**Studienarbeit**

an der

Berufsakademie Sachsen

Staatliche Studienakademie Riesa

Studiengang Labor- und Verfahrenstechnik

Kurs: 14BT-1 Studienrichtung: Biotechnologie

Thema: Konzeptionelle Integration eines Fluoreszenzdetektionsmoduls in ein automatisiertes Pipettiersystem zur Detektion fluoreszierender Biomoleküle

**Eingereicht von: Firma:**

Martin Schneider QuoData GmbH

Am Graben 2 Prellerstraße 14

01809 Dohna 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****

|  |  |
| --- | --- |
| *E. coli* | *Escherichia Coli* |
| *M. musculus* | *Mus musculus* |
| *A. adeninivorans* | *Arxula adeninivorans* |
| IPTG | Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid |
| DTT | Dithiothreitol |
| TAE-Puffer | TRIS-Acetat-EDTA-Puffer |
| LB-Medium | Luria-Broth-Medium |
| EtBr | Ethidiumbromid |
| DNA | Desoxyribonukleinsäure |
| SDS-PAGE | Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese |
| PK | Positivkontrolle |
| RT | Raumtemperatur |
| PDI | Protein-Disulfidisomerase |
| aPDI | Protein-Disulfidisomerase der *Arxula Adeninivorans* |
| mPDI | Protein-Disulfidisomerase der *Mus musculus* |
|  |  |

**Inhaltsverzeichnis**

[Abkürzungsverzeichnis I](#_Toc477195105)

[1 Einleitung 1](#_Toc477195106)

[0.9 Elektronenanregung 1](#_Toc477195107)

[1.0 Fluoreszenz 2](#_Toc477195108)

[1.1 Spektroskopie 3](#_Toc477195109)

[1.2 Fluoreszenzdetektion 4](#_Toc477195110)

[2 Zielstellung 8](#_Toc477195111)

[3 Material 9](#_Toc477195112)

[3.1 Chemikalien 9](#_Toc477195113)

[3.2 Puffer, Medien und Lösungen 9](#_Toc477195114)

[3.3 Plamide und Mikroorganismen 10](#_Toc477195115)

[3.4 Geräte 10](#_Toc477195116)

[4 Methoden 11](#_Toc477195117)

[4.1 Chemisch kompetente Zellen 11](#_Toc477195118)

[4.2 Transformation 11](#_Toc477195119)

[4.3 Miniprep 11](#_Toc477195120)

[4.3.1. Miniprep 11](#_Toc477195121)

[4.3.2 Miniprep via P1, P2, P3 11](#_Toc477195122)

[4.4 Agarose-Gelelektrophorese 11](#_Toc477195123)

[4.4.1 Restriktionsverdau 11](#_Toc477195124)

[4.4.2 Gießen des Agarosegels 11](#_Toc477195125)

[4.4.3 Durchführung der Elektrophorese 11](#_Toc477195126)

[4.4.4 Nachträgliche Ethidiumbromid-Färbung 11](#_Toc477195127)

[4.5 SDS-Page 11](#_Toc477195128)

[4.5.1 Probenvorbereitung 11](#_Toc477195129)

[4.5.2 Gießen des Polyacrylamid-Gels 11](#_Toc477195130)

[4.5.3 Gelelektrophorese 11](#_Toc477195131)

[5 Ergebnisse 12](#_Toc477195132)

[5.1 Transformation 12](#_Toc477195133)

[5.1.1 XL1 Blue 12](#_Toc477195134)

[5.1.2 BL21 12](#_Toc477195135)

[5.2 Miniprep nach Laborprotokoll 12](#_Toc477195136)

[5.3 Miniprep via P1, P2, P3 12](#_Toc477195137)

[5.4 Vergleich der Extraktionseffizienz zwischen kommerziellem Extraktionskit und dem Laborprotokoll via P1, P2, P3 12](#_Toc477195138)

[5.5 SDS-Page der transformierten BL21-Klone 12](#_Toc477195139)

[5.6 Induktionskinetik von Bl21-M1 und BL21-A2 12](#_Toc477195140)

[6 Auswertung 13](#_Toc477195141)

[6.1 Transformation 13](#_Toc477195142)

[6.2 Miniprep nach Laborprotokoll 13](#_Toc477195143)

