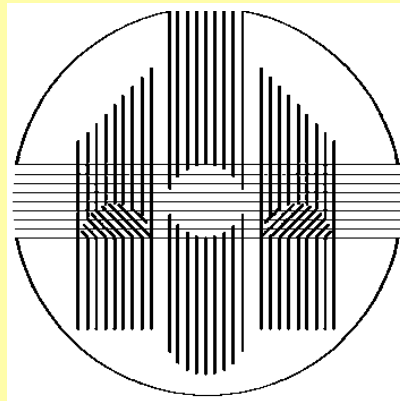


SKRIPT

zum GP-D

ANGEWANDTE MOLEKULARBIOLOGIE

14.-23. März 2005



ZMBH Heidelberg

Steffen Frey, Dagmar Mohr, Dirk Görlich

I	ÜBERBLICK	2
I.1	Thermostabile DNA-Polymerasen.....	3
I.1.1	<i>Pfu- und Pab-DNA-Polymerase</i>	3
I.1.2	<i>Taq- und Tth-DNA-Polymerase.....</i>	3
I.2	Enzyme zur Effizienzverbesserung bei PCR-Reaktionen	4
I.2.1	<i>Pab-Pyrophosphatase</i>	4
I.2.2	<i>Pab-dUTPase.....</i>	4
II	METHODEN.....	5
II.1	Klonierung	5
II.1.1	<i>Theorie.....</i>	5
II.1.2	<i>PCR, Aufreinigung der PCR-Produkte</i>	9
II.1.3	<i>Restriktionsverdau, Vektor-Dephosphorylierung.....</i>	11
II.1.4	<i>Gelextraktion</i>	12
II.1.5	<i>Ligation</i>	13
II.1.6	<i>Elektrotransformation der Ligationsreaktionen in E.coli TOP10F'</i>	14
II.2	Überprüfung des Klonierungserfolgs und Analyse von Einzelklonen	15
II.2.1	<i>Überprüfung des Klonierungs-Erfolgs durch Vergleich der Kolonienzahlen auf Vektorkontrolle und Ligation.....</i>	16
II.2.2	<i>Überprüfung von Einzelkolonien durch Kolonie-PCR.....</i>	17
II.2.3	<i>Überprüfung von Einzelkolonien durch Testexpression</i>	19
II.2.4	<i>Isolierung von Plasmid-DNA aus E.coli und Kontrollverdau</i>	20
II.2.5	<i>Elektro-Transformation der Minipräp-DNA in einen optimierten E.coli-Expressionsstamm</i>	23
II.3	Proteinexpression	24
II.3.1	<i>Prinzipien</i>	24
II.3.2	<i>Expression der DNA Polymerasen aus Pyrococcus furiosus und Pyrococcus abyssi sowie der Pyrophosphatase aus Pyrococcus abyssi.....</i>	27
II.3.3	<i>Expression der DNA Polymerasen aus Thermus aquaticus und Thermus thermophilus</i>	28
II.3.4	<i>Expression der dUTPase aus Pyrococcus abyssi.....</i>	29
II.4	Affinitätschromatographie	30
II.4.1	<i>Theorie.....</i>	30
II.4.2	<i>Reinigung der exprimierten Proteine</i>	39
II.5	Assays zur Bestimmung der Aktivität der aufgereinigten Enzyme	42
II.5.1	<i>DNA-Polymerasen.....</i>	43
II.5.2	<i>Pab-Pyrophosphatase</i>	45
II.5.3	<i>Pab-dUTPase.....</i>	47
III	ANHÄNGE	49
III.1	Puffer und Reagenzien	49
III.2	Glossar.....	52

I ÜBERBLICK

Eines der grundlegenden Erfordernisse moderner biochemisch und molekularbiologisch arbeitender Laboratorien ist die Verfügbarkeit gereinigter Enzyme mit definierter Aktivität. Das Praktikum „Angewandte Molekularbiologie“ bietet einen Überblick über typische Schritte, die zur Erzeugung solcher aufgereinigter und aktiver Enzympräparationen nötig sind. Im Rahmen dieses Praktikums sollen aus unterschiedlichen Organismen für den molekularbiologischen Einsatz interessante Enzyme kloniert, exprimiert, aufgereinigt und funktionell charakterisiert werden. Die einzelnen behandelten Enzyme werden im Folgenden vorgestellt:

Eine der wichtigsten molekularbiologischen Methoden ist die Polymerase-Kettenreaktion (PCR, *polymerase chain reaction*). Die PCR beruht auf der zyklischen Abfolge von DNA-Synthese und thermischer Denaturierung der DNA (d.h. Trennung der komplementären DNA-Stränge). Wegen des thermischen Denaturierungsschrittes bei Temperaturen von 92-98°C sind für diese Reaktion nur thermostabile Enzyme geeignet. Im Rahmen dieses Praktikums sollen die thermostabilen DNA-Polymerasen aus *Pyrococcus furiosus* (*Pfu*), *Pyrococcus abyssi* (*Pab*) *Thermus aquaticus* (*Taq*) und *Thermus thermophilus* (*Tth*) sowie zwei Enzyme zur Verbesserung der DNA-Ausbeute in PCR-Reaktionen - eine thermostabile Pyrophosphatase (PPase) und eine 2'-Desoxyuridin-5'-triphosphat-Pyrophosphohydrolase (dUTPase) aus *Pyrococcus abyssi* - ausgehend von genomischer DNA kloniert und aufgereinigt werden.

Beide *Pyrococcus*-Stämme sind extremophilen Organismen: Ihre natürlichen Lebensräume sind heiße schwefelhaltige Vulkanquellen am Meeresgrund in 1500 bis 3000m Wassertiefe. Bei Temperaturen von 90-120°C gedeihen sie optimal. *Thermus*-Stämme werden sowohl in marinen hydrothermalen Systemen als auch in heißen vulkanischen Schwefelquellen angetroffen. Der *Thermus*-Stamm *Thermus aquaticus* wurde zuerst aus einer Quelle im Yellowstone National Park, danach auch in heißen Quellen auf Island isoliert. Unterschiedliche *Thermus*-Stämme können jedoch an vielen Lebensräumen mit hoher Temperatur (55-100°C) und schwach saurem bis alkalischem pH-Wert (pH 5-9) angetroffen werden. Die Eigenschaften der einzelnen Enzyme dieser Organismen reflektieren diese extremen Lebensbedingungen: Sie zeichnen sich durch eine hohe Toleranz gegenüber thermischer Denaturierung sowie eine optimale Enzymaktivität bei Temperaturen über 70°C aus.

I.1 Thermostabile DNA-Polymerasen

I.1.1 Pfu- und Pab-DNA-Polymerase

Die DNA-Polymerasen aus *P. furiosus* und *P. abyssi* haben ein Temperaturoptimum bei 74°C und können ohne signifikante Aktivitätsverluste mehrere Stunden bei über 90°C inkubiert werden. Oberhalb 95°C ist die *Pab*-Polymerase noch deutlich stabiler als die *Pfu*-Polymerase.

Beide Polymerasen sind in der Lage, während der DNA-Synthese falsch eingebaute Nukleotide zu erkennen und diese zu entfernen (*proof-reading* durch 3'-5'-Exonuklease-Aktivität). Sie replizieren DNA daher mit einer äußerst geringen Fehlerrate.

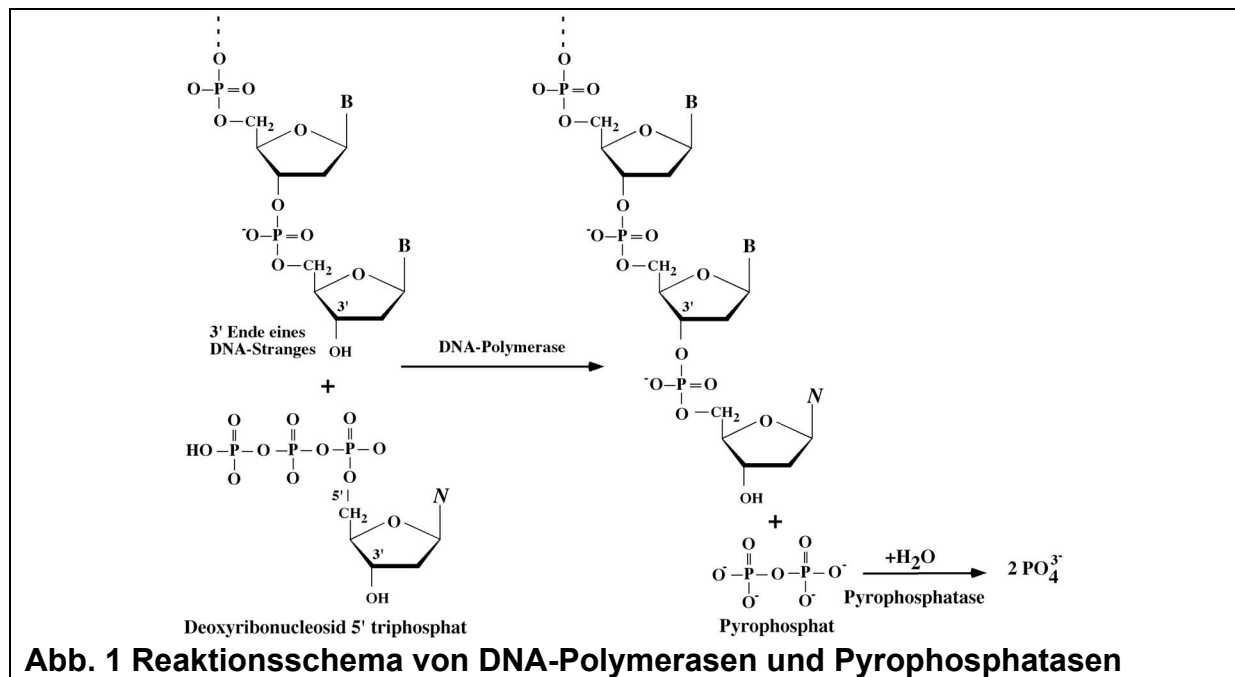


Abb. 1 Reaktionsschema von DNA-Polymerasen und Pyrophosphatasen

I.1.2 Taq- und Tth-DNA-Polymerase

Das Temperaturoptimum der *Thermus*-DNA-Polymerasen liegt bei ca. 72°C. Mit Halbwertszeiten von ca. 20-60 Minuten bei 95°C weisen die Enzyme im Vergleich zu den *Pyrococcus*-Enzymen eine deutlich geringere thermische Stabilität auf. *Thermus*-DNA-Polymerasen besitzen keine 3'-5'-Exonuklease-Aktivität. Die Fehlerrate bei der DNA-Synthese ist daher deutlich höher als bei DNA-Polymerasen mit *proof-reading* Aktivität. Die DNA-Synthese mit *Thermus*-DNA-Polymerasen ist jedoch sehr robust gegenüber Änderungen der Reaktionsbedingungen (Verunreinigungen, Primer- und dNTP-Konzentrationen, Puffer-Bedingungen...). Insbesondere *Taq* DNA Polymerase wird daher häufig als Standard-Enzym für analytische PCR-Reaktionen verwendet. Zusätzlich zur DNA-abhängigen DNA-Synthese ist die *Tth*-Polymerase bei veränderten Puffer-Bedingungen in der Lage, auch DNA von einer RNA-Vorlage zu synthetisieren (reverse Transkriptase-Aktivität). Diese spezielle Eigenschaft kann bei der DNA-Synthese von RNA-Vorlagen mit komplexen Sekundärstrukturen von Vorteil sein, da die Reaktion bei erhöhten Temperaturen ablaufen kann, bei denen Sekundärstrukturen der RNA destabilisiert werden.

I.2 Enzyme zur Effizienzverbesserung bei PCR-Reaktionen

I.2.1 *Pab*-Pyrophosphatase

Als Nebenprodukt der DNA-Synthese entsteht Pyrophosphat. Insbesondere bei hohen Produktmengen führt Pyrophosphat bei PCR-Reaktionen zu einer sukzessiven Hemmung der DNA-Polymerase. Um dieses Problem zu umgehen und auch bei hoher Zyklenzahl eine optimale DNA-Synthese zu erzielen kann dem Reaktionsansatz eine thermostabile Pyrophosphatase (*Pab*-PPase) zugesetzt werden, die anfallendes Pyrophosphat zu Orthophosphat hydrolysiert.

I.2.2 *Pab*-dUTPase

Durch Desaminierung entsteht während der PCR aus dCTP in geringen Mengen dUTP. Dieses dUTP kann zudem bereits in den industriell gefertigten dNTP-Präparationen als Verunreinigung enthalten sein. dUTP kann anstelle von dTTP in neusynthetisierte DNA eingebaut werden und führt zur Synthese von uridinhaltiger DNA.

DNA-Polymerasen aus *Pyrococcus*-Stämmen unterbrechen nach dUTP-Einbau ihre Synthese, weil sie mit hoher Affinität an uridinhaltige DNA binden und dann nicht mehr für die DNA-Synthese zur Verfügung stehen. Dies führt insbesondere bei der PCR-Amplifikation langer DNA-Abschnitte oder bei der PCR mit limitierender *Template*-DNA zu einer starken Verminderung der Produktausbeute. Zur Vermeidung dieses Problems kann dem PCR-Reaktionsansatz eine thermostabile dUTPase zugesetzt werden, die entstehendes dUTP zu Pyrophosphat und dUMP hydrolysiert. dUMP kann nicht in DNA eingebaut werden und führt daher nicht zur Hemmung der DNA-Polymerase.

II METHODEN

II.1 Klonierung

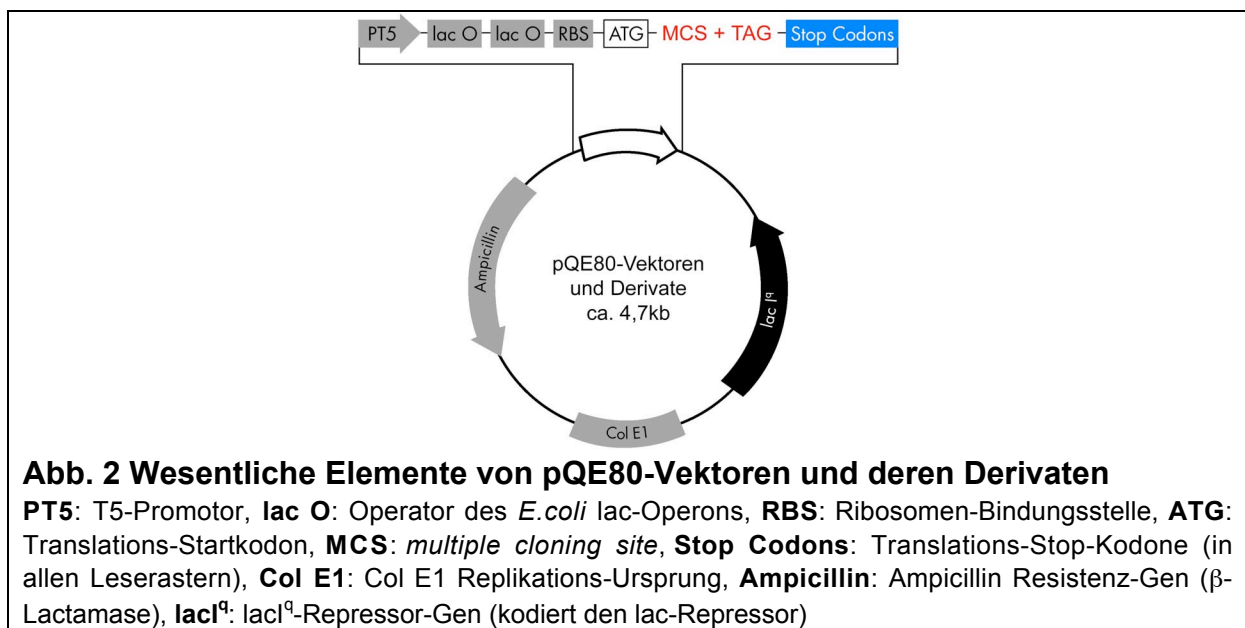
II.1.1 Theorie

Unter Klonierung versteht man im Laborsprachgebrauch die kovalente Verknüpfung von mindestens zwei DNA-Fragmenten (i.A. Vektor und *Insert*) unter Bildung eines neuen (rekombinanten) DNA-Moleküls. Zumeist wird durch eine Klonierung eine aus ihrem genomischen Kontext isolierte kodierende Region eines Gens unter die Kontrolle vektorkodierter regulatorischer Sequenzen gestellt. Dies gestattet die induzierbare Expression des kodierten Proteins in einer gewünschten Wirtszelle (z.B. *E.coli*). Zugleich ermöglicht eine *in-frame* Klonierung mit proteinkodierenden Vektorsequenzen die Expression von Fusionsproteinen. Dies kann genutzt werden, um Proteine mit N- oder C-terminalen Anhängen (*Tags*) zu versehen.

Ziel der im Praktikum durchgeführten Klonierungen ist die Herstellung von Plasmiden, die die induzierbare Expression von Proteinen aus unterschiedlichen Organismen in *E.coli* gestattet.

II.1.1.1 pQE80-Vektoren

Die im Praktikum verwendeten Vektoren sind Derivate des Plasmids pQE80 (Qiagen, Hilden). Die wesentlichen Elemente dieser Vektoren sind in Abb. 2 schematisch aufgeführt (siehe auch Kapitel II.3.: Proteinexpression).

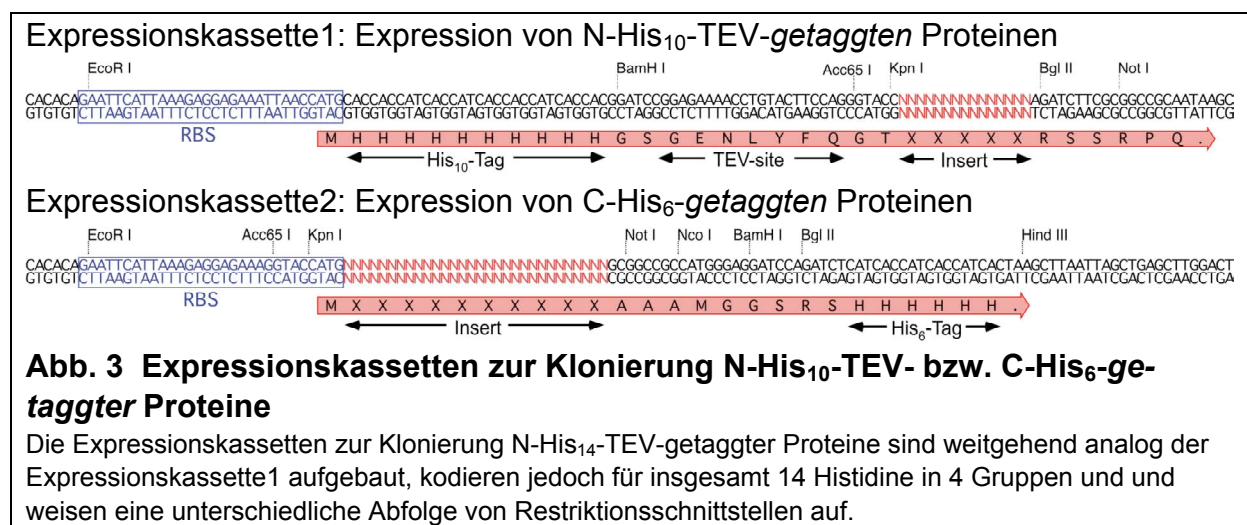


II.1.1.2 Herstellung von Genfusionen, *Tagging*

Je nach Verwendung und gewünschter Aufreinigungsstrategie können klonierte Gene entweder unverändert exprimiert oder mit N- bzw. C-terminalen Anhängen fusioniert werden. Fusionspartner können sowohl kurze Anhänge (*Tags*) als auch ganze Proteine (z.B. GST, GFP...) sein. Alle im Praktikum behandelten Proteine werden zur Erleichterung ihrer Aufreinigung mit *Tags* fusioniert. Je nach Protein kommt einer der folgenden *Tags* zum Einsatz:

- a) **N-His₁₀-TEV**: Auf das Startmethionin folgen 10 Histidine (*His₁₀-Tag*) sowie die Erkennungssequenz für die Protease des *tobacco etch virus* (TEV-site)
- b) **N-His₁₄-TEV**: Auf das Startmethionin folgen in mehreren Gruppen insgesamt 14 Histidinen (*His₁₄-Tag*) sowie die Erkennungssequenz für die Protease des *tobacco etch virus* (TEV-site)
- c) **C-His₆**: am Ende der kodierenden Region folgen sechs C-terminale Histidine

Für die durchgeführten N- und C-terminalen Fusionen stehen Vektoren zur Verfügung, die bereits für den betreffenden *Tag* kodieren. Während der Klonierung wird die kodierende Region des zu klonierenden Gens unter Beibehaltung des Leserasters (*in frame*) mit dem vom Vektor kodierten *Tag* fusioniert. Dies ermöglicht die Expression eines aus *Tag* und Zielprotein bestehenden Polypeptids. Abb. 3 veranschaulicht die Abfolge der für die Klonierung relevanten Sequenzen innerhalb der verwendeten Vektoren.



