

Praxisprojekt 5 (5. Semester)

an der

Berufsakademie Sachsen
Staatliche Studienakademie Riesa
Studiengang Labor- und Verfahrenstechnik

Kurs: 14BT-1

Studienrichtung: Biotechnologie

Thema: Herstellung, Reinigung und Vergleich von zwei Proteinen-Disulfidisomerasen
aus *Mus musculus* und *Arxula adenivorans*.

Eingereicht von:

Martin Schneider
Am Graben 2
01809 Dohna

Firma:

QuoData GmbH
Prellerstraße 14
01309 Dresden

Betrieblicher Betreuer: M. Sc. Martin Jähne

Eidesstaatliche Erklärung

Hiermit versichere ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig und ohne fremde Hilfe angefertigt und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet habe. Die eingereichte schriftliche Fassung der Arbeit entspricht der auf dem elektronischen Speichermedium. Weiterhin versichere ich, dass die vorliegende Arbeit noch nicht als Abschlussarbeit an anderer Stelle eingereicht wurde.

Ort, Datum

Unterschrift

Abkürzungsverzeichnis

<i>A. adenivorans</i>	<i>Arxula adenivorans</i>
aPDI	Protein-Disulfidisomerase der <i>Arxula adenivorans</i>
A _x	Absorption bei Wellenlänge x
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DTT	Dithiothreitol
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EtBr	Ethidiumbromid
IPTG	Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid
LB-Medium	Luria-Broth-Medium
<i>M. musculus</i>	<i>Mus musculus</i>
mPDI	Protein-Disulfidisomerase der <i>Mus musculus</i>
OD _x	Optische Dichte bei Wellenlänge x
PCIA	Phenol/Chloro-form/Isoamylalkohol
PDI	Protein-Disulfidisomerase
PK	Positivkontrolle
RT	Raumtemperatur
SDS	Natriumlaurylsulfat
SDS-PAGE	Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese
SOC-Medium	Super optimal broth medium
TAE-Puffer	TRIS-Acetat-EDTA-Puffer
TEMED	Tetramethylethylendiamin
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
TSA-Agar	Casein-Soja-Pepton-Agar
°C	Grad Celsius
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
bP	Basenpaare
g	Gramm
g	Fallbeschleunigung
h	Stunden
l	Liter
M	Molar
mA	Milliampere
mg	Milligramm
min	Minuten
ml	Milliliter
mM	Millimolar
rpm	Umdrehungen pro Minute
s	Sekunden
V	Volt
kDa	Kilodalton

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	I
1 Einleitung	1
1.1 Protein-Disulfidisomerasen	1
1.2 <i>Mus musculus</i>	1
1.3 <i>Arxula adeninivorans</i>	1
1.4 <i>Escherichia coli</i>	2
1.5 Herstellung rekombinanter Proteine	3
2 Zielstellung	1
3 Material	1
3.1 Chemikalien und Enzyme	1
3.2 Puffer, Medien und Lösungen	1
3.3 Plasmide und Mikroorganismen	4
3.4 Geräte	4
4 Methoden	5
4.1 Chemisch kompetente Zellen	5
4.2 Transformation	5
4.3 Miniprep	5
4.3.1 Miniprep mit PCIA-Extraktion	5
4.3.2 Miniprep mit P1	6
4.3.3 Plasmidextraktion mittels Roti®-Prep Plasmid MINI Kit	6
4.3.4 Reinheitsbestimmung der Plasmidlösungen	7
4.4 Agarose-Gelelektrophorese	7
4.4.1 Restriktionsverdau	7
4.4.2 Gießen des Agarosegels	8
4.4.3 Durchführung der Elektrophorese	8
4.4.4 Nachträgliche Ethidiumbromid-Färbung	8
4.5 SDS-Page	8
4.5.1 Probenvorbereitung	8
4.5.2 Gießen des Polyacrylamid-Gels	8
4.5.3 Gelelektrophorese	9
5 Ergebnisse	10
5.1 Transformation	10

5.1.1 XL1 Blue	10
5.1.2 BL21	10
5.2 Miniprep mit PCIA-Extraktion	10
5.3 Miniprep mit P1	12
5.4 Vergleich der Extraktionseffizienz zwischen kommerziellem Extraktionskit und der Miniprep mit P1	14
5.5 SDS-Page der transformierten BL21-Klone	17
5.6 Expressionskinetik von pET16b-mPDI in BL21-M3 und pET16b-aPDI in BL21-A2 ...	20
6 Auswertung	23
6.1 Transformation	23
6.2 Miniprep mit PCIA-Extraktion	23
6.3 Miniprep mit P1	23
6.4 Vergleich der Extraktionseffizienz zwischen kommerziellem Extraktionskit und der Miniprep mit P1	24
6.5 SDS-PAGE der transformierten BL21-Zellen	26
6.6 Expressionskinetik von BL21-M3 und BL21-A2	27
7 Zusammenfassung.....	29
Literaturverzeichnis.....	31

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1 Systematik <i>E. coli</i>	2
Tabelle 2: Für die Miniprep nach Laborprotokoll verwendete Reagenzien und Puffer.....	2
Tabelle 3: Rezepte der Reagenzien P1, P2 und P3 für die Miniprep	2
Tabelle 4: Zusammensetzung des Sammelgels, ergibt 2,5 ml	2
Tabelle 5: Zusammensetzung des Trenngels mit 12 % Acrylamid, ergibt 5 ml	2
Tabelle 6: Zusammensetzung des Trenngels mit 10 % Acrylamid, ergibt 5 ml	3
Tabelle 6: Zusammensetzung der für die SDS-Page verwendeten Puffer	3
Tabelle 7: Zusammensetzung der für die Agarose-Gelelektrophorese verwendeten Puffer.....	3
Tabelle 8: Name und Typ der verwendeten Geräte.....	4
Tabelle 9: Zu erwartende DNA-Fragmentgrößen nach Restriktionsverdau	7
Tabelle 10: Absorption der mittels Miniprep extrahierten Plasmid-Proben bei 260 nm mit dem jeweiligen, für die Extraktion verwendeten Klon	11
Tabelle 11: Belegung des Agarosegels zur Identifizierung der mittels Miniprep mit PCIA-Extraktion isolierten Plasmide	11
Tabelle 12: Absorption der mittels Miniprep mit P1 extrahierten DNA-Proben bei 260 nm und 260/280 Verhältnis	12
Tabelle 13: Belegung des Agarosegels zur Untersuchung der DNA-Proben der Miniprep mit P1; A1-A3	13
Tabelle 14: Vergleichende Darstellung der erwarteten und ermittelten Banden der Agarose-Gelelektrophorese, alle Angaben in bP.	14
Tabelle 15: Absorptionen der mit dem Roti [®] -Prep Plasmid MINI Kit und der Miniprep mit P1 extrahierten DNA-Proben bei 260 und das 260/280-Verhältnis als Reinheitsparameter.....	15
Tabelle 17: Ermittelte Banden der verdauten DNA-Extrakte und Positivkontrollen der pET16b-aPDI-transformierten XL1-Zellen.....	16
Tabelle 19: Belegung des Acrylamidgels für die SDS-Page der transformierten und induzierten BL21-Klone.....	17
Tabelle 21: Auftragsschema der induzierten und lysierten Zellen der BL21-Klone A1-A4 und M2-M5 auf das Fertiggel und selbstgegossene Gel. Nicht belegte Taschen des selbstgegossenen Gels wurden mit 5-fach konzentriertem Probenladepuffer beladen und nicht aufgeführt.	19
Tabelle 22: Parameter der Induktion zur Untersuchung der Induktionskinetik	21
Tabelle 23: Belegung des Polyacrylamidgels zur Untersuchung der Proteinkonzentration in Abhängigkeit von der Induktionsdauer	21

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Schematischer Ablauf einer Klonierung [BLEILE; 2014]	4
Abbildung 4: Agarose-Gel der per Miniprep extrahierten und mit Restriktionsenzymen geschnittenen DNA unter UV-Licht	12
Abbildung 5: Agarosegel der mit Miniprep mit P1 isolierten und mit Restriktionsverdau aufgespaltenen DNA-Proben unter UV-Licht.....	13
Abbildung 6: Agarosegel zum Restriktionsverdau der mittels Miniprep und kommerziellem Extraktionskit isolierten Plasmidproben mit beschrifteten Markerbanden	16
Abbildung 7: Acrylamidgel der transformierten BL21-Zellen mit Beschriftung der Markerbanden, Coomassie-Färbung mittels Roti® Blue	18
Abbildung 8: Aufnahme des Roti-PAGE Precast Gels des vergleichenden Versuchs zwischen kommerziellem Gel und selbstgegossenem Gel, Bandenbeschriftung in kDa.....	19
Abbildung 9: Aufnahme des selbstgegossenen Polyacrylamidgels (10 % Bis-/Acrylmid) des vergleichenden Versuchs zwischen kommerziellem Gel und selbstgegossenem Gel	20
Abbildung 10: Acrylamidgel der BL21-Klone A2 und M3 nach Induktion für 0 h, 1 h, 2 h, 4 h, über Nacht mit Bandenbeschriftung in kDa	22

1 Einleitung

1.1 Protein-Disulfidisomerasen

Protein-Disulfidisomerasen (PDIs) sind wasserlösliche Proteine, die vorwiegend im Lumen des ER vorkommt. Sie gehören zu den sogenannten Faltungshelferenzymen und katalysiert Thiol-Disulfid-Austauschreaktionen, speziell die Oxidation, Reduktion und Umlagerung von Disulfidbrücken. Die funktionell aktive Form der PDI ist ein Homodimer, dessen Molekulargewicht beim Menschen 56 kDa beträgt. [FREEDMAN, 1988]

PDIs wurden in vielen höheren Eukaryoten wie der Hausmaus *Mus musculus* oder dem Menschen nachgewiesen und treten vermehrt in Zellen auf, die an der Synthese von sekretorischen Proteinen beteiligt sind. Es wurde nachgewiesen, dass die PDIs aktiv auf eine große Vielfalt von Proteinen wirken, von kleinen Monomeren wie dem pankreatischen Trypsin-Inhibitor bis zu vielkettigen Proteinen wie Procollagen. Weiterhin wurde festgestellt, dass PDIs an der Synthese von sekretorischen, an der Zelloberfläche gebundenen Proteinen beteiligt sind. Die PDIs sind durch das reversible Binden von Ca^{2+} -Ionen und Cu^{+} -Ionen ebenfalls von Bedeutung für den zellulären Calciumhaushalt und wirken stimulierend auf die Angiogenese. Eine Publikation von 2009 belegt, dass erhöhte PDI-Aktivitäten in der Maus das Risiko und die Folgen eines Infarktes deutlich senken. [FREEDMAN, 1988; TIAN, 2009]

Diagnostisch kann die PDI-Produktion bei Fischen als Parameter für die Stressbelastung des Organismus sein, bei Menschen kann die gesenkte PDI-Produktion in der Bauchspeicheldrüse ein Indikator für eine Krebserkrankung sein. Wirtschaftlich wird die PDI zur *in vivo* Faltung von Proteinen und als Zusatz für Haarfärbemittel verwendet, um Schäden an den Haaren zu reparieren und die Färbung besser einwirken zu lassen. [FERNANDES, 2011; NOIVA 1994]

1.2 *Mus musculus*

Die Hausmaus *Mus musculus* wurde zu Beginn des 19. Jahrhunderts als einer der ersten genetischen Modellorganismen eingesetzt, aufgrund der einfachen Haltung, der kurzen Generationszeit und der großen Vielfalt einfach zu unterscheidender Phänotypen. Als Säugetiere sind sie dazu geeignet, als Modelle für menschliche Phänotypen und Krankheiten verwendet zu werden. Inzwischen ist *M. musculus* zu einem der wichtigsten Organismen für Untersuchungen und Laborversuche zu Säugetieren geworden. Unter anderem wurde *Mus musculus* für Untersuchungen zu verschiedensten biologischen Prozessen, Krebs, Immunreaktionen, adaptiver Evolution und Sterilisierungen verwendet. [PHIFER-RIXLEY, 2015]

1.3 *Arxula adeninivorans*

Arxula adeninivorans (*A. adeninivorans*) ist eine nicht-pathogene, dimorphe Hefe, die aufgrund einiger ungewöhnlicher Eigenschaften zunehmend an Bedeutung in der Biotechnologie gewinnt. *A. adeninivorans* ist in der Lage, mit einer großen Vielfalt an Substraten als einzige Kohlenstoff- oder Stickstoffquelle auszukommen, baut Stärke effizient ab und zeigt ein für Hefe ungewöhnlich hohes Wachstum. Weiterhin ist *A. adeninivorans*

deutlich temperatur- und halotoleranter als andere Hefen. Ein Wachstum ist in Medien mit 20 % NaCl und bei Temperaturen bis zu 48 °C möglich. [WARTMANN, 2000]

A. adenivorans weist einen temperaturabhängigen Dimorphismus auf. Bei Inkubationstemperaturen von über 42 °C werden reversibel Myzelien gebildet, welche eine zweifache Konzentration von Proteinen und bis zu fünffache Glucoamylase- und Invertase-Aktivität aufweisen als Zellen ohne Myzelien. Aufgrund dieser ungewöhnlichen Eigenschaften ist *A. adenivorans* für biotechnologische Anwendungen von großem Interesse. [WARTMANN, 200]

1.4 *Escherichia coli*

Das stäbchenförmige Bakterium *Escherichia coli* (*E. coli*) wurde nach seinem Entdecker, dem Arzt Theodor Escherich benannt und zählt zu der Familie der Enterobakterien, wie der Systematik in Tabelle 1 zu entnehmen ist. [BÜLTE; 2014]

Tabelle 1 Systematik *E. coli*

Domäne	Bacteria
Reich	Proteobacteria
Klasse	Gamma Proteobacteria
Ordnung	Enteriobacteriales
Familie	Enterobacteriaceae
Gattung	Escherichia
Art	coli

E. coli ist Gram-negativ, aerob oder fakultativ anaerob und peritrich begeißelt bzw. von einer Polysaccharid-Kapsel umgeben. Es kommt im Dickdarm und in den Fäkalien nahezu aller Tiere vor und ist ein fakultativ pathogener Organismus, da er Diarrhöen und Koliken hervorrufen kann. Aufgrund dessen findet *E. coli* in der Analytik von Wasserproben als Fäkalindikator Anwendung und wird zur Beurteilung der Wassergüte herangezogen. [GÄNZLE; 2010]

Weiterhin ist er einer der wichtigsten Wirtsorganismen bei der Klonierung und Expression von Wachstumshormonen, Gensequenzen in der Forschung und von Proteinen wie Insulin. Aufgrund der geringen Generationszeit von bis zu 20 Minuten bei idealen Bedingungen und der hohen Robustheit der Zellen ist *E. coli* einer der verbreitetsten Wirtsorganismen für die Herstellung rekombinanter Proteine. [ROSANO, 2014]

