



LUDWIG-  
MAXIMILIANS-  
UNIVERSITÄT  
MÜNCHEN

GENE CENTER MUNICH



DEPARTMENT für BIOCHEMIE  
der  
LUDWIG-MAXIMILIANS-UNIVERSITÄT MÜNCHEN

# Biochemisches Praktikum 2

(Fortgeschrittenenpraktikum)

2018

Prinzipien der  
Proteinreinigung und Charakterisierung

Kurs (19.02. bis 09.03. 2018):

**Dr. Birgitta Beatrix**

Genzentrum der LMU , Feodor-Lynen-Str. 25, 81377 München  
Tel.: (089) 2180-76902; Email: [beatrix@genzentrum.lmu.de](mailto:beatrix@genzentrum.lmu.de)

Kurs 1 : 19.-23.02.18 Thomas Bromberger, Hannah Kratzat, Agnieska Pochopien  
Kurs 2 : 05.-09.03.18 Alina Huth, Sarah Scholze, Ting Su

## Übersicht über die erste Kurswoche

Kursleiter: Dr. Birgitta Beatrix

	<b><u>Versuch</u> :</b> <b>Reinigung eines Ribosomen-assoziierten Proteinkomplexes und Charakterisierung der Ribosomeninteraktion</b>	<b><u>Vorlesung/Seminar</u>:</b>
<b>Mo</b>	Sicherheitsbelehrung Vorbereitung von Lösungen, Puffern, SDS-Gelen Lyse der <i>E. coli</i> Zellen, Zentrifugation	Einführung 10:15 Uhr Ribosomen-assoziierte Proteine Hinweise zur Protokollführung
<b>Di</b>	Ni-NTA Säule SDS-PAGE Gelfiltration, Dot Blot	Hintergrund zum Tagesprogramm
<b>Mi</b>	Heparin-Chromatographie; Anionenaustauscher-Chromatographie; Kationenaustauscher-Chromatographie; SDS-PAGE Einführung in Äkta Start	Hintergrund zum Tagesprogramm
<b>Do</b>	Proteinbestimmung gereinigtes Protein mittels $\epsilon$ SDS-PAGE, Westernblot zum quantitativen Vergleich mit Ribosomen-assoziierte Fraktion von NAC	Hintergrund zum Tagesprogramm
<b>Fr</b>	Entwicklung Westernblot Electrophoretic Mobility Shift Assay (EMSA) (Bandshift Assay) zur Charakterisierung von Protein-Nukleinsäure-Interaktion	Nachbesprechung

In den letzten Jahren hat sich die Sicht auf die Zelle als kleinste Einheit des Lebens und Ort biochemischer Reaktionen grundlegend verändert. Anstatt sie als einen „Sack“ voller Moleküle zu definieren, in dem mehr oder weniger kompartimentiert diffusionskontrollierte Enzyme biochemische Reaktionen katalysieren, kommt man der Realität wahrscheinlich näher, wenn man die Zelle als einen Ort von ineinander greifenden Aktivitätsmodulen auffaßt, die räumlich und zeitlich genau koordiniert werden. Diese Sichtweise erscheint sinnvoll in Anbetracht vieler Hundert transienter oder stabiler Protein- und Protein-RNA-Komplexe, die in den letzten Jahren identifiziert wurden und die für die Katalyse essentieller biochemischer Prozesse der Zelle verantwortlich sind.

Hieraus ergibt sich die Notwendigkeit unsere biochemisch-analytischen Methoden dieser Tatsache anzupassen: wir müssen Proteinkomplexe und nicht einzelne Proteine überexprimieren und reinigen. Wir müssen nicht nur einzelne Proteine charakterisieren, sondern Protein-Protein- und Protein-Nukleinsäure-Interaktionen untersuchen. Im Rahmen dieses fortgeschrittenen Praktikums und insbesondere in dieser Woche wollen wir Ihnen Methoden erläutern und an die Hand geben, die von profundem allgemeinem Nutzen in jedem biochemischen Labor sind, aber insbesondere auch auf die Charakterisierung makromolekularer Komplexe abzielen.

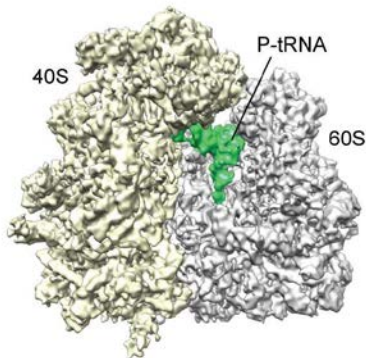
Sie werden lernen wie man einen heterodimeren Proteinkomplex überexprimiert und eine Reinigungsstrategie zur Isolation dieses Heterodimers entwickelt. Anschließend werden Sie testen, ob der gereinigte Komplex aktiv ist. Darüberhinaus werden Sie einfache Methoden lernen, um die Interaktion eines Proteinkomplexes mit einem größeren Komplex zu untersuchen. Dabei werden Sie die Frage beantworten, ob es sich bei dieser Interaktion um eine Protein-Protein- oder um eine Protein-Nukleinsäure-Interaktion handelt.

Als Beispiel wird uns das Ribosom als ein extrem stabiler Protein-RNA-Komplex, sowie ein mit dem Ribosom interagierender heterodimerer Faktor, der *Nascent Polypeptide-associated Complex* (NAC), dienen. Zu dessen Charakterisierung werden Sie die folgenden Methoden einsetzen:

- Zell-Lysis
- SDS-PAGE
- Zentrifugation
- Affinitätschromatographie
- Gelfiltration
- Ionenaustauschchromatographie (Kationen- und Anionentauscher)
- Spezifische Interaktionschromatographie (Heparin)
- Proteinbestimmung mittels Absorptionsmessung (Lambert-Beersches Gesetz)
- Westernblot (semi-quantitativ, verschiedene Färbe- und Detektionsmethoden)
- Bandshift Assay (Electrophoretic mobility shift assay, EMSA)

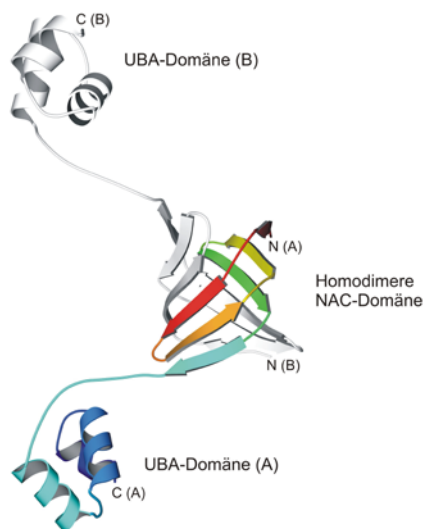
## **Einführung:**

Die Proteinbiosynthese und die sie katalysierenden Ribosomen sind in den letzten Jahren wieder zu einem zentralen Forschungsthema geworden. Was mit der Polypeptidkette geschieht, deren N-terminaler Bereich in der Regel schon die Umgebung des Ribosoms verlässt, während C-terminal die Peptidyltransferase (PTC) des Ribosoms die Kette weiter verlängert, ist in vielen Punkten noch unklar.



Cryo-EM Rekonstruktion eines 80S Ribosoms aus der Hefe *Saccharomyces cerevisiae* bei ca. 6Å.  
Farbcode: 40S Untereinheit gelb, 60S Untereinheit grau, tRNA in der P-site grün.

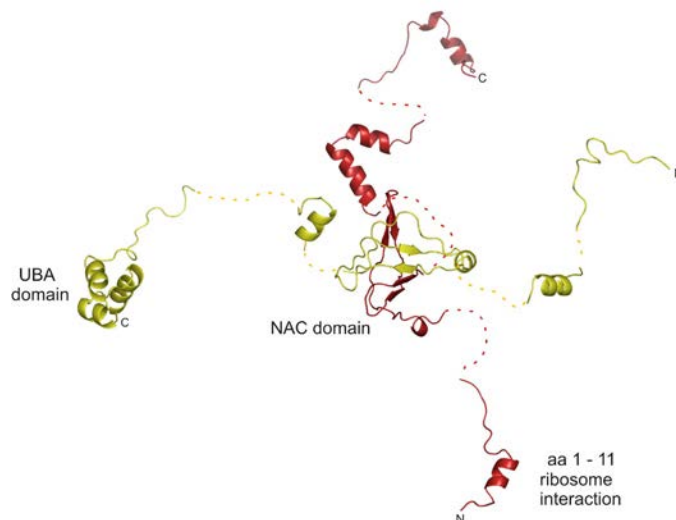
Obwohl es Hinweise darauf gibt, dass die naszierende Kette schon im ribosomalen Exittunnel  $\alpha$ -helikale Sekundärstrukturen ausbilden kann, geht man davon aus, dass die Polypeptidkette das Ribosom weitestgehend ungefaltet verlässt. Letztere muss also nach Verlassen des Ribosoms ihre korrekte Faltung ausbilden und ihre Lokalisation in der Zelle erreichen. Viele Faktoren, die diese Vorgänge beeinflussen interagieren in Eukaryonten bereits während der fortschreitenden Translation, also kotranslational, mit der Polypeptidkette. Da sie an einer Interphase zwischen Ribosom und Zytosol angreifen, sind sie prädestiniert, die Proteinbiosynthese-Maschinerie funktionell mit anderen Vorgängen wie Faltung, Modifikation und Translokation zu verbinden. Unter den Ribosomen-assoziierten eukaryontischen Faktoren wurde bisher der "**Nascent Polypeptide-Associated Complex**" (**NAC**) als frühester Interaktionspartner der wachsenden Polypeptidkette am eukaryontischen Ribosom identifiziert.



NAC ist ein zytosolischer, heterodimerer Proteinkomplex in Eukaryonten, der aus einer  $\alpha$ - und einer  $\beta$ -Untereinheit besteht und im Überschuss zu Ribosomen in der Zelle vorkommt. Beide NAC Untereinheiten zeigen Ähnlichkeiten zueinander, sind wahrscheinlich nach Genduplikation aus einem gemeinsamen Vorläufergen hervorgegangen und sind innerhalb der Eukaryonten hochgradig konserviert. Alle bisher sequenzierten archaebakteriellen Genome weisen ein Homolog zu  $\alpha$ NAC auf, das Homodimere bildet. In Eubakterien gibt es kein zu NAC homologes Protein.