II.1.1.3 Herstellung von *Insert-DNA*, *Primer-Design*

In der Praxis wird die *Insert-DNA* häufig durch PCR von genomischer DNA oder cDNA eines gewünschten Organismus amplifiziert. Die Sequenz der verwendeten Oligonukleotid-*Primer* definiert dabei den während der PCR amplifizierten Bereich. Zumeist bestehen derartige PCR-*Primer* aus einem 18-25nt langen Bereich mit direkter Homologie zur *Template-DNA* sowie weiteren Nukleotiden am 5'-Terminus, die die gewünschten Restriktionsschnittstellen zur Klonierung einführen (Abb. 4). Soll durch die Klonierung eine N- oder C-terminale Fusion mit einem vektorkodierten Polypeptid erzeugt werden, so muss beim Design der *Primer* darauf geachtet werden, dass nach erfolgreicher Klonierung ein durchgehendes Leseraster entsteht.

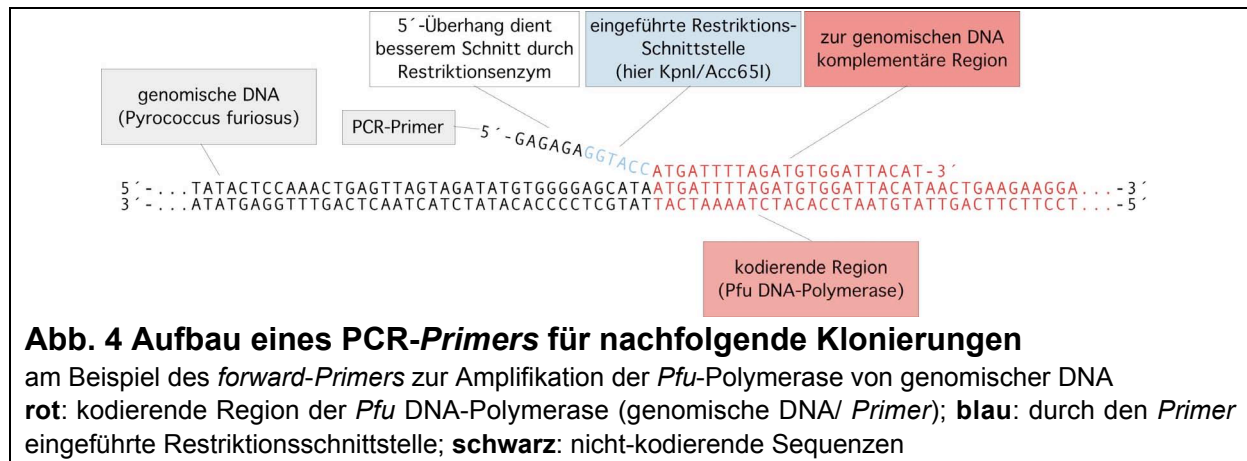
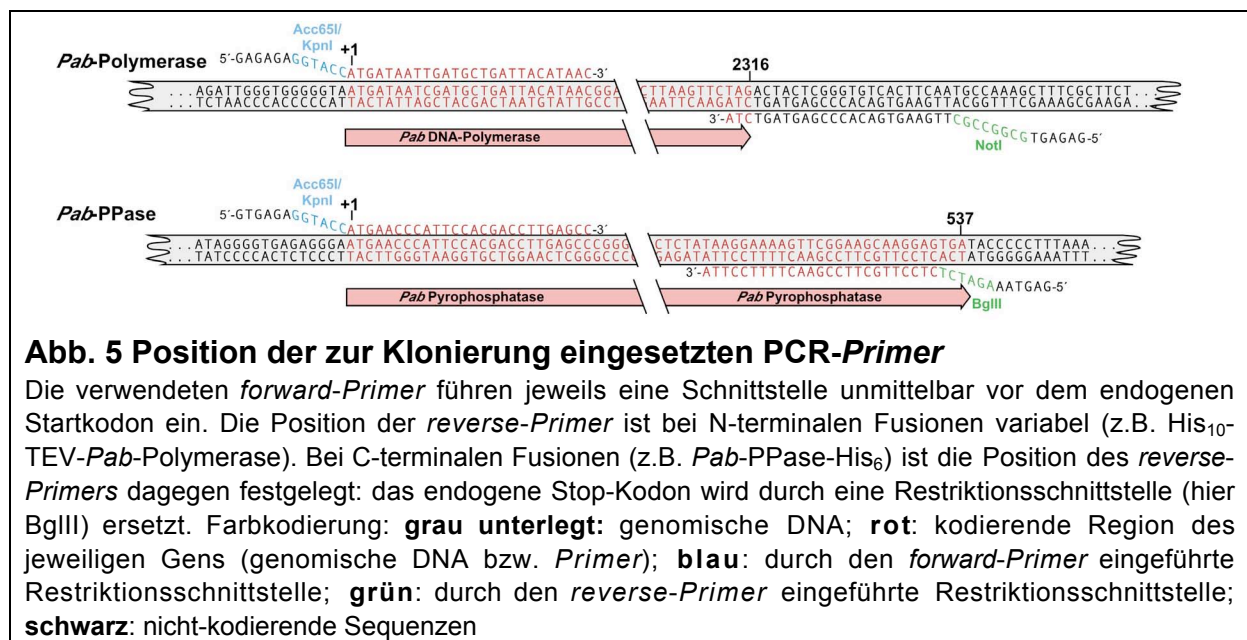


Abb. 5 illustriert am Beispiel der *Pab*-Polymerase sowie der *Pab*-Pyrophosphatase die Hybridisierungs-Positionen der Primer auf der genomischen DNA.



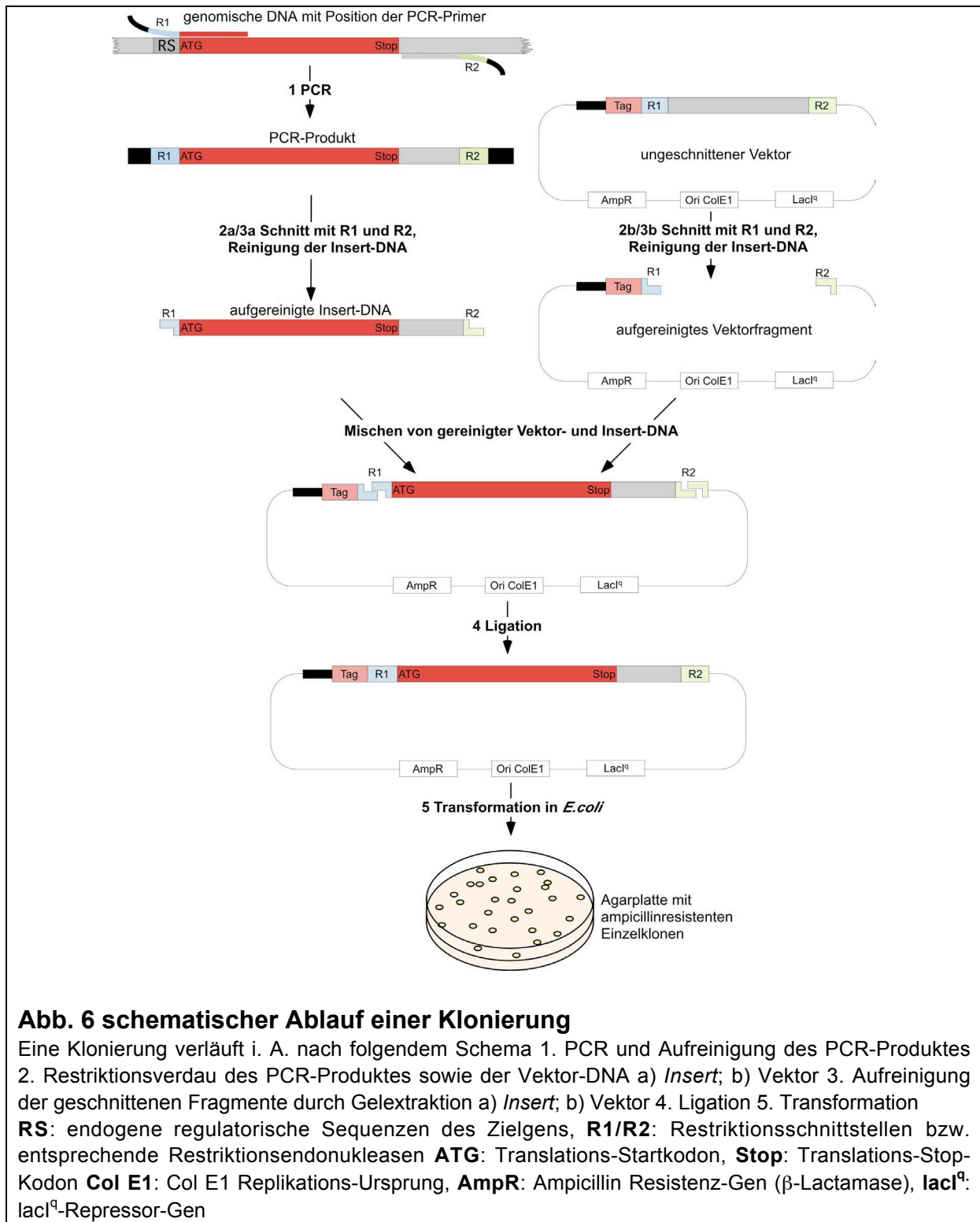
Die Sequenzen der im einzelnen verwendeten *Primer* können Tabelle1 entnommen werden. Die Farbkodierung entspricht Abb. 5.

Tabelle1: Sequenzen der verwendeten Primer

Protein	Primer Name/ Position	Sequenz (5'-3')	Schnittstelle
<i>Pfu</i> -DNA Polymerase	325 F	GAGAGAGGTACCATGATTTTATAGATGTGGATTACAT	KpnI/Acc65I
	326 R	GAGAGAGCGGCCGCACTCCTGGAAAGGTAGCATCTACT	NotI
<i>Pab</i> -DNA Polymerase	323 F	GAGAGAGGTACCATGATAATTGATGCTGATTACATAAC	KpnI/Acc65I
	324 R	GAGAGTGCGGCCGCTTGAAGTGACACCCGAGTAGTCTA	NotI
<i>Taq</i> -DNA Polymerase	431 F	CAACTGCCATGGGTTTCGGGGATGCTG	NcoI
	432 R	GGTCGACTCTAGAGAGATCTATCACTCCT	BglII
<i>Tth</i> -DNA Polymerase	343 F	ATATTAGGTACCATGGAGGCTATGCTTCCGCTCTTT	KpnI/Acc65I
	344 R	GTCTCTAGATCTCCTGGAGGCGTTTCTGAGGGACA	BglII
<i>Pab</i> -PPase	340 F	GTGAGAGGTACCATGAACCCATTCCACGACCTTGAGCC	KpnI/Acc65I
	342 R	GAGTAAAGATCTCTCCTTGCTTCCGAACCTTTCCTTA	BglII
<i>Pab</i> -dUTPase	347 F	GAAGATGGTACCATGCTCCTGCCAGACTGGAAAAT	KpnI/Acc65I
	348 R	GTTGAGGATCCTTAAGATCTCTTGAGAGGACTATT	BamHI

II.1.1.4 schematischer Ablauf einer Klonierung

Der Ablauf einer Klonierung soll anhand des nachfolgenden Schemas veranschaulicht werden (Abb. 6)



II.1.2 PCR, Aufreinigung der PCR-Produkte

II.1.2.1 PCR

Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) dient der Amplifikation der kodierenden Region eines zu klonierenden Gens von einer geeigneten *Template*-DNA. Gleichzeitig werden durch die gewählten *Primer* Erkennungssequenzen für Restriktionsenzyme eingeführt.

Als *Template* kommen im Praktikum die folgenden DNA-Quellen zum Einsatz:

Organismus	Art des Templates	Konzentration	Kopienzahl
<i>Pyrococcus furiosus</i>	genomische DNA	100ng/μl	ca. $5,4 \times 10^7$ /μl
<i>Pyrococcus abyssi</i>	genomische DNA	100ng/μl	ca. $5,4 \times 10^7$ /μl
<i>Thermus thermophilus</i>	genomische DNA	100ng/μl	ca. $5,4 \times 10^7$ /μl
verschiedene	Plasmid-DNA	10-30ng/μl	ca. $1,5-5 \times 10^9$ /μl

Neben der Vervielfältigung der gewünschten Gene von genomischer DNA werden die zu klonierenden Gene parallel von Plasmiden amplifiziert, die die betreffenden genomischen Sequenzen enthalten.

Durchführung:

- o je einen Reaktionsansatz mit genomischer DNA und einen Reaktionsansatz mit Plasmid-DNA in PCR-Reaktionsgefäße pipettieren

	Wasser	Betain	PCR-Puffer	dNTP-Mix	Template	Primer 1	Primer 2	Pol-Mix ⁽¹⁾
Konzentration	---	5M	10x	je 2,5mM	variabel	100μM	100μM	1U/μl
Endkonz.	---	versch.	1x	je 0,2mM	10^4 - 10^8 Kopien	1μM	1μM	10mU/μl
<i>Pfu</i>-Polymerase	117μl	-	15μl	12μl	1,5μl <i>Pfu</i> genomische DNA bzw. 1,5μl Plasmid-DNA	1,5μl 325	1,5μl 326	1,5μl
<i>Pab</i>-Polymerase	117μl	-	15μl	12μl	1,5μl <i>Pab</i> genomische DNA bzw. 1,5μl Plasmid-DNA	1,5μl 323	1,5μl 324	1,5μl
<i>Taq</i>-Polymerase	81μl	36μl	15μl	12μl	1,5μl Plasmid-DNA	1,5μl 431	1,5μl 432	1,5μl
<i>Tth</i>-Polymerase	81μl	36μl	15μl	12μl	1,5μl <i>Tth</i> genomische DNA bzw. 1,5μl Plasmid-DNA	1,5μl 343	1,5μl 344	1,5μl
<i>Pab</i>-PPase	117μl	-	15μl	12μl	1,5μl <i>Pab</i> genomische DNA bzw. 1,5μl Plasmid-DNA	1,5μl 340	1,5μl 342	1,5μl
<i>Pab</i>-dUTPase	117μl	-	15μl	12μl	1,5μl <i>Pab</i> genomische DNA bzw. 1,5μl Plasmid-DNA	1,5μl 347	1,5μl 348	1,5μl

⁽¹⁾ Pol-Mix = *Pfu*-Polymerase, *Pab*-PPase und *Pab*-dUTPase in jeweils optimierten Mengen

- o PCR-Reaktion in Thermocycler durchführen

Schritt	Bezeichnung	<i>Pfu</i> -Pol	<i>Pab</i> -Pol	<i>Taq</i> -Pol	<i>Tth</i> -Pol	PPase	dUTPase
1	Denaturierung	5min@94°C	5min@94°C	2min@96°C	2min@96°C	5min@94°C	5min@94°C
2	Denaturierung	30s@94°C	30s@94°C	30s@96°C	30s@96°C	30s@94°C	30s@94°C
3	Anlagerung	30s@60°C	30s@60°C	30s@60°C	30s@60°C	30s@57°C	30s@57°C
4	Elongation	3,5min@70°C	3,5min@70°C	3,5min@70°C	3,5min@70°C	1min@72°C	1min@72°C
5	finale Elongation	10min@68°C	10min@68°C	10min@68°C	10min@68°C	3min@72°C	3min@72°C
2-4	Zyklenzahl	35	35	35	35	35	35

erwartete Produktgrößen:

	spezifisches Amplifikations- produkt
<i>Pfu</i>-Polymerase	2860bp
<i>Pab</i>-Polymerase	2360bp
<i>Taq</i>-Polymerase	2520bp
<i>Tth</i>-Polymerase	2590bp
<i>Pab</i>-PPase	560bp
<i>Pab</i>-dUTPase	485bp

- o 1%-iges TAE-Agarosegel gießen (ein Gel für alle Gruppen)
- o 3µl der PCR-Reaktion mit 17µl 1x DNA-Auftragspuffer versetzen
- o auf TAE-Agarosegel analysieren

II.1.2.2 Aufreinigung der PCR-Produkte

Die PCR-Produkte können aufgrund der verwendeten Puffer, überschüssigem *Primer* sowie der entstandenen Nebenprodukte nicht direkt zum Restriktionsverdau eingesetzt werden. Während des folgenden Aufreinigungsschrittes werden daher überschüssige *Primer* und niedermolekulare Nebenprodukte der PCR-Reaktion vom spezifischen PCR-Produkt abgetrennt. Dieser Schritt dient zudem der Entfernung von Puffersubstanzen sowie der PCR-Enzyme. Die Aufreinigung erfolgt mit dem Perfectprep® Gel Cleanup Kit (Eppendorf, Hamburg)

Bitte vor Verwendung des *Wash Buffers* kontrollieren, ob der Puffer bereits Ethanol enthält.

- o den verbleibenden PCR-Reaktionsansatz zu 450µl *Binding Buffer* pipettieren, mischen
- o 150µl Isopropanol hinzufügen, mischen
- o Spin-Säulchen in 2ml Auffanggefäß einsetzen
- o DNA-Lösung auftragen
- o 30s bei 4000rpm zentrifugieren
- o Durchfluss nochmals auftragen und zentrifugieren
- o Durchfluss verwerfen, Spin-Säulchen in 2ml Auffanggefäß einsetzen
- o 600µl *Wash Buffer* auftragen
- o 30s bei 4000rpm zentrifugieren
- o Durchfluss verwerfen, Spin-Säulchen in 2ml Auffanggefäß einsetzen
- o 100µl *Wash Buffer* auftragen
- o 2min bei 13000rpm zentrifugieren
- o Durchfluss verwerfen, Spin-Säulchen in frisches 2ml Auffanggefäß einsetzen
- o 30µl *Elution Buffer* direkt auf die Mitte der Membran auftragen
- o 1min bei Raumtemperatur inkubieren
- o 30s bei 13000rpm zentrifugieren
- o weitere 30µl *Elution Buffer* auftragen
- o 1min bei Raumtemperatur inkubieren
- o 30s bei 13000rpm zentrifugieren
- o DNA-Konzentration einer 1:20-Verdünnung (5µl Eluat + 95µl Wasser) am Photometer bestimmen (OD₂₆₀/OD₂₈₀); Referenz: Wasser
- o eluiertes PCR-Produkt mit Wasser auf 40ng/µl verdünnen

II.1.3 Restriktionsverdau, Vektor-Dephosphorylierung

II.1.3.1 Restriktionsverdau

Durch Verdau mit einer definierten Kombination von Restriktions-Endonukleasen werden am PCR-Produkt und an der Vektor-DNA komplementäre Überhänge erzeugt. Die Verwendung unterschiedlicher Restriktionsenzyme für jeweils beide Enden von Vektor- und *Insert*-DNA stellt sicher, dass das *Insert* nur in einer definierten Orientierung in den Vektor ligiert werden kann.

Reaktionsansatz a: PCR-Produkte

Jede Gruppe verdaut Ihr eigenes PCR-Produkt!!!