Wichtige Stämme sind unter anderem die nichtpathogenen Stämme K12 und BL21(DE3) (kurz: BL21), die weitläufig für die Herstellung von rekombinanten Proteinen genutzt werden. Ebenfalls eine große Bedeutung besitzen beide Stämme als Modelorganismen in verschiedensten internationalen Bildungs- und Forschungseinrichtungen. Der in dieser Arbeit verwendete Stamm XL1-Blue ist ein Derivat des K12-Stammes. [PLATTNER, 2011]

1.5 Herstellung rekombinanter Proteine

Rekombinante Proteine sind mittels Gentechnik in Zellen produzierte Proteine, in denen sie natürlich nicht vorkommen. Typische Anwendungsgebiete sind die Herstellung von Enzymen oder Proteinen für menschliche Medikamente in Zellen, die leichter zu kultivieren und zu ernten sind. Ein besonders wichtiger Vertreter dieser Zellen ist *E. coli*, aufgrund der geringen Anforderungen an Nährmedien und Inkubationsverfahren, oder Zellen aus den Ovarien des chinesischen Hamsters aufgrund der hohen Ähnlichkeit zu menschlichen Zellen. [ROSANO, 2014]

Das Verfahren der Herstellung rekombinanter Proteine ist in folgende Schritte gegliedert: Klonierung eines Vektors, Transformation der Zellen, Induktion der Proteinproduktion und Ernte. Typische Vektoren für die Herstellung rekombinanter Proteine in Prokaryoten sind Plasmide, extrachromosomale, selbstreplizierende, ringförmige DNA-Moleküle, die über die Zellwand aufgenommen werden können. Die für die Klonierung wichtigsten Bestandteile des Plasmiden sind der Replikationsursprung, die Multiple Cloning Site, ein Promoter und ein Resistenzgen. [DINGERMAN, 1999]

Der Replikationsursprung, auch ORI (Origin of Replication) genannt, ist entscheidend für die Anzahl der entstehenden Plasmidkopien und ist der Initiationspunkt der Replikation. Ein low-copy-Plasmid stellt dabei weniger als 20 Kopien her während ein high-copy-Plasmid mehrere Hundert Kopien pro Zelle produzieren kann. Die Multiple Cloning Site (MCS) enthält Schnittstellen zur Insertion der zu klonierenden Fragmente. Als Selektionsmarker werden häufig Resistenzgene verwendet. Das Resistenzgen stellt einen Selektionsvorteil dar, durch den später die Selektion der erfolgreich transformierten Zellen erfolgt, indem Zellen ohne das Resistenzgen mittels eines Selektionsmediums abgetötet werden. Der Promoter, als letzter Bestandteil, ist für die Steuerung der Transkription der Zielproteine verantwortlich. [DINGERMAN, 1999]

Der Vektor wird zunächst durch Restriktionsenzyme linearisiert. Dabei handelt es sich um Restriktionsendonucleasen, welche meist bakterieller Herkunft sind und die Phosphodiester-Bindungen in den Strängen eines DNA-Moleküls schneiden können. Die ursprüngliche biologische Funktion von diesen Enzymen ist dabei der Schutz der Zelle durch Spaltung von eingedrungener Fremd-DNA. Bei der Spaltung des DNA-Rings können entweder stumpfe Enden entstehen, sogenannte blunt ends, oder kohäsive Enden, welche um einige Basenpaare versetzt geschnitten werden. In den linearisierten Vektor kann nun das, zu replizierende, Gen für die Proteinherstellung eingesetzt und durch das Wirken von Ligasen verbunden werden. [KNIPPERS, 2001]

Dieser zusammengesetzte Vektor wird als rekombinant bezeichnet. Diese rekombinante DNA wird abschließend in eine zum Beispiel mit Calciumchlorid-Lösung oder durch Elektroporation behandelte Wirtszelle transformiert, wo sich der Vektor zusammen mit der neu eingesetzten DNA vermehrt. Die abschließende Selektion erfolgt häufig durch Zugabe von Antibiotika. Dabei sterben die Zellen, die nicht das Antibiotikaresistenzgen aufweisen, ab (Vgl. Abbildung 1). [GÖTTFERT, 2010]

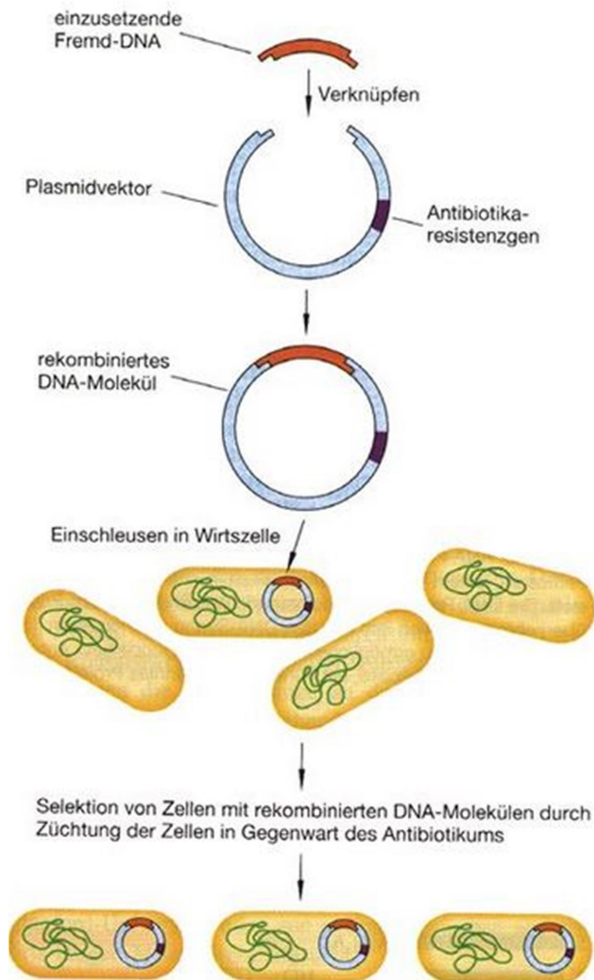


Abbildung 1: Schematischer Ablauf einer Klonierung [BLEILE; 2014]

Die klonierten Zellen können die aufgenommenen Vektoren wieder abstoßen, wenn das Resistenzgen aufgrund der Inkubationsparameter keinen Selektionsvorteil mehr bietet. Deshalb werden klonierte Zellen stets unter Selektionsdruck inkubiert, zum Beispiel in Medium mit Antibiotika. Um die Produktion der rekombinanten Proteine zu verstärken, kann der Promoter des Gens durch Induktion aktiviert werden. Typischerweise wird in *E. coli* das Gen des Zielproteins in das lac-Operon eingefügt, das durch den lac-Promoter reguliert wird. Der lac-Promoter ist negativ reguliert und wird erst durch einen Induktor wie Lactose oder IPTG aktiviert. Ist der Promoter aktiviert, wird das rekombinante Gen exprimiert und das rekombinante Protein gebildet. [ROSANO, 2014]

Die Ernte des rekombinanten Proteins variiert stark abhängig von den Eigenschaften des Proteins. Typische Aufschlussverfahren sind Kombinationen aus mechanischen Verfahren wie dem Ultraschallaufschluss oder der French Press mit chemischen oder enzymatischen Verfahren wie dem Aufschluss über Säuren oder Laugen oder mittels Lysozym. Für *E. coli* wird für den Labormaßstab meist eine Kombination aus Ultraschallaufschluss und enzymatischer Lyse mit Lysozym verwendet. Abhängig von der Stabilität des Proteins oder dem Wirtsorganismus können aber auch Verfahren wie der Hochdruckhomogenisator oder mehreren Zyklen aus Einfrieren und Auftauen eingesetzt werden, um das rekombinante Protein nicht zu beschädigen. Weiterhin ist zu beachten, dass bei dem Aufschluss der Zellen

auch andere Proteine, wie zum Beispiel Proteasen, freigesetzt werden, die das rekombinante Protein zerstören könnten. Es ist auch darauf zu achten, dass die Kultur in einem geeigneten Puffer suspendiert wurde, um das Zielprotein nicht durch die Überführung in ein schädliches Milieu zu denaturieren oder permanent zu beschädigen. [STRUCTURAL GENOMICS CONSORTIUM, 2008]

Nach dem Aufschluss erfolgt eine Aufreinigung des Proteins bis zu der benötigten Reinheit. Eine wichtige Methode für die Extraktion von rekombinanten Proteinen ist das Anhängen eines Affinität-Tags, einer Aminosäuresequenz, dessen Gen oder Basensequenz direkt an das Gen des Proteins angehängt wird. Es entsteht eine Aminosäuresequenz am Ende des rekombinanten Proteins, die eine einfache Aufreinigung mittels Affinitätschromatographie ermöglicht. Ein wichtiger Vertreter ist der Polyhistidin-Tag, kurz His-Tag, der aus mindestens sechs Histidinen besteht, die eine starke Affinität zu zweiwertigen Nickel- und Kobalt-Ionen aufweisen. Dieser Polyhistidinschwanz vermittelt eine Immobilisierung des rekombinanten Proteins an Chelat-gebunden Metallionen und eignet sich daher für die Aufreinigung mittels Metall-Chelat-Chromatographie. [STRUCTURAL GENOMICS CONSORTIUM, 2008]

2 Zielstellung

Ziel dieser Arbeit war die Herstellung, Isolation, Reinigung und Charakterisierung von zwei rekombinanten Protein-Disulfidisomerasen aus *Mus musculus* und *Arxula adeninivorans* in *E. coli* BL21. Dafür wurden im Einzelnen folgende Arbeitsschwerpunkte definiert:

- Transformation von *E. coli* XL1 mit den fertigen Plasmid-Konstrukten und Amplifikation sowie anschließende Isolation und Reinigung. Identifizierung der Plasmide mittels Restriktionsverdau und Agarose-Gelelektrophorese.
- Transformation des Expressionsstamm BL21 und Genexpression durch Induktion. Dokumentation der Herstellung der rekombinanten PDIs mittels SDS-PAGE.
- Zellaufschluss der Kulturansätze und Isolation der rekombinanten PDIs. Einstufige Reinigung über eine Ni-NTA-Säule und Dokumentation mittels SDS-PAGE.
- Charakterisierung der gereinigten PDIs hinsichtlich der Aktivität und Stabilität.

Die für die Umsetzung der o. g. Ziele notwendigen Methoden mussten im Zuge dieser Arbeit erst im Labor der QuoData GmbH erprobt und angepasst werden, da bislang sämtliche Arbeiten zur Herstellung von Biosensoren und rekombinanten Proteinen im Rahmen von FuE-Vorhaben durch Kooperationspartner übernommen wurden.

3 Material

3.1 Chemikalien und Enzyme

Chemikalie/Enzym	Spezifikation	Hersteller
D-Glucose	> 99,5 %	Sigma-Aldrich
Trizma-Hydrochloride	> 99 %	Sigma-Aldrich
Ethylendiamintetraacetat	99,5 %	Sigma-Aldrich
Natriumhydroxid	min. 98 %	Carl Roth
Natriumlaurylsulfat	> 99 %	Carl Roth
Natriumacetat	> 99 %	Fluka
Essigsäure	100 %	Carl Roth
Rotiphorese[®] NF-Acrylamid/-Bis-Lösung	30 %	Carl Roth
Ammoniumpersulfat	> 98 %	Acros Organics
Tetramethylethylendiamin	> 98,5 %	Carl Roth
TSA-Agar	Für die Mikrobiologie	Carl Roth
LB-Medium	Für die Mikrobiologie	Fluka
Magnesiumchlorid	> 98,5 %	Carl Roth
Calciumchlorid-Dihydrat	> 99 %	Carl Roth
Glycerol	99,5 %	Carl Roth
Roti[®]-Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol	-	Carl Roth
Isopropanol	99,6 %	Acros Organics
Ammoniumacetat	97 %	Acros Organics
Ethanol	> 99,8 %	Carl Roth
Agarose	BioScience Grade	Carl Roth
Ethidiumbromid	1 % in Wasser	Acros Organics
Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid	> 99 %	Carl Roth
Methanol	99,5 %	Carl Roth
Bromphenolblau	Natriumsalz	Carl Roth
Dithiothreitol	> 98 %	Sigma-Aldrich
Glycin	>99,5 %	Carl Roth
TRIS-Pufferan[®]	99,9 %	Carl Roth
RNAse A	Salzfrei, proteasefrei	Carl Roth
Ampicillin Natriumsalz	> 99 %	Carl Roth
Kanamycinsulfat		Carl Roth

3.2 Puffer, Medien und Lösungen

Für die Miniprep mit PCIA-Extraktion wurden die folgenden Puffer und Reagenzien verwendet:

Tabelle 2: Für die Miniprep nach Laborprotokoll verwendete Reagenzien und Puffer

Reagenz/Puffer	Zusammensetzung
GTE-Puffer	50 mM Glucose 25 mM Tris-HCl 10 mM EDTA pH 8, eingestellt mit NaOH
TE-Puffer	10 mM Tris-Cl 1 mM EDTA pH 7,5, eingestellt mit NaOH
Lyse-Reagenz	0,2 M NaOH 1 % SDS

Für die Miniprep mit P1 wurden die folgenden Reagenzien verwendet:

Tabelle 3: Rezepte der Reagenzien P1, P2 und P3 für die Miniprep

Reagenz	Rezept
P1	6,1 g/l Tris 3,7 g/l EDTA pH 8
P2	8 g/l NaOH 1 % SDS
P3	29,4 g Natriumacetat 50 ml Wasser Mit Essigsäure auf pH 5,5 einstellen Mit Wasser auf 100 ml auffüllen

Die Zusammensetzung der für die SDS-Page verwendeten Gele sind in Tabelle 4 und Tabelle 5 aufgeführt:

Tabelle 4: Zusammensetzung des Sammelgels, ergibt 2,5 ml

Chemikalie/Reagenz	Verwendetes Volumen
Reinstwasser	1,4875 ml
0,5 M Tris-HCl, pH 6,8	0,625 ml
10 % SDS	25 µl
Bis-/Acrylamid (1 %/ 29 %)	0,335 ml
10 % Ammoniumpersulfat	25 µl
TEMED	2,5 µl

Tabelle 5: Zusammensetzung des Trenngels mit 12 % Acrylamid, ergibt 5 ml

Chemikalie/Reagenz	Verwendetes Volumen
Reinstwasser	1,6 ml
1,5 M Tris-HCl, pH 8,8	1,3 ml
10 % SDS	50 µl
Bis-/Acrylamid (1 %/ 29 %)	2 ml
10 % Ammoniumpersulfat	50 µl
TEMED	5 µl

Tabelle 6: Zusammensetzung des Trenngels mit 10 % Acrylamid, ergibt 5 ml

Chemikalie/Reagenz	Verwendetes Volumen
Reinstwasser	1,6 ml
1,5 M Tris-HCl, pH 8,8	1,3 ml
10 % SDS	50 µl
Bis-/Acrylamid (1 %/ 29 %)	2 ml
10 % Ammoniumpersulfat	50 µl
TEMED	5 µl

Die für die SDS-Page verwendeten Puffer sind in Tabelle 7 dargestellt.

