

Aufreinigung rekombinanter Histidase aus *Escherichia coli*

In dieser Praktikumswoche werden Sie verschiedene grundlegende Methoden der Proteinaufreinigung kennenlernen. Dazu haben wir für Sie im Vorfeld die Histidase aus *Pseudomonas putida*, ein Enzym des Aminosäurekatabolismus, für Sie rekombinant in *Escherichia Coli* (*E. coli*) überexprimiert. Das funktionsfähige Holoenzym ist ein Homotetramer mit einem Molekulargewicht von 216kDa. Jede Untereinheit besteht aus 509 Aminosäuren mit einem Molekulargewicht von 54kDa wobei die monomeren Untereinheiten enzymatisch nicht aktiv sind. Als Enzym des Aminosäurekatabolismus katalysiert die Histidase die erste Reaktion des Histidinabbaus, die nicht-oxidative Desaminierung von L-Histidin zu trans-Urocaninsäure. Es handelt sich hierbei um eine Eliminierungsreaktion, bei welcher unter Ammoniakabspaltung das Amin am C- α Atom unter Ausbildung einer Doppelbindung eliminiert wird. Bei der Histidase handelt es sich demnach um eine Ammoniak-Lyase. Sie werden dieses Enzym am Ende der Woche aufgereinigt in den Händen halten.

Die von der Histidase katalysierte Reaktion hat für uns eine ausgesprochen nützliche Eigenschaft: Das entstehende, im Vergleich zu Histidin verlängerte konjugierte π -Elektronensystem des Reaktionsprodukts Urocaninsäure besitzt eine signifikante UV-Absorption im für uns messbaren UV-Bereich. Das ermöglicht uns, die Produktbildung über die Zeit spektrometrisch sehr unkompliziert zu verfolgen. Aus den so gewonnenen Daten können wir die Aktivität des Enzyms ermitteln. Zusammen mit der gelelektrophoretischen Analyse der Proben durch SDS-PAGE und der Proteinbestimmung mittels Bradford-Assay können wir schließlich die Histidase sicher in den einzelnen Fraktionen identifizieren und den Erfolg jedes Aufreinigungsschrittes bewerten.

Die Aufreinigung wird fünf aufeinanderfolgende Schritte umfassen und Ihnen einen Überblick über die wichtigsten Aufreinigungsmethoden bieten. Wir werden mit einer Ammoniumsulfatfällung beginnen, daran schließt sich eine Anionenaustausch-Chromatographie an. Bei der Hitzedenaturierung werden wir eine besondere Eigenschaft der Histidase nutzen, ihre außergewöhnliche Temperaturstabilität. Die Hydrophobe Interaktions-Chromatographie (HIC) trennt die Probe nach ihrer Hydrophobizität. Abgeschlossen wird die Aufreinigung mit einer Demonstration der Größenausschluss- (oder Gelfiltrations-) Chromatographie an der FPLC- (fast protein liquid chromatography) Anlage. Hier werden wir Gelegenheit haben, auch Ihre Proben zu untersuchen.

Aufgabe: Bitte setzen Sie sich im Vorfeld des Versuchs mit den theoretischen Grundlagen der einzelnen Techniken auseinander. Eine gute Möglichkeit dazu ist die Homepage der Firma GE Healthcare, die Handbücher im Pdf-Format bereitstellt.

http://www.gelifesciences.com/aptrix/upp01077.nsf/content/service_and_support~documents_and_downloads~handbooks

(oder Google: „GE chromatography handbook“)

Die Rezepte für die benötigten Lösungen entnehmen Sie bitte dem Anhang dieses Versuchsprotokolls. Sie werden den Verlauf der Aufreinigung anhand der oben besprochenen Indikatoren verfolgen. Tragen Sie alle entsprechenden Werte bitte in die hierfür vorgesehenen Tabellen ein (Word-Templates stehen zum Download bereit).

1. Versuchstag

Damit Sie direkt in die Aufreinigung der Histidase einsteigen können, wurde diese im Vorfeld für Sie rekombinant in *E. coli* überexprimiert. Jede Gruppe erhält 50ml Zellsuspension, welche Sie zunächst durch Sonifizierung aufschliessen. Die anschließende Zentrifugation trennt Zelltrümmer ab und stellt damit den ersten Reinigungsschritt dar.