	Wasser	Puffer	PCR-Produkt	BSA	Enzym1	Enzym2
Ausgangs-Konzentration	---	10x	40ng/µl	10mg/ml	variabel	variabel
Endkonz. / Menge	---	1x	2µg	0,1mg/ml	variabel	variabel
<i>Pfu</i>-Polymerase	37µl	10µl NEB3	50µl	1µl	1µl Acc65I	1µl NotI
<i>Pab</i>-Polymerase	37µl	10µl NEB3	50µl	1µl	1µl Acc65I	1µl NotI
<i>Taq</i>-Polymerase	36µl	10µl NEB3	50µl	1µl	2µl NcoI	1µl BglII
<i>Tth</i>-Polymerase	37µl	10µl NEB3	50µl	1µl	1µl Acc65I	1µl BglII
<i>Pab</i>-PPase	31µl	10µl NEB3	50µl	1µl	4µl Acc65I	4µl BglII
<i>Pab</i>-dUTPase	31µl	10µl BamHI	50µl	1µl	4µl Acc65I	4µl BamHI

Verdau bei 37°C über Nacht

Reaktionsansatz b: Vektoren

	Wasser	Puffer	Vektor	BSA	Enzym1	Enzym2
Ausgangs-Konzentration	---	10x	0,5µg/µl	10mg/ml	variabel	variabel
Endkonz. / Menge	---	1x	5µg	0,1mg/ml	variabel	variabel
<i>Pfu</i>-Polymerase	75µl	10µl NEB3	10µl (329)	1µl	2µl Acc65I	2µl NotI
<i>Pab</i>-Polymerase	75µl	10µl NEB3	10µl (329)	1µl	2µl Acc65I	2µl NotI
<i>Taq</i>-Polymerase	74µl	10µl NEB3	10µl (387)	1µl	2µl NcoI	3µl BglII
<i>Tth</i>-Polymerase	74µl	10µl NEB3	10µl (397)	1µl	2µl Acc65I	3µl BglII
<i>Pab</i>-PPase	74µl	10µl NEB3	10µl (296)	1µl	2µl Acc65I	3µl BglII
<i>Pab</i>-dUTPase	73µl	10µl NEB3	10µl (305)	1µl	2µl Acc65I	4µl BglII

Verdau 60-90min bei 37°C

II.1.3.2 Dephosphorylierung des Vektors

Nur DNA mit einem phosphorylierten 5'-Ende dient in einer Ligase-Reaktion als Substrat. Durch eine Dephosphorylierung des geschnittenen Vektors kann daher die Religation partiell ungeschnittener Vektor-DNA vermindert werden.

- o Zum Reaktionsansatz b (**nicht a !!!**) 2µl Alkalische Phosphatase (Roche, 1U/µl) pipetieren
- o Reaktionsansatz weitere 30min bei 37°C inkubieren
- o Reaktionsansätze bis zur weiteren Aufreinigung bei -20°C einfrieren

II.1.4 Gelextraktion

Die verdauten PCR-Produkte sowie der verdaute Vektor kann aufgrund der verwendeten Puffer sowie der entstandenen Nebenprodukte nicht direkt zur Ligation eingesetzt werden. Durch Gelelution werden daher die Nebenprodukte der Restriktions-Spaltungen abgetrennt. Zusätzlich dient dieser Schritt der Abtrennung verbliebener unspezifischer PCR-Produkte. Die Aufreinigung erfolgt mit dem Perfectprep® Gel Cleanup Kit (Eppendorf, Hamburg)

- o Am Vortag ein 1%-iges TAE-Agarosegel gießen, für jeden Verdau werden drei abgeklebte Spuren eines Agarosegels benötigt.
- o TAE-Agarosegel in Gelkammer einsetzen (Polung beachten!!)
- o Gelkammer bis ca. 2mm über oberes Gelniveau mit 1xTAE-Puffer füllen
- o jeden Verdauansatz mit 15µl 10x DNA-Auftragspuffer versetzen und in Geltasche auftragen
- o in einzelne Geltasche 10µl 1kb-DNA-Marker auftragen
- o Gellauf 30-45min bei 200V, 600mA, 100Watt
- o die **gewünschte Bande** mit einer Rasierklinge ausschneiden

Bandengrößen:

Gruppe	Vektor	Insert
<i>Pfu</i>-Polymerase	4,8kb	2850bp
<i>Pab</i>-Polymerase	4,8kb	2350bp
<i>Taq</i>-Polymerase	4,9kb	2520bp
<i>Tth</i>-Polymerase	4,9kb	2580bp
<i>Pab</i>-PPase	4,7kb	550bp
<i>Pab</i>-dUTPase	4,9kb	475bp

- o Volumen des ausgeschnittenen Gelblocks durch Wiegen bestimmen
- o mit der 3-fachen Menge *Binding Buffer* versetzen
- o zum Lösen der Agarose 5-10min unter Schütteln bei 50°C inkubieren
- o 1 Ausgangsvolumen (Gelblock) Isopropanol hinzufügen, mischen
- o Spin-Säulchen in 2ml Auffanggefäß einsetzen
- o DNA-Agarose-Isopropanol-Lösung auftragen (maximal 600µl, bei größerem Volumen in mehreren Schritten auftragen)
- o 30s bei 4000rpm zentrifugieren
- o Durchfluss nochmals auftragen und zentrifugieren
- o Durchfluss verwerfen, Spin-Säulchen in 2ml Auffanggefäß einsetzen
- o 600µl *Wash Buffer* auftragen
- o 30s bei 4000rpm zentrifugieren
- o Durchfluss verwerfen, Spin-Säulchen in 2ml Auffanggefäß einsetzen
- o 100µl *Wash Buffer* auftragen
- o 2min bei 13000rpm zentrifugieren
- o Durchfluss verwerfen, Spin-Säulchen in frisches 2ml Auffanggefäß einsetzen
- o 30µl *Elution Buffer* direkt auf die Mitte der Membran auftragen
- o 1min bei Raumtemperatur inkubieren
- o 30s bei 13000rpm zentrifugieren
- o DNA-Konzentration einer 1:10-Verdünnung (10µl Eluat + 90µl Wasser) am Photometer bestimmen (OD_{260}/OD_{280}); Referenz: Wasser

II.1.5 Ligation

Die aufgereinigten Fragmente werden durch Ligation kovalent miteinander verknüpft. Durch Verwendung unterschiedlicher Restriktionsenzyme am 5'-bzw. 3'-Ende der Fragmente ist Orientierung des *Inserts* relativ zum Vektor vorgegeben. Zusätzlich zur eigentlichen Verknüpfung von Vektor und *Insert* wird eine Kontrollreaktion (Vektorkontrolle) durchgeführt. Die Vektorkontrolle dient dazu, die Anzahl der durch den *Vektor alleine* bedingten Transformationsereignisse abzuschätzen. Diese haben zur Ursache, dass ein meist geringer Anteil des Vektors auch ohne *Insert* nach der Ligationsreaktion zirkulär geschlossen vorliegt. Dafür können folgende Gründe bestehen:

- *Beide* verwendeten Restriktionsenzyme haben unvollständig geschnitten
- Eines der verwendeten Restriktionsenzyme hat unvollständig geschnitten *und* die Dephosphorylierungsreaktion verlief ineffizient
- Während der Ligation wurden nicht-komplementäre DNA-Enden miteinander verknüpft

Durchführung

- o Berechnung der benötigten DNA-Mengen

pro Ligation werden 30fmol Vektor und 60fmol der Insert-DNA benötigt

	benötigte DNA-Menge (fmol)	DNA-Konzentration (ng/μl)	benötigte DNA-Menge (μl)
Vektor	30fmol (20ng/kb)		
Insert	60fmol (40ng/kb)		

- o Reaktionsansätze vorbereiten:

	Kontrolle Vektor alleine	Ligation Vektor + Insert
Wasser		
Vektor		
Insert	----	
gesamt	5μl	5μl

- o DNA-Gemische 5min bei 45°C erhitzen
- o auf Eis 2xLigase-Mix für 2,5 Reaktionen vorbereiten:

	Ausgangs- Konzentration	End- Konzentration	Volumen/ Reaktion	für 2,5 Reaktionen
Wasser	---	---		
Ligase-Puffer	10x	2x		
T4-DNA Ligase	60ng/μl	12ng/μl		

- o Reaktionsansätze mit je 5μl kaltem 2x-Ligase-Mix mischen
- o durch mehrmaliges auf- und abpipettieren mischen
- o kurz an zentrifugieren
- o 30min bei 37°C inkubieren

II.1.6 Elektrotransformation der Ligationsreaktionen in *E.coli* TOP10F'

Die in der Ligation entstandene zirkularisierte DNA wird in durch Elektroporation in kompetente *E.coli*-Zellen transformiert. Einzelne *E.coli*-Zellen mit aufgenommenen Plasmiden wachsen zu Einzelkolonien heran. Der verwendete Stamm TOP10F' zeichnet sich insbesondere durch die Deletion der Gene für Endonuklease A1 (EndA1) und der Rekombinase A1 (RecA1) aus. Diese Mutationen führen zu einem verminderten unspezifischen Abbau der isolierten DNA sowie zu einer verminderten Rate unspezifischer rekombinierter Plasmide. Daneben trägt TOP10F' das F'-Episom, das Tetracyclin-Resistenz vermittelt und den LacI^q-Repressor kodiert. Das F'-Episom erleichtert dadurch die Klonierung toxischer Genen unter Kontrolle IPTG-induzierbarer Promotoren.

Durchführung:

Vorsicht: **unnötiges pipettieren aufgetauter Zellen vermeiden!!!**

- o ein Aliquot elektrokompente *E.coli* Stamm TOP10F' auf Eis auftauen (5-10min)
- o zwei Elektroporationskuvetten auf Eis kühlen
- o 1µl jedes Ligationsansatzes in je ein vorbereitetes Eppendorf-Tube pipettieren
- o Eppendorf-Tubes auf Eis kühlen
- o je 45µl der aufgetauten Zellsuspension **vorsichtig** zur vorgelegten DNA in die Eppendorf-Tubes pipettieren, **kurz** mit der Pipettenspitze mischen und mit der gleichen Spitze unter Vermeidung von Blasen an den inneren Rand einer vorgekühlten Elektroporationskuvette pipettieren
- o Zellsuspension/DNA-Mischung auf den Boden der Kuvette schütteln
- o Elektroporationskuvette äußerlich mit einem Papiertuch trocknen und mit einer Elektroporationsapparatur (BioRad MicroPulserTM) im **Programm EC2 (!)** transformieren. Die Zeitkonstante sollte über 4,8 liegen!!! Bei Zeitkonstanten unter diesem Wert ist die gesamte Prozedur zu wiederholen.
- o Zellsuspension mit je 1ml 2YT-Medium mit 2% Glukose aufschwemmen und in ein beschriftetes Rundboden-Plastiktube überführen
- o 60-**90min** bei 37°C auf einem Rad inkubieren
- o je 20µl und 200µl auf selektiven Platten (2YT/Glukose/Ampicillin) ausplattieren
- o über Nacht bei 37°C im Wärmerraum inkubieren

II.2 Überprüfung des Klonierungserfolgs und Analyse von Einzelklonen

Der Erfolg einer Klonierung lässt sich Anhand verschiedener – sich ergänzender und zum Teil redundanter – Methoden abschätzen bzw. untersuchen. Dazu zählen:

- 1) Der **Vergleich der Kolonienzahlen auf Vektorkontrolle und Ligation** bietet eine grobe Abschätzung des Klonierungserfolgs
- 2) Eine **Kolonie-PCR** liefert Aufschluss darüber, ob eine Einzelkolonie Plasmide mit dem richtigen *Insert* in richtiger Orientierung enthält.
- 3) Durch **Testexpression** lässt sich bestimmen, ob die Plasmide einer Einzelkolonie ein *Insert* mit einem durchgehenden Leseraster enthält, das zur Expression des gewünschten Proteins führt.
- 4) Durch **Isolierung des Plasmids** aus Einzelkolonien sowie analytischem **Restriktionsverdau** kann überprüft werden, ob die Erkennungssequenzen der verwendeten Restriktionsendonukleasen während der Ligation erhalten wurden und ob das ligierte *Insert* die richtige Größe hat.
- 5) Durch **Sequenzierung** des isolierten Plasmids kann dessen Identität zweifelsfrei analysiert werden.

Im Praktikum sollen zur Klonierungskontrolle die Methoden 1-4 durchgeführt. Die Gegenüberstellung der Analysen durch die sich ergänzenden Methoden 2-4 soll der Bestimmung positiver Klone dienen. Eine Sequenzierung der klonierten Plasmide wird aus zeitlichen Gründen nicht durchgeführt.

II.2.1 Überprüfung des Klonierungs-Erfolgs durch Vergleich der Kolonienzahlen auf Vektorkontrolle und Ligation

Die Anzahl der zählbaren Kolonien nach Ligation von Vektor *und Insert* im Verhältnis zur Kolonienzahl nach Ligation des Vektors *ohne Insert* ist ein Maß für die Qualität der Klonierung und bestimmt die Anzahl Einzelkolonien, die auf korrekt ligierte Plasmide zu untersuchen sind. Je höher die Anzahl der Kolonien nach Ligation von Vektor mit *Insert* im Verhältnis zur Vektorkontrolle (Stimulation), desto besser ist die Klonierung. Dementsprechend verringert sich die Anzahl der zu untersuchenden Einzelkolonien mit steigender Stimulation. Bei gelungenen Klonierungen sollten auf Ligationsplatten folglich deutlich mehr Kolonien wachsen als auf den Vektorkontrollplatten. Optimale Klonierungen führen i.A. zu 10- bis über 100-facher Stimulation.

Stimulation	zu analysierende Einzelkolonien
< 1 bis 1,5	15
1,5 bis 2	10
2 bis 5	8
> 5	5
>10	3

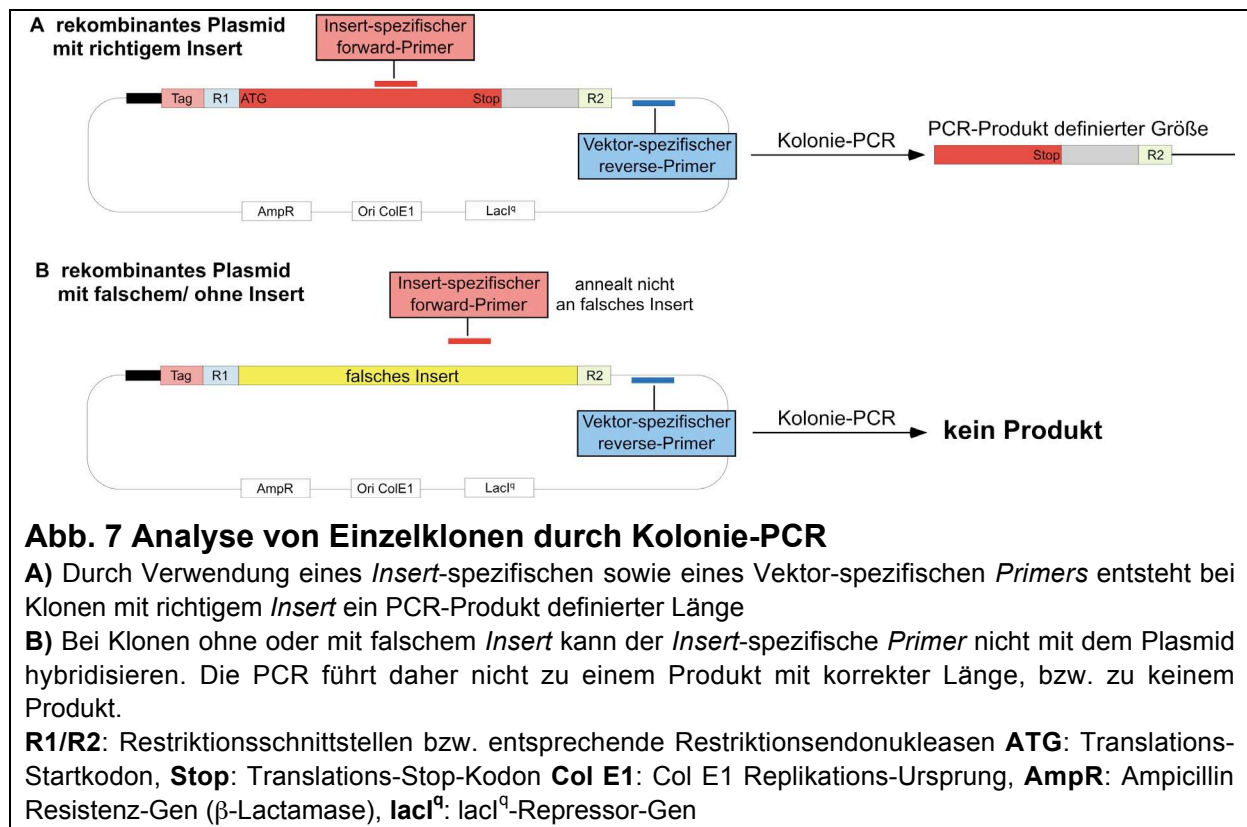
Diese Methode dient ausschließlich der *Abschätzung* des *voraussichtlichen* Klonierungserfolgs, lässt aber naturgemäß keine Rückschlüsse darauf zu, *welche* Einzelkolonien ein korrekt ligiertes Plasmid beinhalten.

Durchführung:

- o Kolonienzahlen auf Vektorkontroll- und Ligationsplatten auszählen bzw. abschätzen

II.2.2 Überprüfung von Einzelkolonien durch Kolonie-PCR

Die Kolonie-PCR ist eine effiziente Methode zur Überprüfung einer Einzelkolonie auf Plasmide mit korrektem *Insert*. Als *Template*-DNA dient hierbei Plasmid-DNA, die durch thermische Zerstörung der *E.coli*-Zellen freigesetzt und dadurch für die *Primer* sowie die thermostabile Polymerase zugänglich gemacht wird. Im Allgemeinen wird durch die Verwendung eines *Insert*-spezifischen sowie eines Vektor-spezifischen *Primers* sichergestellt, dass nur im Falle einer Klonierung des richtigen *Inserts* in der richtigen Orientierung ein PCR-Produkt definierter Länge entsteht. Die Kolonie-PCR gibt jedoch weder Aufschluss über die Qualität des *Inserts* (Mutationen) noch über die Übergänge zwischen Vektor und *Insert*.



Jede Gruppe bearbeitet eine Kolonie von der Vektorkontrollplatte (Negativkontrolle) sowie eine durch die Stimulationsrate bestimmte Anzahl Kolonien von der Ligationsplatte (s.o.). In einer weiteren Reaktion wird vorbereitete Plasmid-DNA, die das jeweilige *Insert* enthält, als *Template* eingesetzt (Positiv-Kontrolle)

Durchführung:

- o einzelne *E.coli*-Kolonien mit einer gelben Spitze in je 10µl **LB**-Medium (!) mit 100µg/ml Ampicillin resuspendieren
- o je 1µl dieser Zellsuspension als *Template* in einer 25µl-PCR-Reaktion einsetzen
- o **!!!WICHTIG!!!** restliche Zellsuspension aufheben
- o Reaktionsmix ansetzen (je eine Reaktion als Volumenreserve einplanen)

	Ausgangs-Konzentration	End-konzentration	pro Reaktion	für Reaktionen
Wasser	---	---	18,75µl	
Puffer für <i>Taq</i>-Pol.	10x	1x	2,5µl	
dNTP-Mix	je 2,5mM	je 200µM	2,0µl	
<i>Primer1</i> ⁽¹⁾	100µM	1µM	0,25µl	
<i>Primer2</i> ⁽¹⁾	100µM	1µM	0,25µl	
<i>Taq</i>-Polymerase	1U/µl	0,01U/µl	0,25µl	

⁽¹⁾ Die einzusetzenden *Primer* sind der nachfolgenden Tabelle zu entnehmen

einzusetzende *Primer* und erwartete Produktlängen

Gruppe	<i>Primer1</i>	<i>Primer2</i>	Produktlänge
<i>Pfu</i>-Polymerase	356	pQE reverse	938bp
<i>Pab</i>-Polymerase	357	pQE reverse	723bp
<i>Taq</i>-Polymerase	433	pQE reverse	349bp
<i>Tth</i>-Polymerase	433	pQE reverse	405bp
<i>Pab</i>-PPase	340	pQE reverse	628bp
<i>Pab</i>-dUTPase	347	pQE reverse	721bp

- o je 24µl Reaktionsmix in beschriftete 0,2ml-PCR-Tubes vorlegen
- o je 1µl Zellsuspension bzw. 1µl Kontrollplasmid (10ng/µl) zupipettieren
- o PCR-Lauf mit folgenden Parametern (für alle Gruppen gleich):

Schritt	Bezeichnung	Dauer und Temperatur
1	Denaturierung	5min@95°C
2	Denaturierung	30s@95°C
3	Anlagerung	30s@60°C
4	Elongation	1min@72°C
5	finale Elongation	3min@72°C
2-4	Zyklenzahl	28

- o Reaktionsansatz mit 5µl 10x DNA-Auftragspuffer versetzen
- o je 15µl auf einem 1% TAE-Agarose-Gel analysieren
- o Gellauf: 20-30min bei 200V, 600mA, 100W

II.2.3 Überprüfung von Einzelkolonien durch Testexpression

Die klonierten Plasmide dienen der Expression *getaggtter* Zielproteine in *E.coli*. Während einer Testexpression wird untersucht, ob in einer Einzelkolonie durch Induktion des vektrokodierten Promotors ein Protein der vorhergesagten Größe überexprimiert werden kann. Dazu wird auf einem SDS-Polyacrylamidgel die Gesamtprotein-Zusammensetzung induzierter, aus Einzelkolonien hervorgegangener *E.coli*-Kulturen analysiert. Durch Vergleich des Proteinmusters mit Extrakten von Zellen, die ein Plasmid ohne korrektes *Insert* tragen, wird untersucht, ob die analysierten Kulturen ein Protein der vorhergesagten Größe überexprimieren. Das Auftreten einer zusätzlichen Proteinbande der erwarteten Größe zeigt die Entstehung eines durchgehenden Leserasters der richtigen Länge. Dieser Assay ergibt folglich direkt eine Aussage über die erfolgreiche Klonierung und Expression eines gewünschten Proteins. Er liefert jedoch keine Aussage über die Sequenz des *Inserts* sowie mögliche PCR-bedingte Mutationen, soweit diese nicht zu einer Verschiebung des Leserasters führen.