Tabelle 7: Zusammensetzung der für die SDS-Page verwendeten Puffer

Reagenz/Puffer	Zusammensetzung
5x Ladepuffer	10 % SDS 10 mM Dithiothreitol 20 % Glycerin 0,2 M Tris-HCl 0,05 % Bromphenolblau
1x Laufpuffer	25 mM Tris-HCl 200 mM Glycin 0,1 % SDS

Die Zusammensetzung der für die Agarose-Gelelektrophorese verwendeten Puffers sind in Tabelle 8 zusammengefasst.

Tabelle 8: Zusammensetzung der für die Agarose-Gelelektrophorese verwendeten Puffer

Reagenz/Puffer	Zusammensetzung
6x Ladepuffer	1 ml Reinstwasser (steril) 1 ml Glycerin ca. 0,05 mg Bromphenolblau
1x TAE-Puffer	2,42 g Tris 0,57 ml reine Essigsäure 1 ml 0,5 M EDTA (pH 8) Auf 500 ml auffüllen mit Reinstwasser

Es wurde in dieser Arbeit außerdem Rotiphorese[®] 10x SDS-PAGE-Laufpuffer und Rotiphorese[®] 10x TAE-Puffer sowie die Färbelösung Roti[®]-Blue von Carl Roth verwendet.

Das genutzte LB-Medium wurde als Pulver von Fluka bezogen, der TSA-Agar ebenfalls als Pulver von Carl Roth. Beide Medien wurden nach den mitgelieferten Anweisungen des Herstellers in Wasser gelöst und autoklaviert.

3.3 Plasmide und Mikroorganismen

Für diese Arbeit wurden die *E. coli*-Stämme XL1 Blue und BL21(DE3) verwendet. Die Zellen wurden vom Leibniz-Institut für Pflanzengenetik und Kulturpflanzenforschung in Gatersleben bereitgestellt.

Die genutzten Plasmide waren:

- pET16b, kloniert mit aPDI-Gen und 10x-His-Tag, Resistenzgen gegen Kanamycin, Plasmidgröße: 7206 bP, kurz: pET16b-aPDI
- pET16b, kloniert mit mPDI-Gen und 10x-His-Tag, Resistenzgen gegen Ampicillin, Plasmidgröße: 7206 bP, kurz: pET16b-mPDI

Die Plasmide wurden ebenfalls bereitgestellt vom Leibniz-Institut für Pflanzengenetik und Kulturpflanzenforschung Gatersleben.

3.4 Geräte

Die für diese Arbeit eingesetzten Geräte sind in Tabelle 9 aufgelistet.

Tabelle 9: Name und Typ der verwendeten Geräte

Gerät	Typ
Schüttler	Thermo MaxQ 4450
Schüttler	Titramax 101
Vortexer	MS 1 Minishaker
Zentrifuge	Eppendorf Zentrifuge 5424 Heraeus Megafuge 1.0
Zentrifuge	Eppendorf Heraeus Labofuge 400e
Brutschrank	VWR IncuLine IL 10
Elektrophorese-Netzteil	Biotec-Fischer Pherostab
SDS Gellaufkammer	Peqlab PerfectBlue™ Doppel-Gelsystem Twin S

4 Methoden

4.1 Chemisch kompetente Zellen

Als Vorkultur wurden 5 ml LB-Medium mit einigen Zellen von einer TSA-Agarplatte inokuliert und über Nacht bei 37 °C und 180 rpm inkubiert. Anschließend wurde 1 ml der Vorkultur in 100 ml LB-Medium überführt und weitere 3 h bei 37 °C und 170 rpm inkubiert, bis eine OD₆₂₀ von 0,35 bis 0,4 erreicht wurde. Anschließend wurde die Kultur etwa 30 Minuten lang bei 4 °C gekühlt.

Die Kultur wurde in vier Zentrifugenröhrchen aliquotiert und mit 3000 g bei 4 °C für 15 min zentrifugiert. Der Überstand wurde dekantiert und die Pellets in jeweils 10 ml eiskaltem 100 mM MgCl₂ resuspendiert. Die Suspensionen wurden in einem Röhrchen vereint und mit 2000 g bei 4 °C 15 Minuten lang zentrifugiert. Der Überstand wurde dekantiert und das Pellet in 20 ml eiskaltem 100 mM CaCl₂ resuspendiert. Die Suspension wurde 20 Minuten lang bei 4 °C gekühlt.

Anschließend wurde die Suspension mit 2000 g bei 4 °C 15 Minuten lang zentrifugiert, der Überstand verworfen und das Pellet in 5 ml 85 mM CaCl₂, 15 % Glycerin resuspendiert. Die Zellen wurden mit 1000 g bei 4 °C 15 Minuten lang abzentrifugiert und anschließend in 200 µl 85 mM CaCl₂, 15 % Glycerin resuspendiert. Die Suspension wurde in 2 ml Eppendorf-Reaktionsgefäße zu je 50 µl aliquotiert und bei -80 °C tiefgefroren.

4.2 Transformation

Für die Transformation wurden kompetente Zellen aus der Lagerung bei -80 °C verwendet. Es wurden Aliquots mit jeweils 50 µl Zellsuspension bei 4 °C aufgetaut und jeweils 1 µl pET16b-mPDI bzw. 2 µl pET16b-aPDI zugegeben. Die Suspension wurde durch sanftes Schütteln des Reaktionsgefäßes gemischt und anschließend 30 Minuten lang bei 4 °C gekühlt. Nach der Kühlung erfolgte ein Hitzeschock bei 42 °C für 10 Sekunden und eine Kühlung bei 4 °C für 5 Minuten. Dann wurden 950 µl SOC-Medium zugegeben und die Suspension eine Stunde lang bei 37 °C und 200 rpm inkubiert. Gleichzeitig wurden die Selektionsplatten auf 37 °C erwärmt. Als Selektionsplatten wurden TSA-Agar-Platten mit 50 µg/ml Kanamycin für pET16b-aPDI-transformierte Zellen bzw. 100 µg/ml Ampicillin für pET16b-mPDI-transformierte Zellen verwendet. 100 µl der Zellsuspension wurden auf den Selektionsplatten ausgespatelt und über Nacht bei 37 °C inkubiert.

4.3 Miniprep

Für die Etablierung der Plasmid-Isolation wurden verschiedene Methoden hinsichtlich ihrer Effizienz verglichen.

4.3.1 Miniprep mit PCIA-Extraktion

Es wurde eine Kolonie der transformierten Zellen von der Selektions-Platte in 5 ml entsprechendem Selektionsmedium (100 µg/ml Ampicillin bzw. 50 µg/ml Kanamycin) in einem 50 ml Reaktionsgefäß inokuliert und bei 37 °C und 180 rpm über Nacht inkubiert.

1,5 ml der Zellsuspension wurde in ein 1,5 ml-Reaktionsgefäß überführt und bei 20000 g eine Minute lang zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in 100 µl GTE-Puffer resuspendiert. Es wurden 200 µl Lyse-Reagenz zugegeben und das Reaktionsgefäß mehrfach gedreht, um die Lösung zu mischen. Dann wurden umgehend 150 µl 5 M Natriumacetat (pH 4,8) hinzugefügt, um das SDS und die genomische DNA auszufällen. Der Ansatz wurde bei 20000 g eine Minute lang zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein neues 1,5 ml-Reaktionsgefäß überführt.

Zu dem Überstand wurden 0,5 ml Isopropanol gegeben und die Mischung 10 Minuten lang bei -20 °C gekühlt. Anschließend wurde der Ansatz bei 20000 g eine Minute lang zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und das Pellet in 0,4 ml TE Puffer gelöst. Es wurden 10 µl RNase A Lösung (20 mg/ml) zugegeben, die Lösung gevortext und bei 37 °C für 30 Minuten inkubiert, um verbliebene RNA zu verdauen.

Mit 300 µl Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol wurden die Proteine ausgefällt. Der Ansatz wurde etwa 30 Sekunden lang gevortext und dann bei 20000 g fünf Minuten lang zentrifugiert. Der wässrige Überstand wurde in ein frisches 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und mit 100 µl 7,5 M Ammoniumacetat und 1 ml reinem Ethanol versetzt. Die Lösung wurde 10 Minuten lang bei -20 °C inkubiert und dann bei 20000 g fünf Minuten lang zentrifugiert. Der ethanolische Überstand wurde abgenommen und das DNA-Pellet in 50 µl Wasser gelöst.

4.3.2 Miniprep mit P1

Für diese Miniprep wurden die Reagenzien P1, P2 und P3 verwendet, die Zusammensetzung ist in Tabelle 3 in den Materialien dargestellt. Das Verfahren basiert auf dem QIAprep Spin Miniprep Kit von Qiagen, allerdings wird die Plasmid-DNA ohne den Einsatz einer Säule durch Isopropanol ausgefällt.

Die Zellsuspension wurde wie unter 4.3.1 beschrieben über Nacht inkubiert. 1,5 ml der Kultur wurden in einem 1,5 ml Eppendorf Reaktionsgefäß mit 16000 g für 2 Minuten zentrifugiert und das Pellet in 250 µl P1 gelöst. Anschließend wurden 250 µl P2 zugegeben und das Reaktionsgefäß mehrmals gedreht, um eine Durchmischung zu erreichen. Die einsetzende Zelllyse sollte nach weniger als 5 Minuten durch die Zugabe von 350 µl P3 beendet werden. Das Reaktionsgefäß wurde mehrfach gedreht und bei 16000 g für 10 Minuten zentrifugiert. 700 µl des Überstandes wurden zu 700 µl Isopropanol in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß pipettiert und 15 Minuten lang bei -20 °C gekühlt.

Das Reaktionsgefäß wurde bei 16000 g 30 Minuten zentrifugiert. Anschließend wurden 250 µl gekühlter, 70 % Ethanol hinzugefügt und das Reaktionsgefäß 10 Minuten lang bei 16000 g zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und das Pellet an der Luft getrocknet. Das trockene Pellet wurde abschließend in 50 µl Wasser gelöst.

4.3.3 Plasmidextraktion mittels Roti®-Prep Plasmid MINI Kit

Für diese Methode wurde das kommerzielle Plasmid-Extraktions-Kit Roti®-Prep Plasmid MINI von Carl Roth verwendet. Die Extraktion wurde entsprechend der beiliegenden Arbeitsanweisung durchgeführt. Für jeden Extraktionsansatz wurden jeweils 1,5 ml der

Kultur verwendet. Der optionale zweite Reinigungsschritt mit Waschpuffer wurde durchgeführt und die Plasmide wurden in 50 µl Elutionspuffer gelöst.

4.3.4 Reinheitsbestimmung der Plasmidlösungen

Ein Spektrometer wurde auf die Messung bei 260 nm vorbereitet und eine Küvette mit 100 µl Reinstwasser als Referenz eingesetzt. Für die Messung der A_{260} einer Probe wurden 100 µl einer 1:10-Verdünnung der Probe in einer Küvette bei 260 nm gemessen und der Messwert mit zehn multipliziert. Die A_{260} ist ein Maß für Plasmidkonzentration in der Probe, 50 µg/l DNA zeigen eine Absorption von etwa 1.

Um die Reinheit der Proben zu bestimmen, wurde mit den Küvetten der verdünnten Proben die Absorption bei 280 nm gemessen. Aus diesem Messwert wurde nach Formel 1 das 260/280-Verhältnis berechnet.

Formel 1: Berechnung des 260/280-Verhältnisses von DNA-Proben

$$R_{260/280} = \frac{A_{260}}{A_{280}}$$

Eine reine DNA-Probe sollte einen $R_{260/280}$ -Wert von etwa 1,8 aufweisen, niedrigere Werte weisen auf Proteinverunreinigungen hin, höhere Werte auf einen hohen RNA-Gehalt. [THERMO SCIENTIFIC, 2008]

4.4 Agarose-Gelelektrophorese

4.4.1 Restriktionsverdau

Es wurde mithilfe des Online-Tools RestrictionMapper (www.restrictionmapper.org, Stand Dezember 2016) für die Plasmide geeignete Restriktionsenzyme gesucht und ein theoretischer Verdau durchgeführt. Für den Verdau von pET16b-mPDI wurde HINDIII verwendet, für den Verdau von pET16b-aPDI EcoRI. Der theoretische Verdau der Plasmide ergab die folgenden zu erwartenden Banden:

Tabelle 10: Zu erwartende DNA-Fragmentgrößen nach Restriktionsverdau

Plasmid	Restriktionsenzym	Erwartete Fragmente
pET16b-aPDI	HINDIII	6436 bP
		770 bP
pET16b-mPDI	EcoRI	6558 bP
		674 bP

Für die Restriktionsansätze wurden 5 µl des mitgelieferten Restriktionspuffers mit etwa 1 µg DNA und 10 Units Restriktionsenzym gemischt und anschließend mit Reinstwasser auf 50 µl Gesamtvolumen aufgefüllt. Die Restriktion erfolgte eine Stunde lang bei 37 °C und wurde durch einen Hitzeschock bei 68 °C für 10 Minuten beendet. Anschließend wurden 25 µl der Ansätze mit jeweils 6 µl 6x-Ladepuffer vermischt und pro Tasche 20 µl Probe aufgetragen.

4.4.2 Gießen des Agarosegels

Es wurde ein Agarosegel mit 1 % Agarose verwendet. Es wurden 0,5 g Agarose mit 50 ml TAE-Puffer auf 80 °C erhitzt und nach dem Abkühlen auf unter 60 °C mit 0,5 µg/ml EtBr vermischt. Etwa 30 ml Gel wurden in der Gießkammer gegossen und ein Kamm eingesetzt. Nach dem Erkalten des Gels wurde der Kamm entfernt und das Gel mit TAE-Puffer mit 0,5 µg/ml EtBr übergossen, bis der Puffer etwa 3 mm über dem Gel stand.

4.4.3 Durchführung der Elektrophorese

Es wurden jeweils 10 µl Marker oder 20 µl Probe pro Tasche aufgetragen. Als Marker wurde 250 bp DNA-Leiter von Carl Roth verwendet.

Die Kammer wurde an eine Energieversorgung angeschlossen. Es wurden 75 V mit maximal 200 mA angelegt. Nach etwa 1 h wurde die Kammer von der Energieversorgung getrennt und das Gel in ein Gelauswertesystem überführt.

