec bei 42 °C im Wasserbad
- danach **sofort** auf Eis stellen und 2 min inkubieren
- 600 µl vorgewärmtes (RT) LB-Medium zugeben
- 50-60 min bei 37°C und 200 rpm schütteln
- pro Ansatz werden jeweils 200 µl auf vorgewärmte (37°C) LB-Kan-Platten ausplattiert
- Platten über Nacht bei 37°C inkubieren
- Platten mit Parafilm verschließen und bei 4°C lagern

Anschließend werden kompetente Hefe-Zellen (INVSc1) mit den Vektoren pYES2/CT und pYES2/CT/Thiolase transformiert.

## 2.17 Transformation von Hefe mit den Vektoren pYES2/CT und pYES2/CT/Thiolase y

benötigte Materialien und Lösungen:

- 100 mM CaCl<sub>2</sub> (50 ml für alle Gruppen zusammen)
- Träger-DNA (Heringssperma, 10 mg/ml) (wird gestellt)
- Platten mit Selektivmedium (SC)
- Puffer 2 und Puffer 3 (30 ml für alle Gruppen zusammen)

### **Puffer 2 (30 ml)**

40% (v/v) PEG 1000  
200 mM Bicin pH 8,35

### **Puffer 3 (30 ml)**

150 mM NaCl  
10 mM Bicin pH 8,35

Transformation:

- Träger-DNA 10 min bei 95°C denaturieren
- danach auf Eis inkubieren
- kompetente Hefezellen aus dem -80°C-Schrank holen und auf Eis stellen
- zu den noch gefrorenen Zellen zunächst 50 µg Träger-DNA (5 µl) und dann 1-4 µg Plasmid-DNA pipettieren
- 30-60 sec bei 37°C im Schüttelthermostat inkubieren, dann 15 µl 100 mM CaCl<sub>2</sub> hinzugeben und weitere 2-3 min schütteln
- 75 µl 100 mM CaCl<sub>2</sub> und 1 ml Puffer 2 hinzugeben
- Reaktionsgefäß vorsichtig wenden (2-3 mal)
- 1 h bei 30°C inkubieren (OHNE Schütteln)
- Zellen 1 min bei 800xg pelletieren
- Zellpellet mit 500 µl Puffer 3 waschen und in 200 µl Puffer 3 resuspendieren
- Ansatz auf Selektivmedium ausplattieren und 2-3 Tage bei 30°C inkubieren

## 2.18 IPTG-induzierte Expression von Proteinen in *E. coli* BL21(DE3)

Folgende Proteine in dem Vektor pET28a sollen in *E. coli* BL21(DE3) exprimiert werden:

Proteine	Vektor
Thiolase	pET28a
$\beta$ -Ketoreduktase	pET28a
keins (Leervektor)	pET28a

Nachdem der *E. coli* Expressionsstamm BL21(DE3) mit den Plasmiden pET28a, pET28a/T\_2493 und pET28a/ $\beta$ -KR transformiert worden ist, wurden die bewachsenen Platten bei 4°C gelagert. Von diesen Platten werden am Vortag der IPTG-induzierten Expression jeweils 5 ml LB/Kanamycin-**Vorkulturen** (5 ml LB + 5  $\mu$ l Kanamycin [c = 50  $\mu$ g/ $\mu$ l]) mit jeweils einer einzelnen Kolonie angeimpft, die über Nacht bei 37°C schüttelnd wachsen.

Jede Gruppe impft andere Kulturen an:

Gruppe	Kulturen
1	Leervektor
2	Leervektor
3	Thiolase
4	Thiolase
5	$\beta$ -Ketoreduktase
6	<b>2</b> $\times$ $\beta$ -Ketoreduktase

Jede Gruppe führt die Expression mit ihrer Vorkultur durch.

IPTG-induzierte Expression:

- 50 ml LB (mit Kanamycin!) mit 1 ml der Vorkultur animpfen
- die Kultur bei 37°C bis zu einer OD<sub>600</sub> von 0,6 bis 0,8 wachsen lassen (das erste mal die OD nach ca. 1 h kontrollieren)
- die Kultur auf eine IPTG-Endkonzentration von 0,4 mM einstellen
- die Kultur 3 h bei 37°C schüttelnd inkubieren.
- 2× je 10 ml Kultur in zwei 15 ml-Röhrchen überführen (Röhrchen mit dem Namen der Kultur beschriften!)
- 10 min bei 4°C und 4.000 rpm (Untertischzentrifuge) abzentrifugieren
- Überstand vollständig entfernen (Autoklavier-Abfall!), Pellet auf Eis halten
- Pellets auf Eis lagern und wie es in der Tabelle steht weiterbehandeln
- die Pellets für die Reinigung der Inclusion Bodies (siehe Tabelle) bei -20°C wegfrieren

Nun sind die Zellen aller Kulturen pelletiert worden. Die Pellets werden nun wie folgt weiter behandelt.

<b>Gr.</b>	<b>Pellet</b>	<b>weitere Behandlung</b>
1	Leervektor	zur Reinigung von Inclusion Bodies (morgen) bei -20°C lagern
1	Leervektor	sofort einen nativen Zellaufschluss durchführen
2	Leervektor	zur Reinigung von Inclusion Bodies (morgen) bei -20°C lagern
2	Leervektor	sofort einen denaturierenden Zellaufschluss durchführen
3	Thiolase	zur Reinigung von Inclusion Bodies (morgen) bei -20°C lagern
3	Thiolase	sofort einen nativen Zellaufschluss durchführen
4	Thiolase	zur Reinigung von Inclusion Bodies (morgen) bei -20°C lagern
4	Thiolase	sofort einen denaturierenden Zellaufschluss durchführen
5	β-Ketoreduktase	zur Reinigung von Inclusion Bodies (morgen) bei -20°C lagern
5	β-Ketoreduktase	sofort einen nativen Zellaufschluss durchführen
6	β-Ketoreduktase	zur Reinigung von Inclusion Bodies (morgen) bei -20°C lagern
6	β-Ketoreduktase	sofort einen nativen Zellaufschluss durchführen
6	β-Ketoreduktase	sofort einen denaturierenden Zellaufschluss durchführen

## 2.19 Nativer Zellaufschluss der *E. coli* BL21(DE3)-Kulturen

Bei einem nativen Zellaufschluss behalten die Proteine in Lösung ihre Tertiär- und Quartärstruktur, also ihre aktive Form bei.

benötigte Lösungen (für 2.19 und 2.20) für alle Gruppen zusammen:

20 ml nativer Lysepuffer	20 ml nativer Waschpuffer	20 ml nativer Elutionspuffer
50 mM NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	50 mM NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	50 mM NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>
300 mM NaCl	300 mM NaCl	300 mM NaCl
10 mM Imidazol	20 mM Imidazol	250 mM Imidazol
pH 8,0 (mit NaOH)	pH 8,0 (mit NaOH)	pH 8,0 (mit NaOH)

Nativer Zellaufschluss:

- Pellet (Kapitel 2.17) in 0,5 ml nativem Lysepuffer resuspendieren
- 1 mg/ml Lysozym hinzugeben (Volumen berechnen!) und 30 min auf Eis inkubieren
- resuspendiertes Pellet in ein 2,0 ml-Reaktionsgefäß überführen
- Zellaufschluss: 6× 10 sec Ultraschall (Probe dabei ständig auf Eis kühlen, Ohrenschutz tragen), dazwischen jeweils 10 sec Pause auf Eis
- 10 µg/ml RNase und 5 µg/ml DNase I hinzugeben und 10 min auf Eis inkubieren
- 30 min bei 13.000 rpm und 4°C zentrifugieren
- den Überstand abnehmen, in ein 1,5 ml-Reaktionsgefäß überführen und mit ÜN (Überstand nativ) beschriften (Name der Kultur nicht vergessen!)
- Proteinkonzentration von ÜN nach Bradford bestimmen
- 20 µg für SDS-Gele aufbewahren
- das Pellet in 1 ml 1× Lämmli-puffer resuspendieren und mit PN (Pellet nativ) beschriften (Name der Kultur nicht vergessen nicht vergessen!)

Nun soll am folgenden Tag aus dem „nativen Überstand“ der **β-Ketoreduktase-Kulturen** das exprimierte Protein (das einen His-Tag besitzt) über Affinitätschromatographie gereinigt werden. Dazu wird als Matrix Ni-NTA-Agarose (Nickel-Nitriloessigsäure) benutzt, mit der die Histidine interagieren können. ÜN (β-KR) dazu auf Eis bei 4°C aufbewahren.

20 µg aller Überstands und die Pellets aller Aufschlüsse werden auf ein SDS-Gel aufgetragen.

## 2.20 Reinigung der exprimierten Proteine mittels Affinitätschromatographie

Jeweils 3 Gruppen (1-3 und 4-6) führen die Reinigung zusammen durch! Es wird die expimierte und His-markierte  $\beta$ -Ketoreduktase gereinigt.

Vorbereitung:

Die Ni-NTA-Agarose (Qiagen) liegt als 50%ige Suspension in Ethanol vor.

- ein Aliquot (250  $\mu$ l) entnehmen und das Säulenmaterial absinken lassen (bzw. kurz abzentrifugieren)
- Überstand abnehmen (genaues Volumen bestimmen!!!) und durch nativen Lysepuffer ersetzen (= waschen).
- Ni-NTA-Agarose durch vorsichtiges Invertieren resuspendieren und das Säulenmaterial absinken gelassen (bzw. kurz abzentrifugiert)
- Überstand abnehmen und durch das selbe Volumen nativen Lysepuffer ersetzen wie oben
- Ni-NTA-Agarose durch vorsichtiges Invertieren resuspendieren und das Säulenmaterial absinken gelassen (bzw. kurz abzentrifugiert)
- Überstand abnehmen und durch das selbe Volumen nativen Lysepuffer ersetzen wie oben
- Ni-NTA-Agarose durch vorsichtiges Invertieren resuspendieren und das Säulenmaterial absinken gelassen (bzw. kurz abzentrifugiert)
- Überstand abnehmen, „Pellet“ = NiNTA-Agarose

Durchführung:

- zu 1 ml nativem Überstand 250  $\mu$ l Ni-NTA-Agarose (nach Vorbereitung) geben und 1 h auf einem 3D-Schüttler bei 4°C schwenken (d.h. Volumen der Überstände bestimmen und das Volumen der Ni-NTA-Agarose berechnen!)
- 2 min bei 1.000 $\times$ g und 4°C zentrifugieren: Überstand = Durchfluss
- Überstand in ein neues 1,5 ml-Reaktionsgefäß überführen und mit D (Durchfluss) und Gruppennummern beschriften
- Pellet 2 $\times$  mit 1 ml Waschpuffer (nativ) waschen: 1 ml Waschpuffer (nativ) auf die Ni-NTA-Agarose geben, mehrmals invertieren, 2 min bei 1.000 $\times$ g und 4°C zentrifugieren. Die Überstände jeweils abnehmen, getrennt aufbewahren und beschriften: W1 (Waschen 1) und W2 (Waschen 2) plus jeweilige Gruppennummern
- Protein mit 3 $\times$  je 200  $\mu$ l Elutionspuffer eluieren: 200  $\mu$ l Elutionspuffer (nativ) auf die Ni-NTA-Agarose geben, mehrmals invertieren, 2 min bei 1.000 $\times$ g und 4°C zentrifugieren die Überstände jeweils abnehmen, getrennt aufbewahren und

beschriften: E1 (Eluat 1), E2 (Eluat 2) und E3 (Eluat 3) plus jeweilige Gruppennummern

- von D, W1, W2, E1, E2 und E3 die Proteinkonzentrationen nach Bradford bestimmen

## 2.21 Denaturierender Zellaufschluss der *E. coli* BL21(DE3)-Kulturen

Bei einem denaturierenden Aufschluss werden die Proteine – wie der Name schon sagt – denaturiert.

benötigte Lösung:

### denaturierender Lysepuffer (20 ml für alle Gruppen)

100 mM  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$

10 mM Tris-HCl pH 8,0

8 M Harnstoff

pH 8,0 mit NaOH einstellen

Denaturierender Zellaufschluss:

- Pellet (Kapitel 2.17) in 1 ml denaturierendem Lysepuffer resuspendieren
- die Zellen etwa 30 min bei Raumtemperatur inkubieren und zwischendurch vorsichtig vortexen, dabei eine starke Schaumbildung vermeiden!
- 30 min bei 13.000 rpm und 4 °C zentrifugieren
- den Überstand abnehmen, in ein 1,5 ml-Reaktionsgefäß überführen und mit ÜD (Überstand denaturiert) beschriften (Namen der Kultur nicht vergessen!)
- Proteinkonzentration von ÜD nach Bradford bestimmen
- das Pellet in 1 ml 1× Lämmli-puffer resuspendieren und mit PD (Pellet denaturiert) beschriften (Namen der Kultur nicht vergessen!)