Durchführung:

Animpfen der Übernacht-Kulturen

- o 5µl der restlichen Zellsuspension vom vorigen Teil (Kolonie-PCR) in 5ml **LB**/ 100µg/ml Ampicillin **in Glasröhrchen** animpfen
- o auf Schüttler im 37°C-Raum über Nacht inkubieren

Verdünnung der Übernacht-Kulturen

- o in Kunststoff-Rundbodenröhrchen je 20µl der Kulturen mit 1ml 2YT/ 2% Glukose/ 100µg/ml Ampicillin verdünnen
(**Ausnahme:** *Taq*-Pol- und *Tth*-Pol-Gruppen: 80µl + 1ml frisches Medium)
- o 60min bei 37°C schütteln
- o restliche Kulturen bei 4°C aufbewahren

Induktion/Expression

- o je 10µl 100mM IPTG zugeben (1mM Endkonzentration)
- o weitere 3-4h bei 37°C schütteln

Analyse der Gesamtprotein-Zusammensetzung durch SDS-PAGE

- o OD₆₀₀ bestimmen (1:20-Verdünnung in 2YT)
- o 0,5 OD₆₀₀ abzentrifugieren (13000rpm, 30sek)
- o in 100µl SDS-Probenpuffer resuspendieren
- o 5min bei 95°C inkubieren
- o je 6µl/Spur auf SDS-PAGE-Gel laden (entspricht 30mOD/Spur)
- o 10µl unstained (BR)-Marker laden

Gellauf

- o 45min bei 600V, 50mA, 100W
- o bei zwei Gelen an einer Stromquelle die **Stromstärke** auf 100mA verdoppeln

Coomassie-Färbung

- o Gel auf die benötigte Größe zurechtschneiden
- o Gel in 300ml 3% Essigsäure mit 3ml Coomassie-Lösung 3min aufkochen
- o weitere 2-5min auf Schüttler inkubieren
- o Färbelösung abgießen, Gel mit Wasser waschen
- o 3min in Wasser aufkochen, Papiertuch einlegen
- o zum Entfärben weitere 5-30min auf Wippe inkubieren, evtl. nochmal aufkochen

Erwartete Größen der überexprimierten Proteine bei positiven Klonen

Protein	M _r berechnet (kDa)	M _r beobachtet (kDa)	SDS-Proteingel (%)
His ₁₀ -TEV- <i>Pfu</i> -Polymerase	92,7	~90	8
His ₁₀ -TEV- <i>Pab</i> -Polymerase	92,1	~90	8
His ₁₄ -TEV- <i>Taq</i> -Polymerase	97,8	~97	8
His ₁₄ -TEV- <i>Tth</i> -Polymerase	97,8	~97	8
<i>Pab</i> -PPase-His ₆	21,9	~23	12
His ₁₀ -TEV- <i>Pab</i> -dUTPase	20,4	~21 ⁽¹⁾	12

⁽¹⁾ stabile Trimere laufen bei unzureichender Denaturierung auf SDS-Gelen bei ca. 55kD

II.2.4 Isolierung von Plasmid-DNA aus *E.coli* und Kontrollverdau

Die Isolierung von Plasmid-DNA aus *E.coli*-Kulturen, die aus Einzelkolonien hervorgegangen sind, kann unterschiedlichen Zwecken dienen:

1) Kontrolle der Konservierung von Klonierungs-*Sites*

Durch analytischen Restriktionsverdau der isolierten DNA mit den bereits für die Klonierung verwendeten Restriktionsenzymen kann überprüft werden, ob die Erkennungssequenzen der verwendeten Restriktionsendonukleasen während der Ligation erhalten wurden. Daneben gibt ein derartiger Verdau Aufschluss über die Größe des klonierten *Inserts*. Voraussetzung für eine derartige Analyse ist jedoch, dass die zur Klonierung verwendeten Restriktionssites erhalten bleiben. Dies ist jedoch z.B. bei der Klonierung eines BglII-geschnittenen *Inserts* in einen BamHI-geschnittenen Vektor nicht gegeben!

2) Analyse der Plasmid-DNA durch ein charakteristisches Verdaumuster

Durch Verdau der isolierten DNA mit einem Restriktionsenzym, das häufiger (5-10mal) in der DNA schneidet, untersucht werden, ob der Verdau des isolierten Plasmids die erwarteten, charakteristischen Fragmentgrößen ergibt.

3) Sequenzierung

Aufgereinigte Plasmid-DNA kann als *Template* für die Sequenzierung eingesetzt werden. Die Sequenzierung bietet eine abschließende Qualitätskontrolle für jede Klonierung und stellt unzweideutig die Identität des isolierten Plasmids fest. Aus zeitlichen Gründen kann eine Sequenzierung der Plasmide im Rahmen des Praktikums nicht durchgeführt werden.

4) Konservierung der DNA

Bei geeigneter Lagerung ist gereinigte Plasmid-DNA weitgehend vor Abbau durch Nukleasen geschützt

5) Überführung der Plasmid-DNA in andere *E.coli*-Stämme

Aufgereinigte Plasmid-DNA kann zur Transformation spezieller *E.coli*-Expressionsstämme eingesetzt werden.

II.2.4.1 Minipräparation von Plasmid-DNA

Im Praktikum erfolgt die Plasmidisolierung mit einem Kit der Firma Nucleobond: Die Zellen werden durch alkalische Lyse aufgeschlossen, das Lysat neutralisiert und die zelluläre RNA durch RNaseA verdaut. Zellbruchstücke mit gebundener chromosomaler DNA werden abzentrifugiert und die Plasmid-DNA aus dem löslichen Überstand durch selektive Bindung an eine Matrix (in Form von Spin-Säulchen) isoliert.

Durchführung:

- o je 1,5ml der Übernachtskultur in Eppendorf-Reaktionsgefäß abzentrifugieren (13000rpm, 1min)
- o Überstand abnehmen
- o in gleichem Gefäß 2x je weitere 1,5ml Kultur abzentrifugieren
- o Zellpellet in 375µl Puffer A1 resuspendieren
- o 375µl Puffer A2 zugeben, durch invertieren mischen
- o 5min bei Raumtemperatur inkubieren
- o 450µl Puffer A3 zugeben, durch invertieren mischen
- o 10min bei 13000rpm zentrifugieren
- o 600µl des Überstands in Spinsäulchen (NucleoSpin Plasmid) überführen
- o 30s bei 13000rpm zentrifugieren
- o Durchfluss verwerfen; restlichen Überstand in Spinsäulchen überführen
- o 30s bei 13000rpm zentrifugieren
- o Durchfluss verwerfen; NucleoSpin-Säulchen in 2ml Auffanggefäß einsetzen
- o 600µl Puffer A4 auftragen
- o 30s bei 13000rpm zentrifugieren
- o Durchfluss verwerfen, NucleoSpin-Säulchen in 2ml Auffanggefäß einsetzen
- o 2min bei 13000rpm zentrifugieren
- o Durchfluss verwerfen, NucleoSpin-Säulchen in frisches 1,5ml Eppendorf-Gefäß einsetzen
- o 30µl Puffer AE auftragen
- o 1min bei Raumtemperatur inkubieren
- o 30s bei 13000rpm zentrifugieren
- o 1:20-Verdünnung des Eluates (5µl + 95µl Wasser) photometrisch quantifizieren
- o Minipräp-DNA mit Wasser auf 50ng/µl verdünnen

II.2.4.2 Kontrollverdau der Minipräp-DNA

Durch den durchzuführenden Kontrollverdau soll überprüft werden, ob in der isolierten Plasmid-DNA die zur Klonierung eingesetzten Restriktionsschnittstellen intakt erhalten sind. Zudem soll der Restriktionsverdau eine Aussage über die Größe des klonierten *Inserts* liefern.

Durchführung:

- o Entsprechend der Anzahl der Minipräps **auf Eis** einen 2x Mastermix vorbereiten, in dem alle Komponenten bis auf die Minipräp-DNA vorgelegt werden. Für Positivkontrolle (50ng/μl) und Volumenreserve je eine Reaktion einkalkulieren.

2x Mastermix pro Reaktionsansatz

	Wasser	Puffer	BSA	Enzym1	Enzym2
Ausgangs-Konzentration	---	10x	10mg/ml	variabel	variabel
Endkonz. / Menge	---	1x	0,1mg/ml	variabel	variabel
<i>Pfu</i>-Polymerase	7,4μl	2μl NEB3	0,2μl	0,2μl Acc65I	0,2μl NotI
<i>Pab</i>-Polymerase	7,4μl	2μl NEB3	0,2μl	0,2μl Acc65I	0,2μl NotI
<i>Taq</i>-Polymerase	7,3μl	2μl NEB3	0,2μl	0,2μl NcoI	0,3μl BglII
<i>Tth</i>-Polymerase	7,3μl	2μl NEB3	0,2μl	0,2μl Acc65I	0,3μl BglII
<i>Pab</i>-PPase	7,3μl	2μl NEB3	0,2μl	0,2μl Acc65I	0,3μl BglII
<i>Pab</i>-dUTPase	7,4μl	2μl NEB3	0,2μl	0,2μl Acc65I	0,2μl NotI ⁽¹⁾

⁽¹⁾Ein Kontrollverdau mit BglII oder BamHI ist nicht möglich!!

- o je 10μl Minipräp-DNA bzw. Positivkontrolle (50ng/μl) mit 10μl 2x Mastermix versetzen
- o 60min bei 37°C inkubieren
- o mit 5μl 5x-Ladepuffer versetzen
- o je 15μl auf einem 1%-igen TAE-Agarosegel analysieren
- o Gellauf: 20-30min 200V, 400mA, 100W

erwartete Fragmentgrößen:

	Vektor	Insert
<i>Pfu</i>-Polymerase	4,8kb	2855bp
<i>Pab</i>-Polymerase	4,8kb	2344bp
<i>Taq</i>-Polymerase	4,8kb	2505bp
<i>Tth</i>-Polymerase	4,8kb	2568bp
<i>Pab</i>-PPase	4,7kb	540bp
<i>Pab</i>-dUTPase	4,75kb	648bp

II.2.5 Elektro-Transformation der Minipräp-DNA in einen optimierten *E.coli*-Expressionsstamm

Zur Klonierung wurde der *E.coli*-Stamm TOP10F' verwendet, der eine hohe Qualität isolierter Plasmid-DNA ermöglicht. Im Gegensatz dazu zeichnen sich die verwendeten optimierten *E.coli*-Expressionsstämme insbesondere durch die Deletion der Proteasen OmpT und Lon aus. Diese Deletionen bewirken eine Verminderung des Proteinabbaus während des Zellaufschlusses sowie der Proteinaufreinigung. Einige behandelte Proteine benötigen daneben für ihre optimale Expression eine Stabilisierung ihrer mRNA (Star-Stämme) und/oder eine vermehrte Expression seltener tRNAs (Rosetta). Einzelheiten der verwendeten *E.coli*-Expressionsstämme werden im Kapitel II.3. (Proteinexpression) behandelt.

Durchführung:

- o von einem ausgesuchten positiven Klon 50ng Minipräp-DNA (1µl) in einen für jedes Konstrukt optimierten *E.coli*-Expressionsstamm transformieren (Protokoll analog zu II.1.6.)

eingesetzte *E.coli*-Expressionsstämme

	<i>E.coli</i>-Stamm	Resistenz
<i>Pfu</i>-Polymerase	BL21 DE3 Star Rosetta	Chloramphenicol
<i>Pab</i>-Polymerase	BL21 DE3 Star Rosetta	Chloramphenicol
<i>Taq</i>-Polymerase	DH5α z1 pSB161	Kanamycin
<i>Tth</i>-Polymerase	DH5α z1 pSB161	Kanamycin
<i>Pab</i>-Pyrophosphatase	BL21 DE3 Star Rosetta	Chloramphenicol
<i>Pab</i>-dUTPase	BL21 DE3 Star Rosetta	Chloramphenicol

- o je 200µl auf selektiven Platten ausplattieren
- o 150ml 2YT mit 300µg/ml Ampicillin und (je nach *E.coli*-Stamm) 34µg/ml Chloramphenicol oder 25µg/ml Kanamycin mit je 500µl des Transformationsansatzes animpfen
- o Platten und Kulturen über Nacht bei 37°C inkubieren

II.3 Proteinexpression

II.3.1 Prinzipien

II.3.1.1 Induzierte Expression

Alle Proteine des Praktikums werden in *E.coli* exprimiert. Ziel ist es, die Proteinexpression zu einem bestimmten Zeitpunkt (z.B. in der logarithmischen Phase des Bakterienwachstums) induzieren zu können. Hierzu werden Elemente des Lac Operons genutzt. In diesem stehen die Gene der β -Galaktosidase, Permease und Transacetylase unter der Kontrolle des Lac Operators, einer regulatorischen DNA Sequenz in der 5' Region des Operons (Abb. 8). Die Expression der Gene wird in Abwesenheit eines Induktors durch die Bindung eines Repressors an den Operator verhindert. Bei Zugabe eines Induktors (Lactose, 1,6 Allolactose, IPTG (Abb. 9)) wird die Expression induziert (Abb. 8). Der Induktor bindet den Repressor und induziert eine Konformationsänderung des Repressors. Diese induzierte Konformationsänderung führt zu einer verminderten Affinität zum Operator: der Komplex diffundiert ab. Die Repression ist aufgehoben und die nachfolgenden Gene werden exprimiert.

Im Praktikum werden die Gene der thermostabilen DNA Polymerasen, Pyrophosphatase und dUTPase in einen pQE Vektor kloniert, der diese Gene unter die Kontrolle des Lac Operators stellt. Das Promotor/Operator Element eines pQE Vektors besteht aus einem T5 Promotor, der von der *E.coli* RNA-Polymerase erkannt wird, und aus zwei nachfolgenden Lac Operator Sequenzen. Der lac Repressor (Produkt des *lacI^q* Gens) ist ebenfalls auf dem pQE Vektor kodiert (siehe auch Kapitel II.1.1.1 für Vekorkarte).

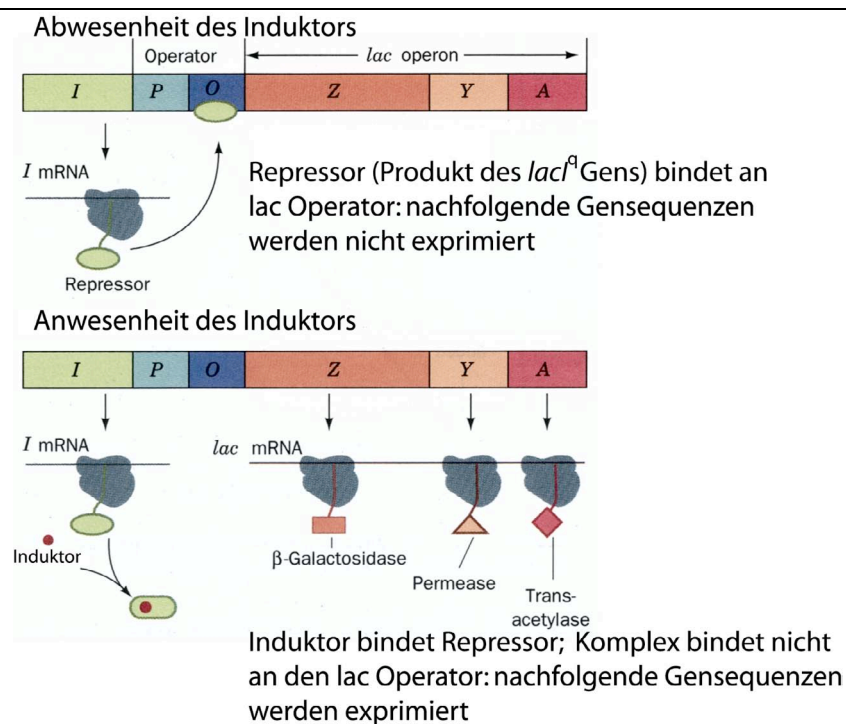
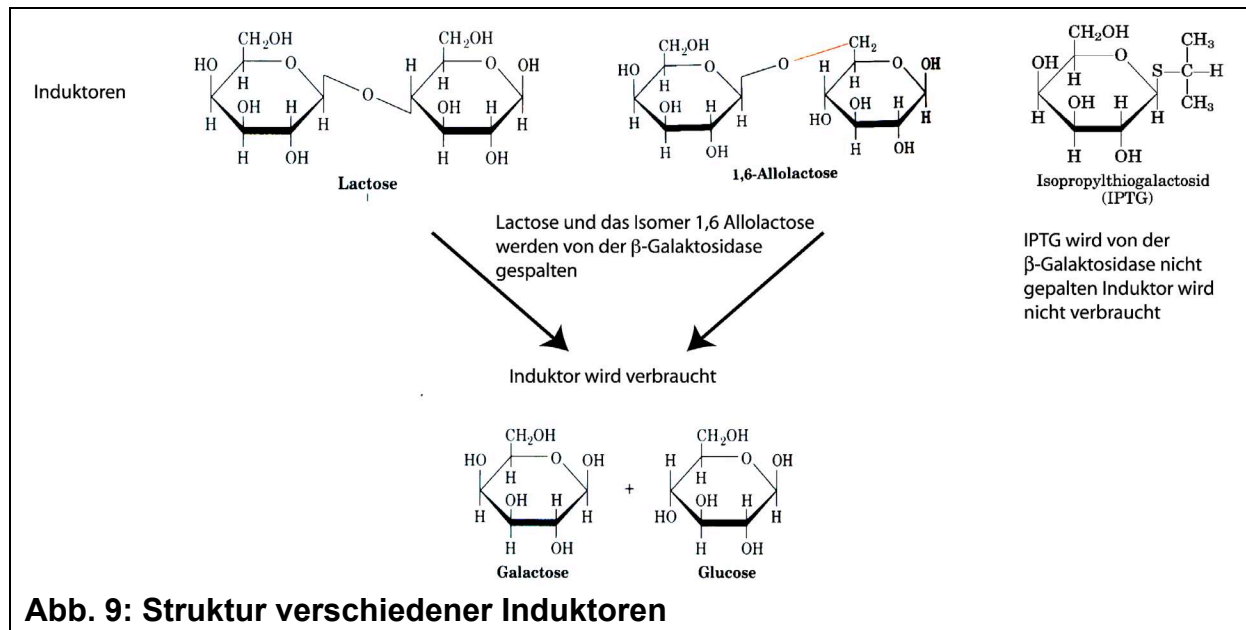


Abb. 8: Regulation des Lac Operons



Das im Praktikum verwendete IPTG ist ein sehr potenter Induktor: er imitiert das natürliche Substrat 1,6 Allolactose, kann aber nicht von der β -Galaktosidase abgebaut werden

II.3.1.2 Expressionsstämme:

Ein Expressionstamm sollte Bedingungen für eine optimale Überexpression bieten. In der folgenden Tabelle sind die Eigenschaften der im Praktikum verwendeten Expressionstämme aufgeführt:

BL21 DE3 Star Rosetta

Nomenklatur	Eigenschaft	Ziel
BL21	Lon + OmpT Protease Defizienz	Reduzierung des Proteinabbaus durch Proteasen
DE3	integrierte λ -Phagen Sequenz, die für die T7 Polymerase unter Kontrolle des lac Operator kodiert	Induktion von Proteinen unter T7 Promotor (wird im Praktikum nicht verwendet)
Star	Mutation in dem Gen für RNase E: prematures Stopkodon führt zur Deletion der C-terminalen Domäne, die zur Degradation von mRNA notwendig ist	erhöhte Stabilität der mRNA
Rosetta	Gene für seltene tRNAs auf einem eigenen Plasmid (Chloramphenicol-Resistenz)	universale Expression, seltene Kodone in <i>E. coli</i> nicht mehr expressionlimitierend

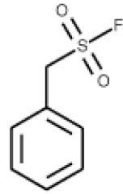
DH5 α z1 pSB161

Nomenklatur	Eigenschaft	Ziel
DH5α	guter Stamm für Plasmid-Präparationen, in Einzelfällen gute Ausbeuten überexprimierter Proteine	
z1	Bakterien-Chromosom kodiert für LacI	reduzierte Hintergrund-expression bei IPTG-induzierbaren Promotoren
pSB161	Gene für seltene Arginin-tRNAs auf einem eigenen Plasmid (Kanamycin-Resistenz)	seltene Arginin-Kodone in <i>E. coli</i> nicht mehr expressionlimitierend

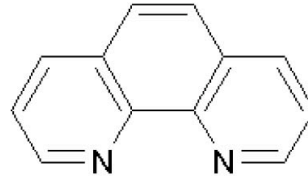
II.3.1.3 Expressionbedingungen

Für eine Proteinexpression können viele Bedingungen verändert/optimiert werden, z.B. Expressionsstamm, Expressionszeit, IPTG Konzentration, Expressions-Temperatur, Koexpression anderer Proteine, Zugabe von Proteaseinhibitoren etc. Eine Optimierung der Expressionsbedingungen findet aus Zeitgründen im Praktikum nicht statt.