Kristallstruktur des archaebakteriellen NAC ( $\Delta$ 1-18aeNAC) (T. Spreter et al. 2005)

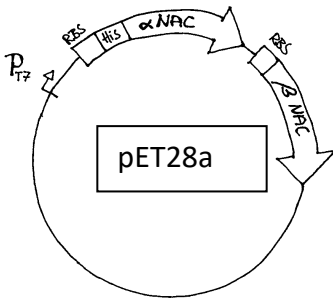
NAC ist wahrscheinlich der erste zytosolische Faktor, der eine naszierende Kette am Ribosom kontaktiert, wodurch möglicherweise unspezifische oder "verfrühte" Interaktionen der Polypeptidkette mit anderen Faktoren verhindert werden können. Obwohl NAC bereits 1994 entdeckt wurde ist seine Funktion am Ribosom noch nicht gut verstanden. NAC scheint die Interaktion von SRP mit dem translatierenden Ribosom und dem Translokon zu modellieren. Während der laufenden Untersuchungen wurde ein Expressionssystem für NAC aus der Bäckerhefe *Saccharomyces cerevisiae* in *Escherichia coli* entwickelt. Hierfür wurde ein künstliches NAC Operon in einem *E. coli* Expressionsvektor konstruiert, von dem die Gene für beide Untereinheiten expremiert werden. Da von diesem Plasmid die beiden Untereinheiten ( $\alpha$ NAC; 18,7 kDa und  $\beta$ NAC; 17 kDa) in verschiedenen Mengen expremiert werden, sollen Sie im Rahmen der ersten Praktikumswoche die beiden verschiedenen NAC-Populationen ( $\alpha\beta$  Heterodimer und  $\alpha\alpha$  Homodimer) mithilfe unterschiedlicher Chromatographie-Methoden voneinander trennen und funktionell charakterisieren.



Kristallstruktur des heterodimeren humanen NAC ( $\alpha$ NAC in gelb und  $\beta$ NAC in rot dargestellt) (B.Beatrix, unpublished).

## 1. Tag: Pufferzubereitung, Zellaufschluß, Zentrifugation

An jede Gruppe wird ein resuspendiertes Zellpellet ausgegeben, das von einer induzierten 1Liter-*E. coli*-Kultur stammt. Diese Zellen enthalten ein Plasmid, das ein künstliches Hefe NAC Operon trägt. Von diesem Plasmid werden beide NAC Untereinheiten gleichzeitig, aber in sehr unterschiedlichen Mengen exprimiert.



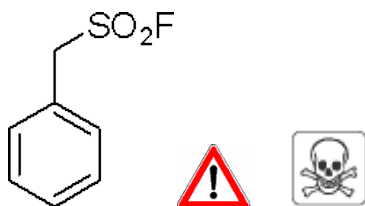
Die alpha-Untereinheit trägt zusätzlich einen His-tag am N-Terminus, der für den ersten Reinigungsschritt benutzt wird. Da *E. coli* Zellen im Gegensatz zu Pflanzen- oder Pilzzellen keine sehr rigide Zellwand besitzen können die Zellen durch Inkubation mit einem Detergenz (Triton X-100) aufgeschlossen werden. Unterstützt wird dieser Vorgang durch eine gleichzeitige Behandlung mit Lysozym. Lysozym kommt unter anderem in der menschlichen Tränenflüssigkeit und im Hühnereiweiß vor. Es spaltet die  $\beta(1-4)$  glykosidische Bindung zwischen N-Acetylglucosamin und N-Acetylmuraminsäure in der Peptidogucanschicht von Bakterien. Da durch den Zellaufschluß auch viele Proteasen v.a. aus dem Periplasma freigesetzt werden, wird dieser Schritt in Gegenwart eines potenten Proteaseinhibitors (PMSF, Phenylmethylsulfonylfluorid, **Vorsicht ! toxisch**) durchgeführt. Nach dem Zellaufschluß werden noch intakte Zellen und Zelltrümmer durch Zentrifugation abgetrennt.

### Versuchsdurchführung:

50 ml Falcon-Tubes  
Eppendorf 5810R Zentrifuge, F-34-6-38 Rotor, Teflon Adapter,  
Kunststoff-Zentrifugenröhrchen mit Deckel  
1M TRIS-HCl pH 8.0  
5M NaCl  
Imidazol (Feststoff)  
15% SDS-Gel, 1 x 15er Kamm und 1 x 10er Kamm

<i>E. coli</i> Zellen:	von einer induzierten 1 Liter Kultur (10-12 ml in Resuspensionspuffer)
PMSF-Stammlösung ( <b>toxisch</b> ):	100 mM in EtOH (Mw: 174.19)
Resuspensionspuffer ( $T^{50}Na^{500}$ ):	50 mM Tris-HCl pH8.0; 500 mM NaCl ( <b>50 ml pro Gruppe ansetzen</b> )
Detergenz:	10% Triton X-100

Lysozym: 50 mg/ml (egg white, 50 KU/mg Sigma)  
 Protease inhibitor: PMSF (Stock 100 mM in EtOH, sehr giftig)  
 SimplyBlue-Färber:



Sicherheitshinweis: **Phenylmethylsulfonyl fluoride** ist toxisch. Es ist ein sehr potenter Serin-Proteaseinhibitor (z. B. Trypsin, Chymotrypsin, Thrombin; inhibiert auch einige Cystein-Proteasen wie z.B. Papain). PMSF ist besonders giftig, weil es auch die Acetylcholinesterase (hydrolysiert Neurotransmitter) in Säugern hemmt. In wässriger Lösung bei pH 7.5 zerfällt PMSF jedoch innerhalb einer Stunde. Beim Umgang mit PMSF sollten immer **Kittel, Schutzbrille** und **Handschuhe** getragen werden. Sollte es trotzdem zu einem Hautkontakt kommen, ist die Stelle gründlich mit viel fließendem Wasser abzuspülen und der Assistent zu verständigen.

1. Zellen von 1 Liter induzierter Kultur werden in 10 -12 ml Aufschlußpuffer ausgeteilt. Tauen sie die Zellen in einem Becherglas mit kaltem Leitungswasser auf und geben sie folgende Komponenten zu: 200 µl Lysozym, 2 ml 10% Triton X-100, 20 µl PMSF und füllen sie mit T<sup>50</sup>Na<sup>500</sup> auf 20 ml auf.
2. Um die, durch die Freisetzung der DNA-Moleküle hervorgerufene, hohe Viskosität der Probe zu verringern, werden 20 µl DNaseI (10 mg/ml) zugegeben. (Bei zu hoher Viskosität evtl. wiederholen).
3. Die resuspendierten Zellen werden 30 min bei Raumtemperatur (RT) unter mehrmaligem Umschwenken inkubiert (Laborwecker). Danach sollte die Suspension weniger milchig und eher „durchsichtig“ (opak) erscheinen. Falls dies noch nicht der Fall ist, muß die Inkubation verlängert werden. **Probe danach sofort auf Eis stellen**, da durch die Membransolubilisierung Proteasen aus dem Periplasma freigesetzt wurden. **Immer zwei Gruppen tarieren ihre Zentrifugenröhrchen mit T<sup>50</sup>Na<sup>500</sup> gegeneinander aus.**

#### Probe nehmen: P1 = Totale Probe

(5 µl + 20 µl T<sup>50</sup>Na<sup>500</sup> + 25 µl 2 x SDS-SB, 5 min 95 °C, 10 µl pro Spur laden)

4. Zelltrümmer werden durch Zentrifugation bei 15.500 g (11.000 rpm im F-34-6-38 Rotor, +4°C) für 20 min entfernt und der Überstand in ein neues Falcon-Tube dekantiert.

5.

(Volumen = ml; Beschriftung Datum Gruppennummer).

**Probe nehmen: P2 = F-34 Überstand**

(5 µl + 20 µl T<sup>50</sup>Na<sup>500</sup> + 25 µl 2 x SDS-SB, 5 min 95 °C, 10 µl pro Spur laden)

6. Zu dem Überstand von Punkt 5 wird nun noch einmal Proteaseinhibitor (20 µl PMSF) hinzugegeben. Der Überstand wird dann in flüßigem Stickstoff (**Schutzbrille !!**) schockgefroren und über Nacht bei -20°C gelagert.

**2. Tag: Ni-NTA Reinigung, SDS-PAGE, Entsalzung**

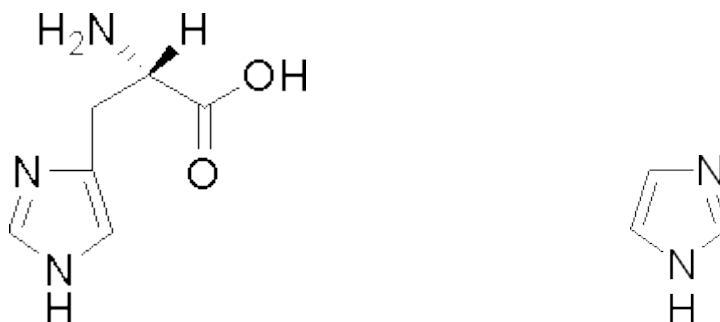
Ni-NTA Agarose

Poly-Prep Chromatographiesäulen, groß (Biorad)

Stativständer, Muffe, Klemme

T<sup>50</sup>Na<sup>500</sup>: 50 mM TRIS-HCl pH 8.0, 500 mM NaCl  
(von gestern)

T<sup>50</sup>Na<sup>500</sup>I<sup>500</sup>: 50 mM TRIS-HCl pH 8.0; 500 mM NaCl; 500 mM Imidazol (als Feststoff erst direkt vor Benutzung zugeben > Chemikalienregal)





Die  $\alpha$ -Untereinheit des exprimierten Proteinkomplexes trägt einen zusätzlichen His<sub>6</sub>-tag am N-Terminus. Dieser His-tag wird benutzt um den rekombinanten Proteinkomplex aus dem Gemisch von zelleigenen *E. coli* Proteinen zu isolieren. Hierbei spielt der pH-Wert des Puffers eine wichtige Rolle ( $pK_s$  für His bei 6.0).

