

Facharbeit
aus dem Fach
Chemie

Thema: Reinigung des trimeren Chaperonfusionsproteins Skp-p53(11-35)-His6 mittels
Affinitätschromatographie (Nickel-Chelat) und Gelfiltration (Superdex 200).

Verfasser/in: Claudia Ott
Leistungskurs: Chemie 3C1
Kursleiter/in: LAss Kurt Gallenberger
Abgabetermin: 30.01.2009

Erzielte Note: _____ in Worten _____

Erzielte Punkte: _____ in Worten _____

Abgabe beim Kollegstufenbetreuer am: _____

(Unterschrift des Kursleiters/der Kursleiterin)

Staatliches Gymnasium Penzberg

Naturwissenschaftliches – technologisches und Sprachliches Gymnasium

Leistungskurs

Chemie 2008/2009

***Reinigung eines trimeren Chaperonfusionsmoleküls Skp-p53(11-35)-His6 mittels
Affinitätschromatographie (Nickel-Chelat) und Gelfiltration (Superdex 200).***

Facharbeit bei Roche Diagnostics GmbH in Penzberg

Abteilung New Reagents

2008 – Januar 2009

Facharbeit

von

Claudia Ott

Betreuer:

Sonja Freiburghaus, Roche Diagnostics GmbH, New Reagents, Penzberg

Dr. Herbert Andres, Roche Diagnostics GmbH, New Reagents, Penzberg

Inhaltsverzeichnis

- 1 GRUNDLAGEN
 - 1.1 Beschreibung des rekombinanten Fusionsproteins Skp-p53(11-35) -His6
 - 1.2 Affinitätschromatographie mittels Nickel-Chelat und Gelfiltration
 - 1.3 p53 und Krebs
- 2 ZIEL DER FACHARBEIT
- 3 MATERIAL
 - 3.1 Chemikalien & Materialien
 - 3.2 Geräte
 - 3.3 Puffer und Lösungen
 - 3.3.1 Chromatographie
 - 3.3.2 SDS - Elektrophorese
- 4 METHODEN
 - 4.1 Affinitätschromatographie mittels Nickel-Chelat
 - 4.2 Gelfiltration mittels Superdex 200
- 5 ERGEBNIS
 - 5.1 Affinitätschromatographie mittels Nickel-Chelat
 - 5.2 Gelfiltration mittels Superdex 200
- 6 DISKUSSION
- 7 ZUSAMMENFASSUNG
- 8 ABKÜRZUNGEN
- 9 QUELLEN
 - 9.1 Literaturverzeichnis
 - 9.2 verwendete Internetseiten
 - 9.3 mündliche Quellen
 - 9.4 Abbildungsverzeichnis
- 10 DANKSAGUNG
- 11 SELBSTSTÄNDIGKEITSERKLÄRUNG
- 12 ANHANG

1. Grundlagen

1.1 Beschreibung des rekombinanten Fusionsproteins Skp-p53(11-35)-His6

Die vorliegende Arbeit beschreibt die Reinigung eines rekombinanten Fusionsproteins aus E.coli-Bakterien, welches aus 4 Domänen besteht.

Hilfs-Domäne 1	Hilfs-Domäne 2	Haupt-Domäne 3	Hilfs-Domäne 4
Chaperon „Skp“	Linker	Teilsequenz von p53	Reinigungs-Tag

Das Fusionsprotein wird zur Untersuchung der Teilsequenz des Tumor Suppressor Proteins mit Namen p53 benötigt (Domäne 3). Die übrigen Domänen haben Hilfsfunktion. Hilfsdomänen bei Fusionsproteinen kommen in der Molekularbiologie/Biochemie zur Anwendung, wenn die Eigenschaften von mehreren Einzelproteinen auf einer durchgehenden Proteinkette zusammengeführt werden sollen (Andres, mündl. Mitteilung). Das Anforderungsprofil an ein Fusionsprotein wird durch die Zwänge der Molekularbiologie einerseits und die gewünschten biochemischen Eigenschaften andererseits festgelegt. Im Folgenden wird die Funktion der 4 Domänen erklärt.