Die im Praktikum verwendeten Proteaseinhibitoren sind PMSF und O-Phenanthrolin (Abb. 10).



Phenylmethylsulfonyl fluoride
(PMSF)
Serinproteaseinhibitor



ortho-Phenanthroline
Metallo-Protease Inhibitor

Abb. 10: Proteaseinhibitoren

PMSF inhibiert Serinproteasen durch kovalente Modifikation des aktivierten Serinresten in deren katalytischem Zentrum. Ortho-Phenanthroline ist ein Inhibitor von Metallo-Proteasen. Es chelatiert Zink und andere zweiwertige Schwermetallionen.

II.3.2 Expression der DNA Polymerasen aus *Pyrococcus furiosus* und *Pyrococcus abyssi* sowie der Pyrophosphatase aus *Pyrococcus abyssi*

- o 1l auf 37°C vorgewärmtes Medium (2YT, 2% Glukose, 40mM K₂HPO₄, 300µg/ml Ampicillin, 34µg/ml Chloramphenicol) in einem 5l Schüttelkolben mit Schikane auf eine OD₆₀₀ von 0,1 von einer 100ml-Übernachtskultur animpfen
- o Angeimpfte Kultur auf dem Schüttler im 37°C Raum schütteln und Bakterienwachstum durch Aufnahme einer Wachstumskurve (Messung OD₆₀₀) kontrollieren
- o 1ml Bakterienkultur bei einer OD₆₀₀ von 0,5 abnehmen, 1min bei 13000rpm in der Tischzentrifuge zentrifugieren, Überstand verwerfen, Pellet in 50µl Protein-Probenpuffer aufnehmen, 5µl auf Gel auftragen (Kontrolle: nicht-induzierte Zellen)
- o 200µl einer 1M IPTG-Lösung (Endkonzentration im Medium: 0,2mM) bei einer OD₆₀₀ von 0,5 zugeben (Induktion der Proteinexpression); die Zellen für weitere 3h schütteln; Wachstumskurve (1h Punkte) weiterführen
- o 3h nach Induktion 10ml einer 100mM PMSF Lösung (Endkonzentration 1mM) und (nur bei den Polymerasen) 2,5ml einer 100mM ortho-Phenanthrolin Lösung (Endkonzentration 250µM) als Proteaseinhibitoren zugeben; Kultur in 1000ml-Zentrifugenbecher überführen und bei 4°C mit 4000rpm für 10min zentrifugieren
- o Zellpellet auf Eis in vorgekühltem Extraktionspuffer (*für DNA Polymerasen*: 50mM Na-PO₄ pH7,5, 500mM NaCl, 1mM Imidazol; *für Pyrophosphatase*: 50mM Tris-HCl pH7,5, 200mM NaCl, 5mM MgCl₂, 1mM Imidazol) durch Vortexen und mit Hilfe einer 25ml Pipette resuspendieren. Das Volumen des Extraktionspuffer bezieht sich auf die OD₆₀₀ bei Zellernte. Es wird pro 100 OD₆₀₀ 1ml Extraktionspuffer eingesetzt.
- o Resuspendierte Zellen in Falcon-Röhrchen überführen und in flüssigem Stickstoff einfrieren

II.3.3 Expression der DNA Polymerasen aus *Thermus aquaticus* und *Thermus thermophilus*

- o 1l auf 37°C vorgewärmtes Medium (2YT, 2% Glukose, 40mM K₂HPO₄, 300µg/ml Ampicillin, 50µg/ml Kanamycin) in einem 5l Schüttelkolben mit Schikane auf eine OD₆₀₀ von 0,3 von einer 100ml-Übernachtskultur animpfen
- o Angeimpfte Kultur auf dem Schüttler im 37°C Raum schütteln und Bakterienwachstum durch Aufnahme einer Wachstumskurve (Messung OD₆₀₀) kontrollieren
- o 1ml Bakterienkultur bei einer OD₆₀₀ von 0,8 abnehmen, 1min bei 13000rpm in der Tischzentrifuge zentrifugieren, Überstand verwerfen, Pellet in 80µl Protein-Probenpuffer aufnehmen, 5µl auf Gel auftragen (Kontrolle: nicht-induzierte Zellen)
- o 500µl einer 1M IPTG-Lösung (Endkonzentration im Medium: 0,5mM) bei einer OD₆₀₀ von 0,8 zugeben (Induktion der Proteinexpression); die Zellen für weitere 6h schütteln; Wachstumskurve (1h Punkte) weiterführen
- o 6h nach Induktion 10ml einer 100mM PMSF Lösung (Endkonzentration 1mM) und 2,5ml einer 100mM ortho-Phenanthrolin Lösung (Endkonzentration 250µM) als Proteaseinhibitoren zugeben; Kultur in 1000ml-Zentrifugenbecher überführen und bei 4°C mit 4000rpm für 10min zentrifugieren
- o Zellpellet auf Eis in vorgekühltem Extraktionspuffer 50mM Tris-HCl pH7,5, 50mM Glukose, 1mM EDTA) durch Vortexen und mit Hilfe einer 25ml Pipette resuspendieren. Das Volumen des Extraktionspuffer bezieht sich auf die OD₆₀₀ bei Zellernte. Es wird pro 200 OD₆₀₀ 1ml Extraktionspuffer eingesetzt.
- o Resuspendierte Zellen in Falcon-Röhrchen überführen und in flüssigem Stickstoff einfrieren

II.3.4 Expression der dUTPase aus *Pyrococcus abyssi*

- o 1l auf 37°C vorgewärmtes Medium (2YT, 2% Glycerin, 400mM NaCl, 20mM K₂HPO₄, 300µg/ml Ampicillin, 34µg/ml Chloramphenicol) in einem 5l Schüttelkolben mit Schikane auf eine OD₆₀₀ von 0,1 von einer 100ml-Übernachtskultur animpfen
- o Angeimpfte Kultur auf dem Schüttler im 37°C Raum schütteln und Bakterienwachstum durch Aufnahme einer Wachstumskurve (Messung OD₆₀₀) kontrollieren
- o 1ml Bakterienkultur bei einer OD₆₀₀ von 0.3 abnehmen, 1min bei 13000rpm in der Tischzentrifuge zentrifugieren, Überstand verwerfen, Pellet in 30µl Protein-Probenpuffer aufnehmen, 5µl auf Gel auftragen (Kontrolle: nicht-induzierte Zellen)
- o 1ml einer 1M IPTG-Lösung (Endkonzentration im Medium: 1mM) bei einer OD₆₀₀ von 0.3 zugeben (Induktion der Proteinexpression); die Zellen für weitere 5h schütteln; Wachstumskurve (1h Punkte) weiterführen
- o 5h nach Induktion 10ml einer 100mM PMSF Lösung (Endkonzentration 1mM) als Proteaseinhibitor zugeben; Kultur in 1l-Zentrifugenbecher überführen und bei 4°C mit 4000rpm für 10min zentrifugieren
- o Zellpellet auf Eis in vorgekühltem Extraktionspuffer (20mM Tris-HCl pH7,5; 500mM NaCl; 1mM Imidazol) durch Vortexen und mit Hilfe einer 25ml Pipette resuspendieren. Das Volumen des Extraktionspuffer bezieht sich auf die OD₆₀₀ bei Zellernte. Es wird pro 100 OD₆₀₀ 1ml Extraktionspuffer eingesetzt.
- o Resuspendierte Zellen in Falcon-Röhrchen überführen, TX-100 auf 0,1% hinzufügen, mischen und in flüssigem Stickstoff einfrieren

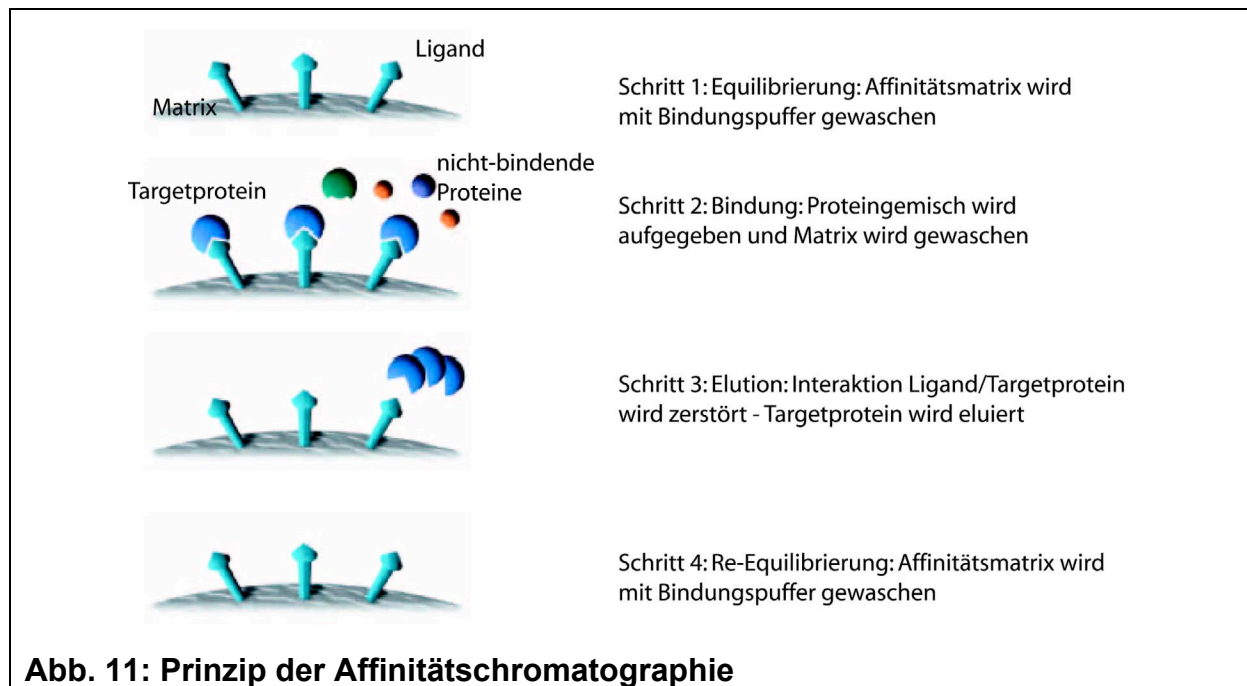
II.4 Affinitätschromatographie

II.4.1 Theorie

II.4.1.1 Prinzip

Die Affinitätschromatographie ist ein sehr effizientes, chromatographisches Trennverfahren. Sie basiert auf der Eigenschaft eines Proteins oder einer Gruppe eines Proteins, reversible Interaktionen mit einem spezifischen Liganden eingehen zu können (Abb. 11). Der Ligand ist an eine poröse, gelartige Festsubstanz (Matrix) gekoppelt, zusammen bilden sie die Affinitätsmatrix und stellen die stationäre Phase der Chromatographie dar.

Nach Äquilibration der Affinitätsmatrix wird das zu trennende Proteingemisch appliziert. Das zu isolierende Protein (Targetprotein) bindet an den Liganden, während andere, nicht-bindende Proteine weggewaschen werden. Im letzten Schritt wird durch Veränderung der Pufferzusammensetzung die Interaktion zwischen Ligand und Targetprotein geschwächt, so dass das Protein vom Liganden eluiert werden kann.

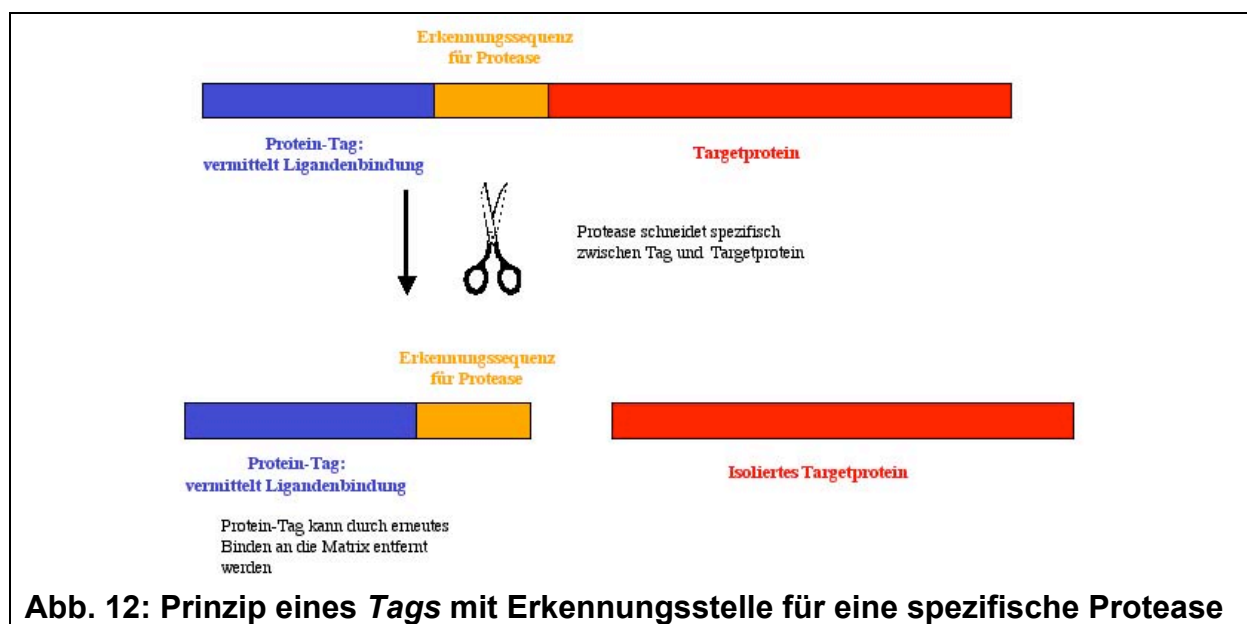


II.4.1.2 Eigenschaften/Vor-Nachteile

Die Bindung eines Liganden ist oft eine spezifische Eigenschaft eines Proteins, die mit seiner biologischen Funktion verbunden ist (siehe auch Kapitel II.4.1.3: Interaktionen in der Affinitätschromatographie). Aufgrund dieser spezifischen Interaktionen ist die Reinigungseffizienz der Affinitätschromatographie sehr hoch. Oft reicht eine Ein-Schritt-Reinigung, um ein Protein in ausreichender Reinheit zu erhalten. Auch im Praktikum wird die Affinitätschromatographie der einzige, ausreichende chromatographische Reinigungsschritt sein. Außerdem wird das Targetprotein auf der Affinitätsmatrix stark konzentriert und kann dann mit relativ kleinen Volumina eluiert werden. Dieser Konzentrationseffekt erlaubt die Applikation großer Volumina eines Proteingemisches.

Die Art der biologischen Interaktionen, die zur Affinitätschromatographie ausgenutzt werden können (siehe auch Kapitel II.4.1.3: Interaktionen in der Affinitätschromatographie), sind begrenzt. Da es nicht für jedes Targetprotein einen natürlichen Liganden gibt, werden Proteine oft als Fusionsproteine exprimiert. Diese Fusionsproteine bestehen aus dem Targetprotein und einem Teil, der die Ligandenbindung vermittelt (Abb. 12). Dieser Teil kann ein eigenständiges Protein sein (z.B. Glutathione-S-transferase) oder nur aus wenigen Aminosäuren bestehen (z.B. Histidinen) bestehen. Die Fusionspartner- oder auch *Tags* (Anhängsel) genannt- sollten die Funktion des Targetproteins nicht beeinflussen, andernfalls müssen sie nach der Chromatographie entfernt werden. Im Praktikum wird ein *Histidin-Tag* verwendet, **der nicht entfernt wird**.

Das Entfernen eines *Tags* ist mit Hilfe spezifischer Proteasen möglich, die zwischen Targetprotein und *Tags* schneiden (**wird im Praktikum nicht durchgeführt**).



Einige Affinitätsmatrices sind benutzungsbereit kommerziell erhältlich. Ist dies nicht der Fall, so muss der Ligand in einem zusätzlichen Schritt an die Matrix gekoppelt werden.

II.4.1.3 Interaktionen in der Affinitätschromatographie

Einige typische biologische Interaktionen, die häufig in der Affinitätschromatographie ausgenutzt werden, sind in der nachfolgenden Tabelle zusammengefasst:

Ligand	Bindungspartner
Antikörper	Antigen, Virus, Zelle
Sustratanalog, Inhibitor, Kofaktor	Enzym
Lectin	Polysaccharide, Glykoprotein, Oberflächenrezeptoren
Hormone, Vitamine	Rezeptor, Carrierprotein
Glutathion	Glutathion-S-transferase (GST) GST-Fusionsproteine
Nukleinsäuren	Nukleinsäure-bindende Protein (z. B. Histone)
Metallionen	Proteine mit zugänglichen Histidinen, Cysteinen und/oder Tryptophanen, Poly(His)- Fusionsproteine

Im Praktikum wird immobilisiertes Nickel als Ligand benutzt, die zu reinigenden Proteine haben einen Poly-Histidin *Tag* (siehe auch Kapitel II.4.1.5).

II.4.1.4 Allgemeines Reinigungsschema

Eine Affinitätschromatographie besteht wie jede Chromatographie aus folgenden Schritten (siehe auch Abb. 11):

- Äquilibration der Säulenmatrix
- Auftragen/Binden der Probe
- Waschen der Säulenmatrix
- Elution der Probe
- Re-Äquilibration der Säulenmatrix

Eine erfolgreiche Reinigung mittels Affinitätschromatographie ist von einigen Aspekten in Einzelschritten der Affinitätschromatographie abhängig, auf die hier im einzelnen eingegangen wird.