1. Hierfür werden **1.5 ml aufgeschlammte** Ni-NTA-Agarose (Qiagen) in ein 50 ml Falcon Tube überführt (blaue Pipettenspitze abschneiden). 5 ml ddH<sub>2</sub>O zugeben. Beads bei 500 rpm im Swing-out Rotor für 3 min abzentrifugieren. Überstand abdekantieren. Waschschrift mit 5 ml ddH<sub>2</sub>O einmal wiederholen. Einen dritten Waschschrift mit 5 ml Resuspensionspuffer (von gestern) durchführen. Überstand wiederum abdekantieren. Währenddessen tauen sie den Überstand von gestern in einem Becherglas mit kaltem Leitungswasser auf und **lagern ihn anschließend sofort auf Eis.**
2. Zu den so äquilibrierten Beads den augetauten Extrakt (Überstand von gestern) zugeben und das beschriftete Falcon Tube auf einem Roller oder Drehrad für 30 min bei Raumtemperatur (RT) inkubieren.
3. Den Inhalt des Falcon Tubes anschliessend in eine Poly-Prep Chromatographiesäule (Biorad) überführen und den Flow-Through in einem sauberen 50 ml Falcon Tube auf Eis auffangen.
4. **Alle Protein-haltigen Proben, die nicht mit Sample Buffer (SB) versetzt sind, sollten immer auf Eis aufbewahrt werden.** (Proben, die bereits mit SB versetzt sind, sollten nicht mehr auf Eis aufbewahrt werden, da ansonsten das SDS ausfällt und mit ihm das Protein!).

#### **Probe nehmen: P3 = Ni-NTA Durchlauf**

(5  $\mu$ l + 20  $\mu$ l T<sup>50</sup>Na<sup>500</sup> + 25  $\mu$ l 2 x SDS-SB, 5 min 95 °C, 10  $\mu$ l pro Spur laden)

5. Die Säule wird mit 3 x 5 ml T<sup>50</sup>Na<sup>500</sup> gewaschen. Diese Waschschrift werden einzeln auf Eis aufgefangen.

#### **Probe P4 – P6 = Waschschrift 1 – 3**

(jeweils 10  $\mu$ l der Waschfraktion + 10  $\mu$ l 2 x SDS-SB, 5 min 95 °C, 10  $\mu$ l pro Spur laden).

6. Das Protein wird wie folgt mit Elutionspuffer von der Säule eluiert und in getrennten Fraktionen aufgefangen. Zunächst werden 200  $\mu$ l Elutionspuffer (T<sup>50</sup>Na<sup>500</sup>I<sup>500</sup>) aufgetragen und direkt aufgefangen (Fraktion E1). Dann wird die Säule am unteren Ende verschlossen (gelbe Kappe). 1ml Elutionspuffer wird aufgetragen und 5 min bei RT inkubiert. Anschliessend wird die Säule am unteren Ende wieder geöffnet und die Fraktion E2 aufgefangen. Alle Fraktionen

werden **sofort auf Eis aufbewahrt**. Danach werden wieder 500µl Elutionspuffer auf die Säule gegeben und direkt aufgefangen. Die Säule wird noch 2 x mit 500 µl Elutionspuffer beladen, die als E4 und E5 aufgefangen werden.

E1:200 µl; E2: 1000 µl, E3: 500 µl; E4: 500 µl, E5: 500 µl

### **Probe P7-P11 = Elutionsfraktionen E1 – E5**

(jeweils 10 µl jeder Fraktion + 10 µl 2 x SDS-SB, 5 min 95 °C, 10 µl pro Spur laden).

Nachdem alle Proben gesammelt sind, werden sie zusammen mit einem Proteinmarker auf einem 15%igen SDS-PAGE (10 Taschen) aufgetrennt (160 V ca. 1 h, bis der blaue Farbstoff den unteren Gelrand erreicht hat). Zusätzlich teilen die Assistenten eine Probe „vor Induktion“ aus. Sie haben somit nicht genügend Spuren für alle Proben. Diskutieren Sie in der Gruppe welche Proben wichtig und welche weniger wichtig für die Auswertung sind.

Das Gel wird mit Simply blue® gefärbt.

### **SimplyBlue™ Färbung:**

1. Entnehmen sie das SDS-Gel aus der Elektrophorese Apparatur und überführen sie es in eine Färbebox, die ca. 100 ml millipore H<sub>2</sub>O enthält. Erhitzen sie das Gel für 1 min in der Mikrowelle (bis H<sub>2</sub>O fast kocht). Dieser Schritt dient der Entfernung des SDS aus dem Gel.
2. Gießen Sie das H<sub>2</sub>O in den Abguss und überschichten Sie das Gel erneut mit ca. 100 ml millipore H<sub>2</sub>O, erhitzen wie unter 1. und werfen das H<sub>2</sub>O wieder.
3. Geben Sie nun in die Färbebox SimplyBlue™. Eine Pumpbewegung ergibt die benötigte Menge. Erhitzen sie das Gel erneut für 1 min in der Mikrowelle und inkubieren Sie das Gel danach für ca. 15 min bei RT auf dem Schüttler.
4. **Sammeln Sie das benutzte Simplyblue™ in der Flasche „SimplyBlue 1 x used“.**
5. Überschichten Sie das Gel erneut mit ca. 50 ml millipore H<sub>2</sub>O, erhitzen Sie für 1 min in der Mikrowelle und stellen Sie das Gel anschliessend bis zur gewünschten Entfärbung auf den Schüttler.
6. Überschichten Sie das Gel erneut mit 50 ml H<sub>2</sub>O und entfärben Sie bis zum nächsten Morgen. Dadurch wird der Kontrast erhöht. Das Gel kann nun fotografiert werden.

### **Auswertung:**

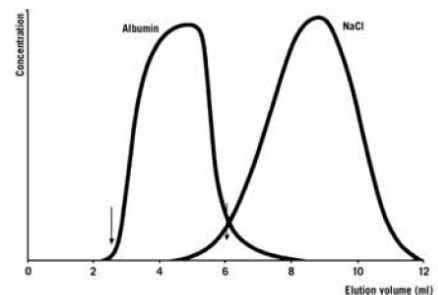
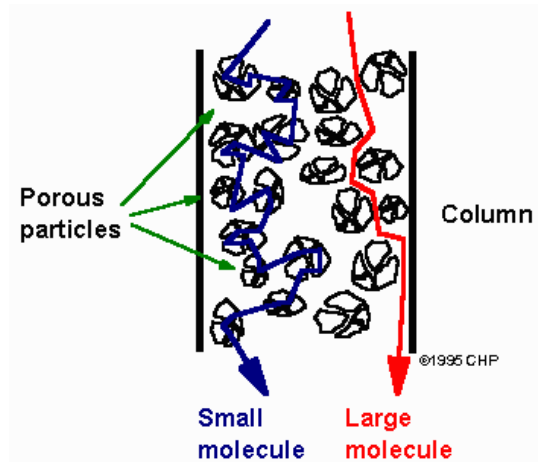
- Kann man beide UE von NAC bereits im Zellextrakt sehen ?
- Welche apparenten molekularen Massen (was ist das ?) weisen die beiden Untereinheiten ungefähr auf?

- Werden die beiden UE im gleichen Mengenverhältniss exprimiert ?
- Werden beide UE über die Ni-NTA Agarose angereichert und was kann man daraus schließen ?

### Entsalzung der Proteinprobe mit PD10-Säulen

Am dritten Tag soll das von der Ni-NTA Säule eluierte Protein mittels verschiedener Trennprinzipien (Heparin-Säule, Ionenaustauscher-Säule) weiter aufgereinigt werden. Für eine erfolgreiche Bindung des Proteins an diese Trennmaterialien ist es essentiell, dass die zu ladende Proteinprobe in einem Puffer mit niedrigem Salzgehalt vorliegt (warum?). Da ihr Elutionspuffer 500 mM NaCl und 500 mM Imidazol enthielt, muss er gegen einen für die folgenden Trennverfahren besser geeigneten Puffer ausgetauscht werden. Hierfür machen wir uns das Trennprinzip der Gelfiltration zu nutze.

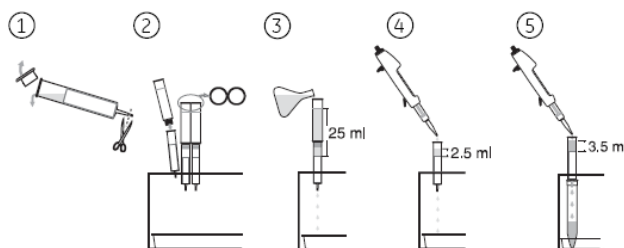
Gelfiltrationssäulen (in diesem Fall Sephadex G25) bestehen aus einer porösen Matrix, die wiederum aus sphärischen Partikeln aufgebaut ist. Wenn ein Molekülgemisch auf eine solche Säule aufgetragen wird, diffundieren kleine Moleküle in die Poren hinein, während große Moleküle zu groß für diese Poren sind und daher einen kürzeren Weg durch die Säule nehmen. Große Moleküle eluieren also früher von der Säule. Mit PD10-Säulen kann man in kurzer Zeit Moleküle mit einem  $M_r > 5000$  von Molekülen mit einem  $M_r < 1000$  abtrennen.



### Durchführung:

PD10 Säulen (GE Healthcare)

PD10 Puffer: 50 mM TRIS pH 7.5, 50 mM NaCl (50 ml pro Gruppe)



1. Unteres Ende einer PD10 Säule mit einer Schere abschneiden, obere Kappe abnehmen und Puffer ausgiessen
2. Säule 3 x mit 4 ml PD10 Puffer äquilibrieren (Durchfluss verwerfen).
3. Die Fraktionen, die exprimiertes Protein enthalten (Beurteilung anhand des Coomassie-gefärbten SDS-PAGE) werden vereinigt („gepoolt“) und auf ein totales Volumen von 2.5 ml mit PD10 Puffer aufgefüllt. **Probe nehmen „PD10 Load“ 5 µl für Dotblot.**
4. Säule in 15 ml Falcon-Röhrchen stellen. Probe (2.5 ml) auftragen. Durchfluss auffangen und **Probe nehmen „PD10\_DF“ 5 µl für Dotblot .**
5. Säule in frisches 15 ml Falcon-Röhrchen stellen und mit 3.5 ml PD10 Puffer eluieren. **Probe nehmen „PD10\_Eluat“ 5 µl für Dotblot. Eine Weitere Probe nehmen für das SDS Gel morgen „PD10\_Eluate“ 25 µl + 25 µl 2 x SDS-SB, 5 min 95°C dann einfrieren.** Diese Probe ist für die SDS-Gele morgen („Load“).
6. Eluat in dreimal 1 ml und 1 x 500 µl in **safe lock epis** portionieren. **Probe beschriften (!)** in flüssigem N<sub>2</sub> (**Abzug, Schutzbrille**) für morgen Vormittag einfrieren und bei -20°C lagern.

### Dotblot:

Ein Dotblot ist eine schnelle Methode semiquantitativ Protein in einer Lösung nachzuweisen und hier z.B. zu überprüfen, ob von der Entsalzungssäule unter den gewählten Bedingungen auch wirklich wieder Protein eluiert wurde.