Nun sollen der „denaturierte Überstand“ (20 µg) und das Pellet in einem SDS-Gel getrennt werden.

## 2.22 Reinigung von Inclusion Bodies

Wenn bei der Expression von Proteinen in *E. coli* hydrophobe Proteine aggregieren, werden diese Aggregate als „inclusion bodies“ (Einschlusskörperchen) bezeichnet. Das ist oftmals bei Membranproteinen der Fall. Deswegen wird das exprimierte Protein aus den „inclusion bodies“ gereinigt. Es sollen aus allen drei *E. coli* Kulturen (Leervektor, Thiolase und  $\beta$ -Ketoreduktase) die „inclusion bodies“ gereinigt werden.

benötigte Lösungen (jeweils für alle Gruppen):

### Lösung 1 (10 ml)

50 mM Tris-HCl pH 8,0  
25% (w/v) Saccharose  
1 mM EDTA

### Lösung 2 (10 ml)

100 mM  $MgCl_2$   
10 mM  $MnCl_2$   
10  $\mu$ g/ml DNase I  
1% (w/v) Na-Deoxycholat

### Lösung 3 (20 ml)

20 mM Tris-HCl pH 7,5  
200 mM NaCl  
1% (v/v) Triton X 100

### Lösung 4 (30 ml)

0,5% (v/v) Triton X 100  
1 mM EDTA

### Lösung 5 (30 ml)

10 mM Tris-HCl pH 8,0  
8 M Harnstoff  
0,1 M  $NaH_2PO_4$   
10 mM  $\beta$ -Mercaptoethanol

Reinigung:

- das Pellet in 600  $\mu$ l Lösung 1 resuspendieren
- 10 mg/ml Lysozym zugeben
- den Ansatz 30 min auf Eis inkubieren
- 83  $\mu$ l Lösung 2 hinzugeben und das 1,5 ml-Reaktionsgefäß invertieren
- 30 min auf Eis inkubieren
- 1,5 ml Lösung 3 hinzugeben und mischen
- 10 min bei 13.000 rpm und 4°C zentrifugieren
- den Überstand (er enthält die löslichen Proteine) abnehmen und in einem neuen Reaktionsgefäß aufbewahren (beschriften!)
- Waschen: das Pellet (= „inclusion bodies“) in 1 ml Lösung 4 resuspendieren
- 10 min bei 13.000 rpm und 4°C zentrifugieren, Überstand abnehmen
- den Waschvorgang 3× wiederholen
- das Pellet in 300  $\mu$ l Lösung 5 resuspendieren
- Proteinkonzentrationen der Überstände und der „inclusion bodies“ nach Bradford bestimmen und je 20  $\mu$ g auf ein SDS-Gel auftragen

## 2.23 Proteinbestimmung nach Bradford

benötigte Lösung:

### Bradford-Lösung (eventuell aus dem Praktikumsteil 1 schon vorhanden)

100 mg Coomassie-Blue G250 (nicht R250!)

50 ml 96% Ethanol

Farbstoff und Alkohol zunächst 30 min rühren

dann unter dem Abzug

100 ml 85% (v/v) Orthophosphorsäure hinzugeben

mit dest. H<sub>2</sub>O auf 1000 ml auffüllen, filtrieren und dunkel (Alufolie) bei 4°C aufbewahren

Durchführung:

- die Bradford-Lösung auf Raumtemperatur erwärmen
- PMS 1:10 mit H<sub>2</sub>O verdünnen (Achtung: nicht die gesamte Probe verdünnen!!!)

### Es werden Dreifachbestimmungen durchgeführt!

- 980 µl Bradford-Lösung in Küvetten geben und mit den Proben versetzen:

**Überstand nativ:** 1 µl + 19 µl H<sub>2</sub>O

**Überstand denaturierend:** 1 µl + 19 µl H<sub>2</sub>O

**D (Durchfluss):** 1 µl + 19 µl H<sub>2</sub>O

**W1 (Waschen 1):** 1 µl + 19 µl H<sub>2</sub>O

**W2 (Waschen 2):** 1 µl + 19 µl H<sub>2</sub>O

**E1 (Eluat 1):** 1 µl + 19 µl H<sub>2</sub>O

**E2 (Eluat 2):** 1 µl + 19 µl H<sub>2</sub>O

**E3 (Eluat 3):** 1 µl + 19 µl H<sub>2</sub>O

**Überstand (inclusion bodies):** 1 µl + 19 µl H<sub>2</sub>O

**Inclusion bodies:** 1 µl + 19 µl H<sub>2</sub>O

**Mitochondrien:** 1 µl + 19 µl H<sub>2</sub>O

**PMS:** 1 µl von der 1:10 Verdünnung + 19 µl H<sub>2</sub>O

- nach ca. 10 min erreicht die Reaktion ein Plateau und der gebildete Farbkomplex ist für etwa eine Stunde stabil
- Absorption bei **595 nm** gegen eine **Blindprobe** (980 µl Bradford-Lösung + 20 µl H<sub>2</sub>O) messen
- Proteinkonzentration mittels der erstellten BSA-Kalibrierungsgeraden errechnen

Auswertung der Proteinbestimmungen nach Bradford:

<b>Fraktion</b>	<b>Volumen [ml]</b>	<b>Proteinkonzentration [mg/ml]</b>	<b>Gesamt-Protein [mg]</b>	<b>Volumen für 20 µg Protein</b>
Überstand nativ Leervektor				
Überstand nativ Thiolase				
Überstand nativ β-Ketoreduktase				
Überstand den. Leervektor				
Überstand den. Thiolase				
Überstand den. β-Ketoreduktase				
D (Durchfluss)				
W1 (Waschen 1)				
W2 (Waschen 2)				
E1 (Eluat 1)				
E2 (Eluat 2)				
E3 (Eluat 3)				
Inclusion bodies				
Überstand (inclusion bodies)				
Mitochondrien				
PMS				

## 2.24 Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

**ACHTUNG: Acrylamid ist im unpolymersisierten Zustand kanzerogen und giftig.**



Bei Arbeiten mit dieser Substanz sind auch in Verdünnung Handschuhe (blau) zu tragen.

### 2.24.1 Gießen der Gele

Am Vortag der SDS-PAGE werden mittlere SDS-Gele mit 12%igem Acrylamid-Anteil im Trenngel und 5%igem Acrylamid-Anteil im Sammelgel gegossen (Aufbau der Gele von den Betreuern zeigen lassen).

Der Aufbau wird mit 2 ml PLUG (Mix aus Acrylamid und TEMED; wird gestellt) + 30 µl 10% (w/v) APS (startet die Polymerisation) abgedichtet, bevor das Gel gegossen wird. Sobald der Aufbau abgedichtet ist, wird ein 12%iger Gelmix vorbereitet (s.u., 70 ml reichen für 2 Gele) und die SDS-Gele gegossen.

benötigte Materialien:

30% Acrylamid/Bisacrylamid-Mix (wird gestellt)

1,5 M Tris-HCl pH 8,8

1 M Tris-HCl pH 6,8

10% (w/v) SDS

10% (w/v) Ammoniumpersulfat (APS)

TEMED (wird gestellt)

Durchführung:

- Gelsandwich zusammenbauen
- Kamm einstecken
- Gießhöhe des Trenngels markieren
- Kamm entfernen
- den Aufbau mit 2 ml PLUG (Mix aus Acrylamid und TEMED) + 30 µl APS abdichten
- 12% Trenngel zusammenpipettieren (im Becherglas)

**12% Trenngel** 70 ml (reicht für 2 Gele)

28 ml	30% Acrylamidmix
17,5 ml	1,5 M Tris/HCl pH 8,8
0,7 ml	10% SDS
13,1 ml	dest. H <sub>2</sub> O
28 µl	TEMED

- 0,7 ml 10% (w/v) APS zum 12% Gelmix geben und vorsichtig mischen
- die Gelsandwiches bis zur Markierung mit dem 12% Gelmix füllen
- Gel mit 0,1% (w/v) SDS überschichten
- auspolymerisieren lassen

Wenn das Trenngel auspolymerisiert ist, wird das Trenngel mit dem Sammelgel überschichtet:

- 5% Sammelgel zusammenpipettieren (im Becherglas)

**5% Sammelgel** 40 ml (reicht für 2 Gele)

6,8 ml	30% Acrylamidmix
5,0 ml	1 M Tris/HCl pH 6,8
0,4 ml	10% (w/v) SDS
27,2 ml	dest. H <sub>2</sub> O
40 µl	TEMED

- das 0,1%ige SDS, mit dem das Trenngel überschichtet wurde, abgießen
- 0,4 ml 10% (w/v) APS zum 5% Gelmix geben und vorsichtig mischen
- Gelsandwich mit dem 5% Gelmix füllen
- Kamm einstecken
- auspolymerisieren lassen

### 2.24.2 Auftragen der Proben

Es sollen alle erhaltenen Proteinproben in einem SDS-Gel getrennt werden.

Pro Fraktion werden wie folgt die Proben vorbereitet:

**Überstände:** 20 µg Protein, auf 40 µl mit H<sub>2</sub>O auffüllen, 10 µl 5× Lämmli-Puffer zugeben

**D, W1, W2, E1, E2, E3:** 20 µg Protein, auf 40 µl mit H<sub>2</sub>O auffüllen, 10 µl 5× Lämmli-Puffer zugeben

**Inclusion Bodies:** 20 µg Protein, auf 40 µl mit H<sub>2</sub>O auffüllen, 10 µl 5× Lämmli-Puffer zugeben

**Mitochondrien:** 20 µg Protein, auf 40 µl mit H<sub>2</sub>O auffüllen, 10 µl 5× Lämmli-Puffer zugeben

**PMS:** 20 µg Protein, auf 40 µl mit H<sub>2</sub>O auffüllen, 10 µl 5× Lämmli-Puffer zugeben

Proben 3 min bei 85°C inkubieren und auf das Gel auftragen (Reihenfolge zuvor mit den Betreuern festlegen!).

Den Protein-Ladder als Marker ebenfalls aufkochen und 7 µl auftragen.

Als Laufpuffer wird **1x (!)** Tris-Glycin (25 mM Tris, 192 mM Glycin, 0,1% (w/v) SDS) verwendet. Die Gele bei 120 V einlaufen und ab dem Trenngel bei 280 V mit Kühlung laufen lassen.

