**Studienarbeit (6. 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 adeninivorans*.

**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 III](#_Toc474262096)

[1 Einleitung 6](#_Toc474262097)

[1.1 Protein-Disulfidisomerasen 6](#_Toc474262098)

[1.2 *Mus musculus* 6](#_Toc474262099)

[1.3 *Arxula Adeninivorans* 6](#_Toc474262100)

[1.4 *Escherichia coli* 7](#_Toc474262101)

[1.5 Herstellung rekombinanter Proteine 8](#_Toc474262102)

[2 Zielstellung 11](#_Toc474262103)

[3 Material 12](#_Toc474262104)

[3.1 Chemikalien 12](#_Toc474262105)

[3.2 Puffer, Medien und Lösungen 12](#_Toc474262106)

[3.3 Plamide und Mikroorganismen 13](#_Toc474262107)

[3.4 Geräte 13](#_Toc474262108)

[4 Methoden 14](#_Toc474262109)

[4.1 Chemisch kompetente Zellen 14](#_Toc474262110)

[4.2 Transformation 14](#_Toc474262111)

[4.3 Miniprep 14](#_Toc474262112)

[4.3.1. Miniprep 14](#_Toc474262113)

[4.3.2 Miniprep via P1, P2, P3 15](#_Toc474262114)

[4.4 Agarose-Gelelektrophorese 15](#_Toc474262115)

[4.4.1 Restriktionsverdau 15](#_Toc474262116)

[4.4.2 Gießen des Agarosegels 16](#_Toc474262117)

[4.4.3 Durchführung der Elektrophorese 16](#_Toc474262118)

[4.4.4 Nachträgliche Ethidiumbromid-Färbung 17](#_Toc474262119)

[4.5 SDS-Page 17](#_Toc474262120)

[4.5.1 Probenvorbereitung 17](#_Toc474262121)

[4.5.2 Gießen des Polyacrylamid-Gels 17](#_Toc474262122)

[4.5.3 Gelelektrophorese 17](#_Toc474262123)

[5 Ergebnisse 18](#_Toc474262124)

[5.1 Transformation 18](#_Toc474262125)

[5.1.1 XL1 Blue 18](#_Toc474262126)

[5.1.2 BL21 18](#_Toc474262127)

[5.2 Miniprep nach Laborprotokoll 18](#_Toc474262128)

[5.3 Miniprep via P1, P2, P3 20](#_Toc474262129)

[5.4 Vergleich der Extraktionseffizienz zwischen kommerziellem Extraktionskit und dem Laborprotokoll via P1, P2, P3 22](#_Toc474262130)

[5.5 SDS-Page der transformierten BL21-Klone 25](#_Toc474262131)

[5.6 Induktionskinetik von Bl21-M1 und BL21-A2 29](#_Toc474262132)

[6 Auswertung 32](#_Toc474262133)

[6.1 Transformation 32](#_Toc474262134)

[6.2 Miniprep nach Laborprotokoll 32](#_Toc474262135)

[6.3 Miniprep via P1, P2, P3 33](#_Toc474262136)

[6.4 Vergleich der Extraktionseffizienz zwischen kommerziellem Extraktionskit und dem Laborprotokoll via P1, P2, P3 33](#_Toc474262137)

[6.5 SDS-Page der transformierten BL21-Zellen 34](#_Toc474262138)

[6.6 Induktionskinetik von Bl21-M1 und BL21-A2 36](#_Toc474262139)

[7 Zusammenfassung 37](#_Toc474262140)

[Literaturverzeichnis 39](#_Toc474262141)

**Tabellenverzeichnis**

[Tabelle 1 Systematik *E.Coli* 8](#_Toc474263523)

[Tabelle 3: Für die Miniprep nach Laborprotokoll verwendete Reagenzien und Puffer 13](#_Toc474263524)

[Tabelle 2: Rezepte der Reagenzien P1, P2 und P3 für die Miniprep 13](#_Toc474263525)

[Tabelle 4: Zusammensetzung des Sammelgels, ergibt 2,5 ml 14](#_Toc474263526)

[Tabelle 5: Zusammensetzung des Trenngels, ergibt 5 ml 14](#_Toc474263527)

[Tabelle 6: Zu erwartende DNA-Banden nach Restriktionsverdau 17](#_Toc474263528)

[Tabelle 7: Stand Belegung des Agarose-Gels 17](#_Toc474263529)

[Tabelle 8: Absorption der mittels Miniprep extrahierten Plasmid-Proben bei 260 nm mit dem jeweiligen, für die Extraktion verwendeten Klon 20](#_Toc474263530)

[Tabelle 9: Absorption der mittels Miniprep via P1, P2, P3 extrahierten DNA-Proben bei 260 nm und 260/280 Verhältnis 21](#_Toc474263531)

[Tabelle 10: Belegung des Agarosegels zur Untersuchung der DNA-Proben der Miniprep via P1, P2, P3; A1-A3 21](#_Toc474263532)