4.4.4 Nachträgliche Ethidiumbromid-Färbung

Alternativ zur Färbung der Banden durch Ethidiumbromid im Gel und im Laufpuffer besteht die Möglichkeit, ein Gel nach dem Lauf in einer 0,5 µg/ml Ethidiumbromidlösung einzulegen und unter sanftem Schütteln zu färben. Die Färbedauer kann dabei zwischen 0,5 h und 24 h betragen. Anschließend wurde das Gel zum Entfärben etwa 15 Minuten lang in Reinstwasser sanft geschüttelt. Nach der Entfärbung wurde das Gel in ein Gelauswertesystem überführt.

4.5 SDS-Page

4.5.1 Probenvorbereitung

Es wurden Klone der transformierten Zellen von den Selektionsplatten in jeweils 5 ml Selektionsmedium angeimpft und bei 37 °C und 180 rpm inkubiert, bis eine OD₆₂₀ von etwa 0,5 erreicht wurde. Zu den Ansätzen wurde jeweils 1 mM IPTG gegeben, um die Überexpression der Gene und dementsprechend eine erhöhte Synthese der Proteine zu erzielen. Die Ansätze wurden über Nacht bei Raumtemperatur und sanftem Schütteln inkubiert.

Anschließend wurden 2 ml der Zellsuspension bei 2000 g für eine Minute abzentrifugiert und der Überstand verworfen. Die Zellen wurden in 50 µl SDS-Ladepuffer resuspendiert und für 10 Minuten gekocht. Bis zum Auftragen auf das Gel wurden die Proben bei 4 °C gelagert.

4.5.2 Gießen des Polyacrylamid-Gels

Es wurde ein Trenngel mit 12 % Acrylamid verwendet. Die Zusammensetzungen des Trenn- und des Sammelgels sind in Tabelle 4 und Tabelle 5 unter 3.2 aufgelistet.

Das Trenngel wurde in die Gießkammer gefüllt und mit Isopropanol überschichtet. Nach dem Auspolymerisieren wurde die Gießkammer mit Sammelgel gefüllt und ein Kamm mit 13 Zähnen eingesetzt. Wenn das Gel nicht sofort verwendet wurde, wurde es ohne Kamm in Silberfolie und feuchte Tücher gewickelt und bei 4 °C gelagert.

4.5.3 Gelelektrophorese

Es wurde ein vertikales Doppelsystem verwendet, der Platz für das zweite Gel wurde gegebenenfalls mit einer Blindplatte verschlossen. Das obere Pufferreservoir wurde mit Laufpuffer gefüllt, bis die kürzere Glasplatte etwa 5 mm weit überschichtet war. Das untere Reservoir wurde gefüllt, bis der Puffer etwa 3 mm über dem unteren Rand des Gels stand. Die Proben wurden vor dem Auftragen in kochendem Wasser erhitzt. Es wurden in jede Tasche 9 µl der jeweiligen Probe oder des Markers gegeben. Als Marker wurde Roti[®] Mark Prestained verwendet.

Es wurde eine Spannung von konstant 125 V angelegt. Sobald die Laufmittelfront die untere Kante der Glasplatten erreichte, wurde die Elektrophorese beendet und das Gel aus den Glasplatten entfernt. Zur Markierung der Banden wurde das Gel zunächst mehrere Stunden oder über Nacht in einer Färbelösung aus Roti Blue[®] und anschließend 5 Minuten in einer Entfärbelösung mit 25 % Methanol inkubiert.

5 Ergebnisse

5.1 Transformation

Bei jeder Transformation wurde als Negativkontrolle ein weiterer Transformationsansatz mitgeführt, bei dem kein Plasmid zugegeben wurde. Die Negativkontrolle wurde anschließend sowohl auf Selektionsplatten mit Ampicillin als auch auf Selektionsplatten mit Kanamycin ausgespatelt und mit den Transformationsansätzen inkubiert. Bei keiner der mitgeführten Negativkontrollen wurde Bakterienwachstum beobachtet.

5.1.1 XL1 Blue

Der Stamm XL1 wurde wie unter 4.1 beschrieben behandelt und als kompetente Zellen bei -80 °C tiefgefroren. Anschließend wurden die Zellen wie unter 4.2 beschrieben transformiert, es wurden hier 1 µl pET16b-aPDI bzw. 1 µl pET16b-mPDI eingesetzt. Die transformierten Zellen wurden auf Selektionsplatten ausgestrichen und nach der Inkubation ausgezählt. Die mit 1 µl pET16b-mPDI transformierten Zellen wiesen eine gute Transformationseffizienz auf, es wurden über 100 Kolonien gezählt. Die mit 1 µl pET16b-aPDI transformierten Zellen bildeten drei Kolonien.

Die Transformation wurde mit 1 µl pET16b-mPDI bzw. 2 µl pET16b-aPDI wiederholt. Die mit pET16b-mPDI transformierten Zellen bildeten erneut über 100 Kolonien, die mit pET16b-aPDI transformierten Zellen bildeten etwa 20 Kolonien. Die im zweiten Versuch transformierten Zellen wurden für alle weiteren Versuche verwendet.

5.1.2 BL21

Für die erste Transformation des Produktionsstammes wurden chemisch kompetente Zellen verwendet, die vom Leibniz-Institut für Pflanzengenetik und Kulturpflanzenforschung in Gatersleben bezogen wurden. Die kompetenten Zellen wurden wie unter 4.2 beschrieben transformiert und auf Selektionsplatten ausgespatelt. Weder die pET16b-aPDI-transformierten Zellen noch die pET16b-mPDI-transformierten Zellen bildeten in diesem Versuch Kolonien aus.

Anschließend wurden neue, chemisch kompetente BL21-Zellen nach 4.1 hergestellt und für die Transformation verwendet. Es bildeten sich fünf pET16b-aPDI-transformierte Zelle und etwa dreißig pET16b-mPDI-transformierte Kolonien. Die im zweiten Versuch transformierten Zellen wurden für alle weiteren Versuche verwendet.

5.2 Miniprep mit PCIA-Extraktion

Von den Selektionsplatten der transformierten XL1-Zellen wurden jeweils fünf pET16b-aPDI-transformierte (Klone A1-A5) und fünf pET16b-mPDI-transformierte (Klone M1-M5) Klone ausgewählt und wie unter 4.3.1 beschrieben für die Miniprep eingesetzt. In einigen Ansätzen konnte vor dem Lösen des Plasmid-Pellets in Wasser ein weißes Pellet im Reaktionsgefäß festgestellt werden. Aufgrund eines Produktionsfehlers in dem Verschluss

eines der verwendeten Reaktionsgefäße ging der Ansatz des Klons A3 während der Miniprep verloren.

Die Absorption der isolierten Plasmid-Proben der Klone wurde anschließend mit einem Spektrometer bei 260 nm gemessen. Es wurden jeweils 100 µl einer 1:50-Verdünnung gegen 100 µl Reinstwasser als Referenz gemessen. Die Messwerte sind in Tabelle 11 zusammengefasst.

Tabelle 11: Absorption der mittels Miniprep extrahierten Plasmid-Proben bei 260 nm mit dem jeweiligen, für die Extraktion verwendeten Klon

Verwendeter Klon	A₂₆₀
Klon A1	23,5
Klon A2	7,0
Klon A4	35,5
Klon A5	15,5
Klon M1	15,5
Klon M2	18,0
Klon M3	14,5
Klon M4	20,5
Klon M5	16,5

Die Proben wurden wie unter 4.4.1 beschrieben mit den Restriktionsenzymen EcoRI bzw. HindIII verdaut und auf einem Agarose-Gel aufgetragen. Die aus Klon A3 wurde in diesem Versuch durch einen Restriktionsansatz von Probe A1 ohne Restriktionsenzyme ersetzt. Das Gel ist in Abbildung 2 gezeigt, die Probenbelegung in Tabelle 12. Die Kamera des Gelauswertesystems war zu dem Zeitpunkt des Versuches aufgrund eines Defektes nicht einsatzbereit, deshalb musste die Aufnahme mit einer mobilen, nicht ideal platzierbaren Kamera durchgeführt werden.

Tabelle 12: Belegung des Agarosegels zur Identifizierung der mittels Miniprep mit PCIA-Extraktion isolierten Plasmide

Tasche	Probe	Restriktionsenzym
1	Marker	-
2	pET16b-aPDI aus XL1-A1	HINDIII
3	pET16b-aPDI aus XL1-A2	HINDIII
4	pET16b-aPDI aus XL1-A1	-
5	pET16b-aPDI aus XL1-A4	HINDIII
6	pET16b-aPDI aus XL1-A5	HINDIII
7	pET16b-mPDI aus XL1-M1	EcoRI
8	pET16b-mPDI aus XL1-M2	EcoRI
9	pET16b-mPDI aus XL1-M3	EcoRI
10	pET16b-mPDI aus XL1-M4	EcoRI
11	pET16b-mPDI aus XL1-M5	EcoRI
12	Marker	-

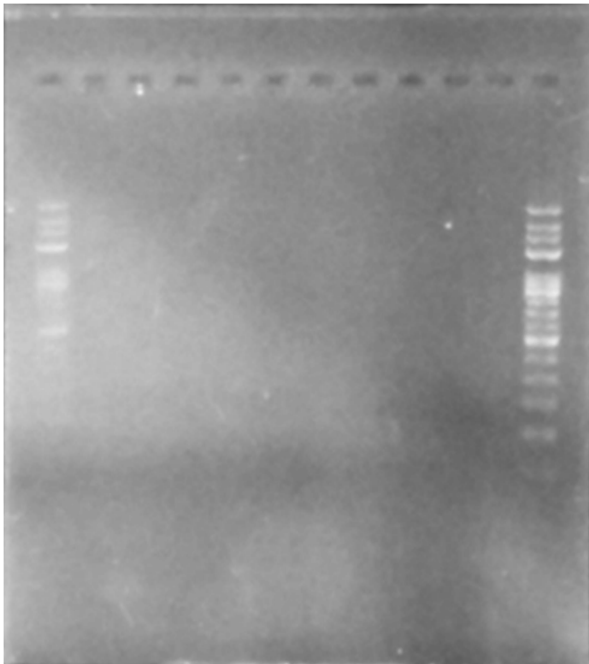


Abbildung 2: Agarose-Gel der per Miniprep extrahierten und mit Restriktionsenzymen geschnittenen DNA unter UV-Licht

Keine der aufgetragenen Proben wies unter UV-Licht Banden auf. Beide Marker sind erkennbar, in Spalte 1 sind die Banden allerdings schwächer und weniger gut aufgelöst als in Spalte 12

5.3 Miniprep mit P1

Für die Miniprep mit P1 wurden die Klone A1-A3 und M1-M3 der transformierten XL1-Zellen eingesetzt. Die Miniprep wurde wie unter 4.3.2 beschrieben durchgeführt und die Plasmid-Pellets in Wasser gelöst. Die Absorption der extrahierten DNA-Proben der Klone wurde anschließend mit einem Spektrometer bei 260 nm und 280 nm gemessen. Die Messwerte der Messung bei 260 nm und die 260/280-Verhältnisse der Proben sind in Tabelle 13 zusammengefasst.

Tabelle 13: Absorption der mittels Miniprep mit P1 extrahierten DNA-Proben bei 260 nm und 260/280 Verhältnis

XL1-Klon	A1	A2	A3	M1	M2	M3
A₂₆₀	6,83	4,77	4,95	6,05	6,60	3,56
R_{260/280}	1,738	1,611	1,435	1,879	1,982	1,762

Die Proben wurden wie in 4.4.1 beschrieben mit Restriktionsenzymen verdaut und per Agarose-Gelelektrophorese aufgetrennt. Die Belegung des Gels ist in Tabelle 14 zusammengefasst. Es wurden jeweils 10 µl des Markers oder 20 µl der Probe aufgetragen. Zusätzlich zu den Plasmid-Extrakten wurden die ursprünglich für die Transformation der Zellen verwendeten Plasmidlösungen aus dem Kryostock mit dem jeweiligen Restriktionsenzym verdaut und auf das Gel aufgetragen.

Tabelle 14: Belegung des Agarosegels zur Untersuchung der DNA-Proben der Miniprep mit P1; A1-A3

Tasche	Aufgetragene Probe	Restriktionsenzym
1	Marker	-
2	pET16b-aPDI aus XL1-A1	HindIII
3	pET16b-aPDI aus XL1-A2	HindIII
4	pET16b-aPDI aus XL1-A3	HindIII
5	pET16b-aPDI aus XL1-A1, Positivkontrolle	-
6	pET16b-mPDI aus XL1-M2, Positivkontrolle	-
7	pET16b-mPDI aus XL1-M1	EcoRI
8	pET16b-mPDI aus XL1-M2	EcoRI
9	pET16b-mPDI aus XL1-M3	EcoRI
10	pET16b-aPDI-Lösung aus Kryostock	HindIII
11	pET16b-mPDI-Lösung aus Kryostock	EcoRI
12	Marker	-

Es wurde eine Agarose-Gelelektrophorese mit nachträglicher Ethidiumbromidfärbung nach 4.4.4 durchgeführt. In dem Gel konnten Banden festgestellt, allerdings aufgrund des schnellen Verblässens nicht dokumentiert werden.

Die Proben wurden auf ein weiteres Gel nach 4.4.2 aufgetragen und eine Gelelektrophorese wie in 4.4.3 beschrieben durchgeführt. Das Gel ist Abbildung 3 in dargestellt. Die Kamera des Gelauswertesystems war zu dem Zeitpunkt des Versuches aufgrund eines Defektes nicht einsatzbereit, deshalb musste die Aufnahme mit einer mobilen, nicht optimal positionierbaren Kamera durchgeführt werden. Der helle Lichtfleck in der Mitte des Bildes und der dunklere Fleck in Spalte 9 entstanden durch Lichtreflexe während des Fotografierens und sind nicht Teil des Gels.

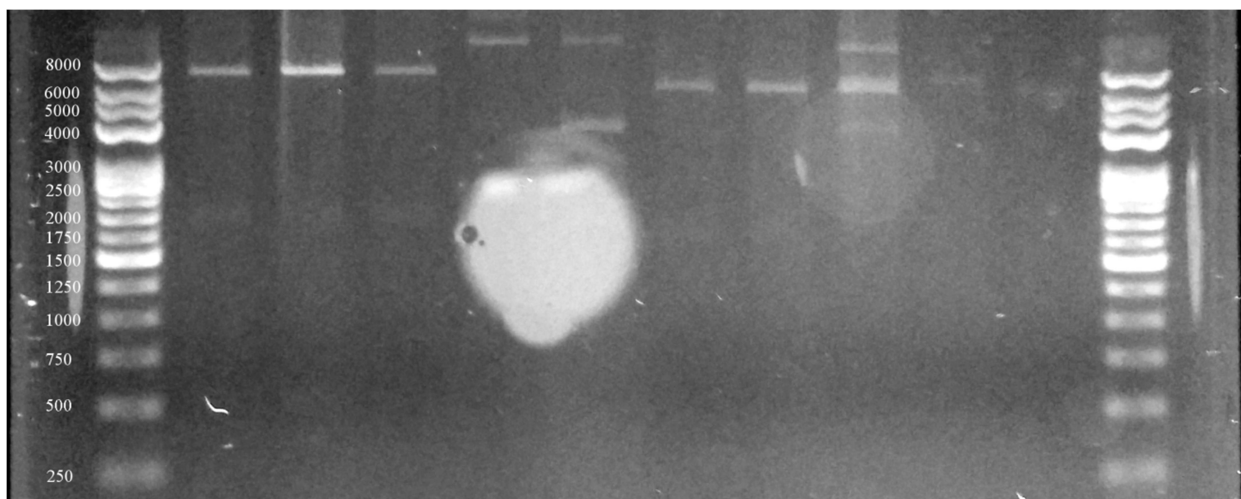


Abbildung 3: Agarosegel der mit Miniprep mit P1 isolierten und mit Restriktionsverdau aufgespaltenen DNA-Proben unter UV-Licht

Die ermittelten und erwarteten Banden sind in Tabelle 15 zusammengefasst.