II.4.1.4.1 Bindung

Die Bindung erfolgt unter Bedingungen, die eine hohe Affinität des Targetmoleküls an den Liganden gewährleisten (pH-Wert, Ionenstärke). Außerdem sollten unspezifische oder Konkurrenzbindungen, die zu Verunreinigungen führen, minimiert werden. Dies erreicht man z.B. durch Zugabe von Kompetitoren, die die Stringenz in der Bindungsreaktion erhöhen, indem sie idealerweise spezifisch ungewünschte Konkurrenzreaktionen kompetitieren. Zusätzliche Stringenz in der Bindungsreaktion erreicht man, indem man den Liganden limitiert (d.h. vergleichsweise kleine Mengen der Affinitätsmatrix einsetzt), so dass Bindungsstellen nur mit hochaffinen Bindungen (Ligand/Targetmolekül) gesättigt werden. Wird ein Proteingemisch (z.B. Bakterienlysat) auf die Affinitätsmatrix aufgegeben, in dem sich noch Proteasen befinden, sollten Temperatur und Zeit im Bindungsschritt minimiert werden.

II.4.1.4.2 Waschen

Die Säulenmatrix wird mit Bindungspuffer gewaschen, so dass nicht- und schwach-gebundene Proteine entfernt werden können. Fand der Bindungsschritt mit niedriger Stringenz statt, so kann diese im Waschschrift erhöht werden (z.B. höhere Konzentration an Kompetitor).

II.4.1.4.3 Elution

Die Elution des Targetproteines von der Affinitätsmatrix kann auf verschiedene Arten erfolgen, die in Abb. 13 dargestellt sind.

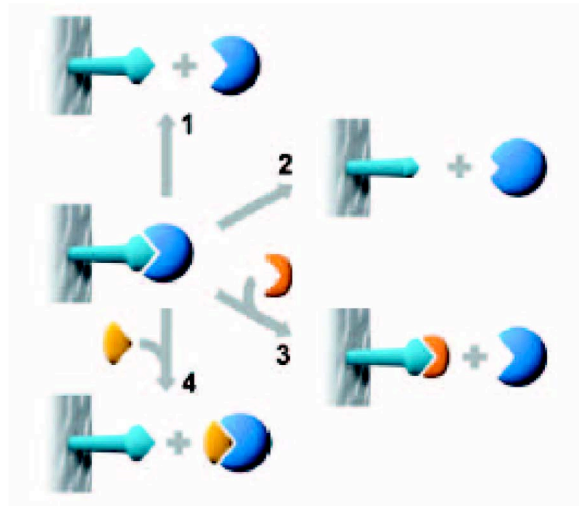


Abb. 13: Möglichkeiten zur Elution eines Targetproteins von der Affinitätsmatrix

1: Eine **Änderung der Pufferzusammensetzung** schwächt die Interaktion zwischen Ligand und Targetmolekül ohne die Struktur oder Funktion des Targetmoleküls zu beeinflussen. Eine Änderung in der Ionenstärke kann z.B. eine Interaktion, die auf ionischen Wechselwirkungen beruht, beeinflussen. Eine Änderung des pH-Wertes kann den Ionisierungszustand einer geladenen Gruppe des Liganden oder des gebundenen Proteins verändern, so dass die Bindungsstelle direkt beeinflusst wird oder leichte Konformationsänderungen in der Umgebung die Affinität verringern.

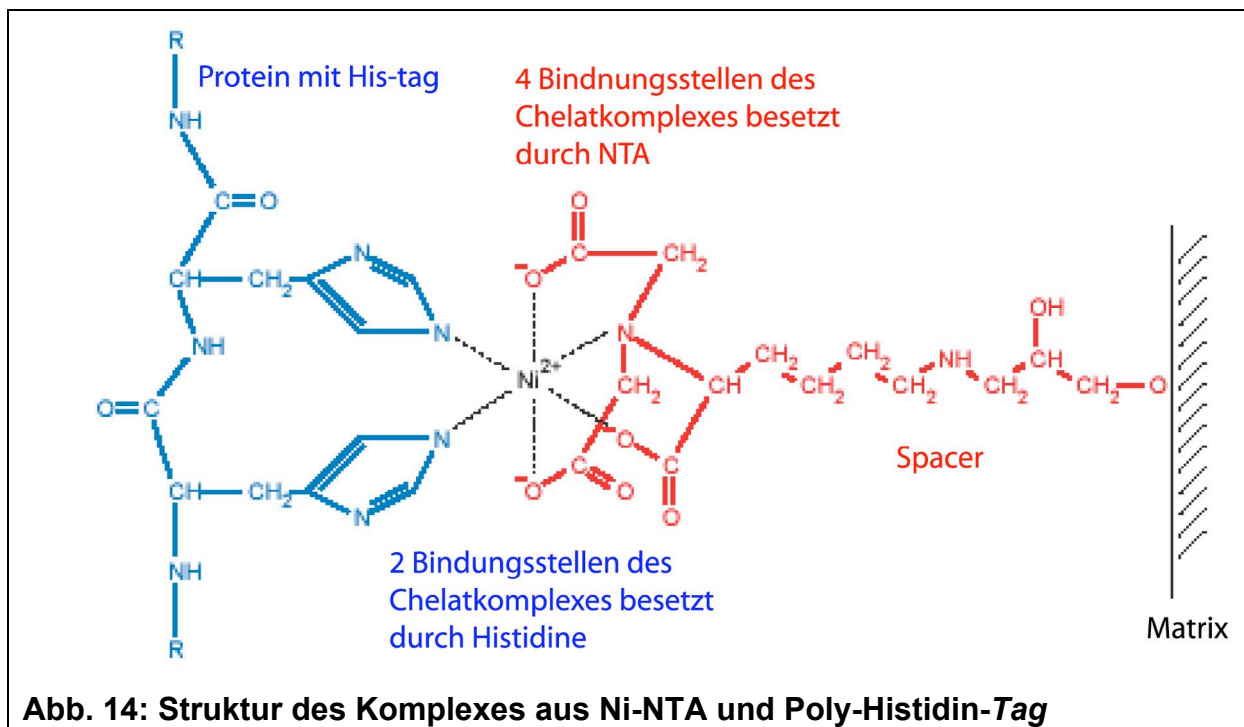
2: **Struktur/Konformationsänderungen des gebundenen Proteins**, die die Interaktion zum Liganden schwächen, werden z.B. durch chaotrophe Substanzen (Guanidiniumhydrochlorid, Harnstoff) induziert. Diese Elutionsmethode hat häufig den Nachteil, dass das aufzureinigende Protein möglicherweise seine native Konformation verliert und danach erst wieder in seine aktive Konformation renaturiert werden muss, was aber oft nicht gelingt.

3/4: **Kompetitive Elution**: Kompetitoren, die entweder den Liganden (3) oder das Protein (4) binden, werden vor allem bei hoher Affinität des Protein zum Liganden eingesetzt. Die Konzentration des Kompetitors im Elutionspuffer ist abhängig von der Affinität des Kompetitors zum Liganden oder Targetmolekül. Er muss ggf. nach der Elution entfernt werden.

II.4.1.5 Reinigung Poly-Histidin *getaggt*er Proteine mittels Affinitätschromatographie an immobilisierten Ni^{2+} -Ionen

Im Praktikum wird zur Aufreinigung der Proteine die Immobilisierte-Metallionen-Affinitätschromatographie (IMAC) angewandt. Die Affinitätsmatrix bilden ein als Zentralatom einer Komplexverbindung fungierendes Metallion zusammen mit einem *Spacer* und einer inerten Matrix. Die im Praktikum verwendete Matrix ist ähnlich der kommerziell erhältlichen Ni-NTA (nitrilotriacetic acid) Agarose (Qiagen, Hilden). Bei dieser bildet Ni^{2+} das Zentralatom eines Chelatkomplexes (Abb. 14). NTA koordiniert 4 Bindungsstellen des Chelatkomplexes. Die zwei übrigen Koordinationsstellen können von zugänglichen Histidinresten eines Proteins besetzt werden. Die im Praktikum zu reinigenden Proteine besitzen am N/C –Terminus einen *His-Tag*, der aus 14, 10 oder 6 Histidinen besteht und die Bindung an das matrixgebundene Ni^{2+} -Ion vermitteln.

Die das Nickel-Ion komplexierende Verbindung ist über einen *Spacer* kovalent an einer Matrix immobilisiert. Als Matrix kommt eine kugelförmige, quervernetzte Agarose (Sephargose-beads) zum Einsatz, die sich eine geringe Adsorption unspezifischer Proteine sowie durch ihre hohe Stabilität (z.B. über weite pH-Bereiche) auszeichnet.



Die Bindung des *His-Tags* eines Proteins an das immobilisierte Nickel-Ion ist unabhängig von seiner Tertiärstruktur, so dass Proteine mit einem *His-Tag* unter nativen oder denaturierenden Bedingungen gereinigt werden können (Abb. 15). Eine Reinigung unter denaturierenden Bedingungen (8M Harnstoff, 6M Guanidinium Hydrochlorid) kann erforderlich sein, wenn z.B. das Targetprotein nach der Expression als Aggregat ausfällt (Bildung von *inclusion bodies*). Zur Produktion eines funktionalen Proteins ist dann aber eine korrekte Rückfaltung des Proteins erforderlich. Alle im Praktikum behandelten Proteine sind in signifikanten Mengen löslich und können daher unter nativen Bedingungen gereinigt werden.

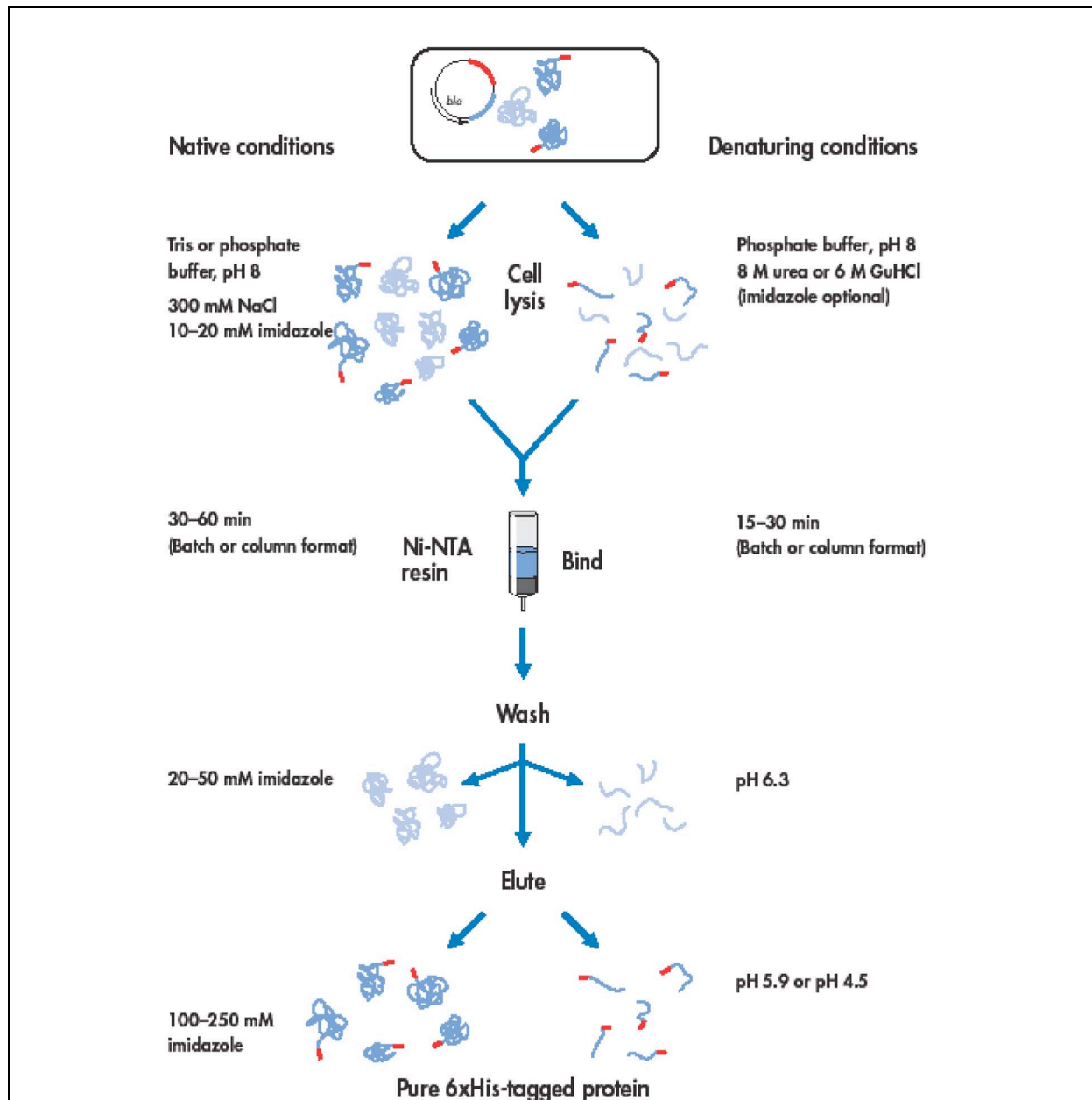


Abb. 15: Reinigungsschema für Poly-Histidin *getaggte* Proteine über Ni-NTA-Sepharose.

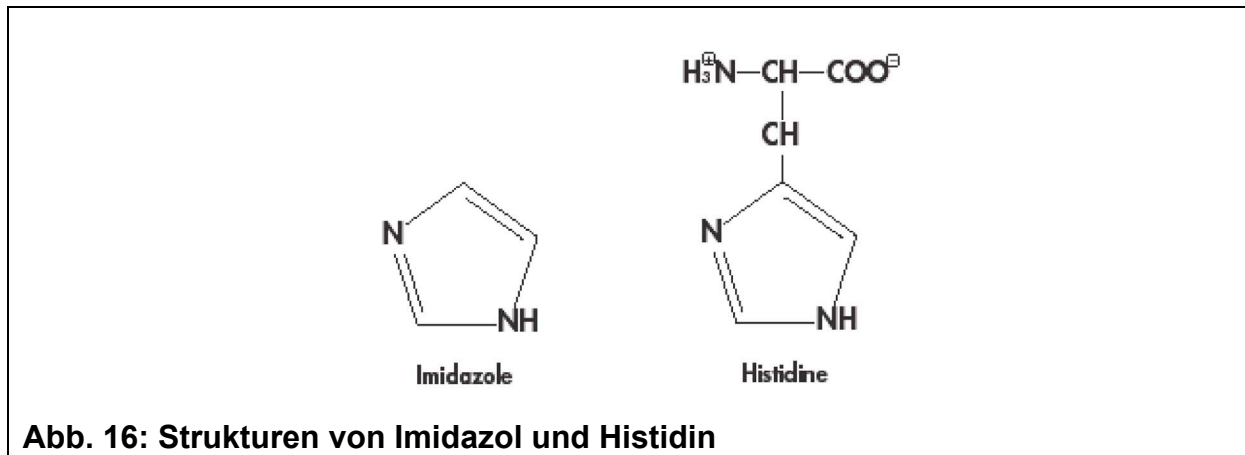
Aufgrund der unterschiedlichen chemischen Struktur des im Praktikum verwendeten Ni^{2+} -Komplexes unterscheiden sich die im Praktikum angewandten Imidazolkonzentrationen von den Angaben in der Abbildung.

Nach Expression, Zellyse und Zentrifugation zur Abtrennung der Zellbruchstücke wird das Bakterienlysate auf die Säule aufgetragen (Bindung). Unspezifische Bindungen können durch Zugabe von Imidazol (Abb. 16) (1–20 mM) oder durch eine leichte Absenkung des pH-Wertes minimiert werden. Außerdem sollte die Affinitätsmatrix in leichtem Überschuss eingesetzt werden, um die Stringenz im Bindungsschritt zu erhöhen (siehe auch Kapitel II.4.1.4.1).

Im Waschschriff werden weitestgehend auch solche Proteine entfernt, die auf Grund zugänglicher endogener Histidinreste an die Matrix gebunden haben. Die

Waschbedingungen sind daher meist stringenter als im Bindungsschritt: Der pH-Wert kann bis zu pH6.3 gesenkt werden und/oder die Imidazolkonzentration erhöht werden. Dabei muss sichergestellt sein, dass unter diesen Bedingungen das Targetprotein noch nicht eluiert.

Zur Elution von Proteinen mit His-Tag gibt es mehrere Möglichkeiten. Die mildeste Methode ist die Zugabe von Imidazol (Abb. 16). Imidazol fungiert als Kompetitor zum Histidin um die freien Bindungsstellen des Chelatkomplexes der Matrix.



Zur Elution wird eine Imidazolkonzentration bis zu 500mM eingesetzt. Eine andere Elutionsmöglichkeit ist die Absenkung des pH-Wertes. Die Histidinreste des Tags haben einen pK_a Wert von ca. 6. Bei einem pH-Wert des Elutionspuffers von pH4.5-5.3 liegen die Histidine größtenteils protoniert vor und binden nicht mehr an die Matrix (chelatieren nicht mehr das Nickel).

Außerdem kann man das Targetprotein als Metall-Protein Komplex mit Hilfe von Chelatoren wie EDTA oder EGTA eluieren. Sie kompetetieren das NTA und lösen somit die Verbingung des Metall-Protein-Komplexes zur Matrix.

Im Praktikum wird mit Hilfe von Imidazol eluiert. Die Konzentration von Imidazol wird in einer Stufe vom Wasch- zum Elutionspuffer erhöht (Stufenelution).

II.4.1.6 Pufferwechsel mit PD10 Entsalzungssäulen: Gelfiltration

Selten ist der Elutionspuffer, der eine hohe Imidazolkonzentration enthält, identisch mit dem Lager-/Reaktionspuffer eines Proteins. Aus diesem Grund ist häufig eine Umpufferung erforderlich. Im Praktikum werden die gereinigten Proteine über ein PD-10 Entsalzungssäule (Amersham Biosciences) umpufferiert. Diese Säulen funktionieren nach dem Prinzip der Gelfiltration: Moleküle werden entsprechend ihrer Größe voneinander getrennt (siehe Abb. 17). Die Matrix einer Gelfiltrationssäule besteht aus sphärischen Partikeln, in die Moleküle entsprechend ihrer Größe eindiffundieren können (siehe Abb. 17). Große Moleküle, die nicht oder unvollständig in die Poren eintreten können, haben den kürzesten Weg durch die Säule und eluieren als erstes. Kleinere Moleküle dagegen nehmen den "Umweg" durch die Poren und eluieren daher später.