[Tabelle 11: Vergleichende Darstellung der erwarteten und ermittelten Banden der Agarose-Gelelektrophorese, alle Angaben in bP. 22](#_Toc474263533)

[Tabelle 12: Absorptionen der mit dem Roti®-Prep Plasmid MINI Kit und der Miniprep via P1, P2, P3 extrahierten DNA-Proben bei 260 und das 260/280-Verhältnis als Reinheitsparameter. 23](#_Toc474263534)

[Tabelle 13: Taschenbelegung des doppelt belegten Agarosegels zum Restriktionsverdau der via Miniprep (in der Tabelle: „Prep“) und Extraktionskit (in der Tabelle: „Kit“) extrahierten Plasmid-Proben. Extr… Extraktionsmethode; PK… Positivkontrolle 24](#_Toc474263535)

[Tabelle 14: Ermittelte Banden der verdauten DNA-Extrakte und Positivkontrollen der aPDI-transformierten XL1-Zellen 25](#_Toc474263536)

[Tabelle 15: Ermittelte Banden der verdauten DNA-Extrakte und Positivkontrollen der mPDI-transformierten XL1-Zellen 26](#_Toc474263537)

[Tabelle 16: Belegung des Acrylamidgels für die SDS-Page der transformierten und induzierten BL21-Klone 26](#_Toc474263538)

[Tabelle 17: Zusammensetzung des Trenngels mit 10 % Acrylamid 27](#_Toc474263539)

[Tabelle 18: Auftragsschema 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. 28](#_Toc474263540)

[Tabelle 19: Parameter der Induktion zur Untersuchung der Induktionskinetik 30](#_Toc474263541)

[Tabelle 20: Belegung des Polyacrylamidgels zur Untersuchung der Proteinkonzentration in Abhängigkeit von der Induktionsdauer 30](#_Toc474263542)

**Abbildungsverzeichnis**

[Abbildung 1: Schematischer Ablauf einer Klonierung [BLEILE; 2014] 11](#_Toc474263628)

[Abbildung 4: Agarose-Gel der per Miniprep extrahierten und mit Restriktionsenzymen geschnittenen DNA unter UV-Licht 21](#_Toc474263629)

[Abbildung 5: Agarosegel der mit Miniprep via P1, P2, P3 isolierten und mit Restriktionsverdau aufgespaltenen DNA-Proben unter UV-Licht 23](#_Toc474263630)

[Abbildung 6: Agarosegel zum Restriktionsverdau der mittels Miniprep und kommerziellem Extraktionskit isolierten Plasmidproben mit beschrifteten Markerbanden, Belegung nach Tabelle 12 26](#_Toc474263631)

[Abbildung 7: Acrylamidgel der transformierten BL21-Zellen mit Beschriftung der Markerbanden, Coomassie-Färbung mittels Roti® Blue 28](#_Toc474263632)

[Abbildung 8: Aufnahme des Roti-PAGE Precast Gels des vergleichenden Versuchs zwischen kommerziellem Gel und selbstgegossenem Gel, Bandenbeschriftung in kDa 29](#_Toc474263633)

[Abbildung 9: Aufnahme des selbstgegossenen Polyacrylamidgels (10 % Bis-/Acrylmid) des vergleichenden Versuchs zwischen kommerziellem Gel und selbstgegossenem Gel 30](#_Toc474263634)

[Abbildung 10: Acrylamidgel der BL21-Klone A2 und M3 nach Induktionf für 0 h, 1 h, 2 h, 4 h, über Nacht mit Bandenbeschriftung in kDa 32](#_Toc474263635)

# 1 Einleitung

## 0.9 Elektronenanregung

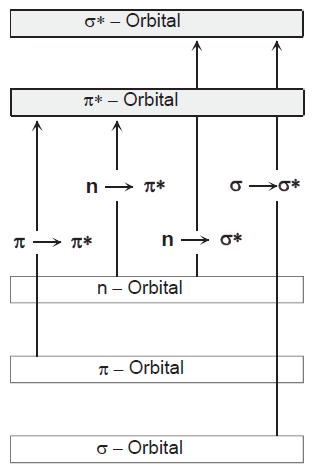


Abbildung : Elektronenübergänge nach Atomorbital

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

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.

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.

## 1.0 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.

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. Je größer die Verschiebung der 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.

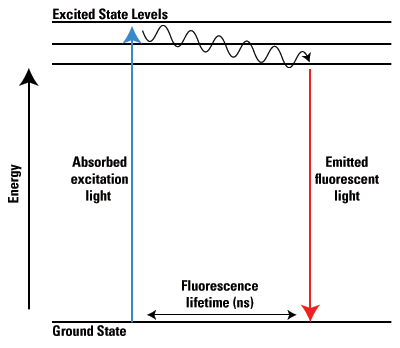


Abbildung : Prinzip der Fluoreszenz als Jablonski-Diagramm

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. ).