[6.3 Miniprep via P1, P2, P3 13](#_Toc477195144)

[6.4 Vergleich der Extraktionseffizienz zwischen kommerziellem Extraktionskit und dem Laborprotokoll via P1, P2, P3 13](#_Toc477195145)

[6.5 SDS-Page der transformierten BL21-Zellen 13](#_Toc477195146)

[6.6 Induktionskinetik von Bl21-M1 und BL21-A2 13](#_Toc477195147)

[7 Zusammenfassung 14](#_Toc477195148)

[Literaturverzeichnis 15](#_Toc477195149)

**Tabellenverzeichnis**

[Tabelle 3: Für die Miniprep nach Laborprotokoll verwendete Reagenzien und Puffer 9](#_Toc477195094)

[Tabelle 2: Rezepte der Reagenzien P1, P2 und P3 für die Miniprep 9](#_Toc477195095)

[Tabelle 4: Zusammensetzung des Sammelgels, ergibt 2,5 ml 9](#_Toc477195096)

[Tabelle 5: Zusammensetzung des Trenngels, ergibt 5 ml 10](#_Toc477195097)

**Abbildungsverzeichnis**

[Abbildung 1: Elektronenübergänge nach Atomorbital 1](#_Toc477195084)

[Abbildung 2: Prinzip der Fluoreszenz als Jablonski-Diagramm 2](#_Toc477195085)

[Abbildung 3: Allgemeines Anregungs- und Emissionspektrum eines Chromophoren (links) und der Zusammenhang zwischen Anregungswellenlänge (Ex1; Ex2) und der resultierenden Emissionsintensität (Em1; Em2) (rechts) 3](#_Toc477195086)

[Abbildung 4: Einteilung typischer spektroskopischer Methoden nach Atom- und Molekülspektroskopie 3](#_Toc477195087)

[Abbildung 5: Schematische Anordnung eines Fluoreszenzspektrometers 5](#_Toc477195088)

[Abbildung 6: Schematischer Aufbau des SPECTRAmax GEMINI Spektralfluorometers 6](#_Toc477195089)

[Abbildung 7: Schematischer Aufbau eines Spektralfluorometers unter Nutzung eines dichroischen Spiegels 7](#_Toc477195090)

# 1 Einleitung

## 0.9 Elektronenanregung

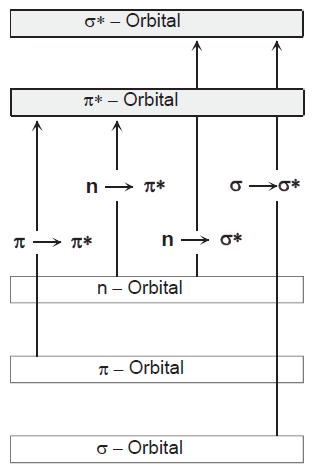


Abbildung : Elektronenübergänge nach Atomorbital

Es wird von einem Atom oder Molekül eine diskrete Energiemenge aufgenommen, die ein Elektron vom Grundzustand in einen angeregten Zustand überführt. [GEY, 2014]

Die diskreten Elektronenübergänge, die mit der Aufnahme bzw. Abgabe nur bestimmter Energiemengen verbunden sind, zeigt Abbildung 1. Die Übergänge σ→σ\* sind die energiereichsten. Sie treten im Vakuum-UV-Bereich bei gesättigten Kohlenwasserstoffen (z.B. Methan; λ = 210 nm) auf. Für Messungen unter 190 nm sind jedoch spezielle Spektrometer mit Vakuumküvetten erforderlich, weshalb diese Übergangsart für die Praxis kaum relevant ist. Beim *n* →σ\*-Übergang werden schon längere Wellenlängen absorbiert. Dies trifft für Verbindungen mit Heteroatomen zu. So zeigen Wasser bei 167 nm, Chloroform bei 173 nm sowie Methanol bei 184 nm noch Absorptionen im Vakuumbereich. Oberhalb von 200 nm besitzen Verbindungen wie CH3NH2 (λ= 215 nm) oder (CH3)3NH2 (λ = 227 nm) Absorptionsmaxima. [GEY, 2014]