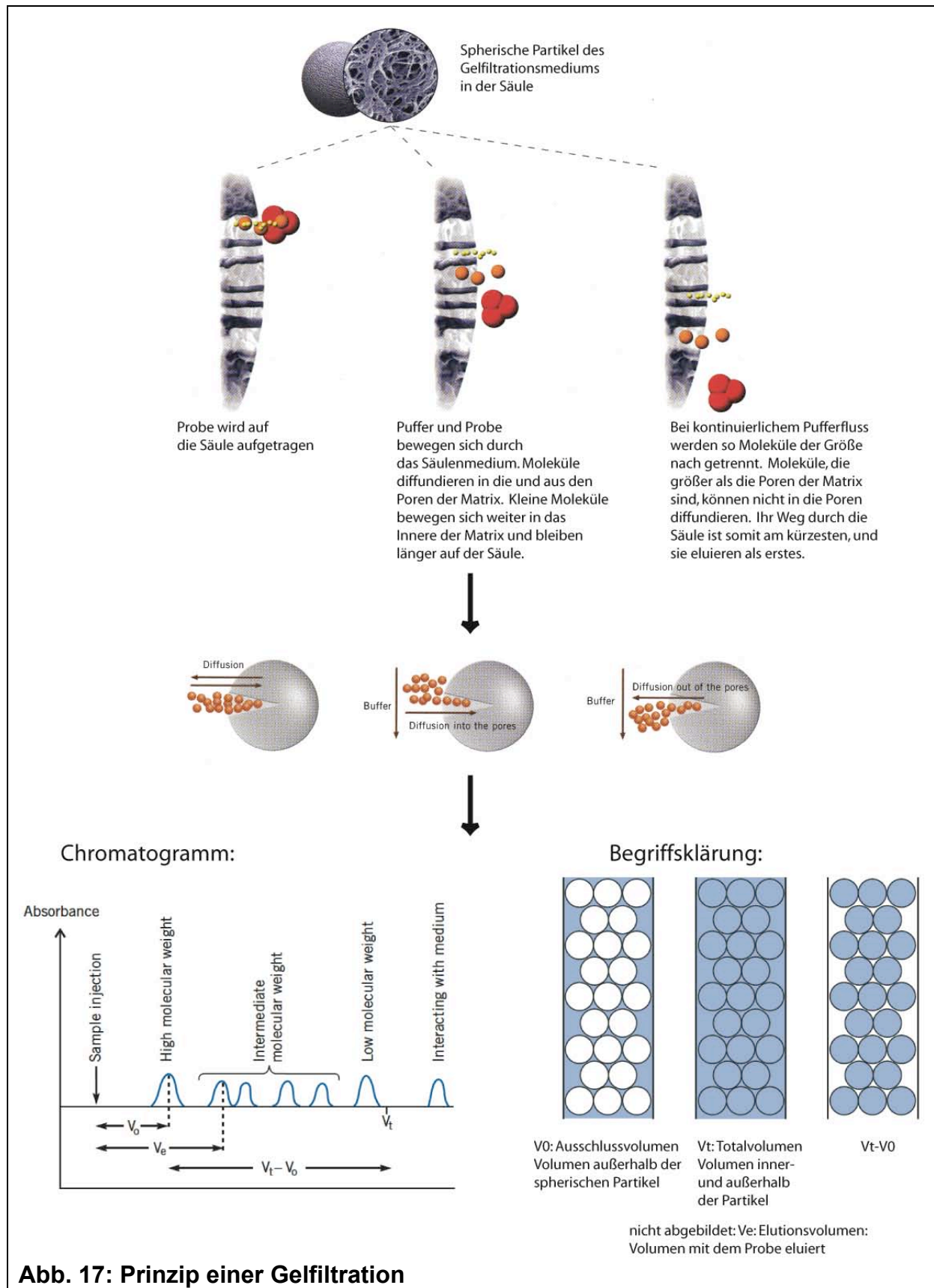


Abb. 17: Prinzip einer Gelfiltration

Die PD-10 Entsalzungssäulen bestehen aus einem *SephadexTM G-25* Medium und sind fertig gepackt kommerziell erhältlich. *SephadexTM* ist ein Säulenmaterial, das aus quervernetzten Dextranen besteht. Die Stärke der Quervernetzung (angegeben

z.B. durch den Zusatz G-25) variiert für verschiedene Sephadex-Medien und bestimmt die Trennungseigenschaften. Im Allgemeinen sind die Trennungseigenschaften von *Sephadex*-Medien begrenzt, so dass sie hauptsächlich für **Gruppentrennungen** eingesetzt werden. Dies bedeutet, dass nur Molekülgruppen, die sich bezüglich ihrer Masse sehr stark unterscheiden, voneinander getrennt werden können; Größenunterschiede innerhalb einer Molekülgruppe führen nicht zu einer Trennung. Das im Praktikum eingesetzte *Sephadex*TM G-25 Medium trennt Gruppen höherer Molekularmasse (MW>5kDa; entsprechend der gereinigten Proteine) von niedermolekularen Substanzen (MW<1kDa; entsprechend Imidazol) (Abb. 18). Die niedermolekularen Substanzen können in die Poren der Partikel eindringen, während Moleküle mit einer Molekularmasse größer als 5kDa im oder kurz nach dem Ausschlussvolumen laufen (Abb. 17/18).

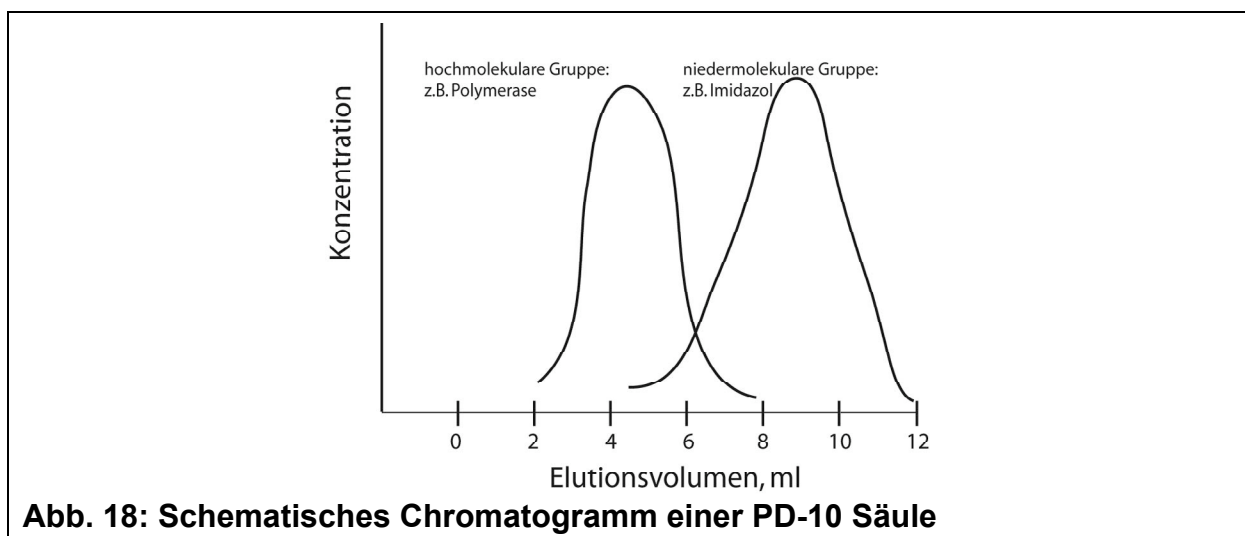


Abb. 18: Schematisches Chromatogramm einer PD-10 Säule

II.4.2 Reinigung der exprimierten Proteine

II.4.2.1 Zellaufschluss und Abtrennen der Zelltrümmer

Wichtig: Falls nicht ausdrücklich anders angegeben ist die Probe bei diesem Schritt immer auf Eis oder bei 4°C zu behandeln.

***Pfu-* und *Pab*-DNA Polymerasen, Pyrophosphatase und dUTPase:**

- o Resuspendiertes Zellpellet in handwarmem Wasser auftauen
- o 10mM β -Mercaptoethanol (β -ME, Stammkonzentration: 14,3M) zugeben
- o 3 x 2min bei maximalem Output (10) und 40% Duty cycle **auf Eis** in einem vorgekühlten Metallbecher sonifizieren
- o 5 μ l (0.5 OD) als Expressionskontrolle (Gesamtmenge) abnehmen, 45 μ l Protein-Probenpuffer zugeben, 5 μ l auf Gel auftragen
- o 15min bei mindestens 4500rpm, 4°C, zentrifugieren
- o Überstand vorsichtig abnehmen und in 50ml Falconröhrchen überführen
- o 5 μ l (0.5OD) als Expressionskontrolle (nativer Überstand) abnehmen, 45 μ l Protein-Probenpuffer zugeben, 5 μ l auf Gel auftragen

***Taq-* und *Tth*-DNA Polymerasen**

- o Resuspendiertes Zellpellets in handwarmem Wasser auftauen
- o 20mM β -Mercaptoethanol (β -ME, Stammkonzentration: 14,3M) zugeben
- o Lysozym zu einer Endkonzentration von 4mg/ml zugeben
- o 15min bei Raumtemperatur inkubieren
- o 5 μ l (1 OD) als Expressionskontrolle (Gesamtmenge) abnehmen, 95 μ l Protein-Probenpuffer zugeben, 5 μ l auf Gel auftragen

II.4.2.2 Reinigungsschritt: Thermische Denaturierung

***Pfu-* und *Pab*-DNA Polymerasen, Pyrophosphatase und dUTPase:**

- o Wasserbad auf 85°C vorheizen
- o nativen Überstand im Wasserbad (85°C) 15min erhitzen
- o auf Eis abkühlen
- o Probe in Ultrazentrifugationsbecher überführen
- o 15-30min bei 38000rpm zentrifugieren, 5 μ l (0.5 OD) des Überstands abnehmen (Protein nach thermischer Denaturierung), 45 μ l Protein-Probenpuffer zugeben, 5 μ l auf Gel auftragen

***Taq-* und *Tth*-DNA Polymerasen**

- o Wasserbad auf 75°C vorheizen
- o Zugabe von 1 Volumen kochend heißem "Extraktionspuffer2" (10mM Tris pH8,0, 50mM KCl, 1mM EDTA, 2mM Imidazol, 0,5% Tween, 0,5% NP-40)
- o im Wasserbad (75°C) 30min erhitzen
- o auf Eis abkühlen
- o Probe in Ultrazentrifugationsbecher überführen
- o 15min bei 38000rpm zentrifugieren, 5 μ l (0.5 OD) des Überstands abnehmen (Protein nach thermischer Denaturierung), 45 μ l Protein-Probenpuffer zugeben, 5 μ l auf Gel auftragen

II.4.2.3 Reinigungsschritt: Affinitätschromatographie

- o 2ml Ni-EDTA Matrix in die Säulenvorrichtung pipettieren
- o **Äquilibration:** Säule mit 10ml Äquilibrationpuffer äquilibrieren

verwendete Äquilibrationpuffer:

Pfu- und Pab-DNA-Polymerasen	50mM Na-PO ₄ pH7,5, 500mM NaCl, 1mM Imidazol
Taq- und Tth-DNA-Polymerase	50mM Tris pH8,0, 100mM NaCl, 0,1mM EDTA, 1mM Imidazol
Pab-Pyrophosphatase	50mM Tris-HCl pH7,5, 200mM NaCl, 5mM MgCl ₂ , 1mM Imidazol
Pab-dUTPase	20mM Tris-HCl pH7,5, 500mM NaCl, 1mM Imidazol, 0.1% TX100

- o **Probenauftrag:** Überstand nach thermischer Denaturierung auf die Säule geben, Durchfluss aufbewahren: 5µl des Durchflusses zu 45µl Protein-Probenpuffer zugeben, 5µl auf Gel auftragen
- o **Waschen:** Säule mit 20ml Waschpuffer waschen, Durchfluss aufbewahren: 10µl des Durchflusses des Waschschrittes zu 40µl Protein-Probenpuffer zugeben, 5µl auf Gel auftragen

verwendete Waschpuffer:

Pfu- und Pab-DNA-Polymerasen	50mM Na-PO ₄ pH7,5, 500mM NaCl, 1mM Imidazol, 5mM DTT
Taq- und Tth-DNA-Polymerase	50mM Tris pH8,0, 100mM NaCl, 0,1mM EDTA, 1mM Imidazol, 5mM DTT
Pab-Pyrophosphatase	50mM Tris-HCl pH7,5, 200mM NaCl, 5mM MgCl ₂ , 1mM Imidazol, 5mM DTT
Pab-dUTPase	20mM Tris-HCl pH7,5, 500mM NaCl, 1mM Imidazol, 0.1% TX100, 5mM DTT

- o **Extraschritt für Taq- und Tth- DNA-Polymerasen:** Säule mit 10ml Waschpuffer2 waschen (Waschpuffer2: 50mM Tris pH8,0, 100mM NaCl, 0,1mM EDTA, 1mM Imidazol, 5mM DTT, 25% Glycerin)
- o **Elution:** Protein mit Elutionspuffer (jeweiliger Waschpuffer + 300mM Imidazol) eluieren (für Taq und Tth DNA-Polymerasen: Waschpuffer2 + 300mM Imidazol): 20 Fraktionen einer Größe von je 5 Tropfen (ca. 200-250µl) sammeln
- o 0,5µl jeder Fraktion auf Nitrocellulosemembran geben, mit Amidoschwarz färben, 2µl zu 18µl Protein-Probenpuffer geben, 10µl auf Gel auftragen
- o Peak-Fraktionen vereinigen und Gesamtvolumen bestimmen
- o **Pufferwechsel:** erst oberen, dann unteren Deckel von PD-10-Säulchen entfernen
- o PD-10-Säule mit mindestens 25ml (2x) Lagerpuffer äquilibrieren

verwendete (2x) Lagerpuffer:

Pfu- und Pab-DNA-Polymerasen	40mM Tris-HCl pH7.5; 200mM KCl; 2mM DTT; 0,2mM EDTA
Taq- und Tth-DNA-Polymerase	50mM Tris pH8,0, 100mM NaCl, 0,1mM EDTA, 2mM DTT, 25% Glycerin
Pab-Pyrophosphatase	40mM Tris-HCl pH7.5; 200mM KCl; 2mM DTT; 0,2mM EDTA
Pab-dUTPase	40mM Tris-HCl pH8.0; 500mM KCl

- o vereinigte Fraktionen auftragen und in Gelbett einsickern lassen
- o mit 2xLagerpuffer auf 2,2ml auffüllen und in Gelbett einsickern lassen (Gesamtvolumen vereinigte Fraktionen + 2xLagerpuffer = 2,2ml)
- o mit 4ml 2xLagerpuffer eluieren, Eluat in Fraktionen zu ca. 300µl sammeln
- o 0,5µl jeder Fraktion auf Nitrocellulosemembran geben, mit Amidoschwarz färben

- o Peak-Fraktionen vereinigen
- o Proteinkonzentration der vereinigten Fraktionen photometrisch bestimmen:
Messung OD₂₈₀ einer 1:20-Verdünnung im jeweiligen (2x)-Lagerpuffer
Als Referenz (Nullwert) dient der jeweilige (2x)-Lagerpuffer

Umrechnung OD₂₈₀-Proteinkonzentration

Protein	1 OD ₂₈₀ entspricht
<i>Pfu</i>-DNA-Polymerase	0,75mg/ml
<i>Pab</i>-DNA-Polymerase	0,79mg/ml
<i>Taq</i>-DNA-Polymerase	0,88mg/ml
<i>Tth</i>-DNA-Polymerase	1,00mg/ml
<i>Pab</i>-Pyrophosphatase	0,70mg/ml
<i>Pab</i>-dUTPase	0,75mg/ml

- o 1 Volumen Glycerin zugeben (**nicht bei bei *Taq*- und *Tth*-DNA-Polymerasen!**),
Puffer der *Pfu*- und *Pab*-DNA-Polymerasen auf 0,5% NP40 und 0,5% Tween20 einstellen
Puffer der ***Taq*- und *Tth*-DNA-Polymerasen** sehr langsam (tropfenweise, dazwischen vorsichtig mischen) mit 1 Volumen Lagerpuffer B (50mM Tris-HCl pH8.0; 100mM NaCl, 0.1mM EDTA, 2mM DTT, 75% Glycerin, 2% TX-100) verdünnen

II.5 Assays zur Bestimmung der Aktivität der aufgereinigten Enzyme

Den abschließenden Schritt jeder Aufreinigung von Enzymen sollte die Bestimmung der spezifischen Aktivität der erhaltenen Präparationen sein. Unter spezifischer Aktivität versteht man die auf die Proteinmenge normalisierte enzymatische Aktivität (enzymatische Aktivität (U) / Mengeneinheit (mg)). Die spezifische Aktivität ist ein Maß für die Qualität einer Enzympräparation: gute Enzympräparationen zeichnen sich durch hohe spezifische Aktivitäten aus. Hilfreich für die Einschätzung der erhaltenen Daten ist der Vergleich mit anderen z.B. käuflich zu erwerbenden Präparationen oder mit vergleichbaren Literaturwerten. Wurden an einem Enzym genetische Veränderungen – z.B. durch Einführung von *Tags* oder Mutationen - durchgeführt, so kann die Bestimmung der spezifischen Aktivität Aufschluss darüber geben, ob diese Veränderungen einen Einfluss auf die Funktionalität des Enzyms haben.

Die Aktivität von Enzymen wird durch sog. Enzym-Assays bestimmt. Diese Assays sollten für das untersuchte Enzym spezifisch, gut (im Optimalfall numerisch) quantifizierbar, in wiederholten Versuchen reproduzierbar sowie möglichst einfach durchführbar sein. Für viele enzymatische Reaktionen haben sich Standard-Assays etabliert, die auch für die Definition von Enzymeinheiten (Units (U)) herangezogen werden können. Insbesondere bei Enzymen mit komplexen Reaktionsschemata ist zu beachten, dass anhand von Enzym-Assays häufig nur einzelne Parameter des gesamten Aktivitätsspektrums untersucht werden können (z.B. bei DNA Polymerasen: Polymerase-Aktivität/ Prozessivität/ Korrekturlesefunktion...).

Im Praktikum werden aus praktischen Erwägungen keine Standard-Assays durchgeführt. Die im Praktikum durchgeführten Assays erlauben daher insbesondere nicht die Bestimmung absoluter Enzymaktivitäten. Sie sind jedoch geeignet, Enzymmengen für einzelne Reaktionen zu optimieren und mit bereits vorhandenen Enzympräparationen zu vergleichen.

II.5.1 DNA-Polymerasen

Der im Praktikum durchgeführte Assay zur relativen Aktivitätsbestimmung der DNA-Polymerasen basiert auf der Bestimmung der optimalen Enzymmenge zur Durchführung einer standardisierten PCR-Reaktion. Ein vorbereiteter PCR-Reaktionsmix (ohne DNA-Polymerase) wird durch unterschiedliche Mengen einer DNA-Polymerase komplettiert. Nach Durchführung der PCR-Reaktion werden die Reaktionsprodukte auf einem Agarose-Gel analysiert und die Enzymmenge bestimmt, die unter den gegebenen Bedingungen die höchste Produktausbeute ergibt. Als Kontrollen werden je eine Reaktion mit einer aktiven Polymerase in bekannter Menge sowie eine Reaktion ohne Polymerase analysiert.

Durchführung:

- o Polymerase-Verdünnungspuffer ansetzen:

für *Pfu*- und *Pab*-DNA-Polymerasen:

20mM Tris-HCl pH7.5; 100mM KCl; 1mM DTT; 0,1mM EDTA; 0,5% NP-40; 0,5% Tween20; 0,1mg/ml BSA, 50%Glycerin;

für *Taq*- und *Tth*-DNA-Polymerasen:

50mM Tris-HCl pH8.0; 100mM NaCl; 1% TX-100, 0,1mM EDTA, 5mM DTT, 0,1mg/ml BSA, 50% Glycerin

- o je 300µl Vorverdünnungen der DNA-Polymerase-Präparation in Verdünnungs-Puffer ansetzen: 1µg/µl, 100ng/µl, 10ng/µl
- o Verdünnungsreihe in Polymerase-Verdünnungspuffer ansetzen:

End-Konzentration	Verdünnungs-Puffer (µl)	Polymerase-Vorverdünnung (µl)
1000ng/µl	-	100µl (1µg/ml)
600ng/µl	40µl	60µl (1µg/ml)
350ng/µl	65µl	35µl (1µg/ml)
200ng/µl	80µl	20µl (1µg/ml)
100ng/µl	-	100µl (100ng/ml)
60ng/µl	40µl	60µl (100ng/ml)
35ng/µl	65µl	35µl (100ng/ml)
20ng/µl	80µl	20µl (100ng/ml)
10ng/µl	-	100µl (10ng/ml)
6ng/µl	40µl	60µl (10ng/ml)
3,5ng/µl	65µl	35µl (10ng/ml)
2ng/µl	80µl	20µl (10ng/ml)
1ng/µl	90µl	10µl (10ng/µl)

- o Standard-Reaktionsmix pipettieren

	Ausgangs-Konzentration	End-Konzentration	Volumen/ 50µl-Reaktion	Volumen für ... Reaktionen
Wasser	---	---	41µl	
PCR-Puffer (je nach Polymerase)	10x	1x	5µl	
dNTP-Mix	2,5mM	150µM	3µl	
Template (pSF310)	100pg/µl	1pg/µl	0,5µl	
Primer336	100µM	0,5µM	0,25µl	
Primer337	100µM	0,5µM	0,25µl	

- o je 50µl Reaktionsmix in beschriftete PCR-Tubes vorlegen
- o je 0,5µl einer Polymerase-Verdünnung zupipettieren

- o Kontrollen:
 Negativ-Kontrolle: 0,5µl Verdünnungspuffer
 Positiv-Kontrolle: je 0,5µl bereitgestellte *Pfu*- oder *Taq*-DNA-Polymerase (50ng/µl bzw. 70ng/µl)
- o PCR-Lauf mit folgenden Parametern:

Schritt	Bezeichnung	Dauer	Temperatur
1	Denaturierung	1min	94°C
2	Denaturierung	30s	94°C
3	Anlagerung	30s	63°C
4	Elongation	1min15s	72°C
5	finale Elongation	5min	72°C
2-4	Zyklenzahl	25	---

- o 1% TAE-Agarose-Gel mit schmalen Taschen gießen
- o jede Probe mit je 6µl 10xDNA-Ladepuffer versetzen
- o je 15µl auf Agarose-Gel analysieren

II.5.2 *Pab*-Pyrophosphatase

DNA-Polymerasen werden durch das bei der Polymerase-Reaktion als Nebenprodukt anfallende Pyrophosphat gehemmt. Die *Pab*-Pyrophosphatase hydrolysiert dieses Pyrophosphat zu ortho-Phosphat, das keinen Einfluss auf die Polymerase-Reaktion hat.