Kleines Stück Nitrozellulosemembran ( ca. 4 x 2 cm)

Amido Black Färbelösung

Entfärbelösung (siehe Anhang)

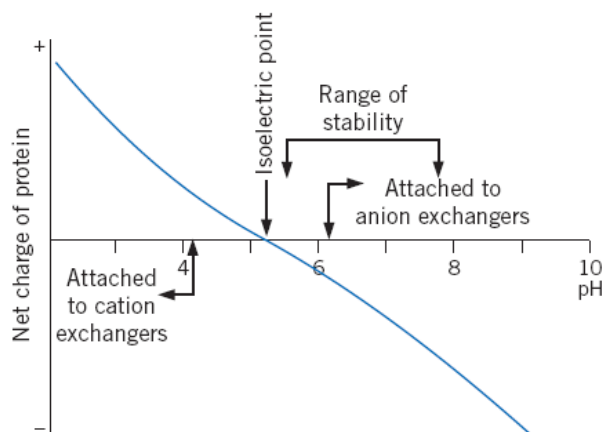
1. Markieren sie drei Kreise auf der Nitrozellulosemembran (ca. 1 cm Durchmesser) mit Kugelschreiber und nummerieren sie die Kreise.
2. Pipettieren sie jeweils 1 µl der drei PD10 Proben Load, DF und Eluat in einen der Kreise. Lassen sie die Probe trocknen.
3. Färben Sie die Nitrozellulose 1 min mit Amidoblack-Färber. Geben sie die Färbelösung in die Flasche zurück.
4. Entfärben sie die Membran. Entfärber in den „Halogenfreien Abfall“ Kanister entsorgen.

### Auswertung:

- Wo färben sie Protein an ? Enthält der Durchfluss Protein ?
- Haben sie Protein verloren (Verdünnung ?) ?

### 3. Tag: Heparin- / Anionenaustauscher- / Kationenaustauscher-Säule

Von den Anfängen der Biochemie an sind Methoden entwickelt worden um biologisch aktive Proteine zu isolieren. Viele der ursprünglichen Trennprinzipien unterliegen auch den heute noch verwendeten Techniken. Sie sollen heute untersuchen welches der drei angebotenen verschiedenen Chromatographie-Trennverfahren sich am besten eignet um das  $\alpha$  NAC-Homodimer vom  $\alpha\beta$  NAC-Heterodimer abzutrennen. Sie werden hierfür eine Anionenaustauscher- (Q-Sepharose), eine Kationenaustauscher- (SP-Sepharose) und eine Heparinsäule benutzen. Anionenaustauschermaterialien weisen positiv-geladene Seitengruppen auf und binden daher Proteine, die bei den pH-Bedingungen des Laufes eine negative Nettoladung aufweisen, wohin gegen Kationenaustauschermaterialien negative Seitenketten aufweisen, an die Proteine mit positiver Nettoladung binden. In beiden Fällen wird das Protein durch Salz ( $\text{Na}^+$  bzw.  $\text{Cl}^-$ ) vom Säulenmaterial wieder abgetrennt. Bei welcher Salzkonzentration dies geschieht ist abhängig von der Anzahl von positiven bzw. negativen Ladungen, die bei dem verwendeten pH-Wert am Protein zugänglich sind. Für Moleküle wie DNA z.B., die nur negativ geladene Gruppen aufweisen, ist ein Anionenaustauscher daher das Material

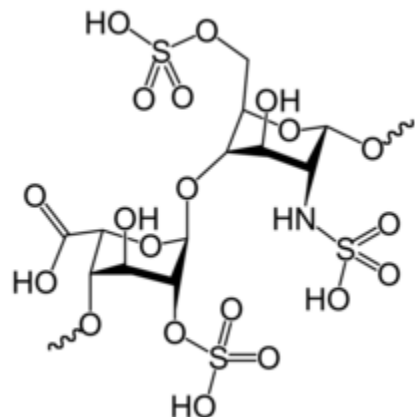


der Wahl. Die Nettoladung von Proteinen dagegen hängt vom verwendeten pH Wert ab.

Zum Beispiel zeigt die Abbildung ein theoretisches Protein, das eine positive Ladung unterhalb seines isoelektrischen Punktes aufweist. Es könnte also an einen Kationenaustauscher binden. Bei einem pH-Wert oberhalb seines isoelektrischen Punktes hat das Protein eine negative Ladung und

kann an einen Anionenaustauscher binden. Unglücklicherweise ist das Protein aber nur in einem pH-Bereich von 5 – 8 stabil. Daher muss in diesem Fall ein Anionenaustauscher verwendet werden.

Heparin dagegen besteht aus alternierenden Folgen von D-Glucuronsäure und D-Glucosamin und ist stark sulfatiert – trägt also viele negative Ladungen. Es bindet vor allem DNA- und RNA-bindende Proteine, kann aber auch als Affinitätsligand für Coagulationsfaktoren fungieren. Auch im Falle von Heparin wird die Interaktion mit Proteinen durch Erhöhung der



Ionenstärke im Puffer abgeschwächt und das Protein kann somit wieder von der Säule abgelöst werden.

Im heutigen Versuch werden Sie je ein Aliquot (1 ml) der am vorigen Tag angereicherten Proteine an eines der Säulenmaterialien binden und mit einem Salzstufengradienten die Proteine eluieren. **Die Kationenaustauscher-Chromatographie wird dabei an einer „Äkta Start“ Anlage durchgeführt (siehe separate Anleitung am Gerät).** Die übrigen 500 µl DP10 Eluate von gestern werden von den Betreuern eingesammelt.

### Durchführung Säulenchromatographie:

2 x Poly-Prep Chromatographiesäulen, klein (Biorad)

Epi-Schwimmer, Alufolie

Heparin- Sepharose, Q-Sepharose (Anionenaustauscher) Säulenmaterial

1M TRIS-HCl, pH7.5

5M NaCl

3 x 15% SDS-Gel mit **15er Kämmen** (eins von Tag 1)

1 x Elektrophoresepuffer (siehe Anhang)

Mischen Sie aus den beiden ausgegebenen Lösungen die Puffer P<sup>50</sup> bis P<sup>500</sup> zusammen. Dabei sollen alle Puffer 50 mM Tris pH7.5 und jeweils 50 mM (P<sup>50</sup>) bis 500 mM (P<sup>500</sup>) NaCl enthalten. Kühlen sie die Puffer auf Eis.

Puffer	Benötigtes Volumen pro Gruppe	1 M Tris pH 7.5	5 M NaCl	H <sub>2</sub> O
P <sup>50</sup>	50 ml (von gestern)	-	-	-
P <sup>100</sup>	10 ml	µl	µl	µl
P <sup>150</sup>	10 ml	µl	µl	µl
P <sup>200</sup>	10 ml	µl	µl	µl
P <sup>250</sup>	10 ml	µl	µl	µl
P <sup>300</sup>	10 ml	µl	µl	µl
P <sup>350</sup>	10 ml	µl	µl	µl
P <sup>400</sup>	10 ml	µl	µl	µl
P <sup>450</sup>	10 ml	µl	µl	µl
P <sup>500</sup>	10 ml	µl	µl	µl

**Jede Gruppe führt zwei Säulenchromatographien durch. Der dritte automatisierte Lauf wird von jeder Gruppe im Laufe des Tages an der „Äkta Start“ Anlage durchgeführt (siehe ausgehängter Zeitplan).**

1. Schneiden Sie die Spitze von einer blauen Pipettenspitze ab.
2. Durchmischen Sie das ausgegebene Säulenmaterial mit der darüberstehenden Flüssigkeit durch Schwenken. Entfernen Sie den unteren Verschluss von einer Biorad Biospin Chromatography Säule durch mehrmaliges hin- und herknicken. Plastikränder, die am Rand überstehen sollten mit einer Schere entfernt werden. Überführen Sie jeweils 600 µl des aufgeschwämmten Materials in eine Leersäule.
3. Waschen Sie die Säule mit 2 ml H<sub>2</sub>O
4. Äquilibrieren Sie die Säule mit 3 ml P<sup>50</sup> (verwerfen)
5. Bereiten sie beschriftete Epis zum Auffangen der Fraktionen vor. Arrangieren sie ihre Epis in einem Schaumstoffschwimmer (Schublade) auf Eis.

(Gruppennummer nicht vergessen)

H\_DF, H\_W1, H\_W2, H\_E<sup>100</sup>, H\_E<sup>150</sup>, etc.

Q\_DF, Q\_W1, Q\_W2, Q\_E<sup>100</sup>, Q\_E<sup>150</sup>, etc.

SP\_Fr1, SP\_Fr2, .....SP\_Fr25. (für Äkta Start Lauf)

6. Setzen Sie die Säule in ein frisches Epi (auf Eis) und tragen sie 1 ml des PD10 Eluates von gestern auf. Eine Manschette aus Alufolie eignet sich gut um die Säule senkrecht über/in dem Epi zu fixieren. Fangen Sie den **Durchlauf auf und beschriften Sie ihn (!!!)**, auf Eis lagern.
7. Danach werden die Säulen wie folgt eluiert:

Säule	Heparin	Q-Sepharose	SP-Sepharose
1. Wasch	1 ml P <sup>50</sup>	1 ml P <sup>50</sup>	1 ml P <sup>50</sup>
2. Wasch	1 ml P <sup>50</sup>	1 ml P <sup>50</sup>	1 ml P <sup>50</sup>
1. Elution	0.5 ml P <sup>100</sup>	0.5 ml P <sup>100</sup>	1 ml P <sup>100</sup>
2. Elution	0.5 ml P <sup>150</sup>	0.5 ml P <sup>150</sup>	1 ml P <sup>150</sup>
3. Elution	0.5 ml P <sup>200</sup>	0.5 ml P <sup>200</sup>	0.5 ml P <sup>200</sup>
4. Elution	0.5 ml P <sup>250</sup>	0.5 ml P <sup>250</sup>	0.5 ml P <sup>250</sup>
5. Elution	0.5 ml P <sup>300</sup>	0.5 ml P <sup>300</sup>	0.5 ml P <sup>300</sup>
6. Elution	0.5 ml P <sup>350</sup>	0.5 ml P <sup>350</sup>	0.5 ml P <sup>350</sup>
7. Elution	0.5 ml P <sup>400</sup>	0.5 ml P <sup>400</sup>	0.5 ml P <sup>400</sup>
8. Elution	0.5 ml P <sup>450</sup>	0.5 ml P <sup>450</sup>	0.5 ml P <sup>450</sup>
9. Elution	0.5 ml P <sup>500</sup>	0.5 ml P <sup>500</sup>	0.5 ml P <sup>500</sup>

Die Puffer bitte aufbewahren für die Proteinbestimmung.