Für eine erfolgreiche Expression muss ein rekombinantes Protein eine Mindestlänge von 40 – 60 Aminosäuren aufweisen, da ansonsten das Protein sehr schnell von der Wirtszelle abgebaut wird. Ist eine Zielsequenz zu kurz, kann sie grundsätzlich durch die Sequenz eines beliebigen Proteins verlängert werden. Da jedoch die Löslichkeit des Fusionsproteins ein wichtiger Aspekt ist, finden in der Praxis Chaperonproteine als Fusionspartner häufig Verwendung. Chaperone sind Proteine, welche verhindern, dass andere, noch nicht gefaltete Proteine ungezielt aggregieren und gegebenenfalls ausfallen. Dies geschieht dadurch, dass Chaperone hydrophobe („klebrige“) Aminosäuren in einer nicht-gefalteten Proteinkette besetzen. Dadurch wird die ungewünschte Aggregation unterdrückt. Dieser Eigenschaft verdanken die Chaperone ihren Namen (Chaperon: [gri.] „Anstandsdame“; die Anstandsdame verhindert, dass sich potentielle „Partner“ in einer unerwünschten Weise näherkommen Walton et al., 2004). Für spezielle Fragestellungen wird oft nicht das Protein in voller Länge („full length protein“) benötigt, sondern nur eine Teilsequenz. In der Regel sind Teilsequenzen nicht

korrekt faltbar und deshalb immer hydrophob, was gleichbedeutend mit schlechter Löslichkeit ist. In der Praxis wäre es möglich, das Chaperon „Skp“ (Domäne 1) aus E.coli-Bakterien, welches in Lösung spontan ein Homotrimer bildet (Schlupschy et al., 2004) und eine Teilsequenz unmittelbar zusammenzufügen. Besser ist jedoch, die beiden Domänen durch einen flexiblen „Linker“ zu verbinden (Domäne 2), was die Interaktion zwischen Teilsequenz und Chaperon erleichtert. Untersuchungen haben ergeben, dass 6 Wiederholungen des Aminosäuremotives Glycin-Glycin-Glycin-Serin- die gewünschten Eigenschaften haben (siehe „verwendete Internetseiten“ 1).

Die dritte Domäne ist eine Teilsequenz des Tumor Suppressor Proteins mit Namen p53 (Molekulargewicht 43 653 Dalton; 393 Aminosäuren). Die Teilsequenz besteht aus 24 Aminosäuren von Position 11 – 35, die – wie oben beschrieben – zu kurz ist um direkt exprimierbar zu sein.

Die vierte Domäne besteht aus 6 aufeinanderfolgenden (konsekutiven) Histidinen, welche eine Affinitätsreinigung mittels Nickel-Chelat-Chromatographie ermöglichen (siehe „verwendete Internetseiten“ 2).

1.2 Affinitätschromatographie mittels Nickel-Chelat und Gelfiltration

Die Nickel-Chelat-Chromatographie ist eine Art der Affinitätschromatographie. Die Synthese dieses Chromatographiematerials erfolgt, in dem man auf ein geeignetes Trägermaterial Nitrilotriessigsäure (NTA) kovalent bindet. NTA ist ein Komplexbildner für Schwermetalle, der diese „krebsscherenartig“ umschliesst (Chelat: gri., chele für Krepsschere, Freiburghaus, mündl. Mitteilung). Dieser Komplexbildner bindet mit vier Koordinationsstellen ein Nickel-Ion. Da Nickel 6-zählige Komplexverbindungen eingeht, werden die beiden fehlenden Koordinationsstellen mit den freien Elektronen-Paaren von Wassermolekülen besetzt (Abb. 1)