Die Elektronenübergänge *n*→π\* und π →π\* sind für die Fluoreszenz-Spektroskopie besonders wichtig. Vor allem π-Elektronen sind im Vergleich zu σ-Elektronen leicht anregbar. Moleküle, die durch diese Übergänge gekennzeichnet sind, zeigen meist signifikante UV/VIS-Spektren. [GEY, 2014]

## Fluoreszenz

Als Floureszenz wird die spontane Emmision von Licht kurz nach der Anregung eines Materials bezeichnet. Erfolgt die Anregung durch absorbiertes Licht, ist das abgegebene Licht in der Regel energieärmer als das absorbierte Licht. Materialen, in denen Fluoreszenz auftritt, heißen Fluorophore, ist es Teil eines Organismus spricht man von dem Auftreten von Biofluoreszenz. [GEY, 2014]

Bei der Fluoreszenz wird ein Photon einer bestimmten Wellenlänge von dem Fluorophor absorbiert und mit dieser Energie ein Elektron auf ein höheres Energieniveau gehoben. Während dieses angeregten Zustandes verliert das Elektron durch molekulare Kollisionen oder Energieabgabe an benachbarte Moleküle ein wenig der aufgenommenen Energie und gibt dementsprechend bei der Lichtemission ein Photon mit einer größeren Wellenlänge ab, als für die Anregung absorbiert wurde. Diese Verschiebung wird Stokessche Regel genannt, der Abstand der Wellenlängen Stokes-Shift. Je größer der Stokes-Shift zwischen den Wellenlängen, desto weniger Überschneidungen zwischen dem zur Anregung verwendeten Licht und dem emittierten Licht treten auf, wodurch die Detektion der Emissionsstrahlung vereinfacht wird. Entspricht die emittierte Wellenlänge der absorbierten Wllenlänge, spricht man von Resonanzfloureszenz. Das Prinzip der Fluoreszenz ist in Abbildung 1 gezeigt. [GEY, 2014; THERMO FISHER, 2017]

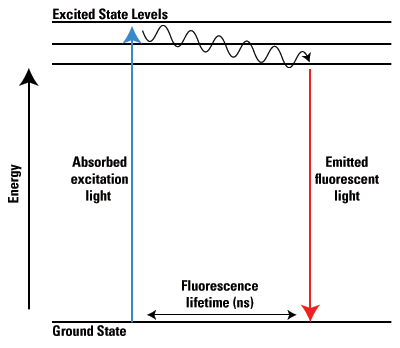


Abbildung : Prinzip der Fluoreszenz als Jablonski-Diagramm [THERMO FISHER, 2017]

Sowohl die Anregungs- als auch die emittierte Wellenlänge sind charakteristisch für den jeweiligen Fluorophor. Monoatomare Fluorophore weißen diskrete Wellenlänge auf, während polyatomare Moleküle breitere Anregungs- und Emissionsspektren zeigen. Die emittierte Wellenlänge ist dabei weitgehend unabhängig von der absorbierten Wellenlänge. Die Intensität der emittierten Strahlung ist abhängig von dem molaren Extinktionskoeffizient ε und der Quantenausbeute Φ. Der Extinktionskoeffizient beschreibt die Lichtmenge, die ein Fluorophor bei einer gegebenen Wellenlänge aufnehmen kann, die Quantenausbeute ist das Verhältnis der absorbierten und emittierten Photonen und ist fluorophorspezifisch. Anregungs- und Emissionsspektren von Fluorophoren können in einem Diagramm zusammengefasst werden (vergl. Abbildung 3). [THERMO FISHER, 2017]

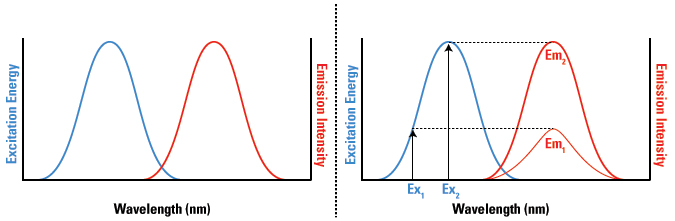


Abbildung : Allgemeines Anregungs- und Emissionspektrum eines Chromophoren (links) und der Zusammenhang zwischen Anregungswellenlänge (Ex1; Ex2) und der resultierenden Emissionsintensität (Em1; Em2) (rechts) [THERMO FISHER, 2017]