Nach Beendigung des Laufs Gel blotten und anschließend mit Coomassie färben.

benötigte Lösungen:

#### **5× Tris-Glycin-Elektrophoresepuffer** (1000 ml)

15,1 g Tris  
72,1 g Glycin  
50 ml 10% (w/v) SDS

#### **5× Lämmli-Puffer** (100 ml, wird gestellt)

5 ml 1 M Tris-HCl pH 8,0  
1 ml 0,5 M EDTA pH 8,0  
5 g SDS  
25 ml β-Mercaptoethanol  
0,25 g Bromphenolblau  
50 ml Glycerin

ad 100 ml (H<sub>2</sub>O); Lagerung bei 4°C

**Gel 1 (Gruppen 1 bis 3) Gel wird geblottet**

<b>Tasche</b>	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>4</b>	<b>5</b>	<b>6</b>	<b>7</b>	<b>8</b>	<b>9</b>	<b>10</b>	<b>11</b>	<b>12</b>	<b>13</b>
<b>Probe</b>	Marker 7 µl	LV ÜN	LV PN	Thiolase ÜN	Thiolase PN	β-KR ÜN	β-KR PN	D	W 1	W 2	E 1	E 2	E 3
<b>Volumen [20 µg]</b>													
<b>H<sub>2</sub>O</b>													
<b>5x Lämmli</b>													



**Gel 3 (Gruppen 1 bis 6) Gel wird geblottet**

Tasche	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
<b>Probe</b>	Marker 7 µl	LV IB Gr. 1	LV ÜS Gr. 1	LV IB Gr. 2	LV ÜS Gr. 2	Thiol IB Gr. 3	Thiol ÜS Gr. 3	Thiol IB Gr. 4	Thiol ÜS Gr. 4	β-KR ÜS Gr. 5	β-KR ÜS Gr. 5	β-KR IB Gr. 6	β-KR ÜS Gr. 6
<b>Volumen</b>													
<b>[20 µg]</b>													
<b>H<sub>2</sub>O</b>													
<b>5x Lämmli</b>													

## Gel 4 (Gruppen 1 bis 6) Gel wird Coomassie gefärbt

Tasche	1	2	3	4	5	6	7
Probe	Marker 7 µl	LV ÜD	LV PD	Thiolase ÜD	Thiolase PD	β-KR ÜD	β-KR PD
Volumen [20 µg]							
H <sub>2</sub> O							
5x Lämmli							

**Gel 5 (Gruppen 1 bis 6) Gel wird geblottet**

<b>Tasche</b>	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>4</b>	<b>5</b>	<b>6</b>	<b>7</b>	<b>8</b>	<b>9</b>	<b>10</b>	<b>11</b>	<b>12</b>	<b>13</b>
<b>Probe</b>	Marker 7 µl	Mitos Gr. 1	PMS Gr. 1	Mitos Gr. 2	PMS Gr. 2	Mitos Gr. 3	PMS Gr. 3	Mitos Gr. 4	PMS Gr. 4	Mitos Gr. 5	PMS Gr. 5	Mitos Gr. 6	PMS Gr. 6
<b>Volumen</b> <b>[20 µg]</b>													
<b>H<sub>2</sub>O</b>													
<b>5× Lämmli</b>													

## 2.25 Proteingel-Färbung mit Coomassie R350

Die Coomassie-Färbung ist eine einfache und schnelle Färbemethode mit einer relativ geringen Empfindlichkeit (untere Grenze 200 bis 400 ng pro Bande). Wird eine starke Expression des Proteins erwartet, was in der Regel bei *E. coli* als Expressionswirt der Fall ist, so reicht diese Färbung aus, um den Erfolg der Expression zu überprüfen.

benötigte Lösung:

### Coomassie R350-Stammlösung (0,2%)

1. 1 Tablette Coomassie R350 in 80 ml dest.H<sub>2</sub>O lösen und 10 min rühren
2. 120 ml Methanol zugeben und rühren, bis der Farbstoff vollständig gelöst ist
3. Lösung filtrieren und bei 4 °C lagern (Lösung ist ca. 4 Wochen haltbar)

Färbung:

Die Coomassie R350-Stammlösung 1:10 mit 10%iger (v/v) Essigsäure verdünnen und auf 90°C erwärmen. Unter dem Abzug über das Gel geben und ca. 1 h schütteln.

Entfärbung:

Das Gel mehrere Stunden bis über Nacht in 10%iger Essigsäure schütteln (ZWEI Zellstofftücher (Kleenex) zugeben).

## 2.26 Western Blot

Um geringe Mengen eines Proteins in einem SDS-Gel nachzuweisen, ist eine Coomassie-Färbung nicht empfindlich genug. Um auch gering exprimierte Proteine sehr spezifisch nachzuweisen, können Western Blots mit anschließender Immunodetektion durchgeführt werden. Es sollen der Erfolg der Expression der putativen Thiolase T\_2493 in Hefe sowie die Reinigung der  $\beta$ -Ketoreduktase aus *E. coli* BL21(DE3) und die Reinigung der Inclusion bodies mit dieser Methode überprüft werden. Zunächst müssen die im SDS-Gel getrennten Proteine vom Gel auf eine Nitrocellulosemembran übertragen werden.

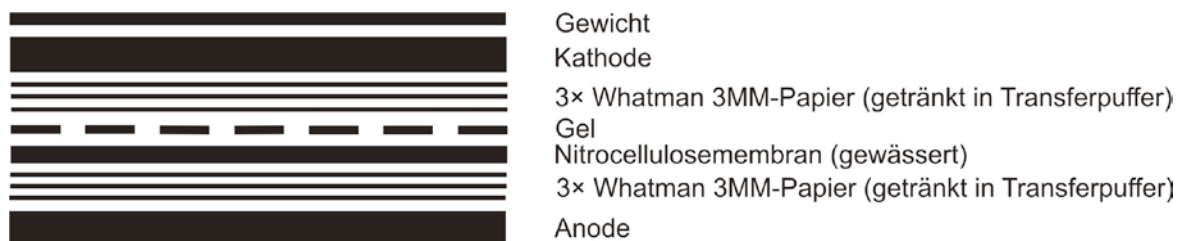
benötigte Lösungen:

### Transferpuffer (500 ml)

1,45 g	Glycin	(= 40 mM)
2,9 g	Tris	(= 50 mM)
1,85 ml	10% SDS	(= 1 mM)
100 ml	Methanol	(= 20% (w/v))

Durchführung:

- Gelgröße bestimmen
- 1× Nitrocellulosemembran (Hybond C Extra, GE Healthcare) und 6× Whatman 3MM-Papier auf Gelgröße zurechtschneiden (Handschuhe tragen!)
- Whatman 3MM-Papier in Transferpuffer tränken
- Nitocellulosemembran wässern
- Aufbau des Blots in einer „Semi-Dry-Blotting“-Apparatur: Der Aufbau erfolgt von der Anode zur Kathode.



- Anode anfeuchten
- 3× in Transferpuffer getränktes Whatman 3MM-Papier luftblasenfrei auf die Anode aufeinanderlegen
- gewässerte Nitrocellulosemembran auflegen (luftblasenfrei)

- SDS-Gel kurz in Wasser schwenken und luftblasenfrei auflegen
- 3× in Transferpuffer getränktes Whatman 3MM-Papier luftblasenfrei auflegen
- Kathode aufsetzen, eventuelle Luftblasen vor dem Aufsetzen der Kathode entfernen, eventuell mit einem Gewicht beschweren
- Anode und Kathode mit dem Spannungsgerät verkabeln
- der Proteintransfer vom Gel auf die Nitrocellulosemembran findet bei konstantem Stromfluss von  $0,82 \text{ mA/cm}^2$  für 60 min statt
- den Transfer der Proteine durch Färben der Membran mit Ponceau S überprüfen
- das SDS-Gel mit Coomassie färben (Kapitel 2.25)

### **Ponceau S-Färbung:**

**Ponceau S** (wird gestellt)

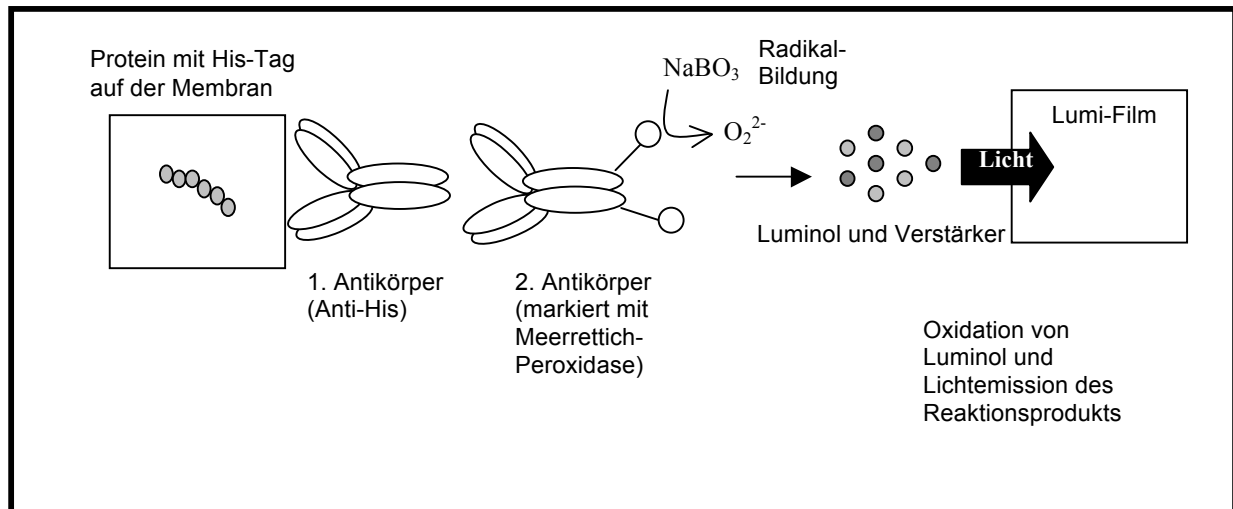
0,5 g     Ponceau S     (= 0,5%)

1 ml     Essigsäure     (= 1%)

Die Membran wird für 1 min mit Ponceau S gefärbt, danach solange mit dest. H<sub>2</sub>O entfärbt, bis Banden sichtbar werden. Dann werden auf der Membran die Markerbanden und die Geltaschen markiert. Es folgt die Immunodetektion mit den entsprechenden Antikörpern (Kapitel 2.26).

## 2.27 Immunodetektion mit einem Anti-His Antikörper

Der His-Tag der exprimierten Proteine ermöglicht nicht nur die Reinigung über eine Ni-NTA-Affinitätsmatrix, sondern auch eine spezifische Detektion des exprimierten Proteins mit einem Anti-His Antikörper.



benötigte Lösungen:

### 1× TBS (1000 ml)

10 mM Tris-HCl pH 7,5  
150 mM NaCl

### TBS-Tween/Triton (1000 ml)

20 mM Tris-HCl pH 7,5  
500 mM NaCl  
0,05% (v/v) Tween 20  
0,2% (v/v) Triton X 100

### Blocking-Puffer (50 ml)

5% (w/v) Magermilchpulver in TBS

### Puffer für den 2. Antikörper (15 ml)

5% (w/v) Magermilchpulver in TBS

benötigte Materialien:

Overhead-Folien (werden gestellt)

Detektionslösungen A und B (werden gestellt)

A: 200 ml 0,1 M Tris-HCl pH 8,6; 50 mg Luminol

B: 11 mg para-Hydroxycoumarinsäure in 10 ml DMSO

30%  $\text{H}_2\text{O}_2$  (wird gestellt)

Chemilumineszenz-Detektionsfilme und Filmkassette (werden gestellt)

Entwickler und Fixierer (werden gestellt)

#### Durchführung:

- die Membran nach der Ponceau S-Färbung 1 h in Blocking-Puffer schwenken
- 15 ml Blocking-Puffer mit 5 µl Anti-His-Antikörper (His Monoclonal antibody, 0,2 µg/µl, Novagen) in einem 50 ml-Röhrchen mischen
- die Membran zusammen mit dem gelösten Antikörper in eine Plastikfolie einschweißen und über Nacht bei 4°C auf einem 3D-Schüttler inkubieren
- die Membran 2× 10 min in TBS-Tween/Triton und 1× 10 min in TBS waschen
- 0,5 µl des Zweitantikörpers (ImmunoPure Goat Anti-Mouse IgG, Peroxidase Conjugated, 0,8 mg/ml, Pierce) zu 15 ml 10% (w/v) Milchpulver in TBS geben
- die Membran mit dem gelösten Antikörper in Plastikfolie einschweißen und 1 h bei Raumtemperatur auf einem 3D-Schüttler inkubieren
- anschließend 3× 10 min in TBS-Tween/Triton waschen

Die Detektion erfolgt in der Dunkelkammer.

- 4 ml Lösung A mit 1,2 µl H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (30%) und 400 µl Lösung B mischen und auf eine Folie geben
- die Nitrocellulosemembran mit der „Proteinseite“ nach unten in die Lösung auf die Folie legen
- die Membran 2 min inkubieren (Lösung gut verteilen, Membran in der Lösung bewegen)
- die Membran luftblasenfrei und ohne die Lösung zwischen zwei Folien in eine Filmkassette legen
- Licht ausschalten und in der Kassette einen Chemilumineszenz-Detektionsfilm auflegen, Kassette schließen
- nach 1 bis 5 min den Film zum Entwickeln entnehmen (ggf. neuen Film auflegen)
- den Film entwickeln: erst in Entwickler baden, dann im Fixierer, dazwischen mit dest. H<sub>2</sub>O spülen (ggf. Expositionszeit für den zweiten Film bestimmen)
- getrockneten Film einscannen

## 2.28 Galaktose-induzierte Expression von Proteinen in Hefe

Der Hefe Expressionsstamm INVSc1 wurde mit dem Plasmid pYES2/CT und mit dem Plasmid pYES2/CT/Thiolase y transformiert. Die Expression in der Hefe wird durch einen Galaktose-Promotor kontrolliert. Glukose verhindert die Expression des gewünschten Proteins, durch Galaktose wird sie induziert.