Tabelle 15: Vergleichende Darstellung der erwarteten und ermittelten Banden der Agarose-Gelelektrophorese, alle Angaben in bP.

Tasche	Proben	Ermittelte Banden	Erwartete Banden
2	pET16b-aPDI aus A1		6436 bP
3	pET16b-aPDI aus A2	ca. 7500 bP	770 bP
4	pET16b-aPDI aus A3		
5	pET16b-aPDI aus A1, unverdaut	> 8000 bP	7206 bP
6	pET16b-mPDI aus M2, unverdaut	> 8000 bP ca. 5000 bP	7232 bP
7	pET16b-mPDI aus M1	ca. 7000 bP	6558 bP
8	pET16b-mPDI aus M2		674 bP
9	pET16b-mPDI aus M3	> 8000 bP ca. 7000 bP ca. 5000 bP	6558 bP 674 bP
10	pET16b-aPDI Kontrolle	ca. 8000 bP	6436 bP 770 bP
11	pET16b-mPDI Kontrolle	ca. 8000 bP	6558 bP 674 bP

5.4 Vergleich der Extraktionseffizienz zwischen kommerziellem Extraktionskit und der Miniprep mit P1

Es wurde vergleichend mit dem kommerziellen Plasmid-Extraktionskit Roti[®]-Prep Plasmid MINI Kit und der Miniprep mit P1 eine Plasmidextraktion aus den Klonen A1-A5 und M1-M5 der transformierten XL1-Zellen vorgenommen. Die Extraktion mit dem Kit wurde wie unter 4.3.3 beschrieben durchgeführt, die Plasmide wurden in 50 µl Elutionsbuffer gelöst. Die Miniprep mit P1 wurde wie unter 4.3.2 beschrieben durchgeführt, die Plasmide wurden in 50 µl Wasser gelöst. Beim Lösen der mit der Miniprep mit 1 isolierten Plasmide konnten weiße Verunreinigungen in den Reaktionsgefäßen beobachtet werden.

Die Absorption der extrahierten Plasmid-Proben wurde anschließend mit einem Spektrometer bei 260 nm und 280 nm gemessen. Es wurden jeweils 100 µl der verdünnten Proben gegen 100 µl Reinstwasser als Referenz gemessen. Die Proben der mittels Miniprep mit P1 extrahierten Plasmide wurden 1:10 verdünnt, Proben des kommerziellen Kits wurden 1:5 verdünnt. Die Messwerte sind in Tabelle 16 zusammengefasst.

Tabelle 16: Absorptionen der mit dem Roti®-Prep Plasmid MINI Kit und der Miniprep mit P1 extrahierten DNA-Proben bei 260 und das 260/280-Verhältnis als Reinheitsparameter.

Roti®-Prep Plasmid MINI Kit			Miniprep mit P1	
Klon	A ₂₆₀	R _{260/280}	A ₂₆₀	R _{260/280}
<i>E.coli</i> XL1 A1	0,965	2,08	2,12	2,08
<i>E.coli</i> XL1 A2	1,025	1,8	2,1	2,36
<i>E.coli</i> XL1 A3	1,01	2,08	2,57	1,88
<i>E.coli</i> XL1 A4	1,14	2,45	2,17	2,15
<i>E.coli</i> XL1 A5	0,825	2,01	2,47	2,42
<i>E.coli</i> XL1 M1	0,62	2,25	4,46	1,7
<i>E.coli</i> XL1 M2	0,925	1,91	7,07	1,56
<i>E.coli</i> XL1 M3	0,94	1,62	1,78	2,07
<i>E.coli</i> XL1 M4	1,465	2,27	3,9	1,34
<i>E.coli</i> XL1 M5	0,675	2,21	6,77	1,51

Die A₂₆₀-Werte der mittels Miniprep isolierten Plasmidproben liegen insgesamt deutlich höher als die Absorptionen der mit dem Extraktionskit isolierten Proben. Die mit dem Kit extrahierten Proben zeigen deutlich höhere 260/280 Verhältnisse, die teilweise bis über 2,2 gehen. Die mittels Miniprep extrahierten Plasmide zeigen dagegen stark schwankende 260/280-Verhältnisse zwischen 1,34 und 2,42. Weiterhin scheinen die Absorptionswerte der extrahierten pET16b-mPDI-Proben unabhängig von der Extraktionsart stärker voneinander abzuweichen als die der pET16b-aPDI-Proben.

Die mittels kommerziellem Kit und mittels Miniprep aus den Klonen A3, A4, M1 und M3 extrahierten DNA-Proben wurden anschließend mit den entsprechenden Restriktionsenzymen wie unter 4.4.1 beschrieben verdaut und auf ein Gel aufgetragen. Weiterhin wurden als Positivkontrollen (PK) Restriktionsansätze der Proben ohne Restriktionsenzym mitgeführt. Beim Gießen des Gels wurde ein weiterer Kamm in die Mitte des Gels gehängt, um das Gel doppelt beladen zu können. Es wurden jeweils 10 µl des Markers oder 20 µl der Restriktionsproben aufgetragen.

Die Restriktionsansätze wurden auf das Gel aufgetragen und die Gelelektrophorese wurde wie unter 4.4.3 beschrieben durchgeführt. Bei der Beladung von Tasche 6 der unteren Gelhälfte trat ein Teil der aufgetragenen Probe wieder aus der Tasche aus und kontaminierte möglicherweise umliegende Taschen. Das Gel mit Bandenbeschriftung ist in Abbildung 3 gezeigt, die Spaltenbelegung mit den ermittelten Banden in Tabelle 17.

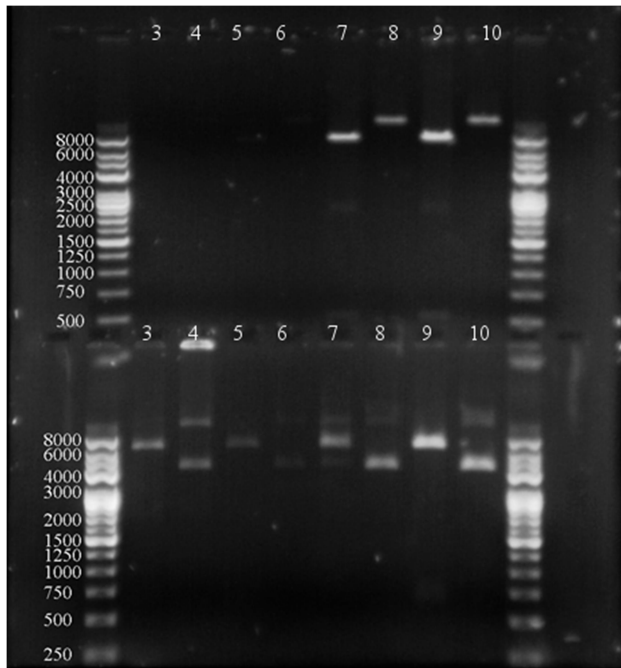


Abbildung 4: Agarosegel zum Restriktionsverdau der mittels Miniprep und kommerziellem Extraktionskit isolierten Plasmidproben mit beschrifteten Markerbanden

Tabelle 17: Ermittelte Banden der verdauten DNA-Extrakte und Positivkontrollen der pET16b-aPDI-transformierten XL1-Zellen

Spalte	Probe	Extraktion mittels	Restriktions- enzym	Ermittelte Banden
3	pET16b-aPDI aus A3	Miniprep	HindIII	-
4	pET16b-aPDI aus A3	Miniprep	-	-
5	pET16b-aPDI aus A4	Miniprep	HindIII	-
6	pET16b-aPDI aus A4	Miniprep	-	-
7	pET16b-aPDI aus A3	Extraktionskit	HindIII	Ca. 8000 bP Ca. 600 bP
8	pET16b-aPDI aus A3	Extraktionskit	-	> 8000 bP
9	pET16b-aPDI aus A4	Extraktionskit	HindIII	Ca. 8000 bP Ca. 600 bP
10	pET16b-aPDI aus A4	Extraktionskit	-	> 8000 bP
Untere Gelhälfte				
3	pET16b-mPDI aus M1	Miniprep	EcoRI	Ca. 7000 bP
4	pET16b-mPDI aus M1	Miniprep	-	> 8000 bP Ca. 5000 bP
5	pET16b-mPDI aus M3	Miniprep	EcoRI	Ca. 7000 bP
6	pET16b-mPDI aus M3	Miniprep	-	> 8000 bP Ca. 5000 bP
7	pET16b-mPDI aus M1	Extraktionskit	EcoRI	> 8000 bP Ca. 7000 bP Ca. 5000 bP
8	pET16b-mPDI aus M1	Extraktionskit	-	> 8000 bP Ca. 5000 bP
9	pET16b-mPDI aus M3	Extraktionskit	EcoRI	Ca. 7500 bP
10	pET16b-mPDI aus M3	Extraktionskit	-	> 8000 bP Ca. 5000 bP

Weiterhin ist in Abbildung 4 zu erkennen, dass die ersten Banden der oberen Marker (250 bP) bereits in den unteren Teil des Gels eingelaufen und nicht mehr erkennbar sind. Die Banden der unteren Marker sind vollständig sichtbar. Ebenfalls zu sehen ist eine deutliche Bande in Tasche 4 der unteren Gelhälfte sowie schwache Banden in den meisten anderen Taschen dieser Hälfte.

5.5 SDS-Page der transformierten BL21-Klone

Jeweils vier Klone der transformierten BL21-Zellen wurden wie in 4.5.1 beschrieben angezogen und für die SDS-Page vorbereitet. Es wurden jeweils 10 µl der Probe und 7 µl des Markers aufgetragen. Die Belegung der Taschen ist in Tabelle 18 zusammengefasst.

Tabelle 18: Belegung des Acrylamidgels für die SDS-Page der transformierten und induzierten BL21-Klone

Tasche	Probe
1	Marker
2	Zellextrakt, Klon A1
3	Zellextrakt, Klon A2
4	Zellextrakt, Klon A3
5	Zellextrakt, Klon A4
6	Zellextrakt, Klon M1
7	Zellextrakt, Klon M2
8	Zellextrakt, Klon M3
9	Zellextrakt, Klon M4
10	Zellextrakt, Klon M5
11	Zellextrakt, Klon M6
12	-
13	Marker

Es wurde für etwa 30 Minuten eine Spannung von 100 V an das Gel angelegt, bis die Laufmittelfront das Sammelgel durchlaufen hatte. Anschließend wurden für weitere 1,5 h 150 V angelegt, bis der Lauf beendet wurde. Etwa auf der Hälfte des Trenngels bildete die Laufmittelfront Zacken und der Lauf stagnierte. Daraufhin verschwand die Laufmittelfront und es bildete sich eine gelbe Front aus. Das Gel nach der Coomassie-Färbung ist in Abbildung 5 gezeigt.

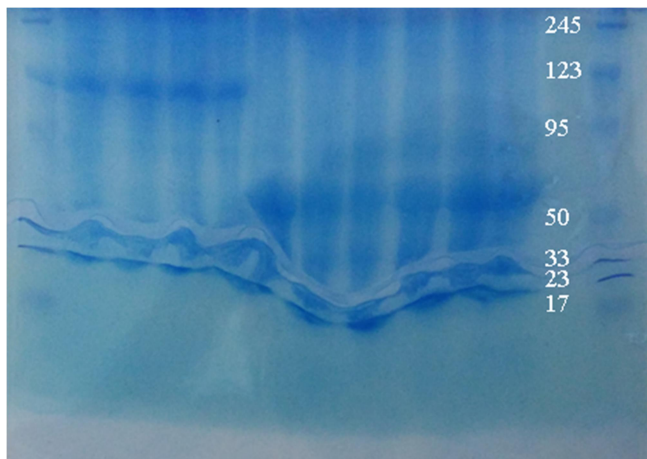


Abbildung 5: Acrylamidgel der transformierten BL21-Zellen mit Beschriftung der Markerbanden, Coomassie-Färbung mittels Roti® Blue

Auffällig ist ein Bruch im Verlauf der Proteinfronten, der den Lauf der Proteine anscheinend verhindert. Ebenfalls wurde während des Laufs ein Anhalten der Bromphenolblau-Front an diesem Bruch beobachtet, woraufhin die blaue Farbfront vollständig verschwand.

Weiterhin ist auf der Aufnahme in den Spalten der pET16b-aPDI-transformierten Klone eine deutliche Bande zu sehen, die bei etwa 120 kDa liegt. In den Spalten der pET16b-mPDI-transformierten Klone wurde eine Bande, zwischen 50 kDa und 95 kDa, bei etwa 60 kDa festgestellt. Die theoretischen Molekulargewichte der rekombinanten Proteine zuzüglich des angehängten His-Tags betragen 115 kDa für die aPDI und 60 kDa für die mPDI.

Es wurde ein weiterer Versuch durchgeführt, bei dem vergleichend ein Roti®-PAGE-Gel, ein kommerziell Fertiggel, mit 10 % Acrylamid von Roth und ein nach 4.5.2 gegossenes Gel verwendet wurden. Um die Vergleichbarkeit mit dem Fertiggel zu gewähren, wurde ein SDS-Gel mit 10 % Acrylamid im Trenngel verwendet.

Das verwendete kommerzielle Gel wies etwa die doppelte Dicke (1 mm) des manuell gegossenen Gels auf. Es wurden mit den Klonen A1-A4 und M2-M5 wie unter 4.5.1 beschrieben die Probenvorbereitung durchgeführt und die Proben nach dem in Tabelle 19 dargestellten Schema aufgetragen. Nicht aufgeführte Spalten des manuell gegossenen Gels wurden mit 5-fach konzentriertem Probenladepuffer belegt. Es wurden jeweils 10 µl Probe oder 9 µl Marker aufgetragen.

Tabelle 19: Auftragsschema der induzierten und lysierten Zellen der BL21-Klone A1-A4 und M2-M5 auf das Fertiggel und selbstgegossene Gel. Nicht belegte Taschen des selbstgegossenen Gels wurden mit 5-fach konzentriertem Probenladepuffer beladen und nicht aufgeführt.