Anders als bei der Phosphoreszenz erfolgt bei dem Elektronenübergang aus dem angeregten Zustand in den Grundzustand keine Umkehr des Elektronenspins. Dementsprechend erfolgt der Übergang schneller, die Lebenszeit der Fluoreszenz ist deutlich geringer als die der Phosphoreszenz. [GEY, 2014]

## 1.3 Spektroskopie

Die Spektroskopie beinhaltet die analytischen Methoden, die auf Wechselwirkungen zwischen elektromagnetischer Strahlung und Materie basieren. Materie bezeichnet die Gesamtheit des zu analysierenden Probenmaterials, also Ionen, Moleküle oder Atom- und Molekülverbände. Elektromagnetische Strahlung ist eine sich mit Lichtgeschwindigkeit bewegende Energieart, die u.a. in Form von ultravioletter und sichtbarer Strahlung, Mikro- und Radiowellen oder auch Gamma- und Röntgenstrahlen messbar bzw. sichtbar ist. Die spektroskopischen Methoden werden nach Atom- und Molekülspektroskopie unterschieden (vergl. Abbildung 1). [GEY, 2014]

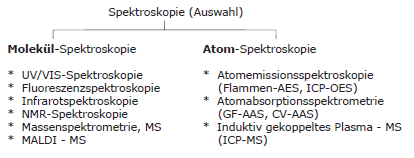


Abbildung : Einteilung typischer spektroskopischer Methoden nach Atom- und Molekülspektroskopie [GEY, 2014]

Methoden der Atomspektroskopie werden in der Bioanalytik vorrangig für die Bestimmung von Elementzusammensetzungen in biologischen Flüssigkeiten, wie Serum und Urin, oder für die Spezies-Bestimmung im Bereich der Toxikologie verwendet. [GEY, 2014]

Die molekülspektroskopischen Methoden werden in bioanalytischen bzw. biochemischen Labors für die Strukturaufklärung verwendet. Besonders die Massenspektrometrie (kurz: MS) hat sich aufgrund der vielen Kopplungsmöglichkeiten mit verschiedenen Chromatographie-Systemen und der Entwicklung von schonenden Ionisierungstechniken wie dem Elektrospray fest etabliert. Für biologische Anwendungen ist auch die Kernmagnetische Resonanzspektroskopie (NMR) von großer Bedeutung, da gerade für Oligosaccharide sehr aussagekräftige Ergebnisse erzielt werden können. [GEY, 2014]

Die UV/VIS und Floureszenzspektroskopie werden hauptsächlich für die Verfolgung und Auswertung biochemischer Reaktionen eingesetzt, besonders als Detektionssysteme für Chromatographie- und Elektrophoresesysteme im On-line-Betrieb finden diese Methoden Anwendung. [GEY, 2014]

## 1.2 Fluoreszenzdetektion

Die Nutzung von fluoreszenten Tracermolekülen ist aufgrund steigender Vielseitigkeit, Sensitivität und Quantifizierbarkeit für viele biologische Anwendungen der Standard geworden, unter anderem werden fluoreszierende Moleküle für die Detektion und Lokalisierung von Proteinen, Identifikation von Proteinkomplexen und die Überwachung von biologischen Prozessen in vivo eingesetzt. [THERMO FISHER, 2017]

Mithilfe der Fluoreszenzdetektion können abhängig von den verwendeten Methoden und Apparaten verschiedene Parameter der Probe quantifiziert werden, einschließlich:

* Zellzahl
* Menge der an Zellen oder sogar Zellkompartimenten lokalisierten Fluorophore
* Geschwindigkeit der Genexpression und Proteinsynthese
* Zellmobilität
* DNA-, RNA- oder Proteingehalt
* Enzymaktivitäten
* Zellvitalität

Für die Fluoreszenzdetektion gibt es verschiedene technische Ansätze, die sich für verschiedene Methoden eignen. Alle Ansätze benötigen folgende Komponenten:

* Eine Lichtquelle für die Anregung. Typischerweise werden Laser. Photodioden oder Lampen abhängig von der benötigten Wellenlänge verwendet.
* Den Fluorophor oder die Probe, in einem für die Strahlung durchdringbaren Gefäß.
* Filter, um spezielle Wellenlängen zu isolieren.
* Einen Detektor, der die gemessene Emission in ein auswertbares, meist elektronisches Signal umwandelt.