Proteine	Vektor
Thiolase y	pYES2/CT
keins (Leervektor)	pYES2/CT

Jede Gruppe impft eine andere Kultur an:

Gruppe	Kultur
1	Thiolase y
2	Leervektor
3	Thiolase y
4	Leervektor
5	Thiolase y
6	Thiolase y

Galaktose-induzierte Expression:

- 50 ml SC-Minimalmedium mit 2% Glukose werden mit einer Einzelkolonie angeimpft und bei 30°C und 200 rpm 1-2 Tage inkubiert
- $OD_{600}$  der Kulturen bestimmen und berechnen, mit welchem Kulturvolumen 500 ml zu einer  $OD_{600}$  von 0,4 angeimpft werden müssen. Dazu folgende Formel benutzen:  
$$\text{ml Vorkultur} = 0,4 \times 500 / OD_{600} \text{ Vorkultur}$$
- diese Menge unter der Sterilbank in ein steriles 50 ml-Röhrchen überführen und 5 min bei RT und 1.500×g in der Untertischzentrifuge pelletieren
- den Überstand vorsichtig abgießen und das Pellet in 1 ml SC-Medium mit 2% Galaktose und 1% Raffinose resuspendieren und damit 500 ml SC-Medium mit 2% Galaktose und 1% Raffinose animpfen
- die Kultur über Nacht bei 30°C und 200 rpm inkubieren

## 2.29 Reinigung der exprimierten putative Thiolase T\_2493 aus *S. cerevisiae*

Da die putative Thiolase T\_2493 als putatives mitochondriales Membranprotein auch in der Hefe im Mitochondrium erwartet wird, ist der erste Reinigungsschritt die Isolation der Mitochondrien aus der Hefe.

## 2.30 Isolation von Mitochondrien aus Hefe

benötigte Materialien:

- Glasperlen (werden gestellt)
- Protease-Inhibitor Cocktail (Sigma) (wird gestellt)

Benötigte Lösung:

### Waschpuffer für Hefemitochondrien (100 ml für alle Gruppen zusammen)

20 mM Tris-HCl pH 7,4

50 mM NaCl

0,6 M Sorbitol

Durchführung:

- die Expressionskulturen bei 1.000×g und 20°C für 5 min abzentrifugieren
- das Pellet in 20 ml H<sub>2</sub>O resuspendieren und erneut zentrifugieren
- das Pellet in 10 ml Waschpuffer für Hefemitochondrien resuspendieren,
- in ein 50 ml-Röhrchen überführen und erneut zentrifugieren
- das Pellet in 5 ml Waschpuffer für Hefemitochondrien resuspendieren
- 5 µl Protease Inhibitor Cocktail und ca. ½ Volumen Glasperlen hinzugeben und 5 min auf Eis inkubieren.

### **Alle folgenden Schritte auf Eis und Zentrifugationen bei 4°C durchführen**

- die Zellen 3× für 1 min bei maximaler Geschwindigkeit vortexen (→ Zellaufschluss) zwischen dem Vortexen die Proben für jeweils 1 min auf Eis abkühlen
- die Suspension 15 min bei 4.000 rpm und 4°C zentrifugieren (Untertischzentrifuge)
- den Überstand in ein Nalgene-Röhrchen überführen und bei 10.000×g und 4°C für 20 min zentrifugieren
- **ACHTUNG: keine Zelltrümmer mitnehmen!!!**
- den Überstand vorsichtig abnehmen [= **PMS** (post mitochondrial supernatant)]
- das Pellet in 200 µl Waschpuffer für Hefemitochondrien mit 2 µl Protease-Inhibitor Cocktail aufnehmen [= „**MITO**“]
- den Proteingehalt der Hefemitochondrien und des PMS nach Bradford bestimmen

Aufgaben:

- *Diskutieren Sie die Unterschiede zwischen denaturierendem und nativem Aufschluss von E. coli mit den Ergebnissen der Coomassie-Färbung*
- *Beschreiben und diskutieren Sie die Ergebnisse des Western Blots*
- *Diskutieren sie die Unterschiede bei der Expression in E. coli und der Hefe. Welcher der beiden Expressionswirte ist für die putative Thiolase T\_2493 der geeignete? Warum?*

### 3. ANHANG

#### 3.1 Verwendete Stämme und Vektoren

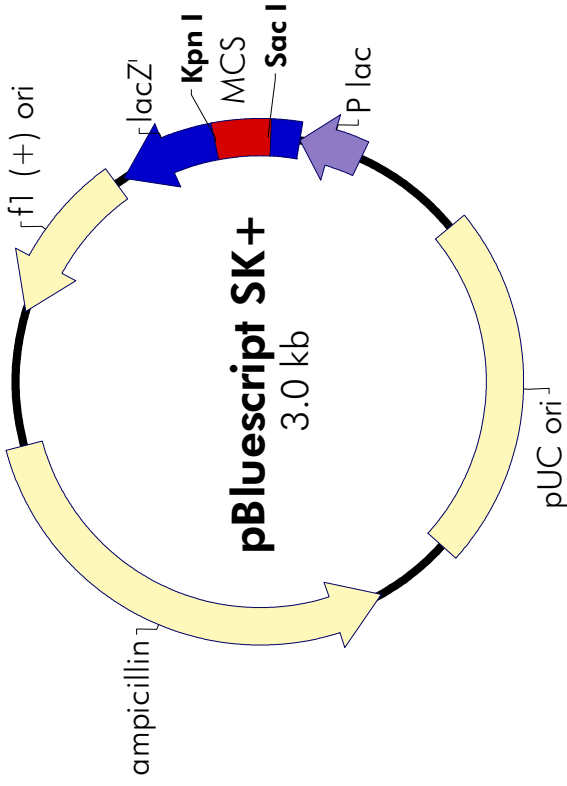
##### Stämme

<i>E. coli</i> XL1Blue	recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac [F' proAB lacI <sup>q</sup> ZΔM15 Tn10 (Tet <sup>R</sup> )]
<i>E. coli</i> BL21(DE3)	<i>E. coli</i> F <sup>-</sup> ompT hsdS(r <sub>b</sub> <sup>-</sup> m <sub>b</sub> <sup>-</sup> ) dcm <sup>+</sup> (DE3) pLysS(Cam <sup>R</sup> )
<i>S. cerevisiae</i> INVSc1	his3Δ1/his3Δ1 leu2/leu2 trp1-289/trp1-289 ura3-52/ura3-52

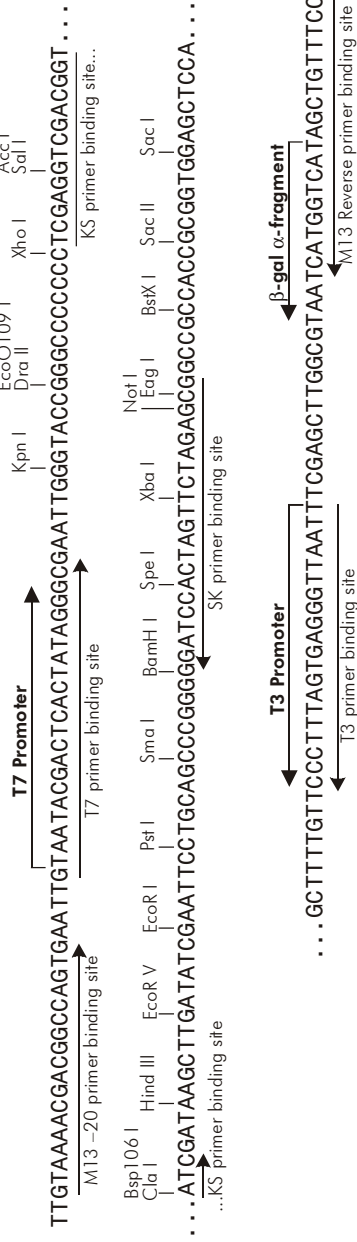
##### Vektoren

pBluescript SK(+)	Vektor für die Sequenzierung, <i>EcoRV</i> geschnitten, Amp <sup>R</sup>
pET28a	<i>E. coli</i> -Expressionsvektor, Kan <sup>R</sup>
pYES2/CT	Hefevektor, Amp <sup>r</sup> , V5Epitop, 6× His, Uracil-Marker

**f1 (+) origin 138–444**  
 **$\beta$ -galactosidase  $\alpha$ -fragment 463–816**  
**multiple cloning site 653–760**  
**lac promoter 817–938**  
**pUC origin 1158–1825**  
**ampicillin resistance (*bla*) ORF 1976–2833**



**pBluescript SK (+/-) Multiple Cloning Site Region**  
**(sequence shown 601–826)**



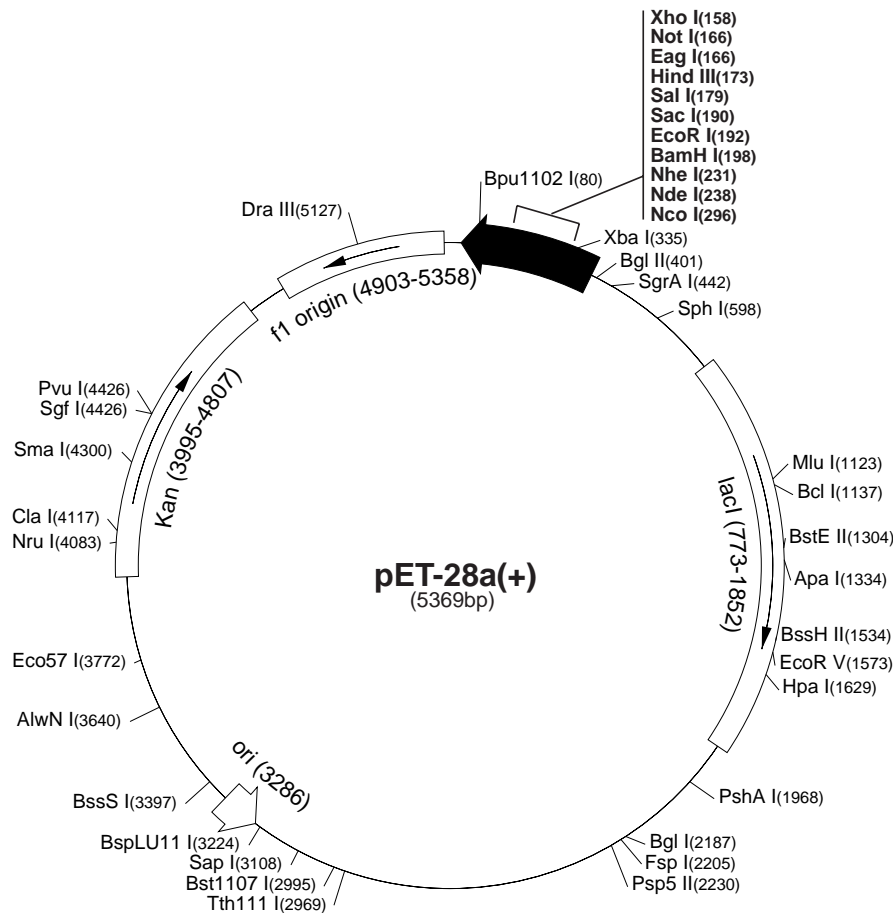
# pET-28a-c(+) Vectors

	Cat. No.
pET-28a DNA	69864-3
pET-28b DNA	69865-3
pET-28c DNA	69866-3

The pET-28a-c(+) vectors carry an N-terminal His•Tag<sup>®</sup>/thrombin/T7•Tag<sup>®</sup> configuration plus an optional C-terminal His•Tag sequence. Unique sites are shown on the circle map. Note that the sequence is numbered by the pBR322 convention, so the T7 expression region is reversed on the circular map. The cloning/expression region of the coding strand transcribed by T7 RNA polymerase is shown below. The f1 origin is oriented so that infection with helper phage will produce virions containing single-stranded DNA that corresponds to the coding strand. Therefore, single-stranded sequencing should be performed using the T7 terminator primer (Cat. No. 69337-3).