Tip: Jeder der Reinigungsschritte baut auf dem vorhergehenden auf. Es ist daher essentiell, jeden Schritt wirklich sorgfältig durchzuführen, damit sowohl der Trenneffekt als auch die Rückgewinnung unseres Zielproteins Histidase jeweils optimal sind. Proteinbestimmung nach Bradford, SDS-PAA Gelelektrophorese, und die Enzymaktivitätsbestimmung weisen Ihnen dabei den Weg. Tragen Sie die gewonnenen Werte in die vorgesehene Tabelle ein. Werfen Sie Pellets und Überstände erst fort, wenn Sie wissen, wo Ihr Zielprotein hingegangen ist! Eventuelle Fehler lassen sich dann meist noch korrigieren. Zur Illustration noch ein kleines Rechenbeispiel: Ein sehr guter Experimentator wird möglicherweise in jedem Schritt etwa 90% der Histidase zurückgewinnen. Bei 6 Schritten hält er am Ende $0,9^6=53\%$ der ursprünglich vorhandenen Histidasemenge in den Händen. Ein etwas nachlässigerer Experimentator wird möglicherweise nur 70% Rückgewinnungsrate für jeden Schritt erzielen, was zunächst nicht dramatisch viel weniger klingt. Am Ende der Reinigung wird er aber nur $0,7^6=12\%$ Gesamtausbeute erzielen. Das ist weniger als ein Viertel dessen, was der sehr gute Experimentator erreicht!

Nach diesen Vorüberlegungen beginnen wir nun also mit ...

(A) Zellaufschluss und Zentrifugation

Jede Gruppe erhält 50ml Zellsuspension in einem 50ml ‚Blaudeckel‘-Reaktionsgefäß. Da die Zellsuspension Proteasen enthält, welche vor allem beim Zellaufschluss freigesetzt und aktiviert werden, geben wir den Proteaseinhibitor PMSF (Phenylmethylsulfonylfluorid) hinzu. Dieser inhibiert Serin-Proteasen durch irreversible Bindung des katalytisch aktiven Serins im aktiven Zentrum. Darüber hinaus werden wir während der gesamten Reinigung das native **Proteinmaterial auf Eis** handhaben, um die Restproteaseaktivität auf ein Minimum zu reduzieren.

Aufgaben: Welche Klassen von Proteasen gibt es? Nennen Sie jeweils ein Beispiel. Wo kommen diese her, warum werden sie erst beim Zellaufschluss aktiviert?

Die Schritte **(A2)-(A4)** können von jeweils einem Gruppenpartner übernommen werden während der andere bereits mit Schritt **(B1)** fortfährt.

(A1) Geben Sie 0,2mM PMSF (mittels ausgeteilter 0,2M Stammlösung) zu Ihrer Zellsuspension.

(A2) Die Zellen werden per Ultraschall-Sonifikation aufgeschlossen und dann für 60 Minuten bei voller Geschwindigkeit in der Tischzentrifuge zentrifugiert, um Zelltrümmer abzutrennen.

(A3) Gießen Sie ein 10% SDS-PAGE Gel

(A4) Stellen Sie 0,5L Puffer A sowie 2l Puffer A mit 2mM DTT her und stellen Sie diesen kühl

(A5) Stellen Sie 50mL 8M Harnstoff (MW=60,06 g/mol) her

(B) Ammoniumsulfat-Fällung

Die Fällungswirkung durch Ammoniumsulfat beruht hier auf dem sogenannten Aussalzungseffekt. Durch die Erhöhung der Ionenkonzentration verringert sich die Hydrathülle um die gelösten Proteine. Dies führt zu verstärkter Interaktionen zwischen diesen, resultierend in der Ausbildung unlöslicher Aggregate. Die notwendige Salzkonzentration für die Präzipitation ist proteinabhängig, was wir zur Optimierung der Reinigungswirkung ausnutzen. Als Salz verwendet man in der Regel Ammoniumsulfat aufgrund seiner hohen Löslichkeit in wässrigen Lösungen, sowie aufgrund seiner Position in der Hofmeister-Reihe.

Es wird eine zweistufige fraktionierte Fällung mit jeweils 45% und 63% Sättigung durchgeführt. Die hierfür benötigte Menge Salz berechnen Sie bitte mit Hilfe der angefügten Tabelle. Rühren Sie das geklärte Lysat im Becherglas (langsam, Schaumbildung vermeiden!) auf Eis und geben Sie die benötigte Menge Ammoniumsulfat spatelweise zum Lysat. Achten sie darauf, dass die zugegebene Menge Ammoniumsulfat vollständig gelöst ist, bevor Sie weiteres Salz hinzugeben, um lokale Übersättigung zu vermeiden. Um einen optimalen Auflösungseffekt zu erreichen, werden wir die Salzkristalle zuvor im Mörser pulverisieren.