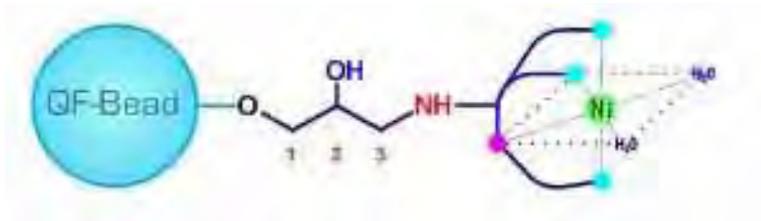


Abb. 1: Darstellung eines Nickel-Chelat-Chromatographiematerials

Der 6-zählige Nickel-Chelat-Komplex, bildet 4 Koordinationsstellen mit NTA und 2 Koordinationsstellen mit Wasser aus.
(siehe „Abbildungsverzeichnis“ 1)

Dieses Chromatographiematerial ist im besondern Masse geeignet, rekombinante Proteine aufzureinigen, da man diese sehr leicht am C- oder N-Terminus auf DNA-Ebene um 6 – 8 Histidin-Reste erweitern kann (His-Tag). Die Imidazol-Seitenkette der Histidin-Reste binden besonders gut am Säulenmaterial, in dem sie das Wasser aus dem bestehenden Komplex verdrängen. Dabei koordinieren die Stickstoffatome der Imidazol-Ringe der Histidine anstelle der Sauerstoffatome der Wassermoleküle mit dem Nickel (Siehe Abb. 2). Der entstehende Komplex ist sehr stabil, was das Auswaschen von allen unerwünschten Proteinen erlaubt (siehe „verwendete Internetseiten“ 3).

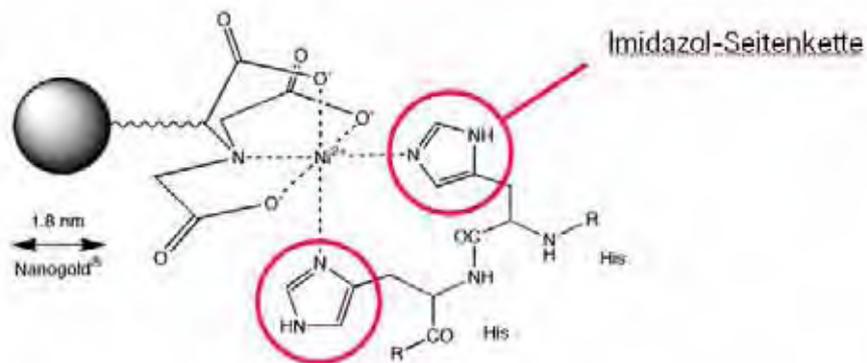


Abb. 2: Nickel-Chelat-Material mit gebundenem Protein via His-Tag

Der 6-zählige Nickel-Chelat-Komplex bildet 4 Koordinationsstellen mit NTA und 2 Koordinationsstellen mit den Stickstoff-Atomen der Imidazol Seitenkette des Histidin-Tags
(siehe „Abbildungsverzeichnis“ 1)

Die Elution des gebundenen Proteins erreicht man, indem Imidazol dem Puffer zugesetzt wird (Imidazol im Puffer kompetiert mit den Imidazol-Seitenketten des Histidin-Tags). Das gereinigte Protein wird eluiert (Hochuli et al., 1987).

Sollte die Reinheit nicht den Anforderungen entsprechen, muss ein weiterer Reinigungsschritt angeschlossen werden. Hier bietet sich die sogenannte Gelfiltration an. Das Prinzip der Gelfiltration beruht darauf, dass die Poren einer Säulenmatrix definierte Größe aufweisen. Das zu untersuchende Proteingemisch wird durch das definierte Gel geleitet, wobei die kleinen Moleküle in die Poren des Säulenmatrix hineindiffundieren. Die größeren Moleküle sind zu groß, um in die Poren einzudringen und werden daher ausgeschlossen (Abb. 3).