Abhängig von den durchzuführenden Versuchen und den zu quantifizierenden Parametern werden verschiedene technische Umsetzungen der Fluoreszenzdetektion verwendet. Die verbreitetsten Gerätetypen sind:

* Fluoreszenz-Mikroskope für die zwei- und dreidimensionale Detektion von lokalisierten Fluorophoren.
* Fluoreszenz-Scanner für die zweidimensionale Detektion von lokalisierten Fluorophoren
* Durchflusscytometer zur Untersuchung der Fluoreszenz einzelner Zellen in einer flüssigen Probe.
* Spektralfluorometer zur Bestimmung der durchschnittlichen Fluoreszenz von Proben. Wichtige Vertreter sind die Microplate Reader, mit deren Hilfe mehrere auf Mikrotiterplatten aufgebrachte Proben in schneller Folge untersucht werden können.

Die Fluoreszenzspektroskopie beruht auf der Anregung der Probe mittels einer Lichtquelle und der Messung der von der Probe emittierten Strahlung. Eine vereinfachte Messanordnung ist in Abbildung 5 gezeigt. [THERMO FISHER, 2017]

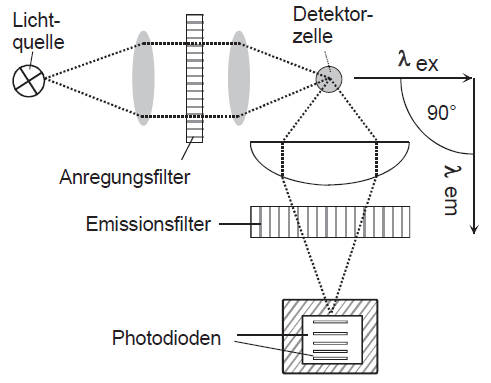


Abbildung : Schematische Anordnung eines Fluoreszenzspektrometers [GEY, 2014]

Das Probenmaterial in der Küvette wird von der Lichtquelle über ein optisches System mit Anregungsfilter mit Licht einer vorgegebenen Wellenlänge (λex) bestrahlt. Das von der Probe emittierte Licht wird senkrecht zur Strahlungsebene der Anregungsstrahlung über einen Emissionsfilter mit einer bestimmten Emissionswellenlänge (λem) auf den Photodioden detektiert, um die Anregungsstrahlung nicht ebenfalls zu erfassen. Auf den Photodioden wird die erfasste Strahlung in ein elektrisches Signal umgewandelt, das an einen Rechner zur Auswertung übergeben werden kann. [GEY, 2014]

Für die Untersuchung einer großen Anzahl von Proben werden Spektralfluorometer mit speziellen Einsätzen für Mikrotiterplatten (MTPs) verwendet. Bei der Messung der Fluoreszenz in einem Well der Mikrotiterplatte ist die Erfassung der Emmisionsstrahlung senkrecht zur Anregungsstrahlung nicht möglich, deshalb gibt es verschiedene optische Anordnungen mit dem Ziel, die Anregungs- und Emissionsstrahlung zu trennen. In dem SPECTRAmax GEMINI Spektralfluorometer wird die in Abbildung 6 gezeigte Anordnung mit Filterschlitten für verschiedene Anregungs- und Emissionswellenlängen eingesetzt. [KECK, 2017]