(B1) Berechnen Sie die benötigten Mengen Ammoniumsulfat für die beiden Fällungsschritte. Pulverisieren Sie dann die Kristalle fein im Mörser und wiegen sie die exakt benötigten Mengen ab.

(B2) Sobald die Zentrifugation (A2) abgeschlossen ist, überführen Sie das geklärte Lysat (Überstand!) vorsichtig in ein Becherglas und nehmen Sie eine Probe (20µl), welche Sie in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß pipettieren und im Verhältnis 1:20 mit Puffer A verdünnen.

*Achtung: Proteinlösungen dürfen nie ‚gevortext‘, gequirlt oder aufgeschäumt werden.
Falls nötig, vorsichtig auf- und abpipettieren oder schwenken.*

Resuspendieren Sie das Pellet in 20 ml 8M Harnstoff. Schütteln etc. ist *hier ausnahmsweise* erlaubt. Nehmen Sie auch hiervon 20 µl Probe.

(B3) Geben Sie das Ammoniumsulfat wie oben beschrieben langsam zu Ihrem geklärten Lysat. Sobald 45% der Sättigungskonzentration erreicht sind, rühren wir noch weitere 30 Minuten

auf Eis. Überführen Sie dann die Probe in neues 50ml Blaudeckelröhrchen und zentrifugieren Sie für 30 Minuten.

(B4) Gießen Sie den Überstand zurück in ein sauberes Becherglas. Das Pellet lösen Sie in 10ml Puffer A.

(B5) Nehmen Sie jeweils 20µL Proben und verdünnen Sie diese wie oben in Puffer A

(B6) Geben Sie nun die Ammoniumsulfat zum Überstand aus (B4) bis auf 63% der Sättigungskonzentration zu. Es wird nun erneut für 30 Minuten weitergerührt und wiederum zentrifugiert.

(B) Ammoniumsulfat-Fällung

(B7) Nach Beendigung der Zentrifugation überführen Sie den Überstand in ein Blaudeckelröhrchen und lösen Sie das Pellet in 10 ml Puffer A.

(B8) Nehmen Sie jeweils Proben, verdünnen Sie diese 1:20 und machen Sie jeweils Bradford-Bestimmungen

Bradford-Protein-Assay

(x1) Pipetieren Sie jeweils 1mL der bereitgestellten Assaylösung in Plastikkuvetten.

(x2) Geben Sie in der Zwischenzeit je 10µL Ihrer vorbereiteten Proben (aus **B2/B5/B8**) zu den Küvetten aus **(x1)** und mischen Sie durch pipettieren.

(x3) Stellen Sie Ihr Photometer auf den Modus „Absorption“. Nullen Sie das Photometer mit Bradfordlösung bei 595nm und führen Sie Ihre Messungen durch.

(x4) Notieren Sie die Messwerte in der vorgesehenen Tabelle und berechnen Sie Proteinkonzentration sowie Gesamtmasse in den einzelnen Proben (Lysat, Überstand 45%, Pellet 45%) mit Hilfe der folgenden Faustregel:

$OD_{595}=1.0 \triangleq 1\text{g/L}$ bei 20µL Probe auf 1ml Bradfordlösung

[Das Photometer gibt im Bereich von 0,1 – 1,0 optischen Einheiten die verlässlichsten Werte, sollte Ihr Messwert nicht in diesem Bereich liegen, führen Sie die Messung mit angepasstem Probenvolumen erneut durch.]

SDS-PAGE

Zur Analyse der Ammoniumsulfatfällung werden die genommen Proben (aus **B2/B5/B8**) per SDS-PAGE Elektrophorese analysiert.

(x5) Nehmen Sie hierfür jeweils 20µL Probe und geben Sie 5µL 5fachen SDS-Puffer hinzu. ‚Kochen‘ Sie die Proben 5min bei 95°C.

(x6) Tragen Sie pro Spur 15µg auf Ihr Gel auf. (Das hierfür benötigte Volumen berechnen Sie bitte anhand der berechneten Proteinkonzentrationen)

Auftragschema:

Lysat | Pellet | Überstand | AS Pellet 45% | AS Überstand 45% | Pellet 63% | Überstand 63% | Längenstandard

(x7) Stellen Sie, während das Gel läuft, Ihre eigene Bradfordlösung her.

Für die weitere Aufarbeitung am zweiten Versuchstag muss das Ammoniumsulfat aus dem Puffer entfernt werden, um die Bindung an das Ionenaustauscher-Material zu ermöglichen. Hierfür wird eine Dialyse der Histidase-haltigen Fraktion(en) gegen Puffer A durchgeführt.