Von jeder Fraktion (inklusive Durchlauf) werden jeweils 20 µl mit 20 µl 2 x SDS-SB gemischt und 5 min bei 95°C aufgekocht. Die Proben werden nach dem Aufkochen bis zum Laden des SDS-Gels bei Raumtemperatur aufbewahrt. Zusammen mit der Probe „PD10\_Eluate“ von gestern (dies entspricht ihrem „Load“) werden jeweils 10 µl pro Spur auf ein 15%iges SDS-Gel (15 Taschen) aufgetragen. In eine Spur laden sie einen Proteinstandard (7 µl). Das Gel läuft bei 160 V ca. 1 h, bis der blaue Farbstoff am unteren Gelrand angelangt ist. Gel mit Coomassie färben. Die gesammelten Fraktionen der Säulenchromatographie werden eingefroren (liq. N<sub>2</sub>) und über Nacht bei -20°C gelagert.

### **Auswertung:**

Beschreiben sie wie sich das Homo- und das Heterodimer auf den drei Säulenmaterialien verhalten und leiten Sie aus den Ergebnissen einen Vorschlag für die Isolation des Heterodimers ab.

### **Vorbereitung für morgen:**

**Der NAC Komplex weist eine molekulare Masse von 36 kDa auf. Berechnen Sie wie viel µg NAC 12 pmol entsprechen.**

**Vorausgesetzt Ihre Proteinfraction hat eine Proteinkonzentration von 0,5 mg/ml – berechnen Sie welches Volumen Sie laden müssten um 12 pmol NAC in eine Spur eines SDS-Gels aufzutragen (ist eine Verdünnung der Probe sinnvoll ?). Berechnen Sie wie sie die anderen Mengen (6, 3, 1.2 pmol) sinnvoll auftragen können. Vergessen Sie den Probenpuffer dabei nicht.**



**4. Tag: Proteinbestimmung / Ribosomen-assoziaton von NAC**

Aus den gestern gewonnenen Proteinfractionen wird eine mit dem NAC Homodimer und eine mit dem NAC Heterodimer ausgesucht, von der sie auf Grund der Färbungsintensität im Gel annehmen, dass sie ungefähr die gleiche Konzentration haben. Sie werden für die weiteren Versuche verwendet. Um die beiden Fractionen vergleichen zu können, und weil Sie das Heterodimer im nachfolgenden Experiment (semiquantitativer Westernblot) als internen Standard verwenden wollen, muss die Proteinkonzentration des Heterodimers bestimmt werden. Dieses sollen Sie mit Hilfe des molaren Extintionskoeffizienten  $\epsilon$  tun.

Der Molare Extintionskoeffizient für das  $\alpha\beta$  Heterodimer beträgt:  $\epsilon_{280} = 4470 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$   
Der Molare Extintionskoeffizient für das  $\alpha\alpha$  Homodimer beträgt:  $\epsilon_{280} = 5960 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$

Welches Gesetz müssen sie zur Anwendung bringen, um mittels  $\epsilon$  die Konzentration ihrer Probe zu berechnen ?

Messen sie in einer reduzierten **UV Küvette** die Absorption der von Ihnen ausgewählten Proteinfraction am Biophotometer bei 280 nm. Benutzen Sie den entsprechenden Puffer mit der gleichen Salzkonzentration von der Reinigung als Blindwert. Sie benötigen ca. 100  $\mu\text{l}$  Probenvolumen in der Küvette, damit der Messstrahl sicher durch Ihre Probe geht. Nach der Messung können sie die Probe wieder in das Epi zurückführen.

In Ihr Protokoll gehören die **Originalmessdaten und alle Berechnungen** ihrer Werte (nachvollziehbar). Achten Sie auch auf korrekte Einheiten !! **Berechnen Sie die Proteinkonzentration in  $\mu\text{M}$  und in  $\text{mg/ml}$ .**

Berechnen Sie wie sie die angestrebten Mengen (12, 6, 3, 1.2 pmol) sinnvoll auf ihr SDS Gel auftragen können. Vergessen Sie den Probenpuffer dabei nicht.

## Ribosomenassoziation von NAC

NAC ist ein heterodimerer Komplex, der transient mit dem Ribosom interagiert um die naszierende Polypeptidkette zu kontaktieren. Um die Art der Interaktion zwischen NAC und dem Ribosom zu charakterisieren, erhalten sie Ribosomen, die entweder unter Hochsalz (500 mM K<sup>+</sup>) oder unter physiologischen Salzbedingungen (100 mM K<sup>+</sup>) aus

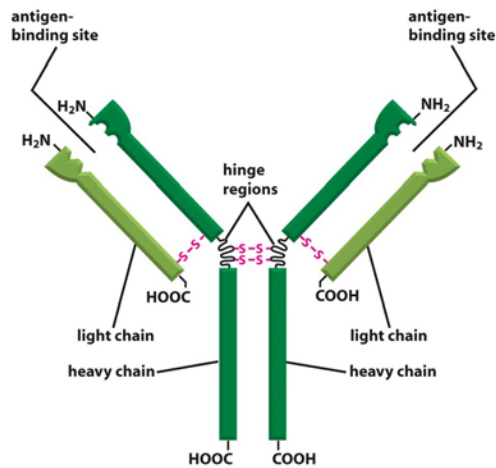
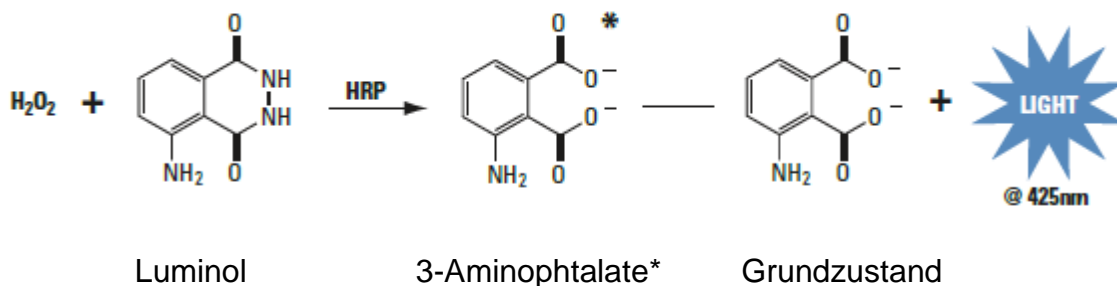


Figure 25-21 Molecular Biology of the Cell 5/e (© Garland Science 2008)

Hefelysate durch Gradientenzentrifugation isoliert wurden. Beide Ribosomenpellets wurden anschließend in Puffer mit physiologischer Salzkonzentration resuspendiert. Sie sollen NAC in den verschiedenen Ribosomenpräparationen mit Hilfe eines spezifischen Peptidantikörpers gegen  $\beta$ NAC durch Westernblot detektieren. Mit Hilfe ihrer quantifizierten NAC-Präparation kann durch entsprechende Referenzmengen im Gel/Westernblot eine Abschätzung der Ribosomen-gebundenen NAC Menge vorgenommen werden.

Zum Nachweis von  $\beta$ NAC wird ein chemilumineszentes Substrat (**Luminol**) verwendet. Als **Chemilumineszenz** bezeichnet man den Vorgang, wenn Energie in Form von elektromagnetischer Strahlung im Bereich des ultravioletten oder sichtbaren Lichts von einer Substanz aufgrund einer chemischen Reaktion abgegeben wird.

In unserem Fall trägt der zweite Antikörper eine Peroxidase aus Meerrettich am F<sub>c</sub> Teil gekoppelt. In Gegenwart dieser Peroxidase und H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> wird Luminol zu einem Produkt im angeregten Zustand (3-Aminophtalate) oxidiert. Bei der Überführung von 3-Aminophtalate in den Grundzustand wird Licht emittiert.



Dieses „Licht“-Signal kann entweder mit Hilfe eines Röntgenfilms und dessen Entwicklung oder mittels einer CCD Kamera (Praktikum) nachgewiesen werden.

**Semiquantitativer Westernblot**

Berechnen Sie in der Gruppe anhand der von Ihnen bestimmten Proteinkonzentration für das NAC Heterodimer, wieviel ihrer Probe sie laden müssen um 1,2; 3; 6 bzw. 12 pmol NAC pro Spur aufzutragen. Sie erhalten von uns jeweils 12 pmol/10µl (ready to load) HS oder LS Ribosomen. Die Beladung des SDS Gels sollte wie hier aufgezeigt erfolgen

15% SDS-PAGE (10er Kamm)

Während das SDS-Gel läuft bitte Transfer-Puffer ansetzen. Pro Saal benötigen wir ca. 1 Liter.

Transfer-Puffer (1 Liter): 3.03 g TRIS base  
14.4 g Glycine  
3.75 ml 10% SDS  
mit H<sub>2</sub>O auf 800 ml  
+ 200 ml Methanol

Während die SDS Gele laufen sollten sie bereits die Filterpapiere (7 Stück, 7 x 9 cm) und die Nitrocellulose-Blottingmembran (1 Stück, 7x9 cm) für den Proteintransfer vorbereiten.

Nachdem das SDS-Gel gelaufen ist, werden die Proteine aus dem Gel auf eine Nitrozellulosemembran übertragen. Auf dieser erfolgt der Nachweis der Proteine mit Hilfe von Antikörpern.

Für den Westernblot benutzen sie jeweils zu 2 bis 3 Gruppen einen „Semi-dry Electroblotter SEDEC“ von Peqlab.



Der Semidry-Blotter ist so konzipiert, dass sich die Kathode im Deckel und die Anode im Unterteil des Gerätes befindet. Stellen Sie daher sicher, dass in ihrem Blotting-Stapel das Gel immer auf der Transfermembran liegt !!