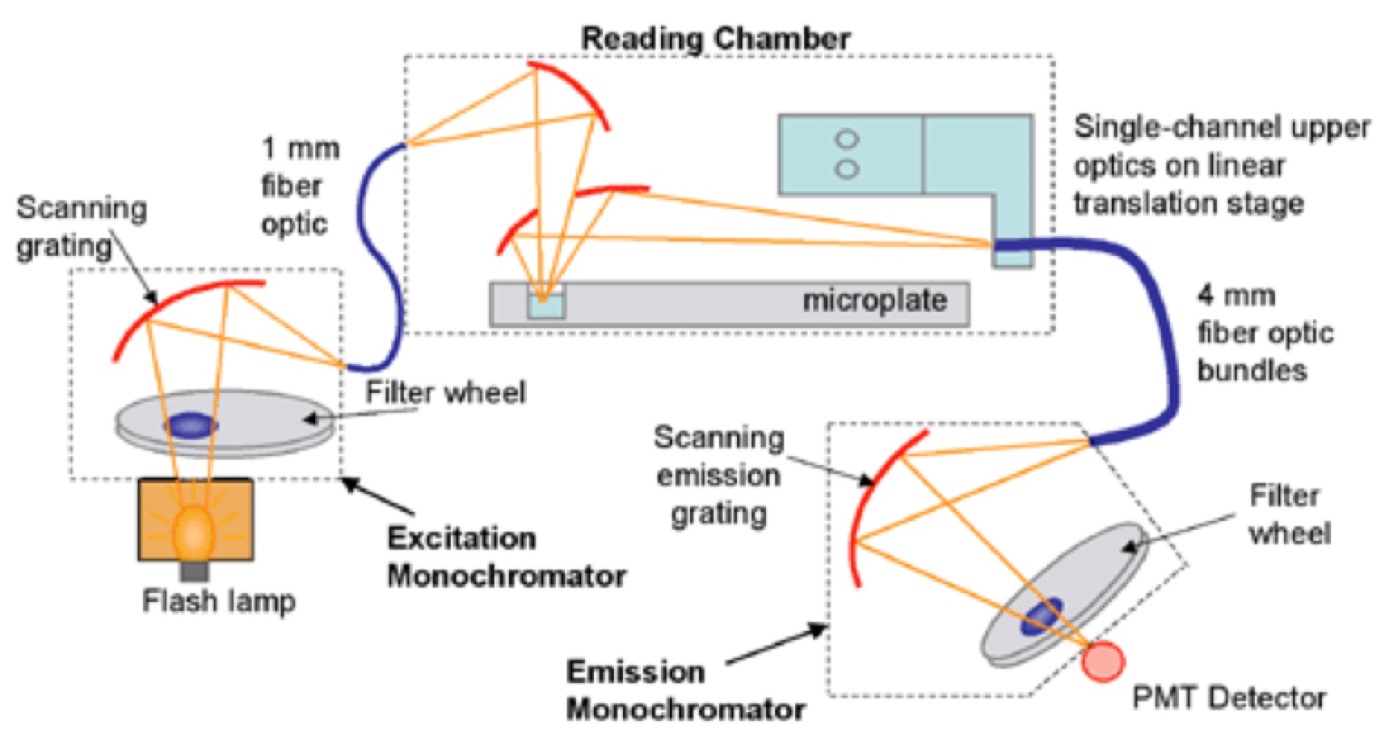


Abbildung : Schematischer Aufbau des SPECTRAmax GEMINI Spektralfluorometers [KECK, 2017]

Das anregende Licht wird durch einen Filter auf eine bestimmte Wellenlänge beschränkt und über einen Hohlspiegel in ein Glasfaserkabel konzentriert. Über einen weiteren Hohlspiegel über der auszulesenden Mikrotiterplatte wird das Licht auf das jeweilige Well konzentriert. Dabei passiert die Strahlung einen Hohlspiegel mit einer Öffnung für die anregende Strahlung, der die emittierte Strahlung in einem weiteren Glasfaserkabel konzentriert und über einen Hohlspiegel und einen weiteren Filter auf die Photodiode konzentriert. Ein Nachteil dieser Konstruktion ist die Erfassung von auf der Probe reflektierter Anregungsstrahlung. Ist der Stokes-Shift zwischen der anregenden und der emittierten Wellenlänge zu gering, können Teile der Anregungsstrahlung fälschlich als Fluoreszenz-Aktivität erfasst werden. [Keck, 2017]