(B9) Überführen Sie die entsprechende(n) Fraktion(en) in den Dialyseschlauch

Ihre Proben aus **B2/B5/B8** werden am 3. Versuchstag wieder benötigt. Bewahren Sie diese also sorgfältig auf.

Probe	OD ₅₉₅	Verdünnung	Proteinkonzentration	Proteinmasse

2. Versuchstag

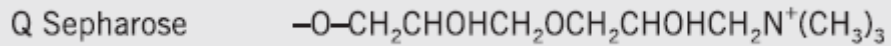
(B10) Überführen Sie das Dialysat in ein Blaudeckelröhrchen. Sollten Sie Trübung oder ein Präzipitat beobachten, muss dieses durch 30 minütiges Zentrifugieren komplett pelletiert und entfernt werden (Beachten Sie dies ggf. in der Auswertung!).

(B11) Nehmen Sie eine 20µL Probe Ihres Dialysats und verdünnen Sie diese 1:20. Resuspendieren Sie ggf. das Pellet in 8M Harnstoff (5:1 Harnstofflg: Pellet) und nehmen Sie auch hiervon eine Probe

Anionenaustauscher-Chromatographie

Die nun verwendeten Chromatographiemedien sind teuer und müssen deshalb sorgfältig zurückgewonnen und regeneriert werden.

Jede Gruppe erhält 2ml Q-Sepharose, sowie eine 10mL Frittensäule. Sepharose ist der Markenname für quervernetzte Agarose der Firma Pharmacia (heute GE Healthcare). Diese ist mit der ‚Q‘-Seitenkette kovalent verlinkt. Bei Q-Sepharose handelt es sich um einen starken Anionentauscher, d. h. sie zeigt eine hohe Ladungsstabilität über einen weiten pH-Bereich.



geladene Gruppe der Q-Sepharose

Die Bindung des Proteins an das Ionenaustauscher-Material führen wir im „batch“-Verfahren aus. Dieses unterscheidet sich vom „flow“-Verfahren dadurch, dass die Probe nicht unter kontinuierlichem Fluss über das vorgepackte Säulenmaterial fließt, sondern die Flüssigphase mit dem Säulenmaterial inkubiert wird. Der Durchfluss wird nach der Inkubation abgetrennt. Dies hat den Vorteil, dass die Kontaktzeit zwischen Material und Flüssigphase länger ist und somit, besonders bei langsamer Bindungskinetik, die Bindungseffektivität erhöht wird. Um eine zuverlässige, spezifische und reproduzierbare Interaktion zu ermöglichen, muss eine stabile Ionenkonzentration und ein stabiler pH gewährleistet sein. Hierfür muss das Säulenmaterial, welches sich zu Beginn zu Konservierungszwecken in 20% Ethanol befindet, mit Puffer A äquilibriert werden. Den oft praktizierten (linearen) Elutionsgradienten nähern wir hier durch 7 Salzlösungen von steigender Konzentration an.

Aufgaben: Welche Eigenschaften sollte ein Protein haben, um gut an einen Anionen- bzw. einen Kationenaustauscher zu binden? Was passiert bei einer Veränderung der Ladungsdichte in der Flüssigphase? (Warum eluieren wir mit ansteigenden Salzkonzentrationen?) Warum ist ein stabiler pH wichtig?

(C1) Überführen Sie die Q-Sepharose mit einer gekappten Pipettenspitze in die Säule und äquilibrieren Sie diese mit 10 Bettvolumen (BV, Volumen, das das gesetzte Material einnimmt: $2\text{ml} \cdot 10 = 20\text{ml}$) Puffer A. Verschließen Sie nach vollständigem Durchfluss des Puffers den Auslauf der Säule. Beginnen Sie parallel mit (C2).

(C2) Bestimmen Sie parallel die Proteinkonzentration im Dialysat **(B10)**

Aufgrund der begrenzten Bindekapazität des Q-Materials verwenden wir nur 50mg der Proteinpräparation vom Vortag weiter. Beachten Sie dies in Ihrer Versuchsauswertung in Bezug auf Ausbeute und Aktivität.

(C3) Berechnen Sie die das weiterzuverwendende Volumen des Dialysats **(B10)** über die Proteinkonzentration. Geben Sie das entsprechende Volumen in ein 15mL Blaudeckelröhrchen

(C4) Verdünnen Sie das Dialysat aus **(C3)** mit Puffer A auf ein Gesamtvolumen von 8mL und überführen Sie es anschließend in die Säule zu der äquilibrierten Q-Sepharose. Verschließen Sie nun die obere Öffnung der Säule mit dem Deckel.