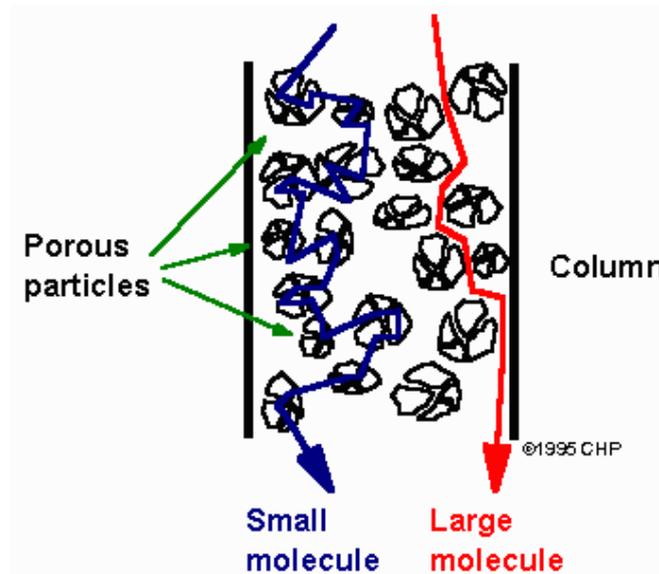


Abb. 3: Trennprinzip eines Proteingemisches mittels Gelfiltration
(siehe „Abbildungsverzeichnis“ 1)

Dies führt dazu, dass zuerst die großen Moleküle eluiert werden. Die kleinen Moleküle verteilen sich in einem viel größeren Volumen, was daher zu einer späteren Elution führt. So können die einzelnen Proteine oder Teilchen nach ihrer Molekülgröße getrennt werden (siehe „verwendete Internetseiten“ 4).

1.3 Tumor Suppressor Protein p53 und Krebs

Das Tumor Suppressor Protein p53 („p53“) ist eines der wichtigsten nukleären Proteine, da es am Beginn einer komplexen Stoffwechsellkaskade steht, die eine kontrollierte Zellteilung organisiert. Zellteilung sollte nur stattfinden, wenn sich die Mutterzelle in einem stabilen Zustand befindet. Ist die DNA einer Zelle zum Beispiel durch Umwelteinflüsse wie UV-Bestrahlung (Sonnenbrand), Hitze oder Chemikalien geschädigt, sollte eine Zellteilung erst dann wieder erfolgen, wenn die geschädigten DNA-Sequenzen durch zelleigene Reparatursysteme erneuert wurden. Im Falle von zellulärem Stress oder zellulärer Schädigung, kommt es zur Überexpression von p53, welches über eine Stoffwechsellkaskade die weitere Teilung der gestressten/geschädigten Zelle verhindert (cell cycle arrest). Diese vorübergehende Unterbrechung der Zellteilung gibt den diversen Reparatursystemen genügend Zeit, die Zelle in ihren stabilen Ausgangszustand zurückzusetzen. Ist dieser erreicht, wird die Expression von p53 soweit herabreguliert, dass sich die Zelle wieder kontrolliert zu teilen beginnt (siehe „verwendete Internetseiten“ 5). Eine Mutation im p53 bewirkt nun, dass das Protein seine Fähigkeit verliert, die Zellteilung situationsabhängig zu regulieren. Ist das p53-Protein defekt, kommt es zu einer unkontrollierten Zellteilung, die man in der Umgangssprache als Krebs bezeichnet. Zusammenfassend kann man die Regulation via p53 folgendermassen beschreiben:

Hohe Expression von intaktem p53	: Zellteilung vorübergehend inhibiert (cell cycle arrest)
mittlere Expressionhöhe von intaktem p53	: kontrollierte Zellteilung
Expression von mutiertem , defektem p53 (bedeutet: kein intaktes p53 vorhanden)	: unkontrollierte Zellteilung

Der oben beschriebenen regulatorischen Funktion verdankt das p53 seinen Namen: „Tumor Suppressor Protein p53“.