Probe	Position im kommerziellen Gel	Position im selbstgegossenen Gel
Marker	1	1
BL21-A1	2	2
BL21-A2	3	3
BL21-A3	4	4
BL21-A4	5	5
BL21-M2	6	8
BL21-M3	7	9
BL21-M4	8	10
BL21-M5	9	11
Marker	10	13

Für diesen Versuch wurde ein kommerzieller Laufpuffer von Roth verwendet. Es wurden 125 V an die Gele angelegt und die Gelkammer mit Wasserkühlung auf 18 °C gekühlt. Nach 45 Minuten wurde das kommerzielle Gel entnommen, der Laufpuffer durch frischen Puffer ersetzt und das manuell gegossene Gel erneut mit 125 V angeschlossen. Nach insgesamt 1,5 h wurde die Elektrophorese beendet. Die Gele sind in Abbildung 6 und Abbildung 7 dargestellt.

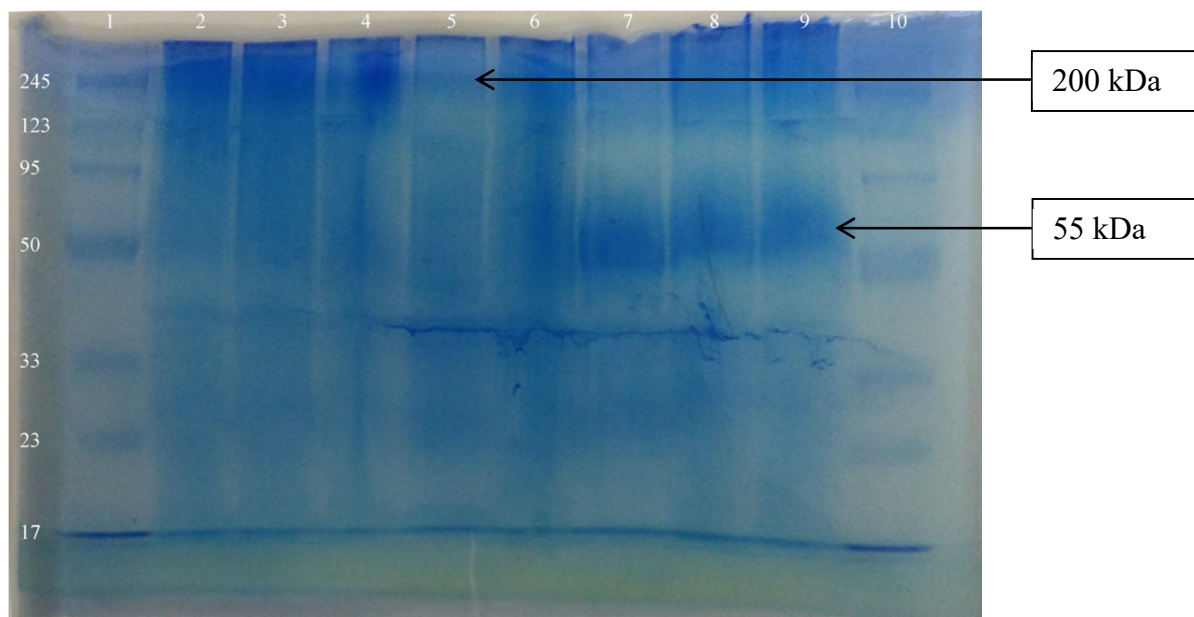


Abbildung 6: Aufnahme des Roti-PAGE Precast Gels des vergleichenden Versuchs zwischen kommerziellem Gel und selbstgegossenem Gel, Bandenbeschriftung in kDa

Verglichen mit vorherigen Gelen sind die Markerbanden des kommerziellen Gels deutlich gerader (Vgl. Abbildung 5). Die Spalten sind klar voneinander abgegrenzt und verlaufen nahezu gerade. Etwa in der Mitte des Gels ist eine Art Riss zu sehen, der über mehrere Spalten verläuft. Eine Störung des Gellaufs durch diese Struktur ist nicht erkennbar. Das Gel weist eine unregelmäßige Hintergrundfärbung auf, die eine quantitative Auswertung unmöglich macht.

In den mit den Proben M2 bis M5 beladenen Spalten ist eine deutliche Bande bei etwa 200 kDa zu erkennen. In den Spalten mit den Proben A1 bis A3 ist eine deutliche Bande bei ca. 55 kDa zu erkennen. Weiterhin gibt es eine Bande bei etwa 25 kDa, die in allen Spalten in unterschiedlicher Ausprägung zu erkennen ist.

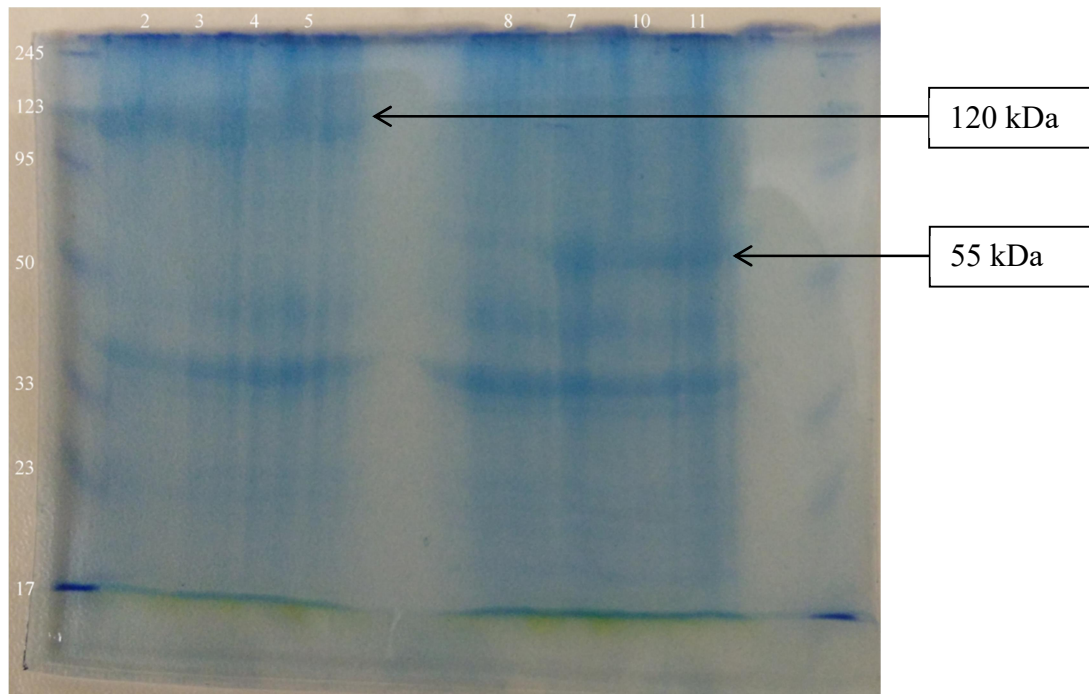


Abbildung 7: Aufnahme des selbstgegossenen Polyacrylamidgels (10 % Bis-/Acrylamid) des vergleichenden Versuchs zwischen kommerziellem Gel und selbstgegossenem Gel

Auffällig sind die nach innen verzogenen Banden der Marker, die eine Bestimmung der Proteinbanden im Gel erschweren. Die Lage und Ausprägung der Banden stimmt mit den Banden des kommerziellen Gels größtenteils überein, es gibt zwei weitere in allen Spalten auftretende Banden bei etwa 35 kDa und 40 kDa. Die im Roti®-Gel bei etwa 200 kDa aufgetretene Bande wurde im manuell gegossenen Gel bei etwa 120 kDa ermittelt. In den nur mit Ladepuffer belegten Spalten konnten keine Banden ermittelt werden.

5.6 Expressionskinetik von pET16b-mPDI in BL21-M3 und pET16b-aPDI in BL21-A2

Um Informationen zur Herstellung der rekombinanten PDIs in *E. coli* BL21 in Abhängigkeit der Kultivierungszeit nach Induktionen zu erhalten, wurden jeweils fünf Übernachtskulturen der Klone BL21-A2 und BL21-M3 in Selektionsmedium bei 37 °C und 180 rpm inkubiert. Jeweils 1 ml der Übernachtskulturen wurde auf 5 ml frisches Selektionsmedium gegeben und die Kulturen bei 180 rpm und 37 °C inkubiert, bis eine OD₆₂₀ von etwa 0,5 erreicht wurde. Es wurde während Inkubation darauf geachtet, die Wachstumsunterschiede zwischen den Kulturen durch exakt gleiche Inkubationsbedingungen gering zu halten. Die Induktion der Zellen erfolgte nach Tabelle 20.

Tabelle 20: Parameter der Induktion zur Untersuchung der Induktionskinetik

Inkubationsdauer	0 h	1 h	2 h	4 h	Über Nacht
Ink.-Temperatur	-	37 °C	37 °C	37 °C	RT

Alle Ansätze wurden während der Induktion mit 180 rpm geschüttelt. Nach Ende der jeweiligen Inkubation wurden die Ansätze mit Medium auf eine OD₆₂₀ von 2 eingestellt und 1 ml der eingestellten Kultur in ein 2 ml Reaktionsgefäß überführt. Die Zellen wurden bei 8000 g für 30 Sekunden abzentrifugiert und das Pellet in 50 µl SDS-Ladepuffer resuspendiert. Das Reaktionsgefäß wurde 30 Sekunden lang auf 95 °C erhitzt und anschließend bis zur Durchführung der SDS-Page bei 4 °C gelagert. Das Polyacrylamidgel wurde wie unter 4.5.2 beschrieben hergestellt, allerdings wurde ein Trenngel mit 10 % Acrylamid verwendet.

Die Proben wurden auf Raumtemperatur gebracht und einzeln für jeweils 2 Minuten in einem Wasserbad auf etwa 95 °C erhitzt und sofort auf das Gel aufgetragen. Es wurden jeweils 9 µl Marker oder 10 µl Probe aufgetragen. Die Belegung des Acrylamidgels ist in Tabelle 21: Belegung des Polyacrylamidgels zur Untersuchung der Proteinkonzentration in Abhängigkeit von der Induktionsdauer dargestellt.

Tabelle 21: Belegung des Polyacrylamidgels zur Untersuchung der Proteinkonzentration in Abhängigkeit von der Induktionsdauer

Tasche	Probe	Induktionsdauer
1	Marker	-
2	Klon BL21-A2, nicht induziert	0 h
3	Klon BL21-A2	1 h
4	Klon BL21-A2	2 h
5	Klon BL21-A2	4 h
6	Klon BL21-A2	Über Nacht
7	Klon BL21-M3, nicht induziert	0 h
8	Klon BL21-M3	1 h
9	Klon BL21-M3	2 h
10	Klon BL21-M3	4 h
11	Klon BL21-M3	Über Nacht
12	-	-
13	Marker	-

Für diesen Versuch wurde ein kommerzieller Laufpuffer verwendet. Es wurden 125 V an die Gelkammer angelegt und eine Wasserkühlung mit 18 °C verwendet. Nach etwa 2 h erreichte die Laufmittelfront das Ende des Trenngels und der Gellauf wurde beendet. Das Gel wurde wie unter 4.5 beschrieben über Nacht gefärbt, aber aufgrund einer starken Hintergrundfärbung für 20 Minuten entfärbt. Das gefärbte Gel ist in Abbildung 8 gezeigt.

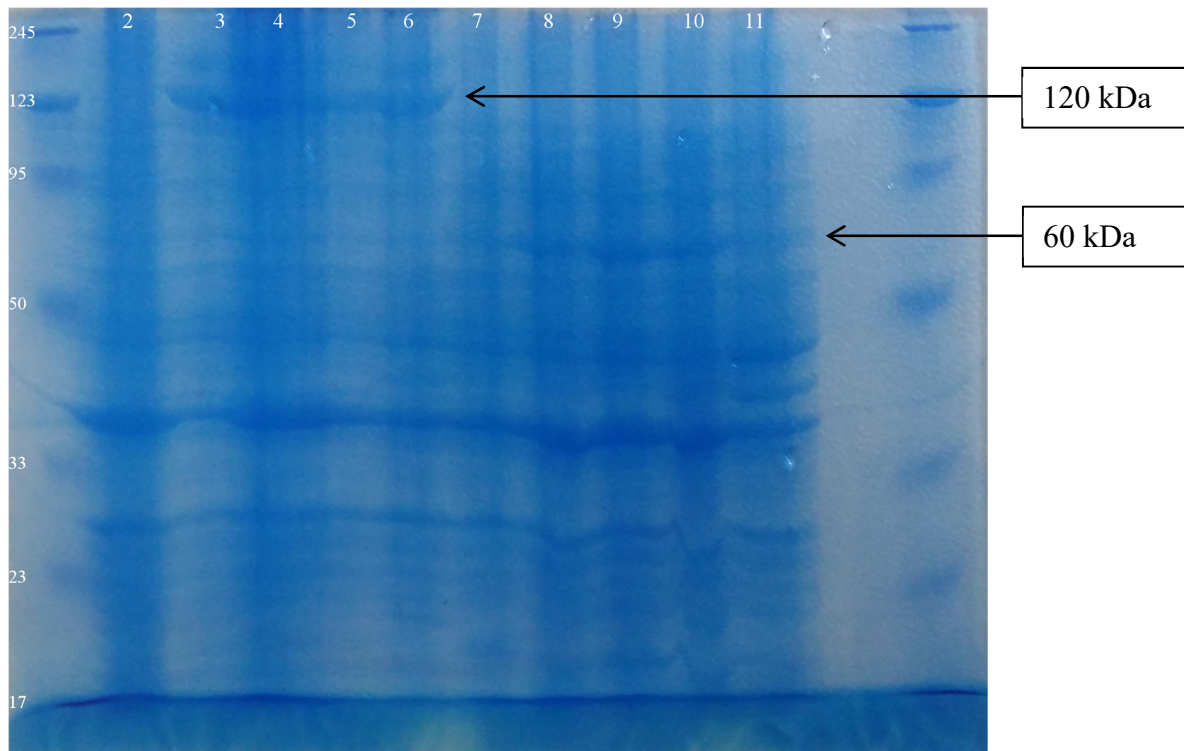


Abbildung 8: Acrylamidgel der BL21-Klone A2 und M3 nach Induktion für 0 h, 1 h, 2 h, 4 h, über Nacht mit Bandenbeschriftung in kDa

Zu erkennen ist eine deutliche Bande bei etwa 125 kDa in den Spalten 3,4,5 und 6 sowie eine Bande bei etwa 60 kDa in den Spalten 8,9, 10 und 11. Ebenfalls sind mehrere Banden zu erkennen, die in allen Spalten auftreten. Die Banden stimmen größtenteils mit den Banden aus vorherigen Versuchen mit den BL21-Zellen überein (vgl. Abbildung 5, Abbildung 6, Abbildung 7), es traten allerdings deutlich mehr als in vorherigen Versuchen auf.