(C5) Es wird für eine Stunde auf einem „head-over-tail“ Drehrad inkubiert.

Bereiten Sie die 7 Puffer für die Elution (Anhang) vor. Beschriften Sie zehn 15ml-Blaudeckelröhrchen für Durchlauf, Wasch1 und 2, sowie die 7 Elutionsstufen.

(C6) Fangen Sie den Durchlauf im beschrifteten Blaudeckelröhrchen auf.

(C7) Waschen Sie zweimal mit jeweils 10 ml Puffer A.

(C8) Starten Sie die Elution mit der geringsten Salzkonzentration (50mM NaCl) und erhöhen Sie diese stufenweise. Verwenden Sie pro Stufe 3,5 BV. Lagern Sie alle Fraktionen auf Eis

(C9) Mischen Sie die Fraktionen durch vorsichtiges invertieren und nehmen Sie jeweils 100µL für die Gelanalyse, Proteintest sowie den morgigen Aktivitätstest ab.

(C10) Bestimmen Sie die Proteinkonzentration jeder Fraktion mit Hilfe des Bradford-Assays. Nehmen Sie für die Messung jeweils 10µL, eine vorherige Verdünnung sollte nicht mehr notwendig sein.

SDS-PAGE

Bereiten Sie Gelproben vor und tragen Sie 10µg pro Probe auf das Gel auf

Auftragschema:

Dialysat (Q-Input) | Durchlauf | Wasch 1/2 | Q Elu1-7 | Längenstandard

Bewahren Sie die Fraktionen bis zur Auswertung des Gels getrennt im Kühlschrank bzw. auf Eis auf.

(C11) Nachdem Sie Ihre Gele ausgewertet haben, vereinigen Sie die Histidase-haltigen Fraktionen und bestimmen Sie Proteinkonzentration und Proteinmasse. Beschriften Sie das Gefäß mit „Q-Pool“.

Probe	Volumen [ml]	OD ₅₉₅	Verdünnung	Proteinkonzentration [g/l]	Proteinmasse [mg]

3. Versuchstag

Heute werden wir uns zunächst mit der Auswertung der ersten beiden Versuchstage beschäftigen. Dann führen wir die Hitzedenaturierung durch. Dabei wird durch hohe Temperatur die Faltung von kontaminierenden Proteinen destabilisiert, die infolgedessen ausfallen. Die Histidase ist im Vergleich zu den meisten anderen Proteinen sehr thermostabil und erleidet deshalb nicht dieses Schicksal.

Aufgaben: *Kennen Sie weitere thermostabile Proteine? Worauf könnte eine erhöhte Stabilität beruhen?*

Aktivitätstest

(D1) Stellen Sie die Lösungen her, welche für den Aktivitätstest benötigt werden (siehe Anhang).

Der Aktivitätstest wird durchgeführt mit den Proben:

Lysat | Pellet | Überstand | Pellet AS 45% | Überstand AS 45% | Pellet AS 63% | Überstand AS 63% | Q-Input | Q Wash 1/2 | Q-Elutionsfraktionen | Q-Pool

(D2) Bereiten Sie für jede zu messende Probe eine Küvette mit

865µL Pyrophosphatpuffer

15µL 0,1M DTT

50µL Probe (Histidase) vor.

Diese werden bei 25°C inkubiert. Die Aktivität wird spektrometrisch über die Zunahme der optischen Dichte bei 277nm berechnet.

Wir ermitteln die Enzymaktivität in Internationalen Einheiten (IU). Eine IU ist *spezifisch für die Histidase* definiert als die Enzymmenge, die

bei 25°C und pH 9,3 ein µMol Substrat in einer Minute umsetzt.

Die Berechnung erfolgt nach dem Lambert-Beer-Gesetz:

$$\frac{d}{dt} E = \varepsilon \cdot \frac{d}{dt} c \cdot l$$

$$\text{mit } c = \frac{n}{V} \rightarrow \frac{d}{dt} E = \varepsilon \cdot \frac{dn}{V dt} \cdot l$$

$$\text{mit } \frac{dn}{dt} = A \rightarrow \frac{d}{dt}E = \varepsilon \cdot \frac{A}{V} \cdot l$$

Unter der Annahme einer linearen Änderung über die Zeit

dürfen wir für endliche Zeitintervalle schreiben:

$$A = \frac{\Delta E \cdot V}{\varepsilon \cdot \Delta t \cdot l}$$

ε - Extinktionskoeffizient von Urocaninsäure bei 280nm = $18,8 \text{ ml} \cdot \mu\text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$

l - Lichtweg/ Küvettenbreite (hier 1cm)