Der Aktivitätstest für die *Pab*-Pyrophosphatase beruht auf der Aufhebung einer durch Pyrophosphat vermittelten Inhibition der DNA-Polymerase: Unterschiedliche Mengen *Pab*-Pyrophosphatase werden zu einem vorbereiteten PCR-Reaktionsmix gegeben, dem neben Puffer, *Primern*, *Template* und DNA-Polymerase zusätzlich 0,5mM Pyrophosphat zugesetzt wurde. Nach Durchführung der PCR werden die Reaktionsprodukte auf einem Agarose-Gel analysiert und die minimale Enzymmenge bestimmt, die für eine vollständige Aufhebung der durch Pyrophosphat vermittelten Inhibition der Reaktion notwendig ist. Als Kontrollen werden je eine Reaktion ohne Pyrophosphatase, eine Reaktion mit einer aktiven Pyrophosphatase in bekannter Menge sowie eine Reaktion ohne Zusatz von Pyrophosphat analysiert.

Durchführung:

- o Pyrophosphatase-Verdünnungspuffer ansetzen:
20mM Tris-HCl pH7.5; 100mM KCl; 1mM DTT; 0,1mM EDTA; 0,1mg/ml BSA
50%Glycerin
- o je 300µl Vorverdünnungen der Pyrophosphatase-Präparation in PPase-Verdünnungs-Puffer ansetzen: 100ng/µl, 10ng/µl, 1ng/µl
- o Verdünnungsreihe in PPase-Verdünnungspuffer ansetzen:

End-Konzentration	Verdünnungs-Puffer (µl)	Pyrophosphatase-Vorverdünnung (µl)
100ng/µl	-	100µl (100ng/µl)
60ng/µl	40µl	60µl (100ng/µl)
35ng/µl	65µl	35µl (100ng/µl)
20ng/µl	80µl	20µl (100ng/µl)
10ng/µl	-	100µl (10ng/µl)
6ng/µl	40µl	60µl (10ng/µl)
3,5ng/µl	65µl	35µl (10ng/µl)
2ng/µl	80µl	20µl (10ng/µl)
1ng/µl	-	100µl (1ng/µl)
0,6ng/µl	40µl	60µl (1ng/µl)
0,35ng/µl	65µl	35µl (1ng/µl)
0,2ng/µl	80µl	20µl (1ng/µl)
0,1ng/µl	90µl	10µl (1ng/µl)

- o Standard-Reaktionsmix (mit DNA-Polymerase) pipettieren

	Ausgangs-Konzentration	End-Konzentration	Volumen/ 50µl-Reaktion	Volumen für ... Reaktionen
Wasser	---	---	40,5µl	
PCR-Puffer für <i>Pfu</i>-Polymerase	10x	1x	5µl	
dNTP-Mix	2,5mM	150µM	3µl	
Template (pSF310)	100pg/µl	1pg/µl	0,5µl	
Primer336	100µM	0,5µM	0,25µl	
Primer337	100µM	0,5µM	0,25µl	
<i>Pfu</i>-DNA-Polymerase	50ng/µl	0,5ng/µl	0,5µl	

- o 50µl Reaktionsmix in beschriftetes PCR-Tubes vorlegen (PCR-Kontrolle ohne Pyrophosphat)
- o restlichen PCR-Reaktionsmix mit 50mM Pyrophosphat-Lösung auf 0,5mM Pyrophosphat einstellen (1/100-Volumen), mischen
- o je 50µl Reaktionsmix (mit Pyrophosphat) in beschriftete PCR-Tubes vorlegen
- o je 0,5µl einer Pyrophosphatase-Verdünnung zupipettieren
- o Kontrollen:
 - Negativ-Kontrolle: 0,5µl Verdünnungspuffer
 - Positiv-Kontrolle: 0,5µl bereitgestellte *Pab*-Pyrophosphatase (~15ng/µl)
- o PCR-Lauf mit folgenden Parametern:

Schritt	Bezeichnung	Dauer	Temperatur
1	Denaturierung	1min	94°C
2	Denaturierung	30s	94°C
3	Anlagerung	30s	63°C
4	Elongation	1min15s	72°C
5	finale Elongation	5min	72°C
2-4	Zyklenzahl	25	---

- o 1% TAE-Agarose-Gel mit schmalen Taschen gießen
- o jede Probe mit je 6µl 10xDNA-Ladepuffer versetzen
- o je 15µl auf Agarose-Gel analysieren

II.5.3 Pab-dUTPase

Ähnlich wie der Pyrophosphatase-Assay beruht der Test zur Bestimmung der *Pab*-dUTPase-Aktivität auf der Aufhebung einer durch dUTP vermittelten Inhibition der DNA-Polymerase: Unterschiedliche Mengen *Pab*-dUTPase werden zu einem vorbereiteten PCR-Reaktionsmix gegeben, dem neben Puffer, *Primern*, *Template* und DNA-Polymerase zusätzlich 1µM dUTP zugesetzt wurde. Nach Durchführung der PCR werden die Reaktionsprodukte auf einem Agarose-Gel analysiert und die minimale Enzymmenge bestimmt, die für eine komplette Aufhebung der durch dUTP-vermittelten PCR-Inhibition notwendig ist. Als Kontrollen werden je eine Reaktion ohne dUTPase, eine Reaktion mit einer aktiven dUTPase in bekannter Menge sowie eine Reaktion ohne Zusatz von dUTP analysiert.

Durchführung:

- o dUTPase-Verdünnungspuffer ansetzen:
20mM Tris-HCl pH8.0; 250mM KCl; 0,1mg/ml BSA, 50%Glycerin
- o je 300µl Vorverdünnungen der dUTPase-Präparation in dUTPase-Verdünnungs-Puffer ansetzen: 100ng/µl, 10ng/µl, 1ng/µl
- o Verdünnungsreihe in dUTPase-Verdünnungspuffer ansetzen:

End-Konzentration	Verdünnungs-Puffer (µl)	dUTPase-Vorverdünnung (µl)
100ng/µl	-	100µl (100ng/µl)
60ng/µl	40µl	60µl (100ng/µl)
35ng/µl	65µl	35µl (100ng/µl)
20ng/µl	80µl	20µl (100ng/µl)
10ng/µl	-	100µl (10ng/µl)
6ng/µl	40µl	60µl (10ng/µl)
3,5ng/µl	65µl	35µl (10ng/µl)
2ng/µl	80µl	20µl (10ng/µl)
1ng/µl	-	100µl (1ng/µl)
0,6ng/µl	40µl	60µl (1ng/µl)
0,35ng/µl	65µl	35µl (1ng/µl)
0,2ng/µl	80µl	20µl (1ng/µl)
0,1ng/µl	90µl	10µl (1ng/µl)

- o auf Eis Standard-Reaktionsmix (mit DNA-Polymerase) pipettieren

	Ausgangs-Konzentration	End-Konzentration	Volumen/ 50µl-Reaktion	Volumen für ... Reaktionen
Wasser	---	---	40,5µl	
PCR-Puffer für <i>Pfu</i>-Polymerase	10x	1x	5µl	
dNTP-Mix	2,5mM	150µM	3µl	
Template (pSF310)	100pg/µl	1pg/µl	0,5µl	
Primer336	100µM	0,5µM	0,25µl	
Primer337	100µM	0,5µM	0,25µl	
<i>Pfu</i>-DNA-Polymerase	50ng/µl	0,5ng/µl	0,5µl	

- o 50µl Reaktionsmix in beschriftetes PCR-Tubes vorlegen (PCR-Kontrolle ohne dUTP)
- o restlichen PCR-Reaktionsmix mit 100µM dUTP-Lösung auf 1µM dUTP einstellen (1/100-Volumen), mischen
- o je 50µl Reaktionsmix (mit dUTP) in beschriftete PCR-Tubes vorlegen
- o je 0,5µl einer dUTPase-Verdünnung zupipettieren
- o Kontrollen:
 - Negativ-Kontrolle: 0,5µl Verdünnungspuffer
 - Positiv-Kontrolle: 0,5µl bereitgestellte *Pab*-dUTPase (~3ng/µl)
- o PCR-Lauf mit folgenden Parametern:

Schritt	Bezeichnung	Dauer	Temperatur
1	Denaturierung	1min	94°C
2	Denaturierung	30s	94°C
3	Anlagerung	30s	63°C
4	Elongation	1min15s	72°C
5	finale Elongation	5min	72°C
2-4	Zyklenzahl	25	---

- o 1% TAE-Agarose-Gel mit schmalen Taschen gießen
- o jede Probe mit je 6µl 10xDNA-Ladepuffer versetzen
- o je 15µl auf Agarose-Gel analysieren

III ANHÄNGE

III.1 Puffer und Reagenzien

Puffer für Proteinaufreinigungen

<i>Pfu-</i> und <i>Pab-</i> DNA-Polymerasen	Extraktionspuffer	50mM Na-PO ₄ pH7.5 500mM NaCl	1mM Imidazol (10mM β-Mercaptoethanol)
	Äquilibrationpuffer	50mM Na-PO ₄ pH7,5 500mM NaCl	1mM Imidazol
	Waschpuffer	50mM Na-PO ₄ pH7.5 500mM NaCl	1mM Imidazol 5mM DTT
	Elutionspuffer	50mM Na-PO ₄ pH7.5 500mM NaCl	300mM Imidazol 5mM DTT
	2xLagerpuffer	40mM Tris-HCl pH7.5 200mM KCl	2mM DTT 0.2mM EDTA
	Verdünnungspuffer	20mM Tris-HCl pH7.5 100mM KCl 1mM DTT 0.1mM EDTA	0.5% NP40 0.5% Tween20 0,1mg/ml BSA 50% Glycerin
<i>Taq-</i> und <i>Tth-</i> DNA-Polymerasen	Extraktionspuffer1	50mM Tris-HCl pH7,5 50mM Glukose	1mM EDTA (20mM β-Mercaptoethanol)
	Extraktionspuffer2	10mM Tris pH8,0 50mM KCl 1mM EDTA,	2mM Imidazol 0,5% Tween 0,5% NP-40
	Äquilibrationpuffer	50mM Tris pH8,0 100mM NaCl	0,1mM EDTA 1mM Imidazol
	Waschpuffer	50mM Tris pH8,0 100mM NaCl 0,1mM EDTA	1mM Imidazol 5mM DTT
	Waschpuffer2	50mM Tris pH8,0 100mM NaCl 0,1mM EDTA	1mM Imidazol 5mM DTT 25% Glycerin
	Elutionspuffer	50mM Tris pH8,0 100mM NaCl 0,1mM EDTA	300mM Imidazol 5mM DTT 25% Glycerin
	Lagerpuffer	50mM Tris pH8,0 100mM NaCl 0,1mM EDTA	5mM DTT 25% Glycerin
	Lagerpuffer B	50mM Tris pH8,0 100mM NaCl 0,1mM EDTA	5mM DTT 75% Glycerin 2% TX-100
	Verdünnungspuffer	50mM Tris-HCl pH 8,0 100mM NaCl 0,1mM EDTA 1mM DTT	1% TX-100 50% Glycerin 0,1mg/ml BSA
<i>Pab</i>-Pyrophosphatase	Extraktionspuffer	50mM Tris-HCl pH7.5 200mM NaCl 5mM MgCl ₂	1mM Imidazol (10mM β-Mercaptoethanol)
	Äquilibrationpuffer	50mM Tris-HCl pH7,5 200mM NaCl	5mM MgCl ₂ 1mM Imidazol
	Waschpuffer	50mM Tris-HCl pH7.5 200mM NaCl 5mM MgCl ₂	1mM Imidazol 5mM DTT
	Elutionspuffer	50mM Tris-HCl pH7.5 200mM NaCl 5mM MgCl ₂	300mM Imidazol 5mM DTT
	2xLagerpuffer	40mM Tris-HCl pH7.5 200mM KCl	2mM DTT 0.2mM EDTA
	Verdünnungspuffer	20mM Tris-HCl pH7.5 100mM KCl 1mM DTT	0.1mM EDTA 0,1mg/ml BSA 50% Glycerin

Pab-dUTPase	Extraktionspuffer	20mM Tris-HCl pH7.5 500mM NaCl 1mM Imidazol	10mM β -Mercaptoethanol 0.1% TX100
	Äquilibrationpuffer	20mM Tris-HCl pH7,5 500mM NaCl	1mM Imidazol 0.1% TX100
	Waschpuffer	20mM Tris-HCl pH7.5 500mM NaCl 1mM Imidazol	5mM DTT 0.1% TX100
	Elutionspuffer	20mM Tris-HCl pH7.5 500mM NaCl 300mM Imidazol	5mM DTT 0.1% TX100
	2xLagerpuffer	40mM Tris-HCl pH8.0	500mM KCl
	Verdünnungspuffer	20mM Tris-HCl pH8.0 250mM KCl	0,1mg/ml BSA 50% Glycerin

Elektrophoresepuffer, Auftragspuffer und Färbelösungen

Coomassie-Lösung	0.25% Coomassie Brilliant Blue R250 45ml Methanol	10ml Eisessig 45ml Wasser
10x DNA-Auftragspuffer	50% Glycerin 10mM EDTA	Orange G
10x SDS-Laufpuffer	für 1 Liter: 150g Glycin	30g Tris Base 10g SDS
5x SDS-Probenpuffer	250mM Tris-HCl pH6.8 500mM DTT 10% SDS	50% Glycerin 0.5% Bromphenolblau
TAE-Puffer	40mM Tris-Acetat 10mM EDTA	für 1l 50x TAE: 242g Tris-Base 57.1ml Essigsäure 100ml 0.5M EDTA pH8.0

Puffer für enzymatische Reaktionen

10x Ligationspuffer	für T4-DNA-Ligase	500mM Tris-HCl pH7.5 100mM MgCl ₂ 100mM DTT	10mM ATP 250 μ g/ml BSA
10x PCR-Puffer	für <i>Pfu</i> - Polymerase	100mM Tris-HCl pH8.85 250mM KCl	50mM (NH ₄) ₂ SO ₄ 20mM MgSO ₄
	für <i>Pab</i> -Polymerase	200mM Tris-HCl pH9.0 250mM KCl 15mM MgSO ₄	100mM (NH ₄) ₂ SO ₄ 1% Tween20 1mg/ml BSA
	für <i>Taq</i> -Polymerase	100mM Tris-HCl pH8,3 15mM MgCl ₂	500mM KCl
	für <i>Tth</i> -Polymerase	100mM Tris-HCl pH8,9 15mM MgCl ₂ 1M KCl	500 μ g/ml BSA 0,5% Tween20

Antibiotika

Substanz	Konzentration der Stammlösung	Endkonzentration
Ampicillin	100mg/ml	100-300mg/ml
Chloramphenicol	34mg/ml	34mg/ml
Kanamycin	25mg/ml	25-50mg/ml

Medien und Medienzusätze

Name	Zusammensetzung oder Konzentration
2YT-Medium	pro Liter: 16g Bacto-tryptone 5g NaCl 10g Bacto-yeast extract 200µl 5N NaOH
LB-Medium	pro Liter: 10g Bacto-tryptone 10g NaCl 5g Bacto-yeast extract 200µl 5N NaOH
Glukose	40% (w/v)
Glycerin	50% (v/v)
K₂HPO₄	1 M

TAE-Agarose-Gele

	Stock	Endkonzentration	0,8%	1%	1,2%	1,5%
1xTAE-Puffer	1x	1x	200ml	200ml	200ml	200ml
Agarose	fest	variabel	1,6g	2g	2,4g	3g
Ethidiumbromid	10mg/ml	0,5µg/ml	10µl	10µl	10µl	10µl

Die Mischung wird in der Mikrowelle aufgekocht bis die Agarose vollständig gelöst ist, unter leichtem Schwenken im Wasserstrahl auf etwa 60-70°C abgekühlt und in die abgeklebte Gelkammer mit eingesetztem Gelkamm gegossen.

III.2 Glossar

dNTPs	Desoxyribonucleosid-Triphosphate; eine äquimolare Mischung von dATP, dGTP, dCTP, dTTP
Fusionsprotein	Durch gentechnische Veränderung hergestellte Verknüpfung zweier Proteine oder eines Proteins mit einem Peptid
<i>in-frame</i>	im gleichen Leseraster
<i>Insert</i>	bei Klonierungen: DNA-Fragment, das in einen geschnittenen Vektor eingefügt wird
Klon	Population genetisch identischer Organismen
Klonierung	ursprünglich: Heranzucht einer Population genetisch identischer Organismen aus einer Einzelzelle im Laborjargon verwendet als: kovalente Verknüpfung von mindestens zwei DNA-Fragmenten unter Bildung eines neuen (rekombinanten) DNA Moleküls
Ligand	Molekül, das spezifisch und reversibel ein anderes Molekül oder eine Gruppe anderer Moleküle bindet
Matrix	in der Affinitätschromatographie: inerte Festsubstanz, an die ein Ligand gekoppelt werden kann
multiple cloning site (MCS)	artificialer DNA-Abschnitt mit tandemartig angeordneten Erkennungssequenzen für unterschiedliche Restriktionsendonukleasen
NTA	engl.: nitrilotriacetic acid
OD₆₀₀	optische Dichte bei 600nm wird auch als Mengenangabe bei Zellsuspensionen verwendet: 1 OD ₆₀₀ entspricht der Menge an Zellen, die in 1ml Kultur einer optischen Dichte von 1 bei 600nm enthalten sind
PCR	engl.: Polymerase chain reaction Technik zur Amplifizierung spezifischer DNA Regionen; beruht auf zyklischer Abfolge von thermischer Denaturierung der DNA und DNA-Synthese
<i>Primer</i>	Kurze DNA-Moleküle (Oligonukleotide), die komplementär zu einer Ziel-DNA Sequenz sind
<i>proof-reading</i>	bei DNA-Polymerasen: Korrekturlesefunktion
rpm	Rotationen pro Minute
<i>Site</i>	Erkennungsstelle für Restriktionsendonukleasen oder Proteasen
<i>Spacer</i>	i.A. Abstandshalter In der Affinitätschromatographie: Abstandshalter zwischen Matrix und Ligand. Verbessert Bindung des Targetmoleküls an den Liganden durch Verminderung sterischer Hindernisse
Spezifische Aktivität	enzymatische Aktivität, normalisiert auf Proteinmenge; Einheit: U/mg
<i>Tag</i>	DNA-oder Protein-Anhänge, die der Immobilisierung, Aufreinigung, Markierung oder (visuellen) Detektion dienen können
<i>Template</i>	DNA-Präparation, die als Ausgangsmaterial zur DNA-Vervielfältigung mittels Polymerase Kettenreaktion eingesetzt werden kann
Thermische Denaturierung	partielle oder vollständige Entfaltung der nativen Konformation (Tertiär- bzw. Quartärstruktur) eines Proteins unter Auflösung nichtkovalenter Bindungen aufgrund hoher Temperaturen
Vektor	In der Gentechnologie versteht man unter einem Vektor ein Transportvehikel zur Übertragung einer Fremd-Nukleinsäure (oft DNA) in eine Empfängerzelle. Als Vektoren werden meist Plasmide oder modifizierte Viren (z.B. Bakteriophagen oder Retroviren) verwendet