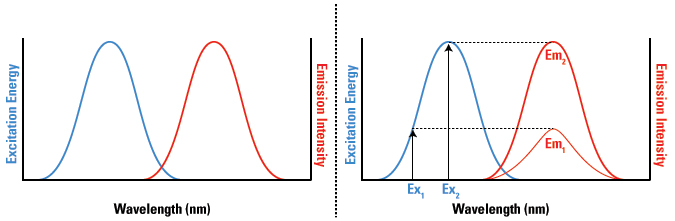


Abbildung : Allgemeines Anregungs- und Emissionspektrum eines Chromophoren (links) und der Zusammenhang zwischen Anregungswellenlänge (Ex1; Ex2) und der resultierenden Emissionsintensität (Em1; Em2) (rechts)

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.

## 1.1 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).

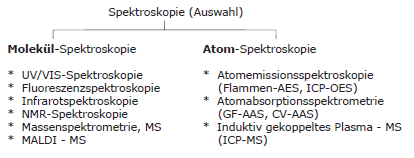


Abbildung : Einteilung typischer spektroskopischer Methoden nach Atom- und Molekülspektroskopie

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.

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.

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.

## 1.2 Fluoreszenzspektroskopie

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.

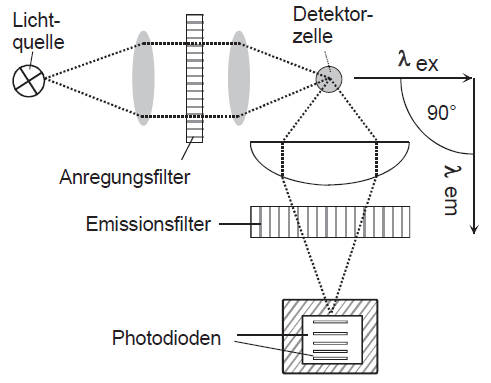


Abbildung 5: Schematische Anordnung eines Fluoreszenzspektrometers

Die Probe befindet sich in diesem Aufbau in einer Mikrodurchflussküvette. Das Probenmaterial 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. Für die Fluoreszenzspektroskopie gibt es verschiedene 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 Apparate sind:

* Fluoreszenz-Mikroskope für die zwei- und dreidimensionale Detektion von lokalisierten Fluorophoren.
* Fluoreszenz-Scanner für die zweidimensionale Detektion von lokalisierten Fluorophoren
* Spektrofluorometer 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.
* Durchflusscytometer zur Untersuchung der Fluoreszenz einzelner Zellen in einer flüssigen Probe.

Mithilfe der Fluoreszenzdetektion können abhängig von der verwendeten Methode und Apparate 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

# **2 Zielstellung**

# 3 Material

## 3.1 Chemikalien

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| Chemikalie | Spezifikation | Hersteller |
|  |  |  |
|  |  |  |
|  |  |  |
|  |  |  |
|  |  |  |
|  |  |  |
|  |  |  |
|  |  |  |
|  |  |  |
|  |  |  |
|  |  |  |

## 3.2 Puffer, Medien und Lösungen

Für die Miniprep nach Laborprotokoll wurden die folgenden Puffer und Reagenzien verwendet:

Tabelle : Für die Miniprep nach Laborprotokoll verwendete Reagenzien und Puffer

|  |  |
| --- | --- |
| Reagenz/Puffer | Zusammensetzung |
|  |  |
|  |  |
|  |  |

Für die Miniprep via P1, P2, P3 wurden die folgenden Reagenzien verwendet:

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

|  |  |
| --- | --- |
| Reagenz | Rezept |
|  |  |
|  |  |
|  |  |

Die Zusammensetzung der für die SDS-Page verwendeten Gele sind in Tabelle 3 und Tabelle 4 aufgeführt:

Tabelle : Zusammensetzung des Sammelgels, ergibt 2,5 ml

|  |  |
| --- | --- |
| Chemikalie/Reagenz | Verwendetes Volumen |
|  |  |
|  |  |
|  |  |
|  |  |
|  |  |
|  |  |

Tabelle : Zusammensetzung des Trenngels, ergibt 5 ml

|  |  |
| --- | --- |
| Chemikalie/Reagenz | Verwendetes Volumen |
|  |  |
|  |  |
|  |  |
|  |  |
|  |  |
|  |  |

## 3.3 Plamide 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 aPDI und pET16b mPDI, ebenfalls bereitgestellt vom Leibniz-Institut für Pflanzengenetik und Kulturpflanzenforschung Gatersleben.

## 3.4 Geräte

|  |  |
| --- | --- |
|  |  |
|  |  |
|  |  |
|  |  |

# 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.: Pathogene Mikroorganismen: Escherichia Coli, Behr´s-Verlag, Hamburg, 2. Auflage, 2014 |
| 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 |