V - Volumen der Probe (Küvette)

n - Stoffmenge

c - Stoffkonzentration

E – Absorption/ optische Dichte

t – Zeit

A - Aktivität

(D3) Für die Messung gehen Sie bitte wie folgt vor:

- (1) Stellen Sie das Photometer auf den Modus Absorption
- (2) Nullen Sie das Photometer mit der gefüllten Küvette unmittelbar bevor sie das Histidin zugeben
- (3) Zugabe von 70 μ L Histidinlösung, Starten der Stoppuhr, sofortiges Mischen der Lösung durch Pipettieren
- (4) Messung an 3 Zeitpunkten, je nach 1 min, 2 min und 3 min

Für die Berechnung der Aktivität beachten Sie bitte das Gesamtvolumen, Probenvolumen und eventuelle Verdünnungen. Berechnen Sie für jede Probe die Aktivität und die jeweiligen Werte bezogen auf Proteinmasse bzw. Volumen.

Probe	Verdünnung	E (1min)	E(2min)	E(3 min)	$\Delta E / \Delta t$ [1/min]	A [IU]	U/V [IU/ml]	U/m [IU/mg]

Hitzenaturierung

Die Hitzenaturierung wird im Wasserbad durchgeführt. Bereiten Sie zusätzlich ein Eiswasserbad vor.

(E1) Erhitzen Sie dieses auf 70°C und überprüfen Sie die Temperatur mit dem bereitliegenden Digitalthermometer. Bereiten Sie ein Eiswasserbad vor.

(E2) Sobald das Wasserbad die Zieltemperatur erreicht hat, stellen Sie Ihre bereitstehenden Blaudeckelröhrchen (Q-Pool/ **C11**) in das Wasser und stoppen Sie die Zeit.

(E3) Inkubieren Sie Ihre Blaudeckelröhrchen für 7 Minuten im Wasserbad und kontrollieren Sie regelmäßig die Temperatur des Wasserbads.

(E4) Nach **exakt** 7 Minuten stellen Sie Ihre Probe sofort für 10 Minuten zum Kühlen in das vorbereitete Eiswasserbad.

(E5) Zentrifugieren Sie denaturierte, unlösliche Bestandteile für 15 Minuten in der Tischzentrifuge ab und überführen Sie den Überstand anschließend in ein neues Blaudeckelröhrchen. Anschließend resuspendieren Sie das Pellet in 8M Harnstoff (Verhältnis 5:1 Harnstofflg.:Pellet).

(E6) Nehmen Sie von Überstand und Pellet je eine Probe von 100µL für Proteintest, Aktivitätstest und SDS-PAGE.

Probe	OD ₅₉₅	Verdünnung	Proteinkonzentration	Proteinmasse

Probe	Verdünnung	E (1min)	E(2min)	E(3 min)	$\Delta E / \Delta t$ [1/min]	A [IU]	U/V [IU/ml]	U/m [IU/mg]

4. Versuchstag

Hydrophobe-Interaktions-Chromatographie

Jede Gruppe erhält 0,5ml Octyl-Sepharose. Diese ist teuer, bitte sorgfältig behandeln. Bei der HIC wird der hydrophobe Effekt angewendet, welcher die Zusammenlagerung unpolarer Substanzen in polaren Lösungsmitteln beschreibt. Die verwendeten Materialien haben hydrophobe Seitenketten, also aliphatische oder aromatische Kohlenwasserstoffe, welche an polymere Trägermatrizes gebunden sind. Die Bindung an das Material erfolgt ähnlich der Ammoniumsulfat-Fällung aufgrund des hydrophoben Effekts, weshalb unter erhöhter Salzkonzentrationen gebunden wird und die Elution mit stufenweise verringerter Salzkonzentration durchgeführt wird. Die Auftrennung beruht darauf, dass je nach Hydrophobizität des Proteins unterschiedliche Salzkonzentrationen für eine Bindung an das Material notwendig sind.

(F1) Äquilibrieren Sie die Octyl-Sepharose mit 10 BV HIC 1 Puffer

(F2) Geben Sie 1,5M Ammoniumsulfat (MW = 132g/mol) zu Ihrer Proteinlösung (Überstand der Hitzedenaturierung aus **E5**)

(F3) Geben Sie diese zu dem HIC Material und inkubieren Sie für 1h (aufgrund des Probenvolumens ggf. in einem 50mL Blaudeckelröhrchen)

(F4) Waschen Sie mit mindesten 10 BV Puffer HIC 1

(F5) Führen Sie die Chromatographie mit schrittweise sinkenden Salzkonzentrationen durch. Verwenden Sie pro Elutionsstufe 5 BV.