pET-28a(+) sequence landmarks	
T7 promoter	370-386
T7 transcription start	369
His•Tag coding sequence	270-287
T7•Tag coding sequence	207-239
Multiple cloning sites ( <i>Bam</i> H I - <i>Xho</i> I)	158-203
His•Tag coding sequence	140-157
T7 terminator	26-72
<i>lac</i> I coding sequence	773-1852
pBR322 origin	3286
Kan coding sequence	3995-4807
f1 origin	4903-5358

The maps for pET-28b(+) and pET-28c(+) are the same as pET-28a(+) (shown) with the following exceptions: pET-28b(+) is a 5368bp plasmid; subtract 1bp from each site beyond *Bam*H I at 198. pET-28c(+) is a 5367bp plasmid; subtract 2bp from each site beyond *Bam*H I at 198.



```

pET upstream primer #69214-3
AGATCTCGATCCCGCGAAATTAATACGACTCACTATAGGGGAATTGTGAGCGGATAACAATTCGCCCTAGAAATAATTTGTTAACTTTAAGAAGGAGA
TATACCATGGGCAGCAGCCATCATCATCATCACAGCAGCGGCCTGGTGC CGCGCGGCAGCCATATGGCTAGCATGACTGGTGGACAGCAA
MetGlySerSerHisHisHisHisHisHisHisSerSerGlyLeuValProArgGlySerHisMetAlaSerMetThrGlyGlyGlnGln
...GGTGGGATCCGAATTCGAGCTCCGTCGACAAGCTTGC GGCCGCACTCGAGCACCACCACCACCACCCTGAGATCCGGCTGCTAACAAAGCCC pET-28a(+ )
...GlyArgAspProAsnSerSerSerValAspLysLeuAlaAlaLeuGluHisHisHisHisHisHisEnd
...GGTGGGATCCGAATTCGAGCTCCGTCGACAAGCTTGC GGCCGCACTCGAGCACCACCACCACCACCCTGAGATCCGGCTGCTAACAAAGCCC pET-28b(+ )
...GlyArgIleArgIleArgAlaProSerThrSerLeuArgProHisHisSerSerThrThrThrThrGluIleArgLeuLeuThrLysPro...
GAAAGGAAGCTGAGTTGGCTGCTGCCACCGCTGAGCAATAACTAGCAATAACCCCTTGGGGCCTCTAAACGGGCTTGAGGGGTTTTTTG
T7 terminator primer #69337-3
    
```

**pET-28a-c(+) cloning/expression region**

# pET-28a(+) Restriction Sites

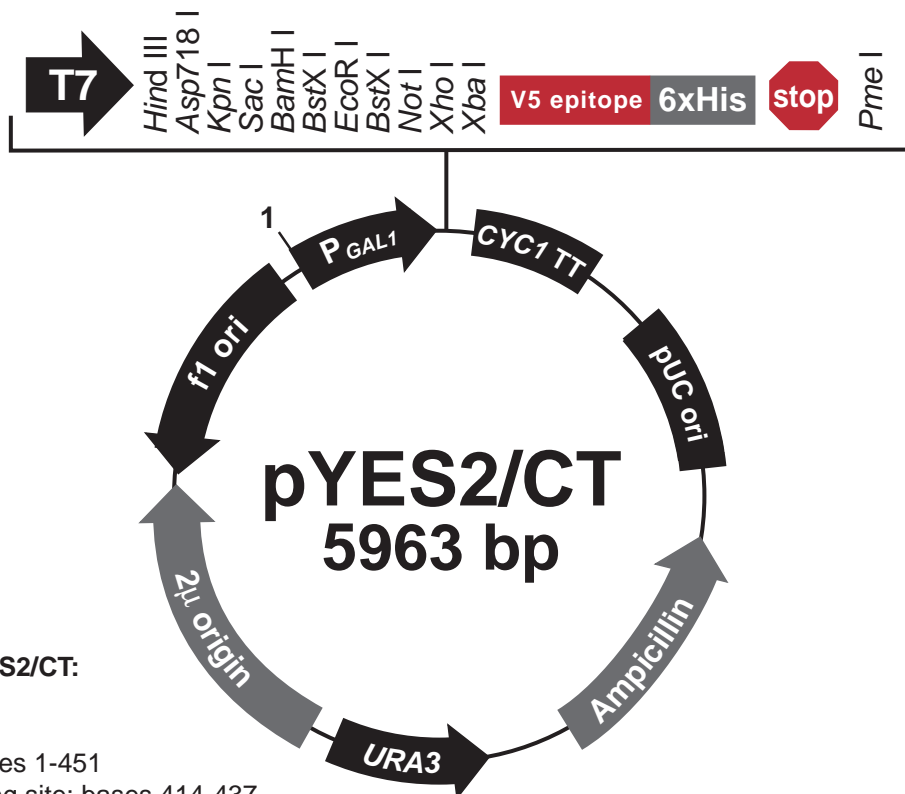
Enzyme	# Sites	Locations
AccI	2	180 2994
AccIII	7	890 1618 1949 2733 2874 3176 4967
Acil	77	
AflIII	2	1123 3224
AluI	22	
AlwI	13	
Alw21I	7	159 190 623 1107 2218 3042 3542
Alw44I	3	1103 3038 3538
AlwNI	1	3640
ApaI	1	1334
ApaBI	1	807
ApoI	6	192 1398 4039 4223 4929 4940
AvaI	2	158 4298
AvaII	5	1675 2051 2139 2230 2509
BamHI	1	198
BanI	9	253 445 466 580 1043 1762 1892 2018 5164
BanII	6	190 507 521 1334 4081 5202
BbsI	4	1269 1608 1982 2342
BbvI	27	
BccI	14	
Bce83I	6	21 1937 2107 3315 3613 3854
BceII	6	642 983 1610 3726 4745 5153
BcgI	9	160 194 228 1415 1449 1949 1983 2801 2835
BclI	1	1137
Bfal	7	70 232 336 2238 3719 4026 5278
BglI	1	2187
BglII	1	401
BmgI	1	1332
BpmI	4	961 1450 2084 2751
Bpu10I	2	2330 4443
Bpu1102I	1	80
BsaAI	2	2976 5127
BsaBI	3	400 406 2421
BsaHI	5	446 467 581 1080 1763
BsaJI	10	57 296 560 566 1758 2196 3384 4297 4298 4699
BsaWI	7	2 1442 1945 2413 3430 3577 4561
BsaXI	2	1782 5075
Bsbl	2	2940 5034
BscGI	11	
BsGI	3	974 1174 2384
Bsil	1	3397
BsiEI	5	169 1908 3140 3564 4426
BsII	23	
BsmI	2	4310 4387
BsmAI	6	820 1225 1351 1738 2865 4442
BsmBI	3	1738 2865 4442
BsmFI	4	584 2125 2495 5342
BsoFI	48	
Bsp24I	12	
Bsp1286I	12	
BspEI	2	2 2413
BspGI	1	2750
BspLU11I	1	3224
BsrI	22	
BsrBI	4	356 3157 4825 5271
BsrDI	2	1170 1536
BsrFI	7	433 442 809 2021 2181 4380 5228
BssHII	1	1534
Bst1107I	1	2995

Enzyme	# Sites	Locations
BstEII	1	1304
BstXI	3	925 1054 1177
BstYI	9	132 198 401 687 1899 2416 3865 3876 4675
Cac8I	40	
CjeI	26	
CjePI	30	
Clal	1	4117
CviJI	86	
CviRI	22	
DdeI	11	
DpnI	21	
DraIII	1	5127
DrdI	3	2917 3332 5082
DrdII	2	846 5132
Dsal	3	296 560 2196
EaeI	4	166 431 563 1797
EagI	1	166
EarI	3	741 3108 4239
Ecil	3	900 3298 3444
Eco47III	3	528 2029 2478
Eco57I	1	3772
EcoNI	2	658 4338
EcoO109I	3	53 556 2230
EcoRI	1	192
EcoRII	10	256 846 1161 1701 1758 3250 3371 3384 4314 4671
EcoRV	1	1573
FauI	17	
FokI	9	1169 1178 2443 2505 2583 2769 2910 4064 4670
FspI	1	2205
GdIII	4	166 431 563 1797
HaeI	6	851 2172 3239 3250 3702 4513
HaeII	14	
HaeIII	24	
Hgal	11	
HgiEI	2	721 3810
Hhal	47	
Hin4I	3	1022 4112 4654
HincII	2	181 1629
HindIII	1	173
Hinfl	18	
HpaI	1	1629
HphI	16	
Maell	14	
MaellI	16	
MbolI	12	
MluI	1	1123
MmeI	7	3439 3623 4068 4262 4624 4633 5104
MnlI	25	
MseI	25	
MslI	6	1175 1463 1493 2211 2406 2797
MspI	29	
MspAII	9	84 264 1153 1723 1816 2815 2934 3566 3811
MwoI	39	
NarI	4	446 467 581 1763
NciI	12	
NcoI	1	296
NdeI	1	238
NgoAIV	4	433 2021 2181 5228
NheI	1	231
NlaIII	26	
NlaIV	22	
NottI	1	166
NruI	1	4083
Nsil	2	4276 4542
Nspl	4	598 2569 2861 3228

Enzyme	# Sites	Locations
Pfi1108I	1	2010
PfiMI	2	705 4689
PleI	9	384 672 759 1555 3118 3603 4658 5062 5070
PshAI	1	1968
Psp5II	1	2230
Psp1406I	4	785 2153 2549 4912
PvuI	1	4426
PvuII	3	1723 1816 2815
RcaI	3	521 3944 4819
RsaI	3	1270 3030 4261
SacI	1	190
Sall	1	179
SapI	1	3108
Sau96I	14	
Sau3AI	21	
ScrFI	22	
SfaNI	23	
SfcI	4	369 3489 3680 5346
Sgfl	1	4426
SgrAI	1	442
Smal	1	4300
SphI	1	598
Sspl	2	4351 4919
StyI	2	57 296
TaqI	15	
TaqII	6	1031 1249 1922 3126 4680 5031
TfiI	9	1802 2104 2274 2778 3199 4337 4393 4565 4656
Thal	38	
Tsel	27	
Tsp45I	7	1304 2132 2663 2876 2971 4573 5300
Tsp509I	20	
Tth111I	1	2969
Tth111III	8	962 1655 2685 3814 3821 3853 4262 4389
UbaII	21	
VspI	5	384 1808 1867 4625 4814
XbaI	1	335
XcmI	3	979 1495 1513
XhoI	1	158
XmnI	2	2782 4815

Enzymes that do not cut pET28a(+):

AatII	AflII	AgeI	AscI	AvrII
BaeI	BsaI	BseRI	BspMI	BsrGI
Bsu36I	DraI	Eam1105I	FseI	KpnI
MscI	MunI	NspV	Pacl	PmeI
PmlI	PstI	RleAI	RsrII	SacII
Scal	SexAI	SfiI	SnaBI	SpeI
SrfI	Sse8387I	StuI	SunI	Swal



**Comments for pYES2/CT:  
5963 nucleotides**

*GAL1* promoter: bases 1-451

*GAL1* forward priming site: bases 414-437

T7 promoter/priming site: bases 475-494

Multiple cloning site: bases 501-594

V5 epitope: bases 607-648

Polyhistidine (6xHis) region: bases 658-675

*CYC1* transcription termination signal: bases 708-961

*CYC1* reverse priming site: bases 725-743

pUC origin: bases 1145-1818

Ampicillin resistance gene: bases 1963-2823 (complementary strand)

*URA3* gene: bases 2841-3948 (complementary strand)

2 $\mu$  origin: bases 3952-5423

f1 origin: bases 5491-5946 (complementary strand)

### 3.2 Lösungen und Chemikalien

1× 100 ml	1 M Glukose	
1× 10 ml	TE	10 mM Tris-HCl pH 8,0 (aus Stammlösung)
		1 mM EDTA pH 8,0 (aus Stammlösung)
50 ml	H <sub>2</sub> O steril	setzt sich jede Gruppe an!
1× 200 ml	0,5 M Imidazol	
1× 100 ml	1 M NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	
1× 30 ml	5 M K-Acetat	
1× 10 ml	1 M K-Acetat pH 7,5	wird gestellt
	5 M NaOH	wird gestellt
	Konz. Essigsäure	wird gestellt
	100 mg/ml Ampicillin	wird gestellt
	100 mM X-Gal	wird gestellt
	5 mg/ml Tetracyclin	wird gestellt
	50 mg/ml Kanamycin	wird gestellt
1× 50 ml	100 mM CaCl <sub>2</sub>	
	0,5 M IPTG	wird gestellt

### 3.3 Bakterien-Medien

#### LB-Medium (300 ml)

1% (w/v) BactoTrypton  
1% (w/v) NaCl  
0,5% (w/v) Yeast Extract

in 200 ml H<sub>2</sub>O lösen,  
pH mit NaOH auf 7,5 einstellen, in einen Meßzylinder überführen  
auf 300 ml auffüllen.