1. **Tragen sie Handschuhe bei allen Arbeitsschritten.**
2. Schneiden sie ein Nitrozellulosestück und 7 Filterpapiere pro Gruppe zurecht, die so groß sind wie ihr Gel (9 x 7 cm).
3. Wenn das SDS-Gel fertig ist, entnehmen sie es der Laufapparatur und lassen sie es in eine Blottingbox (**blauer Deckel**), die mit Transferpuffer ca. 2 cm hoch gefüllt ist, gleiten.
4. Äquilibrieren sie in der abgebildeten weissen Schale 1 x drei Filterpapiere als Stapel und 1 x vier Filterpapiere als Stapel und die Transfermembran in Transferpuffer. Platzieren sie den Filterpapierstapel(4x) in eine Ecke der Blotapparatur.
5. Platzieren sie die ebenfalls äquilibrierte Membran auf dem Filterpapierstapel.
6. Platzieren Sie das Gel auf der Membran.
7. Zum Schluss Platzieren sie den Stapel von drei Filterpapieren auf ihrem Gel.
8. Rollen Sie mit einem 15 ml Falkontube vorsichtig über den ganzen Stapel um etwaig vorhandene Luftblasen zu entfernen.
9. **Allen beiden Gruppen müssen ihren Stapel für eine Apparatur zügig zusammenbauen!!!**
10. Saugen sie überflüssige Tropfen auf der Bodenplatte weg, da sie ansonsten einen Kurzschluss verursachen könnten, der den Proteintransfer verhindern würde.
11. **Schliessen sie die Apparatur ohne Deckel und Bodenteil gegeneinander zu verschieben.**
12. Fixieren sie vorsichtig den Deckel mit den Schrauben (nicht zu fest drehen!).
13. Verbinden sie die Bananenstecker mit den entsprechenden Outlets am Powersupply.
14. Semidryblots werden generell im Niedrigvoltbereich (ca. 10V) und bei konstanter Stromstärke durchgeführt.
15. Transferieren sie 2 Gele für 1 h bei 150 mA. Bei weniger oder mehr Gelen muss die Stromstärke angepasst werden (75 mA für 1 h pro Gel).
16. Nach Ablauf dieser Zeit nehmen sie den Transferstapel auseinander, überführen sie die Membran in ihre Blottingschale (blauer Deckel) und fahren mit dem Nachweis der Protein wie nachfolgend beschrieben fort.

## Westernblot – Nachweis

- 1 x TBS: 20 mM Tris pH 7.6, 150 mM NaCl (50 ml pro Gruppe)  
1x TBS-T: 20 mM Tris pH 7.6, 150 mM NaCl, 0.05% Tween 20 (500 ml pro Gruppe)  
1. Antikörper: anti-Hefe  $\beta$ NAC Antikörper aus Kanninchen (MSK24)  
2. Antikörper: anti-Kanninchen-IgG Antikörper (aus Ziege) konjugiert mit  
horse raddish peroxidase (goat anti rabbit HRP).  
5% (w/v) Milchpulver in 1 x TBS: (50 ml pro Gruppe ansetzen)

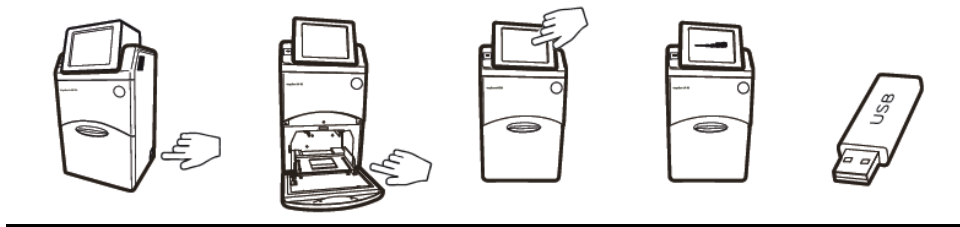
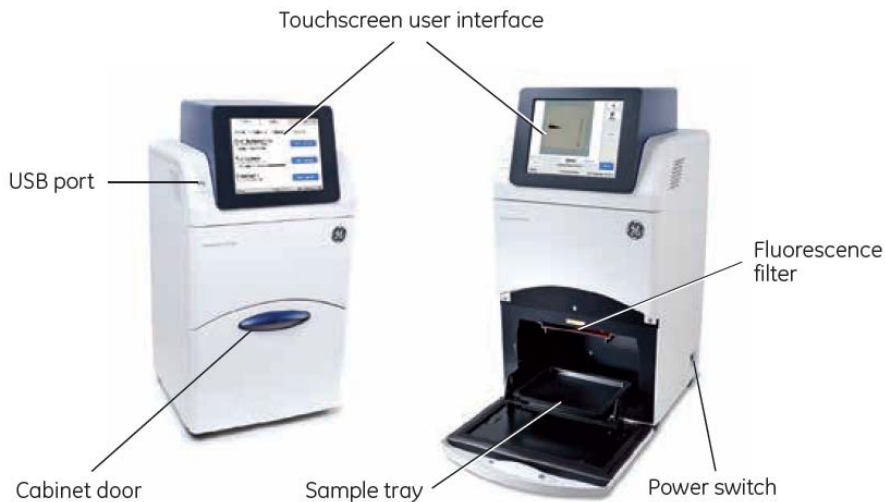
Um den erfolgreichen Transfer der Proteine auf die Membran zu dokumentieren, werden die Proteinbanden mit **Amido Black (irreversibel)** gefärbt.

Danach wird der Blot **in der Markerspur** auseinander geschnitten. Die linke Seite des Blots (LS HS M) wird mit Amido black gefärbt, mit Entfärber entfärbt und fotografiert.

1. Membran 1 min mit Amido Black Färbelösung inkubieren (nicht länger, weil ansonsten die Entfärbung nicht mehr gut funktioniert. Die Färbelösung in die Amido Black Flasche zurückfüllen).
2. Die Membran mit Entfärbelösung entfärben bis das erwünschte Färbeergebnis erreicht ist. Membran mit H<sub>2</sub>O überschichten. Die Membran an der Geldokumentations-Anlage fotografieren. Bild als „Jpeg“ File abspeichern im Folder „BC2\_12 Week 1\_Kurs 1“.
3. Danach wird der Blot **in der Markerspur** auseinander geschnitten. Die linke Seite des Blots (LS HS M) bitte aufheben für das finale Bild. Der rechte Teil der Membran wird für den Westernblot verwendet.
4. Die Membran wird 1 x 1 min mit 1 x TBS gewaschen. (Das Milchpulver könnte ansonsten wegen des Transferpuffers (MeOH) gerinnen).
5. Zur Blockierung unspezifischer Bindestellen wird die Membran nun für 30 min mit 15 ml 5% Milchpulver in 1 x TBS unter Schwenken bei RT inkubiert. Lösung danach verwerfen.
6. Danach wird die Membran mit 10 ml der 1. Antikörperverdünnung (1:6000 in 5% Milchpulver in 1 x TBS) überschichtet und die Schale über Nacht bei 4°C geschwenkt (Betreuer).

**5. Tag: Westernblot / Electrophoretic mobility shift Assay**

7. **Morgens** wird überschüssiger 1. Antikörper durch 3 x 10 min Waschen mit 1xTBS-T entfernt.
8. Anschliessend wird die Membran mit 10 ml der 2. Antikörper (Goat-anti-Rabbit-HRP Konjugat (1 : 4000 in 5% Milchpulver in 1 x TBS) Verdünnung für mindestens 1 h bei Raumtemperatur schwenkend inkubiert.
9. Überschüssiger 2. Antikörper wird ebenfalls durch 3 x 10 min Waschen mit 1xTBS-T entfernt. Giessen Sie die letzte Waschlösung ab.
10. Die folgenden Schritte müssen die Guppen etwas zeitversetzt durchführen (Betreuer fragen!!).
11. Mischen sie 750 µl Substratlösung 1 mit 750 µl Substratlösung 2 (2 ml epi, erst direkt vor Verwendung mischen).
12. Überschichten Sie die Membran im relevanten Größenbereich mit der Substratlösung und inkubieren Sie für 1 min.
13. Entnehmen Sie die Membran und überführen Sie flach liegend in einen Klarsichtbeutel (Luftblasen vermeiden).
14. Der Chemiluminiszenz Nachweis erfolgt am ImageQuant LAS 500 (Raum 411).



**Auswertung Westernblot:**

1. Unterscheiden sich die unter Hochsalz-gereinigten Ribosomen von denen, die unter Niedrigsalz-Bedingungen gereinigt wurden auf Ebene der Proteinzusammensetzung?
2. An welchen Ribosomen detektieren Sie NAC?
3. Es wurden  $0.6 A_{260}$  units Ribosomen pro Spur aufgetragen. Dies entspricht ungefähr 12 pmol Ribosomen. Schätzen sie aus dem Vergleich mit ihren aufgetragenen NAC Standard Proben wieviel NAC an die verschieden vorbehandelten Ribosom gebunden ist. (Der heterodimere Hefe NAC Komplex hat ein Molekulargewicht von ca. 36 kDa).

## Electrophoretic Mobility Shift Assay (EMSA)

### Bandshift-Puffer:

10 mM TRIS-HCl, pH 7.6  
1 mM EDTA pH 8.0  
5 mM DTT  
5% Glycerin

### Ausgleichs-Puffer:

20 mM TRIS-HCl pH7.5  
1 mM DTT  
300 mM NaCl

### 0.5 x TAE (1 Liter pro Gruppe):

10-fache Stammlösung

### Salzlösung: 5 M NaCl

Proteine, die an Nukleinsäure (DNA/RNA) binden, führen zu einem veränderten Laufverhalten der entsprechenden Nukleinsäure in der elektrophoretischen Auftrennung (Electrophoretic Mobility Shift Assay; EMSA; manchmal auch einfach „Bandshift Assay“ genannt). Dieser Assay soll hier genutzt werden, um die Frage zu beantworten, ob NAC eventuell über eine Protein-Nukleinsäure-Interaktion (RNA im Falle des Ribosoms) mit dem Ribosom interagieren könnte.

Plasmid DNA, die uns in diesem Fall als Nukleinsäure dienen soll, wurde bereits verdaut und wird im Kurs ausgeteilt. Dabei handelt es sich um das Plasmid **pBluescript**, das mit dem Restriktionsenzym **BanI** (G/GYRCC) in 4 unterscheidbare Fragmente (244, 386, 1097 and 1231 bp) gespalten wurde. Durch den Verdau erhält man 4 Fragmente. Diese DNA Fragmente werden mit BSA oder mit verschiedenen Mengen an  $\alpha$ NAC bzw.  $\alpha$  $\beta$ NAC inkubiert und anschließend das Laufverhalten der DNA Fragmente auf einem Agarosegel analysiert. Da mit großer Wahrscheinlichkeit Unterschiede zwischen Hochsalz- und Niedrigsalz-behandelten Ribosomen hinsichtlich der NAC-Assoziation beobachtet wurden, soll dieser Bandshift Assay u.a. auch in Gegenwart von Hochsalz durchgeführt werden, um mögliche Ähnlichkeiten im Interaktionsverhalten von NAC zu erkennen.