(F6) Nehmen Sie von jeder Fraktion eine 100µL Probe, verwenden sie hiervon 20µL für ein weiteres SDS-PAGE Gel.

Auftragschema:

Pellet (**E6**) | Überstand (**E6**) (HIC-Input) | Durchlauf | Wasch 1/2 | HIC Elu1-7 | Längenstandard

Probe	OD ₅₉₅	Verdünnung	Proteinkonzentration	Proteinmasse

Probe	Verdünnung	E (1min)	E(2min)	E(3 min)	$\Delta E / \Delta t$ [1/min]	A [IU]	U/V [IU/ml]	U/m [IU/mg]

5. Versuchstag

Größenausschluss-Gelfiltrations-Chromatographie

Heute wird die Aufreinigung der Histidase mit einer Gelfiltrations-Chromatographie abgeschlossen. Hierbei wird der Analyt nach dem molekularen Gewicht, genauer des hydrodynamischen Volumens, der Bestandteile aufgetrennt. Dies beruht darauf, dass aufgrund der dichten Packung des Säulenmaterials großen Partikeln ein geringeres Interaktionsvolumen als kleinen Partikeln zur Verfügung steht. Je nach verwendetem Säulenmaterial steht Partikeln, sobald sie ein bestimmtes Molekulargewicht überschreiten, nur noch die Flüssigphase zur Verfügung. Sie halten sich ausschließlich außerhalb der Festphase auf und eluieren deshalb sehr früh - im sogenannten Ausschlussvolumen. Partikel unterhalb der Ausschlussgröße dringen (zeitweise) in die Festphase ein und eluieren mit abnehmender Partikelgröße später. Bei globulären Proteinen steht das Elutionsvolumen in linearer Korrelation zum dekadischen Logarithmus des Molekulargewichts.

Das Auflösungsvermögen der Gelfiltration wird stark durch das Probenvolumen, die Flussrate und die Viskosität der Probe beeinflusst. Da das Probenvolumen nicht mehr als 1-5% des Bettvolumens betragen sollte, muss die Probe zuvor konzentriert werden. Hierfür stehen Centricon-Filtereinheiten zur Verfügung, welche mit einer Membran versehen sind, die höhermolekulare Bestandteile zurückhält und somit durch Zentrifugation eine Anreicherung im oberen Gefäßbereich stattfindet. Die Porengröße der Membran wird mit dem MWCO-Wert (molecular weight cut off) angegeben.

(G1) Füllen Sie Ihren Pool der HIC-Elutionsfraktionen in das Centricon Röhrchen und zentrifugieren Sie solange, bis Ihre Probe ein Gesamtvolumen von ca. 500µL erreicht hat

(G2) Überführen Sie durch Pipettieren Ihre Probe in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß, waschen Sie den Konzentrator mit 200µL Puffer nach und stellen Sie das Reaktionsgefäß für 15 Minuten bei maximaler Geschwindigkeit in Ihre Tischzentrifuge, um evtl. Präzipitat abzutrennen

(G3) Führen Sie in der Zwischenzeit wie gewohnt Proteintest und Aktivitätstest der gestern vorbereiteten Proben der HIC-Fraktionen durch.

Die Gelfiltration wird vor kleineren Gruppen von ca. 4 Leuten vorgeführt. Nach Abschluss der Läufe entnehmen Sie bitte Ihre Fraktionen und bereiten Sie mit jeweils 20µL Gelproben für ein abschließendes SDS-PAGE vor.

Probe	OD ₅₉₅	Verdünnung	Proteinkonzentration	Proteinmasse

Probe	Verdünnung	E (1min)	E(2min)	E(3 min)	$\Delta E / \Delta t$ [1/min]	A [IU]	A/V [IU/ml]	A/m [IU/mg]

Füllen Sie zum Abschluss des Versuchs mithilfe der erarbeiteten Werte die (hinten angehängte) Reinigungstabelle aus.

Anhang

Hinweise zur Auswertung

Das zentrale Ergebnis ist die beiliegende Reinigungstabelle in Kombination mit Ihren SDS-Gelen. Bitte füllen Sie Ersterer vollständig aus. Die Reinigungstabelle dokumentiert nachvollziehbar und eindeutig den Fortgang sowie den Erfolg (oder Misserfolg) jedes einzelnen Reinigungsschritts. Dies ermöglicht gegebenenfalls eine gezielte Optimierung der Reinigungsstrategie. In diesem Hinblick sollte die Tabelle zusammen mit der Auswertung der Gele präsentiert und diskutiert werden.