#### LB-Medium mit Agar für Platten (500 ml)

1,5% (w/v) Agar abwiegen und in eine Flasche geben  
dann folgendes abwiegen und in ein Becherglas geben:

1% (w/v) BactoTrypton  
1% (w/v) NaCl  
0,5% (w/v) Yeast Extract

in 400 ml H<sub>2</sub>O lösen,  
pH mit NaOH auf 7,5 einstellen, in einen Meßzylinder überführen  
auf 500 ml auffüllen,  
in die Flasche mit dem Agar geben und einen Rührfisch hinzugeben und autoklavieren.

Für **LB-AIX-Platten**: LB mit Agar nach dem Autoklavieren auf einem Magnetrührer rühren lassen und das Medium auf ca. 50°C abkühlen lassen. Dann unter der Sterilbank Ampicillin (100 µg/ml), X-Gal (0,1 mM) und IPTG (0,2 mM) zugeben und die Platten gießen (mindestens 36).

Für **LB-Kanamycin-Platten**: LB mit Agar nach dem Autoklavieren auf einem Magnetrührer rühren lassen und das Medium auf ca. 50°C abkühlen lassen. Dann unter der Sterilbank das Antibiotikum zugeben (Endkonzentration 50 µg/ml) und die Platten gießen (mindestens 36).

Für **LB-Ampicillin-Platten**: LB mit Agar nach dem Autoklavieren auf einem Magnetrührer rühren lassen und das Medium auf ca. 50°C abkühlen lassen. Dann unter der Sterilbank das Antibiotikum zugeben (Endkonzentration 100 µg/ml) und die Platten gießen (mindestens 12).

**Jede Gruppe** setzt 300 ml LB-Medium (ohne Agar) selbst an und teilt es wie folgt auf:

- 4× 50 ml LB in 250 ml-Erlenmeyerkolben (mit Alufolie verschließen)
- 18× 5 ml LB in Reagenzglasern (mit Alukappen verschließen)

dann wird das Medium autoklaviert.

Für **alle Gruppen** zusammen werden folgende LB-Platten hergestellt:

- LB-AIX-Platten (dazu 2× 500 ml LB mit Agar ansetzen)
- LB-Kan-Platten (dazu 2× 500 ml LB mit Agar ansetzen)
- LB-Amp-Platten (dazu 1× 500 ml LB mit Agar ansetzen)

insgesamt also 5× 500 ml LB mit Agar ansetzen und autoklavieren.

### 3.4 Hefe-Medien

#### **YPD-Medium (Yeast Extract Peptone Dextrose) (100 ml)**

1 g Yeast Extract [= 1% (w/v)]

2 g Peptone [= 2% (w/v)]

2 g Glukose [= 2% (w/v)]

im Zuckerprogramm autoklavieren

#### **SC Minimalmedium (500 ml) (für Platten: 1,5% (w/v) Agar hinzugeben)**

3,35 g Yeast Nitrogen Base (ohne Aminosäuren!) [= 0,67% (w/v)]

0,96 g Yeast Synthetic Dropout Medium Supplement (ohne Uracil für  $ura^-$ -Stämme)

[0,01% (Adenin, Arginin, Cystein, Leucin, Lysin, Threonin, Tryptophan)

0,005% (Asparaginsäure, Histidin, Isoleucin, Methionin, Phenylalanin, Prolin, Serin, Tyrosin, Valin)]

im Zuckerprogramm autoklavieren

**Jede Gruppe** setzt folgendes an:

- 40 ml **YPD** in 250 ml-Erlenmeyerkolben (mit Alufolie verschließen)
- 50 ml **SC** in 250 ml-Erlenmeyerkolben (mit Alufolie verschließen) [für Glukose]
- 500 ml **SC** in 1000 ml-Erlenmeyerkolben (mit Alufolie verschließen)  
[für Galaktose/Raffinose]

Für **alle Gruppen** zusammen wird folgendes hergestellt:

- 100 ml **YPD**
- 500 ml **SC für Platten**: autoklavieren, auf 50°C abkühlen lassen, 50 ml 20% (w/v) Glukose (steril) hinzugeben, Platten gießen und bei 4°C lagern
- 100 ml 20% (w/v) Glukose
- 350 ml 20% (w/v) Galaktose
- 350 ml 10% (w/v) Raffinose

## Kurzüberblick über die Reihenfolge der Versuche im Praktikum

- 3 PCRs (Thiolase, Thiolase  $\gamma$ ,  $\beta$ -Ketoreduktase)
- Fragmente aus dem Gel eluieren
- Fragment auffüllen und phosphorylieren
- Reinigen (mit Kit)
- Ligation mit pBluescript SK+
- Transformation von *E. coli* XL1-Blue
- ausplattieren auf LB-AIX-Platten
- positive weiße Kolonien picken und Kulturen (5 ml) animpfen (ÜN wachsen lassen)
- Isolation der Plasmide
- Testrestriktion
- positive Plasmide auswählen und großen Restriktionssatz durchführen
- Restriktionsfragmente aus dem Gel eluieren
- Ligation mit den entsprechenden Expressionsvektoren
- Transformation von *E. coli* XL1-Blue
- Isolation der Plasmide und Testrestriktion
- Expressionsstämme mit den entsprechenden, positiven Plasmiden transformieren
- Induktionskulturen starten
- denaturierender oder nativer Zellaufschluss
- Isolation von Mitochondrien
- Ni-NTA-Reinigung der His-markierten  $\beta$ -Ketoreduktase
- SDS-Gelelektrophoresen
- Western Blots

## Aufbau der Protokolle

Gliederung:

1. Einleitung (was ist warum gemacht worden; theoretischer Hintergrund)
2. Material und Methoden (beim Material auf das Skript verweisen und eventuelle Änderungen angeben; die Theorie der angewendeten Methoden kurz beschreiben; bei der Durchführung auf das Skript verweisen und eventuelle Änderungen angeben)
3. Ergebnisse (die Ergebnisse darstellen und beschreiben; spezifische Aktivitäten von Enzymen als Säulendiagramme darstellen; Ergebnisse beschreiben!)
4. Diskussion (die Ergebnisse erklären, deuten und diskutieren; ggf. mit den Ergebnissen der anderen Gruppen vergleichen)
5. Literaturverzeichnis (Bücher der Theorie, paper etc.)
6. Anhang (ggf. nicht in den Text eingefügte Bilder o.ä.)

Allgemeines:

im Blocksatz und mit 1,5-fachem Zeilenabstand schreiben

Schriftgröße: 12 (z.B. Times New Roman) oder 11 (z.B. Arial)

Seitenzahlen angeben

keine Zeitwechsel

Abbildungen unten beschriften (Abb. 1: ... → ausführlich!)

Tabellen oben beschriften (Tab. 1: ... → ausführlich!)

bei Abbildungen von Gelen/Filmen die relevanten Markerbanden beschriften

Zitate kenntlich machen, z.B. (Sanger *et al.*, 1977)

Artnamen *kursiv* schreiben (auch bei Restriktionsenzymen (z.B. *EcoRI*))

auf Rechtschreibung achten

**niemals** „man“ schreiben, sondern stets passiv bleiben: „es wurde..., es sind...“

## QIAquick® Spin Handbook

### QIAquick PCR Purification Kit

For purification of PCR products, 100 bp to 10 kb

### QIAquick Nucleotide Removal Kit

For oligonucleotide (17-40mers) and DNA (40 bp to 10 kb) cleanup from enzymatic reactions

### QIAquick Gel Extraction Kit

For gel extraction or cleanup of DNA (70 bp to 10 kb) from enzymatic reactions



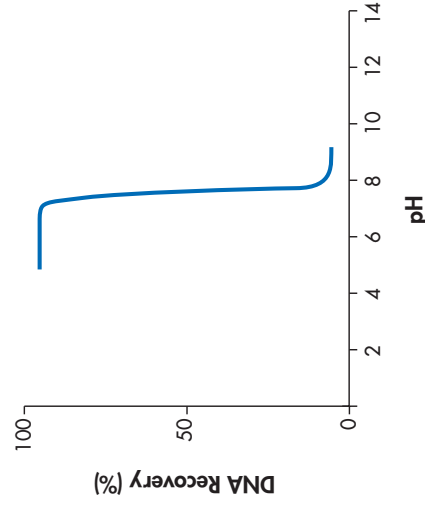
## The QIAquick Principle

The QIAquick system combines the convenience of spin-column technology with the selective binding properties of a uniquely designed silica membrane. Special buffers provided with each kit are optimized for efficient recovery of DNA and removal of contaminants in each specific application. DNA adsorbs to the silica membrane in the presence of high concentrations of salt while contaminants pass through the column. Impurities are efficiently washed away, and the pure DNA is eluted with Tris buffer or water (see page 17). QIAquick spin columns offer 3 handling options — as an alternative to processing the spin columns in a microcentrifuge, they can now also be used on any commercial vacuum manifold with luer connectors (e.g., QIAvac 6S or QIAvac 24 Plus with QIAvac Luer Adapters) or automated on the QIAcube.

### Adsorption to QIAquick membrane — salt and pH dependence

The QIAquick silica membrane is uniquely adapted to purify DNA from both aqueous solutions and agarose gels, and up to 10 µg DNA can bind to each QIAquick column. The binding buffers in QIAquick Spin Kits provide the correct salt concentration and pH for adsorption of DNA to the QIAquick membrane. The adsorption of nucleic acids to silica surfaces occurs only in the presence of a high concentration of chaotropic salts (1), which modify the structure of water (2).

Adsorption of DNA to silica also depends on pH. Adsorption is typically 95% if the pH is  $\leq 7.5$ , and is reduced drastically at higher pH (Figure 1). If the loading mixture pH is  $> 7.5$ , the optimal pH for DNA binding can be obtained by adding a small volume of 3 M sodium acetate, pH 5.0.



**Figure 2. pH dependence of DNA adsorption to QIAquick membranes.** 1 µg of a 2.9 kb DNA fragment was adsorbed at different pHs and eluted with Buffer EB (10 mM Tris-Cl, pH 8.5). The graph shows the percentage of DNA recovery, reflecting the relative adsorption efficiency, versus pH of adsorption.

### Optimized binding buffers for every DNA cleanup task

All QIAquick Spin Kits contain identical QIAquick spin columns but different binding buffers optimized for each specific application:

- Buffer PB in the QIAquick PCR Purification Kit allows the efficient binding of single- or double-stranded PCR products as small as 100 bp and the quantitative (99.5%) removal of primers up to 40 nucleotides. This kit can therefore be used to remove oligo-dT primers after cDNA synthesis or to remove unwanted linkers in cloning experiments.
- Buffer PN in the QIAquick Nucleotide Removal Kit promotes the adsorption of both oligonucleotides  $\geq 17$  bases and DNA fragments up to 10 kb to the membrane.
- Buffer QG in the QIAquick Gel Extraction Kit solubilizes the agarose gel slice and provides the appropriate conditions for binding of DNA to the silica membrane.

All of these buffers are available separately (see ordering information, page 37).