Ein weiterer möglicher Aufbau unter Nutzung eines dichroitischen Filters ist in Abbildung 7 dargestellt. Als Anregungsquelle wird ein Laser genutzt, in Kombination mit einem Anregungsfilter. Über eine Linse wird die anregende Strahlung (Grün) auf einen dichroischen Spiegel konzentriert, der die Strahlung auf eine Linse über der Probe reflektiert. Die Linse konzentriert gleichzeitig die Anregungsstrahlung auf die Probe und sammelt die von der Probe emittierte Strahlung (Rot und Blau) auf dem Spiegel. Die emittierten Wellenlängen werden nicht reflektiert und passieren den Spiegel. Über einen Emissionsfilter werden die erwarteten Wellenlängen von Hintergrundstrahlung befreit und mithilfe einer Linse auf die Photodiode fokussiert. Aufgrund des dichroischen Spiegels kann kein von der Probe reflektiertes Licht der Anregungsquelle auf der Photodiode erfasst werden, allerdings kann ein Teil der emittierten Strahlung (Rot) ebenfalls von der Photodiode abgeschirmt werden, falls der Stokes-Shift nicht groß genug ist. Weiterhin ist die Wellenlängenselektivität der Spiegel in ihrer speziellen Beschichtung begründet und damit nicht anpassbar. Eine Anpassung der genutzten Anregungs- und Emissionswellenlängen ist dementsprechend erschwert und häufig mit der Anschaffung eines neuen dichroischen Spiegels verbunden. [McGUINESS, 2010]

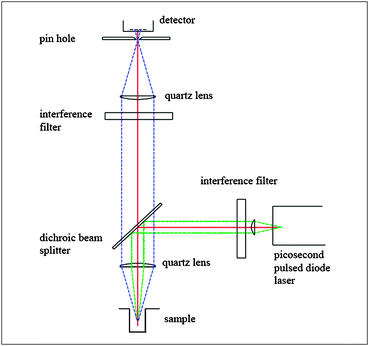


Abbildung : Schematischer Aufbau eines Spektralfluorometers unter Nutzung eines dichroischen Spiegels [McGUINESS, 2010]

Die Durchflusszytometrie ist ein Verfahren für die Analyse von Zellen, die einzeln in einem hohen Tempo an einer Spannungsquelle oder einen Lichtstrahl vorbeifliesen. Vorteil der Methode ist die Möglichkeit, jede Zelle individuell untersuchen und, mit einem nachgeschalteten Sortiermechanismus, sogar anhand der Messwerte trennen zu können. Durchflusscytometer mit einer Fluss-Sortierung werden FACS genannt, kurz für fluoreszenz-aktivierte Zell-Sortierer. Anwendung findet dieses Verfahren zum Beispiel bei der Bestimmung der Vitalitätsbestimmung von Zellen, bei der Analyse von Proteinen und Chromosomen in einer Zelle oder der Überwachung von Zellfunktionen. [FOLDER, 2014]

Bei der Durchflusszytometrie befindet sich die Probe in einer Durchflussküvette. Exemplarisch für diesen Gerätetyp ist der schematische Aufbau des CyAn ADP High-Performance Flow Cytometer in Abbildung 8 gezeigt.

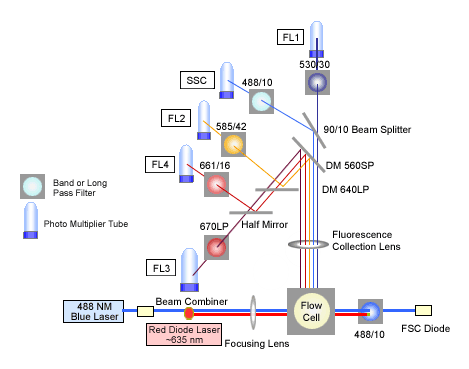


Abbildung : Schematischer Aufbau des CyAn ADP Durchflusszytometers [FOLDER, 2014]

Aktuelle Durchflusszytometer wie das CyAn ADP besitzen mehrere Lichtquellen, um verschiedene Fluoreszenzmarker gleichzeitig aktivieren zu können. Dementsprechend wird das emittierte Licht mit mehreren dichroischen Spiegeln der Wellenlänge nach aufgetrennt und auf mehrere Photodioden konzentriert. Weiterhin wird hinter der Durchflussküvette die Intensität der anregenden Strahlung gemessen und als Forward-Scatter-Wert (FSC) gemessen. Anhand dieses Wertes kann das Passieren einer Zelle detektiert werden und gleichzeitig Aussagen zu deren Volumen getroffen werden. Des Weiteren wird aus der emittierten Strahlung die von der Probe gebrochene anregende Strahlung isoliert und als Sidewards-Scatter-Wert (SSC) erfasst. Dieser Wert gibt Auskunft über die Granularität der Zelle und die Struktur des Zellkerns. [HOLSCHBACH, 2013]