Rezepte & Tabellen

SDS-PAGE

10% Trenngel	1 Gel (18,75mL)
Acrylamid [30% (37,5:1)]	6,25
1M Tris-HCl pH 8,8	7,0
ddH ₂ O	5,2
10% SDS	95µL
10% APS	95µL
TEMED	95µL
5% Sammelgel	1 Gel (9mL)
Acrylamid [30% (37,5:1)]	1,5mL
1M Tris-HCl pH 6,8	2,25mL
ddH ₂ O	5,15mL
10% SDS	45µL
10% APS	45µL
TEMED	22,5µL

Bradford-Proteinassay-Lösung (50mL)

2,5mg Coomassie Blue G250 einwiegen

Lösen sie diesen in 2,5mL Ethanol

Geben Sie vorsichtig 5mL 85% 3-protonige Phosphorsäure (ortho-Phosphorsäure) zu der Farbstoff-Ethanol-Lösung

Geben Sie diese zu 25mL Wasser (NICHT das Wasser zur Säure!!!)

10 Minuten auf dem Magnetprüher rühren

Filtern Sie Ihre Lösung

Geben Sie weitere 17,5mL Wasser hinzu

Puffer:

Ionenaustauscher	Puffer A	Q1	Q2	Q3	Q4	Q5	Q6	Q7
Tris-HCl pH7.2	10mM	10mM	10mM	10mM	10mM	10mM	10mM	10mM
DTT	10mM	10mM	10mM	10mM	10mM	10mM	10mM	10mM
NaCl	/	50mM	100mM	150mM	200mM	250mM	300mM	500mM
benötigte Mengen								
Tris-HCl pH7.2								
DTT								
NaCl								

Aktivitätstest	
Pyrophosphatpuffer:	für 200mL:
0,1M Na ₄ P ₂ O ₇ * 10 H ₂ O (MW = 446,06g/mol)	
10µM ZnCl ₂ (MW = 136,29g/mol)	
0,1M DTT: (MW=154g/mol)	für 10mL:
0,5M Histidin (MW=209,6g/mol)	für 10mL:

HIC	HIC 1	HIC 2	HIC 3	HIC 4	HIC 5	HIC 6	HIC 7
Tris-HCl pH7.2	10mM	10mM	10mM	10mM	10mM	10mM	10mM
DTT	10mM	10mM	10mM	10mM	10mM	10mM	10mM
(NH ₄) ₂ SO ₄	1.5M	1.3M	1.1M	1.0M	0.9M	0.7M	0.5
Benötigte Mengen							
Tris-HCl pH7.2							
DTT							
(NH ₄) ₂ SO ₄							

Tabelle 3-4 Tabelle zur Bestimmung der Ammoniumsulfat-Menge zur Einstellung einer gewählten Konzentration (in % Sättigung) bei 0°C

	Endkonzentration an (NH ₄) ₂ SO ₄ (% Sättigung)																
	20	25	30	35	40	45	50	55	60	65	70	75	80	85	90	95	100
	Zuzugebende (NH ₄) ₂ SO ₄ -Menge in g pro l																
0	106	134	164	194	226	258	291	326	361	398	436	476	516	559	603	650	697
5	79	108	137	166	197	229	262	296	331	368	405	444	484	526	570	615	662
10	53	81	109	139	169	200	233	266	301	337	374	412	452	493	536	581	627
15	26	54	82	111	141	172	204	237	271	306	343	381	420	460	503	547	592
20	0	27	55	83	113	143	175	207	241	276	312	349	387	427	469	512	557
25		0	27	56	84	115	146	179	211	245	280	317	355	395	436	478	522
30			0	28	56	86	117	148	181	214	249	285	323	362	402	445	488
35				0	28	57	87	118	151	184	218	254	291	329	369	410	453
40					0	29	58	89	120	153	187	222	258	296	335	376	418
45						0	29	59	90	123	156	190	226	263	302	342	383
50							0	30	60	92	125	159	194	230	268	308	348
55								0	30	61	93	127	161	197	235	273	313
60									0	31	62	95	129	164	201	239	279
65										0	31	63	97	132	168	205	244
70											0	32	65	99	134	171	209
75												0	32	66	101	137	174
80													0	33	67	103	139
85														0	34	68	105
90															0	34	70
95																0	35
100																	0
↑																	
	Anfangskonzentration an (NH ₄) ₂ SO ₄ (% Sättigung)																