### pH indicator

Binding buffer PB and binding and solubilization buffer QG are specially optimized for use with the QIAquick silica membrane. Buffer QG contains an integrated pH indicator, while an optional pH indicator can be added to Buffer PB allowing easy determination of the optimal pH for DNA binding. DNA adsorption requires a pH  $\leq 7.5$ , and the pH indicator in the buffers will appear yellow in this range. If the pH is  $>7.5$ , which can occur if during agarose gel electrophoresis, the electrophoresis buffer had been used repeatedly or incorrectly prepared, or if the buffer used in an enzymatic reaction is strongly basic and has a high buffering capacity, the binding mixture turns orange or violet (Figure 2). This means that the pH of the sample exceeds the buffering capacity of Buffer PB or QG and DNA adsorption will be inefficient. In these cases, the pH of the binding mixture can easily be corrected by addition of a small volume of 3 M sodium acetate\*, pH 5.0, before proceeding with the protocol. In addition, in the QIAquick Gel



Optimal pH

pH too high

**Figure 3. Indicator enables easy checking of the optimal pH.** Indicator dye in solubilization and binding Buffers QG and PB identifies optimal pH for DNA binding.

\* When working with chemicals, always wear a suitable lab coat, disposable gloves, and protective goggles. For more information, please consult the appropriate material safety data sheets (MSDSs) available from the product supplier.

Extraction Kit procedure, the color of the binding mixture allows easy visualization of any unsolubilized agarose, ensuring complete solubilization and maximum yields. The indicator dye does not interfere with DNA binding and is completely removed during the cleanup procedure. Buffers PB and QG do not contain sodium iodide (NaI). Residual NaI may be difficult to remove from DNA samples, and reduces the efficiency of subsequent enzymatic reactions such as blunt-end ligation.

### Washing

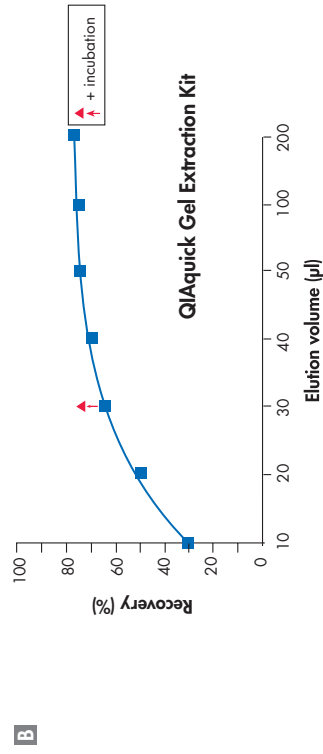
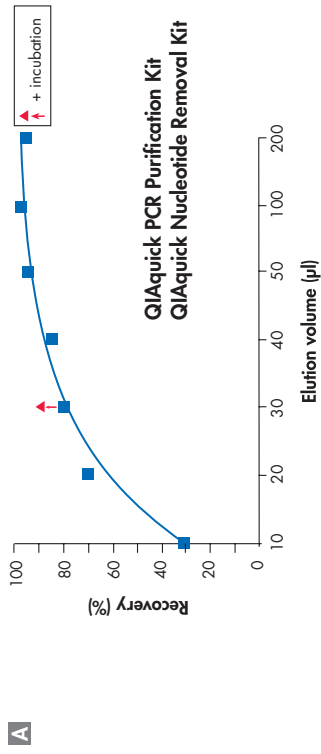
During the DNA adsorption step, unwanted primers and impurities, such as salts, enzymes, unincorporated nucleotides, agarose, dyes, ethidium bromide, oils, and detergents (e.g., DMSO, Tween® 20) do not bind to the silica membrane but flow through the column. Salts are quantitatively washed away by the ethanol-containing Buffer PE. Any residual Buffer PE, which may interfere with subsequent enzymatic reactions, is removed by an additional centrifugation step.

### Elution in low-salt solutions

Elution efficiency is strongly dependent on the salt concentration and pH of the elution buffer. Contrary to adsorption, elution is most efficient under basic conditions and low salt concentrations. DNA is eluted with 50 or 30  $\mu$ l of the provided Buffer EB (10 mM Tris-Cl, pH 8.5), or water. The maximum elution efficiency is achieved between pH 7.0 and 8.5. When using water to elute, make sure that the pH is within this range. In addition, DNA must be stored at  $-20^{\circ}\text{C}$  when eluted with water since DNA may degrade in the absence of a buffering agent. Elution with TE buffer (10 mM Tris-Cl, 1 mM EDTA, pH 8.0) is possible, but not recommended because EDTA may inhibit subsequent enzymatic reactions.

### DNA yield and concentration

DNA yield depends on the following three factors: the volume of elution buffer, how the buffer is applied to the column, and the incubation time of the buffer on the column. 100–200  $\mu$ l of elution buffer completely covers the QIAquick membrane, ensuring maximum yield, even when not applied directly to the center of the membrane. Elution with  $\leq 50$   $\mu$ l requires the buffer to be added directly to the center of the membrane, and if elution is done with the minimum recommended volume of 30  $\mu$ l, an additional 1 minute incubation is required for optimal yield. DNA will be up to 1.7 times more concentrated if the QIAquick column is incubated for 1 minute with 30  $\mu$ l of elution buffer, than if it is eluted in 50  $\mu$ l without incubation (Figure 4, page 14).

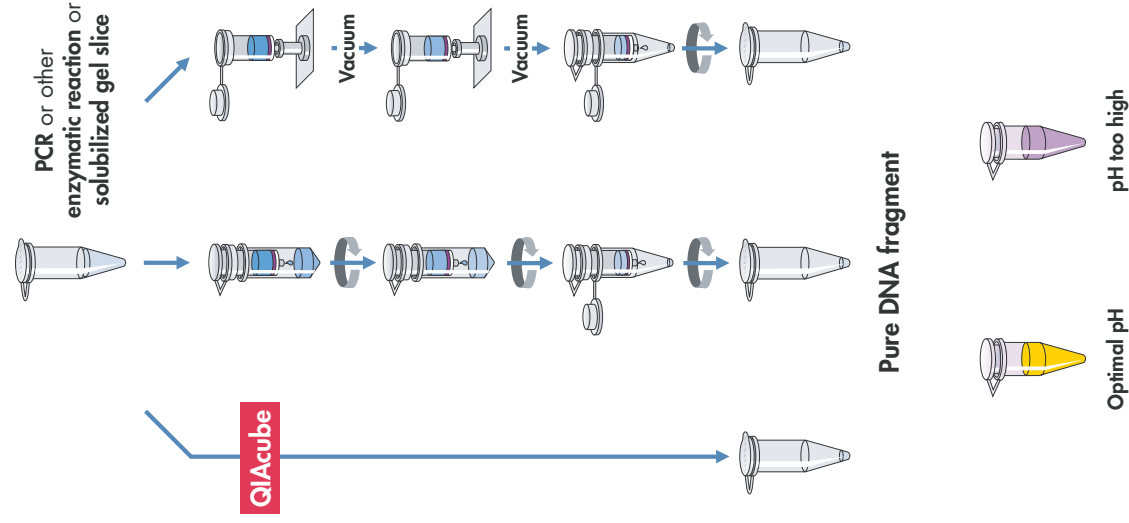


**Figure 4. Highly concentrated DNA.** Effect of elution buffer volume on DNA yield for **A** the QIAquick PCR Purification and QIAquick Nucleotide Removal Kit; **B** the QIAquick Gel Extraction Kit. 5 µg of a 2.9 kb DNA fragment were purified and eluted with the indicated volumes of Buffer EB. 30 µl plus 1 minute incubation on the QIAquick column gives DNA yields similar to 50 µl without incubation, but at a concentration 1.7 times greater.

### Loading dye

Loading dye is provided for analysis of purified DNA samples using electrophoresis. It contains 3 marker dyes (bromophenol blue, xylene cyanol, and orange G) that facilitate estimation of DNA migration distance and optimization of agarose gel run time. Refer to Table 2 (page 15) to identify the dyes according to migration distance and agarose gel percentage and type. Loading dye is supplied as a 5x concentrate; thus 1 volume of loading dye should be added to 5 volumes of purified DNA.

### The QIAquick Procedure



# QIAquick Gel Extraction Kit Protocol

## using a microcentrifuge

This protocol is designed to extract and purify DNA of 70 bp to 10 kb from standard or low-melt agarose gels in TAE or TBE buffer. Up to 400 mg agarose can be processed per spin column. This kit can also be used for DNA cleanup from enzymatic reactions (see page 8). For DNA cleanup from enzymatic reactions using this protocol, add 3 volumes of Buffer QG and 1 volume of isopropanol to the reaction, mix, and proceed with step 6 of the protocol. Alternatively, use the MinElute Reaction Cleanup Kit.

### Important points before starting

- The yellow color of Buffer QG indicates a pH  $\leq 7.5$ .
- Add ethanol (96–100%) to Buffer PE before use (see bottle label for volume).
- All centrifugation steps are carried out at 17,900  $\times g$  (13,000 rpm) in a conventional table-top microcentrifuge at room temperature.

### Procedure

#### 1. Excise the DNA fragment from the agarose gel with a clean, sharp scalpel.

Minimize the size of the gel slice by removing extra agarose.

#### 2. Weigh the gel slice in a colorless tube. Add 3 volumes of Buffer QG to 1 volume of gel (100 mg ~ 100 $\mu$ l).

For example, add 300  $\mu$ l of Buffer QG to each 100 mg of gel. For >2% agarose gels, add 6 volumes of Buffer QG. The maximum amount of gel slice per QIAquick column is 400 mg; for gel slices >400 mg use more than one QIAquick column.

#### 3. Incubate at 50°C for 10 min (or until the gel slice has completely dissolved). To help dissolve gel, mix by vortexing the tube every 2–3 min during the incubation.

**IMPORTANT:** Solubilize agarose completely. For >2% gels, increase incubation time.

#### 4. After the gel slice has dissolved completely, check that the color of the mixture is yellow (similar to Buffer QG without dissolved agarose).

If the color of the mixture is orange or violet, add 10  $\mu$ l of 3 M sodium acetate, pH 5.0, and mix. The color of the mixture will turn to yellow.

The adsorption of DNA to the QIAquick membrane is efficient only at pH  $\leq 7.5$ . Buffer QG contains a pH indicator which is yellow at pH  $\leq 7.5$  and orange or violet at higher pH, allowing easy determination of the optimal pH for DNA binding.

#### 5. Add 1 gel volume of isopropanol to the sample and mix.

For example, if the agarose gel slice is 100 mg, add 100  $\mu$ l isopropanol. This step increases the yield of DNA fragments <500 bp and >4 kb. For DNA fragments between 500 bp and 4 kb, addition of isopropanol has no effect on yield. Do not centrifuge the sample at this stage.

6. **Place a QIAquick spin column in a provided 2 ml collection tube.**
7. **To bind DNA, apply the sample to the QIAquick column, and centrifuge for 1 min.**  
The maximum volume of the column reservoir is 800  $\mu$ l. For sample volumes of more than 800  $\mu$ l, simply load and spin again.
8. **Discard flow-through and place QIAquick column back in the same collection tube.**  
Collection tubes are reused to reduce plastic waste.
9. **Recommended: Add 0.5 ml of Buffer QG to QIAquick column and centrifuge for 1 min.**  
This step will remove all traces of agarose. It is only required when the DNA will subsequently be used for direct sequencing, in vitro transcription, or microinjection.
10. **To wash, add 0.75 ml of Buffer PE to QIAquick column and centrifuge for 1 min.**

**Note:** If the DNA will be used for salt-sensitive applications, such as blunt-end ligation and direct sequencing, let the column stand 2–5 min after addition of Buffer PE, before centrifuging.

11. **Discard the flow-through and centrifuge the QIAquick column for an additional 1 min at 17,900  $\times$  g (13,000 rpm).**

**IMPORTANT:** Residual ethanol from Buffer PE will not be completely removed unless the flow-through is discarded before this additional centrifugation.