Zusammengefasst sind bei beiden Klonen die charakteristischen Banden, bei etwa 60 kDa und etwa 120 kDa, erkennbar nach 1 h, 2 h und 4 h Induktion bei 37 °C. Der a-PDI-transformierte Klon A2 wies auch bei Induktion über Nacht bei Raumtemperatur eine deutliche Bande auf, der pET16b-mPDI-transformierte Klon M3 zeigte bei diesen Induktionsparametern hingegen eine sich kaum vom Hintergrund abhebende Bande. Ohne Induktion konnte bei keinem der Klone die charakteristische Bande festgestellt werden. Weiterhin wurden über die gesamte Gellänge verteilt Banden festgestellt, die in allen Spalten auftreten.

6 Auswertung

6.1 Transformation

Während der Transformation der XL1- und BL21-Zellen wurde festgestellt, dass bei Zugabe von jeweils 1 µl pET16b-aPDI-Lösung oder 1 µl pET16b-mPDI-Lösung zu den Transformationsansätzen die Transformation mit pET16b-aPDI erheblich weniger effektiv verlief als die Transformation mit pET16b-mPDI. Die geringe Transformationseffizienz kann verschiedene Gründe haben, unter anderen phenolische oder alkoholische Verunreinigungen in der Plasmidlösung oder ein zu großes Plasmid [NEB, 2017]. Da die Größendifferenz der Plasmide lediglich 26 bP beträgt, ist ein Einfluss der verschiedenen Größen auf den Unterschied der Transformationseffizienz unwahrscheinlich. Möglicherweise liegt der Grund der geringeren Transformationseffizienz in einer niedrigeren Plasmidkonzentration begründet, die Konzentrationen der Plasmid-Stammlösungen wurden im Vorfeld nicht ermittelt.

Die Transformation der vom Leibniz-Institut für Pflanzengenetik und Kulturpflanzenforschung bezogenen kompetenten BL21-Zellen führte zu keinen transformierten Zellen. Ein Grund für das Ausbleiben von Koloniebildungen war möglicherweise ein Problem mit den kompetenten Zellen, entweder aufgrund eines Fehlers beim Herstellen der chemischen Kompetenz oder aufgrund von ungeeigneter Lagerung der Zellen. Eine andere mögliche Erklärung ist ein Problem der BL21-Zellen mit der Expression des Resistenzgens, wodurch auch transformierte Zellen bei der Selektion absterben würden. Eine Wiederholung der Transformation mit neu hergestellten kompetenten Zellen ergab nachfolgend mehrere transformierte Kolonien.

6.2 Miniprep mit PCIA-Extraktion

Die mittels Miniprep extrahierte Plasmid-DNA der Klone A1-A5 und M1-M5 wiesen eine hohe Absorption bei 260 nm auf, was auf eine hohe DNA-Konzentration hinweist. Die Restriktion der Proben und anschließende Agarose-Gelelektrophorese ergab keine Banden in den Spalten mit den Proben (vergl. 5.2). Es wurden keine Banden im Gel oder in den Taschen festgestellt, die Markerbanden wurden allerdings wie erwartet sichtbar gemacht. Ein Problem mit der Elektrophorese oder der Ethidiumbromidfärbung war also auszuschließen. Eine mögliche Erklärung für dieses Ergebnis ist eine zu geringe Konzentration von Plasmid-DNA durch eine unzureichende Extraktion der Plasmide. Die hohe Absorption der DNA-Proben bei 260 nm kann durch Verunreinigungen, vorrangig mit Proteinen oder Phenol, erklärt werden. Diese Erklärung würde mit der Beobachtung von weißen Verunreinigungen in den Plasmidproben vor der Elution in Wasser übereinstimmen. Diese Vermutung könnte durch eine Messung der Absorption bei 280 nm bestätigt oder widerlegt werden, da Proteine eine starke Absorption bei 280 nm aufweisen. [EPPENDORF, 2013]

6.3 Miniprep mit P1

Mit der Miniprep mit P1 wurden DNA-Proben isoliert, die bei 260 nm Absorptionen zwischen 3,6 bis 6,8 aufwiesen. Um die Reinheit der Extrakte zu überprüfen, wurden die

260/280-Verhältnisse der Proben berechnet (vergl. Tabelle 13). Eine reine DNA-Probe sollte einen $R_{260/280}$ -Wert von etwa 1,8 aufweisen, niedrigere Werte weisen auf Proteinverunreinigungen hin, höhere Werte auf einen hohen RNA-Gehalt. [THERMO SCIENTIFIC, 2008] Die Messung der in diesem Versuch isolierten DNA-Proben ergab $R_{260/280}$ -Werte zwischen 1,44 für die aus Klon A3 extrahierte Probe und 1,98 für die aus Klon M2 extrahierte Probe. Es sind also nach dieser Methode Protein- und RNA-Verunreinigungen nicht auszuschließen.

Bei der Gelelektrophorese wurde festgestellt, dass die verdauten Plasmide nur eine der erwarteten Banden zeigte. Die Banden bei 770 bP der pET16b-aPDI und 674 bP der pET16b-mPDI traten auf dem Gel nicht auf. Ein Grund dafür könnte sein, dass das Ethidiumbromid in diesen kurzen Fragmenten schlechter binden kann und dementsprechend schwach detektierbare Banden entstehen, die mit dem zur Verfügung stehenden Dokumentationssystem nicht erfasst werden konnten. In dem Zeitraum der Versuchsdurchführung war keine Kamera mit ausreichender Auflösung verfügbar. Als weitere Ursache ist die unvollständige Restriktion der Plasmide zu diskutieren, wodurch nur eine Bande bei etwa 7200 bP zu erwarten gewesen wäre. Allerdings zeigten die unverdauten Positivkontrollen Banden im Gel, die oberhalb der Banden der verdauten Plasmiden liegen. (Vgl. Abbildung 3). Dies deutet auf eine erfolgreiche Restriktion der Plasmide in den Spalten 2-4 und 7-9 hin. Bei der Positivkontrolle der aus Klon M2 extrahierten Plasmide in Spalte 6 wurde weiterhin eine Bande bei ca. 5000 bP festgestellt. Diese Bande ist die superhelikale Form der pET16b-mPDI, die aufgrund der kompakten Faltung das Gel schneller durchqueren als die lineare Form. [CAMPBELL, 2007]

In Spalte 9 wurden zwei Banden mehr ermittelt als in den Spalten der anderen verdauten pET16b-mPDIs. Die Banden ähneln den Banden der Positivkontrolle, was auf eine unvollständige Restriktion der Plasmide hindeutet, die in unverdauten oder nur an einer Stelle geschnittenen Plasmiden resultieren.

Die pET16b-aPDI und pET16b-mPDI aus dem Kryostock zeigen ähnliche Banden wie die aus den Klonen extrahierten Plasmide. Die isolierten Plasmide scheinen identisch mit den eingesetzten Plasmiden aus dem Kryostock zu sein.

6.4 Vergleich der Extraktionseffizienz zwischen kommerziellem Extraktionskit und der Miniprep mit P1

Aus den pET16b-aPDI-transformierten Klonen A1-A5 und pET16b-mPDI-transformierten Klonen M1-M5 wurden jeweils mittels der Miniprep mit P1 und dem kommerziellen Extraktionskit Roti®-Prep Plasmid MINI Kit als Referenz Plasmide isoliert und auf die Plasmidkonzentration und Reinheit untersucht. Als Parameter für die Plasmidkonzentration wurde die Absorption bei 260 nm genutzt, als Reinheitsparameter das 260/280-Verhältnis.

Es wurde festgestellt, dass die mittels Miniprep mit P1 hergestellten Plasmidextrakte eine deutlich höhere Absorption aufweisen als die mittels des Extraktionskits extrahierten Proben. Anhand der Absorptionswerte scheint die Plasmidkonzentration in den mittels Miniprep mit P1 isolierten Plasmid-Proben höher zu sein als die der mittels Extraktionskit extrahierten

Proben. Andererseits wiesen die mittels Miniprep mit P1 extrahierten Proben ein geringeres 260/280-Verhältnis auf. Dies deutet auf eine Kontamination mit Proteinen hin, welches mit der Beobachtung von weißen Verunreinigungen bei der Elution der Plasmide übereinstimmt. Diese Kontamination würde die Absorption bei 260 nm beeinflussen. Die tatsächliche Plasmidkonzentration in den mittels Miniprep isolierten Plasmidproben könnte dementsprechend niedriger sein, als die Absorptionswerte bei 260 nm es vermuten lassen. Diese Annahme wurde durch die schwach oder nicht erkennbaren Banden der mittels Miniprep isolierten Plasmide während der Gelelektrophorese bestätigt.

Weiterhin wurden in den Taschen der aus den pET16b-mPDI-transformierten Zellen extrahierten Plasmid-Proben Rückstände festgestellt, die entweder auf Proteinverunreinigungen oder DNA, die nicht in das Gel einlaufen konnte, zurückzuführen sind.

In Spalte 7 der unteren Gelhälfte wurden drei Banden festgestellt, von denen nur eine in dieser Spalte erwartet wurde. Beide zusätzlichen Banden waren nahezu identisch mit den Banden aus Spalte 6, bei deren Beladung ein Teil der aufgetragenen Probe die aus der Tasche in den Puffer ausgetreten ist. Es wurde deshalb angenommen, dass die zusätzlichen Banden durch Kontaminationen mit der Probe aus Spalte 6 entstanden sind.

Bei der mittels Kit extrahierten Proben konnten eindeutige und scharfe Banden im Gel festgestellt werden, die im Bereich der zu erwartenden Fragmente lagen. Bei den verdauten pET16b-mPDIs konnte nur eine der beiden erwarteten Banden eindeutig ermittelt werden, die Banden bei etwa 700 bP waren zu schwach für eine Auswertung. Die $R_{260/280}$ -Verhältnisse deuten auf niedrigere Proteinkontaminationen hin als bei der Extraktion mittels Miniprep mit P1, allerdings scheint es RNA-Verunreinigungen zu geben.

Zusammenfassend konnte durch diesen Versuch festgestellt werden, dass bei der Extraktion von pET16b-aPDI mittels Miniprep mit P1 hohe A_{260} -Werte gemessen werden konnten, allerdings konnten bei der Gelelektrophorese keine Plasmide in den Extrakten festgestellt werden. Bei der Extraktion pET16b-mPDI konnten Banden festgestellt werden, die allerdings schwächer waren, als die A_{260} vermuten ließ. Die Extraktion mit dem kommerziellen Extraktionskit ergab für beide Plasmide Proben mit hohen $R_{260/280}$ -Verhältnissen, also einer hohen Reinheit. Die auftretenden Banden der verdauten und unverdauten Plasmide stimmten mit den zu erwartenden Fragmentgrößen und den unter 5.3 erzielten Ergebnissen größtenteils überein. Die erwarteten Banden bei etwa 700 bP konnten nur beim Verdau der pET16b-aPDI zweifelsfrei festgestellt werden.

Es ist bezüglich der Vergleichs zwischen der Miniprep mit P1 und Extraktionskit festgestellt worden, dass die mittels des kommerziellen Extraktionskit Roti®-Prep Plasmid MINI Plasmidextrakte sowohl eine höhere Plasmidkonzentration als auch eine höhere Reinheit aufweisen. Weiterhin ist die Durchführung Miniprep mit P1 wesentlich zeitaufwändiger aufgrund von langen Zentrifugations- oder Kühschritten. Die Isolation von Plasmiden aus einer bereits angezogenen Kultur mit dem Kit dauert insgesamt etwa 45 Minuten, bei der Miniprep mit P1 handelt es sich um mindestens 2 h. Die Kosten für das Kit belaufen sich auch etwa 1 € bis 2,5 € pro Extraktionsansatz zuzüglich weiteres für die Methode nötiges Material

und liegen damit nur wenig höher als die Kosten für die Chemikalien, die für die Miniprep mit P1 benötigt werden. Insgesamt ist die Nutzung des kommerziellen Kits zu empfehlen.

6.5 SDS-PAGE der transformierten BL21-Zellen

Ziel der Induktion und SDS-Page der BL21-Klone in diesem Versuch war der Nachweis der rekombinanten Proteine aPDI und mPDI. Die theoretischen Molekulargewichte der Proteine mit His-Tag betrugen 115 kDa für aPDI und 60 kDa für mPDI. Diese Banden konnten in der SDS-Page der induzierten BL21-Zellen ermittelt werden. Aufgrund eines qualitativ minderwertigen Gels durch unvollständige Polymerisation oder ungleicher Wärmeentwicklung bei der Elektrophorese, konnten keine weiteren Banden in diesem Gel festgestellt werden und der Versuch musste wiederholt werden (Vgl. Abbildung 5).

Um die Eignung von manuell gegossenen Polyacrylamidgelen für die Elektrophorese der induzierten Zellen zu testen, wurde der Versuch sowohl mit einem selbst hergestelltem Gel als auch mit einem kommerziell erhältlichen Fertiggel vergleichend durchgeführt. Es wurden jeweils Gele mit 10 % Bis-/Acrylamid-Gehalt verwendet. In beiden Gelen konnte übereinstimmende Banden festgestellt werden, die erwarteten Proteinbanden wurden im Fertiggel bei 200 kDa und 55 Da gefunden, im manuell gegossenen Gel bei etwa 120 kDa und 55 kDa. Damit wurde nachgewiesen, dass die Induktion und Proteinherstellung erfolgreich waren und in den Zellen nachweisbare Mengen der rekombinanten Proteine vorliegen. Weiterhin wurden in allen Gelen verschiedene, in allen Proben vorliegende Banden festgestellt, die auf *E. coli* -Proteine zurückzuführen sind. In den nur mit Ladepuffer belegten Spalten des manuell gegossenen Gels wurden keine Banden festgestellt, eine Entstehung der Banden durch Lade- oder Laufpuffer ist also ausgeschlossen.