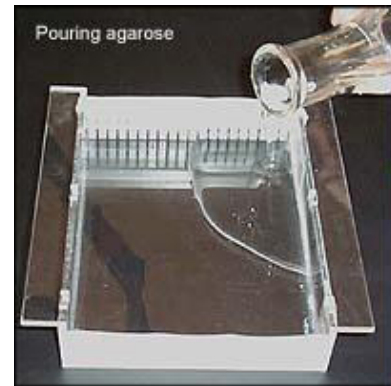


## Durchführung:

### 0.8% Agarosegel in 0.5 x TAE:

1. Für ein Midigel werden 100 ml Agaroselösung benötigt
2. Die Betreuer teilen Gelschienen der benötigten Größe aus.
3. Agarosemenge für ein 0.8%iges Gel in Weithals-Erlenmeyerkolben abwägen
4. 100 ml 0.5 x TAE Puffer zugeben, Agarose durch Schwenken verteilen
5. Lösung in der Mikrowelle vorsichtig zum Kochen bringen; 600 Watt ca. 2 min (Vorsicht: Siedeverzug möglich > **Schutzbrille tragen !!!**)
6. Kolben entnehmen und vorsichtig umschwenken, Vorgang wiederholen bis Gellösung klar und frei von Partikeln ist
7. Rührfisch zugeben, Lösung unter Rühren auf dem Magnetrührer etwas abkühlen lassen (bis ca. 70°C). Rührfisch entnehmen (Rührfischangel).
8. 10 µl SYBRsafe pro 100 ml Gellösung **unter dem Abzug** zugeben (**besonderer Abfall !**). **Vorsichtig zum Mischen schwenken.**
9. Käbme einstecken und Gel **unter dem Abzug (laminiertes Filterpapier als Unterlage verwenden)** giessen. Glaskolben **sofort** mit Wasser auswaschen.
10. Gel ca. 20 min lang aushärten lassen, den Kamm vorsichtig entfernen. Eventuell ausgelaufenes oder verspritztes Gel mit Papierhandtuch aufnehmen und in „**SYBRsafe Abfall fest**“ (blaue Tonnen) geben.
11. Gelkammer mit 0.5 x TAE Puffer füllen (2-3mm über dem Gel), Gel laden und für genau 60 min bei 80 V laufen lassen.
12. Gel an der Geldokumentations-Anlage fotografieren und Bild als jpeg file im Ordner speichern.

**Achtung:** Das Agarosegel nach dem Lauf im **SYBRsafe -Abfall fest** (große blaue Plastiktonne) entsorgen. Den Puffer im **Flüssiger SYBRsafe-Abfall** (großer weißer Kannister unter dem Abzug) entsorgen. Gelkammer, Gelträger und Käbme nach Gebrauch sofort mit reichlich Wasser reinigen.



- in einem **Mastermix (- BSA \*)** (was ist das, wie stellt man ihn her ?) werden **pro Ansatz** 12 µl Bandshift-Puffer und 2 µl verdaute pBluescript DNA gemischt. In das 1. und 7. Epi werden 14 µl davon pipettiert.
- zum restlichen Mastermix werden pro verbleibendem Ansatz 0.5 µl BSA (10 mg/ml) zupipettiert. Danach erhalten alle weiteren Cups 14 µl dieses **Mastermix (+BSA)**.
- für die Markerspur werden 10 µl Gene ruler DNA ladder mix (ready to load) verwendet.

Test-Nr:	Bandshift-Puffer	Ausgleich-Puffer	αNAC	αβNAC	5 M NaCl
1	14 µl *	6 µl	-	-	-
2	14 µl	6 µl	-	-	-
3	14 µl	5 µl	1 µl	-	-
4	14 µl	3 µl	3 µl	-	-
5	14 µl	-	6 µl	-	-
6	14 µl	-	6 µl	-	2 µl
7	14 µl *	6 µl	-	-	-
8	14 µl	6 µl	-	-	-
9	14 µl	5 µl	-	1 µl	-
10	14 µl	3 µl	-	3 µl	-
11	14 µl	-	-	6 µl	-
12	14 µl	-	-	6 µl	2 µl

- alle Proben werden auf Eis zusammen pipettiert, anschließend 10 min bei Raumtemperatur und 5 min auf Eis inkubiert.
- zu jeder Probe werden 3 µl 6 x DNA Loading buffer zugegeben
- die ganze Probe wird vorsichtig geladen (1 Spur für 10 µl Marker (ready to load) zwischen den Proben 6 und 7).
- das Gel wird bei 80 V in 0.5 x TAE Puffer 1 h laufen gelassen (nicht länger; der Farbstoff läuft in die entgegengesetzte Richtung)
- Analyse auf dem UV-Leuchtschirm, Foto machen, Bild speichern

**Auswertung:**

1. Wie groß sind die DNA Fragmente nach dem Verdau ?
2. Welchen Einfluß hat BSA auf das Laufverhalten der DNA Fragmente ?
3. Welchen Einfluß hat NAC auf das Laufverhalten der DNA Fragmente ?
4. Gibt es einen Unterschied zwischen  $\alpha$ NAC und  $\alpha\beta$ NAC ?
5. Welchen Einfluß hat Salz auf die Interaktion ?
6. Kann man eine Aussage treffen wieviele NAC Moleküle an die DNA binden ?
7. Welche Schlußfolgerungen hinsichtlich der NAC-Ribosomen-Interaktion sind möglich?

## Appendix:

### **Gießen von Polyacrylamid-Gelen für SDS-PAGE nach Lämmli:**

unter dem Abzug, Handschuhe tragen

Arbeitsplatz mit lamminierte Filterpapier (Blattgröße so, daß Gelständer drauf passt) vorbereiten. Glasplatten gründlich putzen (EtOH) und nach Anweisung der Assistenten in BioRad MiniProtean Gießständer einspannen. Vorsicht, Glasplatten brechen leicht! Überprüfen Sie die Dichtheit des Aufbaus mit H<sub>2</sub>O.

Jeweils die folgenden Lösungen **unter dem Abzug** mischen (nicht mit Rainin Pipetten in die Acrylamid-Vorratsflasche gehen !!!). **Benutzen Sie hier eine serologische 10 ml Einmalpipette mit ihrem Pipettboy und die Pipetten unter dem Abzug.**

#### **15% Trenngel (15 ml für 2 Gele):**

3.5 ml H<sub>2</sub>O

7.5 ml 30% Acrylamid Stammlösung (Rothiphorese 30)

3,75 ml 1.5 M Tris pH 8.8

150 µl 10% SDS

8 µl TEMED

Gewünschte Füllhöhe auf Glasplatte mit Hilfe des Gelkamms markieren. Polymerisation starten durch Zugabe von **150 µl 10% APS für 2 Gele**, mischen, blasenfrei in vorbereiteten Gelaufbau gießen, bis ca. 1.5 cm unterhalb der kürzeren Glaskante. Eine Markierung mit dem feinen Edding Filzschreiber ist hier hilfreich. Vorsichtig mit ca. 0.5 ml **Isopropanol** überschichten. Nach vollständiger Polymerisation Isopropanol abgießen.

#### **5% Sammelgel (4.5 ml, für 2 Gele):**

2.7 ml H<sub>2</sub>O

750 µl 30% Acrylamid (Rothiphorese 30)

565 µl 1 M Tris pH 6.8

45 µl 10% SDS

5 µl TEMED (pro 2 Gele)

starten mit 45 µl 10% APS

gut mischen, blasenfrei auf Trenngel pipettieren, Teflon-Kamm (10/15 Taschen) blasenfrei einschieben. Für das Giessen eines Geles entsprechend skalieren.

Auspolymerisierte Gele werden **in nassfeuchte Zewa-Tücher eingewickelt und sind in einem Plastikbeutel im Kühlschrank** einige Tage haltbar.

**Puffer:****SDS-Gel Sample buffer (1 x):**

10% Saccharose

0.0625 M Tris-HCl (pH 6.8)

2% SDS

10 mM DTT ( oder 1%  $\beta$ -Mercaptoethanol; 0.0025% Bromphenolblau)**10 x SDS-PAGE Elektrophorese-Puffer:**

Endkonz.		Für 2 Liter
250 mM	TRIS Base	60,57 g
1.92 M	Glycin	288.27 g
1% SDS	10%ige SDS Lösung	200 ml
	H <sub>2</sub> O	Ad 2000 ml

1 L H<sub>2</sub>O vorlegen, Feststoffe unter Rühren lösen, dann SDS und Restwasser zugeben > bei diesem Puffer wird der pH **nicht** nachträglich eingestellt > er ergibt sich automatisch aus der Mischung von TRIS und Glycin !!!!! pH 8.3

**Coomassie-Färber:**

Endkonz.		Für 1 Liter
50%	EtOH (technisch)	500 ml
10%	Essigsäure	100 ml
0.25%	Coomassie Brillant Blue R250	2.5 g
	H <sub>2</sub> O	400 ml

Coomassie Pulver in EtOH lösen + H<sub>2</sub>O > erst dann Eisessig zugeben > unter dem Abzug

**Amido Black Färber:**

Endkonz.		Für 1 Liter
20%	EtOH (technisch)	200 ml
7.5%	Essigsäure	75 ml
0.1%	Naphtol Blue Black	1.0 g
	H <sub>2</sub> O	725 ml

H<sub>2</sub>O vorlegen + Pulver + Eisessig + 200 ml EtOH > unter dem Abzug

**Coomassie und Amido Black Entfärber:**

Endkonz.		Für 2 Liter
	H <sub>2</sub> O	1000 ml
40%	EtOH (technisch)	800 ml
10%	Essigsäure	200 ml

> unter dem Abzug

**Transfer Puffer:**

Endkonz.	Stock	Für 1 Liter
25 mM	TRIS Base	3.03 g
192 mM	Glycin	14.4 g
	10% SDS	3.75 ml
	H <sub>2</sub> O	Ad 800 ml
	Methanol	200 ml

H<sub>2</sub>O vorlegen + TRIS + Glycin + 200 ml Methanol + 10%ige SDS Lösung > unter dem Abzug > der pH-Wert stellt sich automatisch auf 8.3 ein > nicht nachstellen !!!