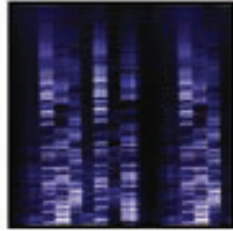
12. **Place QIAquick column into a clean 1.5 ml microcentrifuge tube.**
13. **To elute DNA, add 50  $\mu$ l of Buffer EB (10 mM Tris-Cl, pH 8.5) or water (pH 7.0–8.5) to the center of the QIAquick membrane and centrifuge the column for 1 min. Alternatively, for increased DNA concentration, add 30  $\mu$ l elution buffer to the center of the QIAquick membrane, let the column stand for 1 min, and then centrifuge for 1 min.**

**IMPORTANT:** Ensure that the elution buffer is dispensed directly onto the QIAquick membrane for complete elution of bound DNA. The average eluate volume is 48  $\mu$ l from 50  $\mu$ l elution buffer volume, and 28  $\mu$ l from 30  $\mu$ l.

Elution efficiency is dependent on pH. The maximum elution efficiency is achieved between pH 7.0 and 8.5. When using water, make sure that the pH value is within this range, and store DNA at  $-20^{\circ}\text{C}$  as DNA may degrade in the absence of a buffering agent. The purified DNA can also be eluted in TE (10 mM Tris-Cl, 1 mM EDTA, pH 8.0), but the EDTA may inhibit subsequent enzymatic reactions.

14. **If the purified DNA is to be analyzed on a gel, add 1 volume of Loading Dye to 5 volumes of purified DNA. Mix the solution by pipetting up and down before loading the gel.**

Loading dye contains 3 marker dyes (bromophenol blue, xylene cyanol, and orange G) that facilitate estimation of DNA migration distance and optimization of agarose gel run time. Refer to Table 2 (page 15) to identify the dyes according to migration distance and agarose gel percentage and type.



# PCR clean-up Gel extraction

## User Manual NucleoSpin® Extract II

May 2010 / Rev. 10

**MACHERY-NAGEL**



## 2 Product description

### 2.1 The basic principle

With the **NucleoSpin® Extract II** method, DNA binds to a silica membrane in the presence of chaotropic salt added by Binding Buffer NT. The binding mixture is loaded directly onto **NucleoSpin® Extract II Columns**. Contaminations like salts and soluble macromolecular components are removed by a simple washing step with ethanol Wash Buffer NT3. Pure DNA is finally eluted under low ionic strength conditions with slightly alkaline Elution Buffer NE (5 mM Tris/HCl, pH 8.5).

### 2.2 Kit specifications

- The **NucleoSpin® Extract II** kit is designed for the direct purification of PCR\* products and for the purification of DNA from TAE/TBE agarose gels (two applications in one kit).
- The **NucleoSpin® Extract II** buffer formulation ensures complete removal of primers from PCR\* reactions while small DNA fragments are still bound and purified with high recovery.
- With **NucleoSpin® Extract II** even DNA fragments from PCR\* reaction buffers rich in various detergents can be purified with high recovery.
- The adsorption of DNA to the **NucleoSpin® Extract II** membrane is pH-dependent. Optimal recovery is achieved by using TAE standard gels or reaction mixtures with pH 6 – 8.
- Standard as well as low melting agarose gels can be used.
- The prepared DNA fragments can be used directly in applications like automated fluorescent DNA sequencing, PCR\*, or any kind of enzymatic reaction.

\* PCR is patented by Roche Diagnostics

**Table 1: Kit specifications at a glance**

Parameter	NucleoSpin® Extract II
Elution volume	15 – 50 µl
Binding capacity	15 µg
Time/prep	10 min for 6 preps
Direct purification of amplified DNA	see section 5
Concentration, removal of salts, enzymes, nucleotides, and/or labeling reagents like biotin or radioactive ATP etc.	see section 5 and 7.1
DNA fragments from agarose gels	see section 6
Purification of reaction mixtures <b>without SDS</b>	see section 5
Purification of reaction mixtures <b>containing SDS</b>	see section 7.1
Purification of <b>single stranded DNA</b>	see section 7.2
Removal of small DNA fragments and <b>primer-dimers</b>	see section 2.3

### 2.3 Removal of small DNA fragments and primer-dimers

**NucleoSpin® Extract II** is designed to remove even traces of unused primers, and at the same time, to purify PCR products down to 65 bp. However, in some cases it is necessary to exclude these small fragments, e.g. primer-dimers or side products resulting from unspecific annealing, since they might interfere with your downstream sequencing or cloning applications.

Removal of double stranded DNA > 65 bp can be achieved by diluting an aliquot of Buffer NT with sterile water in an appropriate ratio and then proceeding with the standard protocol (see section 5). Diluting Buffer NT in a certain range lowers the binding efficiency for small fragments without compromising the recovery of larger PCR products. Which dilution ratio to choose depends on the fragment size that is to be purified as well as on the PCR buffer system that is used.

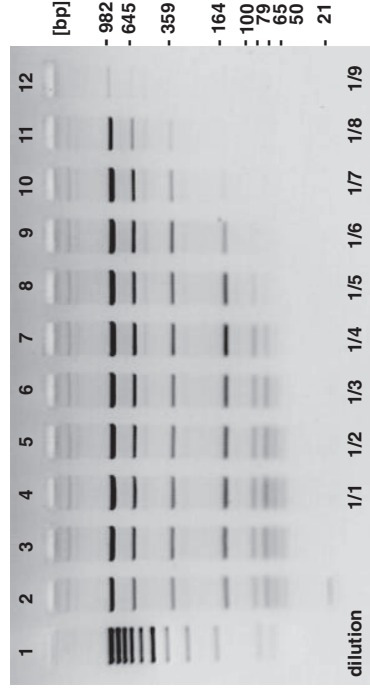
**Influence of fragment size:** *The smaller the fragment in question, the less you have to dilute Buffer NT.*

**Influence of PCR buffer system:** The influence of the PCR buffer system on the removal of small fragments is more complex. Some reaction buffers contain detergents

like Tween or high concentrations of additives like betaine to lower the melting temperature of the DNA template. These substances can usually be found in PCR buffers for high fidelity or long range PCR. They tend to lower the binding efficiency of DNA to the silica membrane and therefore have to be considered when choosing a dilution ratio of Buffer NT. **As a rule of thumb if a PCR buffer system without special additives is used, adding 3 to 5 volumes of water to 1 volume of Buffer NT will lead to removal of small fragments up to 100 bp. Otherwise adding 1 to 3 volumes of water to 1 volume of Buffer NT will be sufficient.**

Therefore for each size of small fragments >65 bp that has to be removed, and for each PCR system, you can determine the appropriate ratio of Buffer NT dilution, in advance.

Figure 1 shows a purification result with a Buffer NT dilution series. Pure Buffer NT (lane 3), as well as Buffer NT plus one volume of water (lane 4), lead to 100% recovery of a PCR fragment ladder (lane 2). More diluted Buffer NT cuts off more and more of the low molecular mass bands. Usually a dilution with 5 volumes of water should be sufficient to eliminate even larger unwanted primer-dimer fragments while purifying the 164 bp fragment with > 90%.



**Figure 1: Purification of**

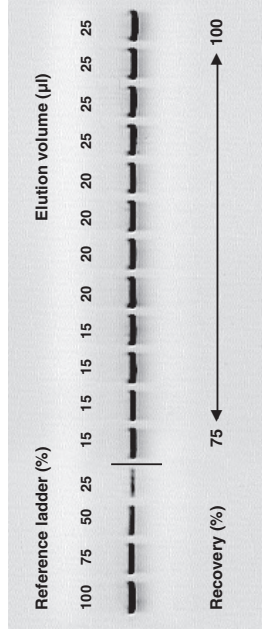
## 2.4 Elution procedures

- For the elution of DNA, one of the following solutions can be used: Buffer NE (supplied, 5 mM Tris/HCl, pH 8.5), TE buffer, pH 8.5, distilled water, pH 8.5 or comparable low-salt buffer (important pH > 7).
- **Note:** EDTA in TE buffer may cause problems in subsequent reactions, and the pH of distilled water should be checked before use to avoid lower recovery. See Table 2 for the correlation between dispensed elution buffer volumes and typical recoveries for the purification of 1 – 5 µg of PCR\* fragments (for gel extraction, recovery is approx. 10% lower).
- With an elution volume of 15 µl of Buffer NE, a typical recovery of 70 – 95% is usually obtained for DNA fragments between 50 – 10,000 bp resulting in highly concentrated eluates (see Table 2, Figure 2). If larger amounts (5 – 15 µg) of DNA have to be purified (e.g., from PCR\* reactions > 100 µl or gel slices > 200 mg), elution with at least 50 µl of Buffer NE is recommended. Primers are not bound.
- Yields of larger fragments (> 5 – 10 kbp) can be increased by using preheated elution buffer (70°C); For elution, add preheated Elution Buffer NE and incubate for 1 – 2 min before collecting eluate by centrifugation. For fragments > 10 kbp the use of our **NucleoTrap<sup>®</sup>PCR** kit is recommended.

**Table 2: DNA recovery with NucleoSpin<sup>®</sup> Extract II**

Fragment length	Elution volume	Recovery
65 bp	15 µl	85%
	25 µl	90%
	50 µl	95%
	100 µl	95%
400 bp	15 µl	85%
	25 µl	95%
	50 µl	100%
	100 µl	100%
700 bp	15 µl	85%
	25 µl	90%
	50 µl	95%
	100 µl	95%
1500 bp	15 µl	85%
	25 µl	85%
	50 µl	90%
	100 µl	95%

\* PCR is patented by Roche Diagnostics



**Figure 2: DNA recovery with different elution volumes**

A PCR sample with a fragment size of 782 bp was purified from a 1% TAE agarose gel according to the standard protocol of **NucleoSpin<sup>®</sup> Extract II** using different elution volumes as shown. All elution volumes were adjusted to 25 µl plus 4.5 µl loading dye. For analysis the mixture was loaded on a 1% TAE agarose gel. The recovery was estimated by comparison with a fragment ladder.

## 5 Protocol for PCR clean-up

The following protocol is suitable for PCR clean-up as well as concentration and removal of salts, enzymes, etc. from samples without SDS.

### Before starting the preparation:

- Check if Wash Buffer NT3 was prepared according to section 3.

#### 1 Adjust DNA binding condition

Mix **1 volume of sample** with **2 volumes of Buffer NT** (e.g., mix 100 µl PCR reaction and 200 µl Buffer NT).

*For sample volumes < 100 µl adjust the volume of the reaction mix to 100 µl using Buffer NT or water.*

*Note: For removal of DNA fragments > 65 bp, dilutions of Buffer NT can be used instead of 100% Buffer NT. Please refer to section 2.3.*



**+ 2 vol NT  
per  
1 vol sample**

#### 2 Bind DNA

Place a **NucleoSpin® Extract II Column** into a Collection Tube (2 ml) and load the sample.

Centrifuge for **1 min** at **11,000 x g**. Discard flow-through and place the column back into the collection tube.



**Load sample**



**11,000 x g  
1 min**

#### 3 Wash silica membrane

Add **700 µl Buffer NT3** to the NucleoSpin® Extract II Column. Centrifuge for **1 min** at **11,000 x g**. Discard flow-through and place the column back into the collection tube.

*Note: Carry-over of chaotropic salt may result in low  $A_{260}/A_{230}$  values. To prevent problems in very sensitive downstream applications or if the entire eluate has to be used, follow the instructions given in section 8.1 ("Suboptimal performance of DNA in sequencing, restriction, or ligation reactions - Carry-over of chaotropic salts").*



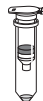
**+ 700 µl NT3**



**11,000 x g  
1 min**

#### 4 Dry silica membrane

Centrifuge for **2 min** at **11,000 x g** to remove **Buffer NT3** completely. Make sure the spin column does not come in contact with the flow-through while removing it from the centrifuge and the collection tube.



*Note: Residual ethanol from Buffer NT3 might inhibit enzymatic reactions. Total removal of ethanol can be achieved by incubating the columns for 2 – 5 min at 70°C prior to elution.*



**11,000 x g**  
**2 min**

#### 5 Elute DNA

Place the NucleoSpin® Extract II Column into a **new** 1.5 ml microcentrifuge tube (not provided). Add **15 – 50 µl Buffer NE** and incubate at **room temperature** (18 – 25°C) for **1 min**. Centrifuge for **1 min** at **11,000 x g**.



**+ 15 – 50 µl NE**

**1 min**  
**RT**

*Note: Yield of larger fragments (>5 – 10 kbp) can be increased by using prewarmed elution buffer (70°C).*



**11,000 x g**  
**1 min**