Bezüglich der Eignung der manuell gegossenen Gele wurde festgestellt, dass gegenüber dem kommerziellen Referenzgel die Laufzeit deutlich erhöht war. Diese Verzögerung ist wahrscheinlich durch die unterschiedliche Dicke der Gele begründet, möglicherweise aber auch durch unbekannte Zusätze in dem kommerziellen Gel. Außerdem wurde festgestellt, dass die Banden des Proteinmarkers stark nach innen verzerrt waren und die genaue Auswertung der Banden damit verhindern. Dieser Effekt wird auch „Smile Effect“ genannt und entsteht unter anderem durch eine starke Temperaturdifferenz zwischen der Gelmitte und den Rändern des Gels. Dieser Effekt sollte durch Wasserkühlung verhindert werden, allerdings ist gerade die Gelmitte durch die Glasplatten um das Gel gegen den Puffer und die Wasserkühlung isoliert und könnte sich dementsprechend stärker erwärmen als die äußeren Bereiche des Gels. Ein möglicher Lösungsansatz wäre eine geringere Spannung, um die Erhitzung zu vermindern, oder eine intensivere Kühlung, zum Beispiel durch kälteres Wasser. Ebenfalls möglich, wenn auch aufwändig, wäre die Durchführung der Elektrophorese in einem gekühlten Raum. [HYCULT, 2010]

Die Auftrennung der Proteine mit dem manuell gegossenen Gel ergab klar definierte, gegen den geringen Hintergrund gut erkennbare Banden, die deutlich schmaler waren als die Banden des kommerziellen Gels. In diesem manuell gegossenen Gel wurde keine Unregelmäßigkeit wie in Abbildung 5 entdeckt. In dem kommerziellen Gel wurde dagegen eine gerade, rissartige Struktur festgestellt (Vgl. Abbildung 6), die auf eine Beschädigung des Gels durch

mechanische Kräfte hindeutet. Da die Unregelmäßigkeit keinen offensichtlichen Einfluss auf den Lauf der Proteine unterhalb des Risses zeigte und da bei der Durchführung des Gellaufes streng nach der mitgelieferten Anleitung vorgegangen wurde, wurde von einer Beschädigung des Gels beim Entfernen aus der Gelkammer oder beim Färbungsprozess ausgegangen.

6.6 Expressionskinetik von BL21-M3 und BL21-A2

In diesem Versuch wurde die Abhängigkeit der Produktion von rekombinanter aPDI bzw. mPDI von der Inkubationsdauer nach der Induktion untersucht. Vorrangig sollten kürzere Induktionszeiten als die unter 4.5.1 beschriebenen 4 h untersucht werden, um die Induktion in Zukunft effizienter zu gestalten. Das Polyacrylamidgel der verschiedenen induzierten und aufgeschlossenen Zellproben ist in Abbildung 8 gezeigt.

Es wurde festgestellt, dass bereits nach 1 h Induktion bei 37 °C eine deutliche Bande des rekombinanten Proteins erkennbar war. Aufgrund der hohen Hintergrundfärbung des Gels konnte kein Unterschied in der Bandenstärke zwischen 1 h, 2 h und 4 h Induktion festgestellt werden. Die Banden der über Nacht bei Raumtemperatur induzierten Zellen waren ebenfalls erkennbar, allerdings im Falle von Klon M3 deutlich schwächer als nach der Induktion bei 37 °C. Der Grund für diese Differenz konnte in dieser Arbeit nicht hinreichend untersucht werden. Die gemessene Zelldichte der Kultur war ähnlich der Zelldichte der bei 37 °C inkubierten Kulturen und es konnte kein sichtbarer Unterschied festgestellt werden, ein Problem mit dem Zellwachstum unter den gegebenen Inkubationsbedingungen ist wenig wahrscheinlich. Da alle anderen Banden der natürlichen Zellproteine gut erkennbar waren, ist ein allgemeines Problem mit der Proteinbildung auszuschließen. Eine Möglichkeit ist ein Fehler bei der Zugabe des IPTG, resultierend in einer abgeschwächten Induktion, oder eine Hemmung der mPDI-Bildung durch die niedrigere Temperatur. Um den Grund näher zu betrachten, wäre eine weitere Untersuchung des Einflusses der Inkubationstemperatur auf die Bildung des rekombinanten Proteins nötig, die aus Zeitgründen nicht mehr möglich war.

In den nicht-induzierten Zellen konnte das rekombinante Protein nicht nachgewiesen werden. Der Grund dafür ist die Repression des Lac-Promoters durch den lacI-Repressor, wodurch das rekombinante Gen nicht abgelesen werden kann. Ohne einen Induktor wie IPTG oder Laktose kann dementsprechend das rekombinante Protein nicht gebildet werden. [ROSANO, 2014]

Aus diesen Ergebnissen geht hervor, dass die Proteinproduktion bereits nach 1 h Inkubation begonnen hat und die Konzentration der rekombinanten aPDI bzw. mPDI im weiteren Verlauf der Inkubation nicht mehr steigt. Die Zellen könnten dementsprechend für analytische Zwecke bereits nach 1 h Inkubation geerntet und aufgeschlossen werden. Für die Proteinisolation sollte mindestens 2 h inkubiert werden, da in dieser Zeit die Zelldichte der Kulturen deutlich zunimmt und so die Ausbeute erhöht werden kann.

Als weiterführende Versuche wäre zur Induktion noch der Einfluss von Stress durch Glucosemangel und die minimal benötigte Induktionszeit für die nachweisbare Bildung der rekombinanten Proteine interessant, um den Prozess der Induktion weiter zu optimieren.

Ebenso wäre eine Wiederholung dieses Versuchs zur Induktionskinetik nötig, um einen Bearbeiterfehler bei der Induktion der Übernachtskultur von BL21-M3 auszuschließen.

7 Zusammenfassung

Ziel dieser Arbeit war die Extraktion, Isolation und Charakterisierung von zwei rekombinanten Protein-Disulfidisomerasen aPDI und mPDI aus *E. coli* BL21(DE3)-Zellen. Die dafür benötigten Methoden sollten im Labor der QuoData erstmalig etabliert und angepasst werden. Weiterhin sollten *E. coli* XL1-Blue-Zellen transformiert werden, um die verwendeten Plasmide zu vervielfältigen und schließlich zu extrahieren. Sowohl die benötigten Zellen als auch die fertigen Plasmidkonstrukte wurden zu Beginn der Arbeit vom Leibniz-Institut für Pflanzengenetik und Kulturpflanzenforschung Gatersleben zur Verfügung gestellt.

Die BL21- und XL1-Zellen wurden chemisch kompetent gemacht und für weitere Versuche bei -80 °C gelagert. Die Plasmidextraktion aus *E. coli* XL1 mittels der Miniprep mit PCIA-Extraktion ergab Proben, in denen mit Agarose-Gelelektrophorese keine Plasmid-DNA nachgewiesen werden konnte. Bei der Dokumentation des Agarose-Gels musste aufgrund eines Defektes in der integrierten Kamera eine mobile Kamera verwendet werden, die nicht für diese Aufnahmen geeignet war. Die Durchführung der Agarose-Gelelektrophorese musste mehrfach wiederholt werden, bis die optimalen Parameter für diese Methode gefunden wurden.

Es wurde ein weiteres Protokoll zur Plasmidextraktion angewendet, die Miniprep mit P1. Es wurden damit Plasmidproben isoliert, die eine hohe Reinheit aufwiesen. In diesem Versuch konnte bestätigt werden, dass die isolierten Plasmide die gleiche Größe wie die für die Transformation eingesetzten Plasmide im Agarose-Gel zeigen.

Bei einem Vergleich der Miniprep mit P1 mit einem kommerziellen Kit zur Plasmidextraktion wurde festgestellt, dass die Nutzung des kommerziellen Extraktionskits der Miniprep mit P1 vorzuziehen ist, da höhere Plasmidausbeuten und Reinheit erzielt werden und das Verfahren schneller und zeiteffizienter ist.

Bei der Elektrophorese der kultivierten, induzierten und lysierten BL21-Zellen konnten die rekombinanten Proteine in den entsprechenden Zellen nachgewiesen werden, allerdings trat bei der SDS-Page ein Problem aufgrund mangelhafter Gels auf. Bei der Etablierung der SDS-Page traten gehäuft Schwierigkeiten mit schlecht polymerisierendem Gel und ungleichmäßiger Wärmeentwicklung im Gel auf, die im Laufe der Arbeit allerdings beseitigt oder vermindert werden konnten. Der Versuch wurde vergleichend mit einem kommerziellen Fertiggel wiederholt. Das Fertiggel stellte sich aufgrund einer ungleichmäßigen Hintergrundfärbung und einer geringeren Trennschärfe als weniger geeignet heraus als ein manuell gegossenes Gel.

Abschließend wurde der Einfluss der Induktionsdauer auf die Konzentration der rekombinanten Proteine in den Zellen durchgeführt. In den nicht induzierten Zellen konnten die rekombinanten Proteine nicht nachgewiesen werden. Nach 1 h, 2 h, 4 h und über Nacht Induktion konnten in den induzierten Zellen die rekombinanten Proteine nachgewiesen

werden, aufgrund der hohen Hintergrundfärbung des Gels konnte allerdings kein quantitativer Vergleich der Bandenstärke durchgeführt werden.

Die weiteren, in der Zielstellung festgelegten Ziele dieser Arbeit konnten aufgrund von Verzögerungen bei der Etablierung der benötigten Methoden nicht erreicht werden. Es wurde mit den transformierten Zellen und der Etablierung der Induktion allerdings eine Grundlage für die Extraktion und Reinigung der rekombinanten Proteine und dementsprechend für die Weiterführung dieser Arbeit geschaffen.

Literaturverzeichnis

- 1 ROWLAND, S. (2011): Miniprep Protocol, In:
<http://webserver.mbi.ufl.edu/~rowland/protocols/miniprep.pdf>
- 2 BREMA, S.: Entwicklung eines indirekten ELISA zum Nachweis von Infektionen mit potenziell onkogenen Gammaherpesviren beim Schwein als Beitrag zur Virussicherheit in der Xenotransplantation, Dissertation an der Freien Universität Berlin, 2004
- 3 BÜLTE, M. et al.: Pathogene Mikroorganismen: Escherichia Coli, Behr's-Verlag, Hamburg, 2. Auflage, 2014
- 4 GÄNZLE, M. (2004): Escherichia Coli. In:
<https://roempp.thieme.de/roempp4.0/do/data/RD-05-01711>
26.09.2016 08:04
- 5 DINGERMAN, T. (1999): Gentechnik Biotechnik, Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft, Stuttgart, 1999
- 6 CAMPBELL, H. (2007): Supercoiled. In: Does Our Genome Oscillate?
<http://content.science20.com/files/plasmid%20supercoiling.jpg>
13.09.2016 13:03
- 7 KNIPPERS, R. (2001): Molekulare Genetik, Georg Thieme Verlag, Stuttgart New York, 8. Auflage, 2001
- 8 ZIEGLER, M. (2003): SDS-PAGE. In:
http://cbc.arizona.edu/classes/bioc462/462a/NOTES/Protein_Properties/protein_purification
21.10.2016 11:15
- 9 MÜLLHARDT, C. (2013): Der Experimentator Molekularbiologie/Genomics, Spektrum Akademischer Verlag, Berlin Heidelberg, 7. Auflage, 2013
- 10 GOLDENBERG, P. (2016): SDS Gel Elektrophoresis and Introduction of Chromatographie, University of Utah, 2016
http://courses.biology.utah.edu/31oil31nberg/31oil.3515/lectMaterials/lect12_sdsGels.pdf
16.12.2016
- 11 DYBALLA, N. (2008): Sensitive Coomassie-Färbung. In:
<http://www.laborjournal.de/rubric/tricks/tricks/trick122.lasso>
21.10.2016 11:20
- 12 BIRNBOIM, H., et al. (1979): A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA, In:
Nucleic Acids Research Vol. 7 Iss. 6, 1979
- 13 GOODWIN, DC., et al. (1993): Microwave Miniprep of total genomic DNA from fungi, plants, protists and animals for PCR, In:
Biotechniques Vol. 15(3), 1993
- 14 CHAKRABARTI, A., et al. (1992): A Procedure for large-scale plasmid isolation without using ultracentrifugation, In:
Biotechnology and Applied Biochemistry Vol. 16, Iss. 2, 1992
- 15 HEMSCHMEIER, S., et al. (2017): Proteinfaltung, In:
<http://www.chemgapedia.de/vsengine/vlu/vsc/de/ch/8/bc/vlu/faltung/faltung.vlu.html>
27.01.2017 11:51
- 16 TIAN, F., et al. (2009): Protein Disulfid isomerase increases in myocardial endothelial cells in mice exposed to chronic hypoxia: a stimulatory role in angiogenesis, In:
American Journal of Physiology Vol. 297, 2009

- 17 NOIVA, R. (1994): Enzymatic catalysis of disulfide formation, In:
Protein Expression and Purification Vol. 5 Iss. 1, 1994
- 18 FERNANDES, M., et al (2011): Protein disulphide isomerase-assisted functionalization
of keratin-based matrices, In:
Applied Microbiology and Biotechnology Vol. 90 Iss. 4, 2011
- 19 CORNING (2012): Protein Electrophoresis Troubleshooting
[http://cellgro.com/media/upload/file/techinfosheets/new/Troubleshooting-
Protein%20Electrophoresis.pdf](http://cellgro.com/media/upload/file/techinfosheets/new/Troubleshooting-Protein%20Electrophoresis.pdf)
27.01.2017
- 20 PHIFER-RIXLEY, M. et al. (2015): Insights into mammalian biology from wild house
mouse *Mus musculus*, In:
eLife Vol. 4, 2015
- 21 ROSANO, G. et al. (2014): Recombinant protein expression in *Escherichia coli*:
advances and challenges, In:
Frontiers in Microbiology, Iss. 5 2014
- 22 STRUCTURAL GENOMICS CONSORTIUM (2008): Protein production and
purification, In:
Nature Methods, Vol. 5(2), 2008
- 23 WARTMANN, T. et al. (2000): Genetic transformation and biotechnological application
of the yeast *Arxula adeninivorans*, In:
Applied Microbiology and Biotechnology, Vol. 54, Iss. 5, 2000
- 24 GÖTTFERT, M. (2010): Klonierung. In:
<https://roempp.thieme.de/roempp4.0/do/data/RD-11-01273>
13.12.2016 18:15
- 25 BLEILE, B. (2014): Klonierung. In: <http://slideplayer.org/slide/1337201/>
10.09.2016, 13:33
- 26 NEB, 2017: Troubleshooting Transformation Reactions, In:
[https://www.neb.com/tools-and-resources/troubleshooting-guides/troubleshooting-
transformation-reactions](https://www.neb.com/tools-and-resources/troubleshooting-guides/troubleshooting-transformation-reactions)
03.02.2017, 17:25
- 27 EPPENDORF, 2013: Detektion von Kontaminationen in DNA und Protein-Proben
durch photometrische Messungen, In:
Application Note No. 279, 2013
- 28 THERMO SCIENTIFIC, 2008: 260/280 and 260/230 Ratios, In:
T009-Technical Bulletin, Rev. 4/08
- 29 HYCULT BIOTECH, 2010: Troubleshooting Sodium Dodecyl Sulfate-Polyacrylamide
Gel Electrophoresis (SDS-Page), 2010
- 30 MIROUX, B. et al., 1996: Overproduction of proteins in *Escherichia coli*: Mutant Hosts
that allow synthesis of some membrane proteins and globular proteins at high level, In:
Journal of Molecular Biology, Vol. 260, Iss. 3, 1996
- 31 PLATTNER, H. et al., (2011): Zellbiologie, Georg Thieme Verlag, Stuttgart, 4. Auflage,
2011