# **2 Zielstellung**

Ziel dieser Arbeit war die theoretische Ausarbeitung eines automatischen Liquid-Handling-Systems mit integrierter Fluoreszenzmessung für die Überwachung und Auswertung von biologischen Assays. Dafür sollten die folgenden Schritte durchgeführt werden:

* Recherche zum Thema Fluoreszenzdetektion und automatisiertem Liquid Handling
* Recherche zu aktuellen Messsytemen für Fluoreszenzquantifikation
* Recherche zu kommerziellen Integrationen von Microplate Readern in Pipettierstationen
* Entwicklung weiterer Möglichkeiten zur Kopplung von Liquid-Handling-Systemen mit einem Modul zur Fluoreszenzquantifikation

# 3 Aktuelle Messsysteme

3.1 Spektralfluorometer

# 4 Methoden

## 4.1 Chemisch kompetente Zellen

## 4.2 Transformation

## 4.3 Miniprep

### 4.3.1. Miniprep

### 4.3.2 Miniprep via P1, P2, P3

## 4.4 Agarose-Gelelektrophorese

### 4.4.1 Restriktionsverdau

### 4.4.2 Gießen des Agarosegels

### 4.4.3 Durchführung der Elektrophorese

### 4.4.4 Nachträgliche Ethidiumbromid-Färbung

## 4.5 SDS-Page

### 4.5.1 Probenvorbereitung

### 4.5.2 Gießen des Polyacrylamid-Gels

### 4.5.3 Gelelektrophorese

# 5 Ergebnisse

## 5.1 Transformation

### 5.1.1 XL1 Blue

### 5.1.2 BL21

## 5.2 Miniprep nach Laborprotokoll

## 5.3 Miniprep via P1, P2, P3

## 5.4 Vergleich der Extraktionseffizienz zwischen kommerziellem Extraktionskit und dem Laborprotokoll via P1, P2, P3

## 5.5 SDS-Page der transformierten BL21-Klone

## 5.6 Induktionskinetik von Bl21-M1 und BL21-A2

# 6 Auswertung

## 6.1 Transformation

## 6.2 Miniprep nach Laborprotokoll

## 6.3 Miniprep via P1, P2, P3

## 6.4 Vergleich der Extraktionseffizienz zwischen kommerziellem Extraktionskit und dem Laborprotokoll via P1, P2, P3

## 6.5 SDS-Page der transformierten BL21-Zellen

## 6.6 Induktionskinetik von Bl21-M1 und BL21-A2

# 7 Zusammenfassung

# Literaturverzeichnis

|  |  |
| --- | --- |
| 1 | GEY, M.: Instrumentelle Analytik und Bioanalytik, Springer Verlag, Berlin, 3. Auflage, 2014 |
| 2 | KECK BIOPHYSICS RESOURCE (2017): Fluorescence Plate Reader. In: <http://keck>.med.yale.edu/biophysics/technologies/platereader/platereader.aspx  13.03.2017 18:30 |
| 3 | McGUINESS et al. (2010): Detection of single nucleotide polymorphisms using a DNA Holliday junction nanoswitch—a high-throughput fluorescence lifetime assay. In:  Mol. BioSyst, Vol. 6, 2010 |
| 4 | THERMO FISHER (2017): Fluorescent Probes. In:  https://www.thermofisher.com/de/de/home/life-science/protein-biology/protein-biology-learning-center/protein-biology-resource-library/pierce-protein-methods/fluorescent-probes.html  12.03.2017 14:20 |
| 5 | FOLDER, S. (2014): Flow cytometrie, In:  https://www.ucl.ac.uk/wibr/scientific-support/flow-cytometry1  14.03.2017 |
| 6 | HOLSCHBACH, M. (2013): Durchflusszytometrie, Messprinzip und Aufbau. In:  http://www.antikoerper-online.de/resources/17/1247/durchflusszytometrie-facs-messprinzip-aufbau/  14.03.2017 |
| 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 | DINGERMANN, 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/oilnberg/oil.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 | HEMSCHEMEIER, 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  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  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 |