**10 x TBS:**

Endkonz.		Für 2 Liter
200 mM	TRIS Base	48.23 g
1.5 M	NaCl	175.32 g
	H <sub>2</sub> O	2000 ml

800 ml H<sub>2</sub>O vorlegen + TRIS + NaCl > pH auf 7.6 mit HCl einstellen > auf 2000 ml auffüllen

**10 x TBS-T:**

Endkonz.		Für 2 Liter
200 mM	TRIS Base	48.23 g
1.5 M	NaCl	175.32 g
0.1%	Tween 20	20 ml
	H <sub>2</sub> O	2000 ml

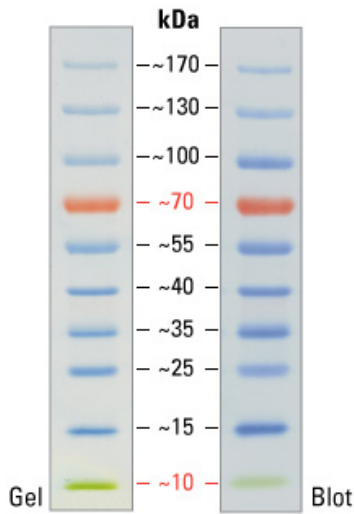
800 ml H<sub>2</sub>O vorlegen + TRIS + NaCl > pH auf 7.6 mit HCl einstellen > Tween zugeben > auf 2000 ml auffüllen

**50 x TAE:**

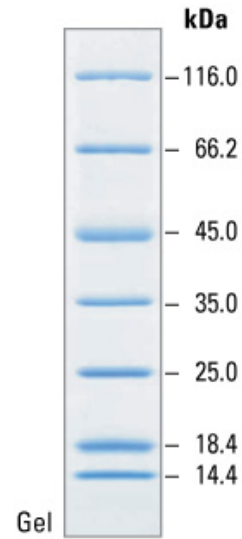
Endkonz.		Für 1 Liter
2.0 M	TRIS Base	242 g
1.0 M	Eisessig	57.1 ml (17.4 M)
100 mM	0.5 M EDTA pH 8.0	200 ml
	H <sub>2</sub> O	Ad 1000 ml

700 ml H<sub>2</sub>O vorlegen + TRIS einrühren > Eisessig vorsichtig unter dem Abzug zugeben > EDTA Lösung zugeben > auf 1000 ml auffüllen

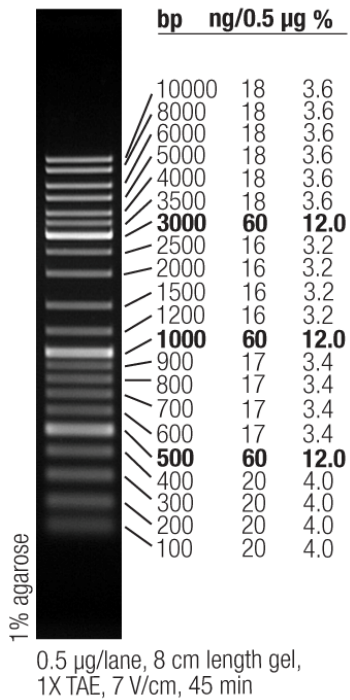
**Marker:**



Thermo PageRuler prestained (#26616)  
(only for Westernblot)



Thermo PageRuler unstained (#26610)



Thermo GeneRuler DNA Ladder Mix , ready to use (#SM0333)

## **Allgemeine Hinweise zur Protokollführung**

*Die Protokolle werden benotet und sollten - in Ihrem eigenen Interesse - aus diesem Grund sorgfältig erstellt werden. Sorgfältige Protokolle sind aber nicht unbedingt lange Protokolle! Maximal 18 Seiten sollten für diese Woche genügen, inklusive der Abbildungen und Graphen!*

*Das Protokoll sollte wie folgt strukturiert sein:*

*1. Einführung in den Versuch mit kurzer Darstellung des wissenschaftlichen Hintergrunds und (!) der Fragestellung, die mit diesem Versuch beantwortet werden soll.*

*2. Versuchsdurchführung/Methoden bitte nicht als copy/paste aus dem Skript einfügen. Besser ist eine kurze Beschreibung warum gerade diese Methode verwendet wurde(n). Bei den Methoden kann für die Details durchaus auf das Skript verwiesen werden! Bitte also keine Details, es sei denn, es gibt Abweichungen vom Skript!*

*3. Ergebnisse: Hier halten wir es für essentiell, nicht nur die Endergebnisse in Form von Graphen, sondern die Original-Messdaten und die Formel(n), die von den Originaldaten zu den Endergebnissen führen, mit aufzuführen. Die Aufstellung von Tabellen ist dabei hilfreich. Wenn die Ergebnisse in Form von Gelbildern vorliegen, nicht die sorgfältige Beschriftung vergessen (Spur, Grössenstandards)! Was ist auf den Bildern zu sehen? Wichtige Banden können z.B. durch Pfeile am rechten Rand gekennzeichnet werden. Was kann direkt aus dem Dargestellten als Ergebniss abgeleitet werden?*

*4. Diskussion: Was lässt sich weiterführend aus den Ergebnissen schließen? Was nicht (!)? Stimmen die Ergebnisse mit den Erwartungen überein? Wenn ja, warum? Falls nicht, welche Ursachen könnte das haben?*



## **Protokoll BC2 Prinzipien der Proteinreinigung und Charakterisierung**

II

Name: **Student Studento**

Matr.-Nr.: 007

E-mail: wer@wo.was

Gruppen-Nr.: 666

Gruppenpartner(in): XY

Kurs1: 06.03.-10.03.2017

### **Allgemeine Einleitung:**

#### **Was ist das Untersuchungsobjekt und was ist das Gesamtziel dieses Versuches**

halbe bis dreivierteil Seite maximal

#### **Versuch W1.1 Affiniätsreinigung eines heterodimeren Proteinkomplexes**

##### **Einleitung:**

Warum soll was mit welcher Methode gemacht werden?

halbe Seite maximal

##### **Durchführung:**

Ein bis zwei Sätze, die die Skriptbeschreibung zusammenfasst + Angabe von Abweichungen.

halbe Seite maximal

##### **Ergebnisse:**

Was wird beobachtet und was kann daraus direkt geschlossen werden?

1,5 Seiten maximal



**Abb. Beispiel: NAC-Reinigung über Ni-NTA-Säule, SDS-PAGE der verschiedenen Fraktionen nach Coomassie-Färbung.**

Aliquots der verschiedenen Fraktionen wurden wie folgt auf ein 99% SDS-Gel geladen: Spur 1, Totalextrakt; Spur 2, Rest.....

**Diskussion:**

Welche weiteren Schlußfolgerungen sind aufgrund der Ergebnisse möglich? Wie gut wurde der Versuch durchgeführt und inwieweit wurden die Erwartungen erfüllt? Was bedeuten die Ergebnisse?

halbe Seite maximal

**Insgesamt maximal 3 Seiten**

**Versuch W1.2 Chromatographie eines Proteinkomplexgemisches**

**Einleitung:**

Warum soll was mit welcher Methode gemacht werden?

halbe Seite maximal

**Durchführung:**

Ein bis zwei Sätze, die die Skriptbeschreibung zusammenfasst + Angabe von Abweichungen.

halbe Seite maximal

**Ergebnisse:**

Was wird beobachtet und was kann daraus direkt geschlossen werden?

2 Seiten maximal

**Abb. Beispiel: NAC-Reinigung über Ni-NTA-Säule, SDS-PAGE der verschiedenen Fraktionen nach Coomassie-Färbung.**

Aliquots der verschiedenen Fraktionen wurden wie folgt auf ein 99% SDS-Gel geladen: Spur 1, Totalextrakt; Spur 2, Rest.....

**Diskussion:**

Welche weiteren Schlußfolgerungen sind aufgrund der Ergebnisse möglich? Wie gut wurde der Versuch durchgeführt und inwieweit wurden die Erwartungen erfüllt? Was bedeuten die Ergebnisse?

halbe Seite maximal

**Insgesamt maximal 3,5 Seiten**

## **Versuch W1.3 Semiquantitativer Western-Blot**

**Hier soll hin:**      **Proteinbestimmung**  
**Messergebnisse / Berechnung der Konzentration**  
**Berechnung der NAC Mengen (nachvollziehbar !!)**  
**Westernblot (Amidofärbung)**  
**Westernblot entwickelt**

### **Einleitung:**

Warum soll was mit welcher Methode gemacht werden?

halbe Seite maximal

### **Durchführung:**

Ein bis zwei Sätze, die die Skriptbeschreibung zusammenfasst + Angabe von Abweichungen.

halbe Seite maximal

### **Ergebnisse:**

Was wird beobachtet und was kann daraus direkt geschlossen werden?

2 Seiten maximal

**Abb. Beispiel: NAC-Reinigung über Ni-NTA-Säule, SDS-PAGE der verschiedenen Fraktionen nach Coomassie-Färbung.**

Aliquots der verschiedenen Fraktionen wurden wie folgt auf ein 99% SDS-Gel geladen: Spur 1, Totalextrakt; Spur 2, Rest.....

### **Diskussion:**

Welche weiteren Schlußfolgerungen sind aufgrund der Ergebnisse möglich? Wie gut wurde der Versuch durchgeführt und inwieweit wurden die Erwartungen erfüllt? Was bedeuten die Ergebnisse?

halbe Seite maximal

**Insgesamt maximal 3,5 Seiten**

## **Versuch W1.4 Protein-DNA-Interaktionsstudie**

### **Einleitung:**

Warum soll was mit welcher Methode gemacht werden?

halbe Seite maximal

### **Durchführung:**

Ein bis zwei Sätze, die die Skriptbeschreibung zusammenfasst + Angabe von Abweichungen.

halbe Seite maximal

### **Ergebnisse:**

Was wird beobachtet und was kann daraus direkt geschlossen werden?

1 Seite maximal

**Abb. Beispiel: NAC-Reinigung über Ni-NTA-Säule, SDS-PAGE der verschiedenen Fraktionen nach Coomassie-Färbung.**

Aliquots der verschiedenen Fraktionen wurden wie folgt auf ein 99% SDS-Gel geladen: Spur 1, Totalextrakt; Spur 2, Rest.....

### **Diskussion:**

Welche weiteren Schlußfolgerungen sind aufgrund der Ergebnisse möglich? Wie gut wurde der Versuch durchgeführt und inwieweit wurden die Erwartungen erfüllt? Was bedeuten die Ergebnisse?

halbe Seite maximal

**Insgesamt maximal 2,5 Seiten**

**Bis hierher sollten Sie für das gesamte Protokoll der ersten Woche nicht mehr als 18 Seiten benötigen. Wir werden nicht mehr als 18 Seiten lesen.**

**Die Protokolle zu allen drei Kurswochen müssen spätestens am Di, den 13.04.2018 in ausgedruckter Form an der Pforte des Genzentrums abgegeben werden (Ausschlussdatum). Es werden keine elektronisch-übermittelten Protokolle akzeptiert. Wenn sie dieses Datum verpassen, haben sie das Praktikum nicht bestanden. In begründeten Fällen (z.B. Krankheit mit Attest) kann bei rechtzeitiger, vorheriger Anfrage eine Verlängerung der Frist von dem betroffenen Dozenten gewährt werden.**