Bei vielen Tumoren liegt p53 mutiert vor. Mutiertes p53 ist funktionslos und hat die oben beschriebenen regulatorischen Eigenschaften verloren. Die Zellen teilen sich

unkontrolliert, wofür Krebs ein Synonym ist. Eine Mutation im p53 ist somit die molekulare Ursache für viele Tumorerkrankungen (siehe „verwendete Internetseiten“ 5). Die zahlenmäßig häufigsten Tumorarten sind das kolorektale Karzinom (CRC = colorectal cancer = Darmkrebs) und die Lungenkarzinome (LC = lung cancer = Lungenkrebs). Zusammen stehen sie für 50 % aller Tumorerkrankungen. Von diesen 50 % haben die Hälfte eine Mutation im Tumor Suppressor Protein p53. Das heißt, dass 25 % aller Krebserkrankungen auf eine Mutation im p53 zurückzuführen sind (Russo et al., 2005).

Das mutierte, veränderte p53 wird vom Körper wie ein Fremdprotein behandelt. Fremdproteine werden vom Immunsystem erkannt und lösen die Produktion von Antikörpern aus. Wenn Antikörper gegen körpereigene, mutierte und damit veränderte Proteine gebildet werden, nennt man sie Autoantikörper (auto, gr.: selbst) (siehe „verwendete Internetseiten“ 6). Die Messung von Autoantikörpern gegen p53 („full length“ oder Teilsequenzen) lässt auf die Existenz eines Tumors schließen. Als technische Voraussetzung benötigt man p53 („full length“ oder Teilsequenzen). Als besonders immundominant (antikörperauslösend) hat sich die Teilsequenz 11 – 35 erwiesen, welche im Rahmen dieser Arbeit als Skp-p53(11-35)-His6-Fusionsprotein aus *E. coli* isoliert wurde. (Lubin et al., 1993)

2. Ziel der Facharbeit

Ziel der Facharbeit ist die Reinigung des trimeren Chaperonfusionsproteins Skp-p53(11-35)-His6 aus *E. coli*. Es wird für die Messung von Autoantikörpern benötigt, welche von Krebskranken gebildet werden, bei denen eine Mutation des p53 Ursache ihrer Krebserkrankung ist.

3. Materialien

3.1 Chemikalien & Materialien

Produktname	Lieferant
Biomasse Skp-p53-(11-35), Complete EDTA-free, HPLC Standard	Roche
Lysozyme , D(+)-Saccharose, Imidazol, Essigsäure,a	Fluka
NaCl, NaH ₂ PO ₄ , Benzonase, Methanol z.A. Dithioerythrol	Merck KGaA
SDS-Gel-Elektrophorese Artikel	Invitrogen NuPAGE
Materialien zur Sterilfiltration	Pall Corporation
Amicon Ultra 30000 MWCO	Millipore
HisTrap HP 5 ml Gelbett	GE Healthcare
Superdex 200 HR 10 / 30	Amersham Biosciences

3.2 Geräte

Zentrifugen	Centrifuge 5415 D, Eppendorff, Hamburg Typ 4 K 15, Sigma, Osterode am Harz
SDS-Gel Zubehör	Invitrogen, Carlsbad, Canada
HPLC-Anlage	Merck Hitachi L 6200 A Intelligent Pump, L 4000 UV-Detector, Injector LC Organizer, Chromato Integrator, Merck, Darmstadt
Photometer(Spektrophotometer)	Uvikon 930, Kontron AG, Ergolding
French Press	
Fraction Collector	Modell 2110, Bio-Rad, München
PH-Elektrode	Mettler-Tledo GmbH, Prozessanalytik, Gießen InLab 423 pH Einstabmesskette
Rollmischer	Roller mixer SRT 1 Stuard, Bibby Sterlin Ltd, Staffordshire, United Kingdom

3.3 Puffer und Lösungen:

3.3.1 Chromatographie

Lysepuffer 1 (1.5 Liter) :

50 mM NaH₂PO₄ / NaOH pH 7.5
500 mM NaCl

Lysepuffer 2 (50 ml) (täglich frisch ansetzen) :

1 mg/ml Lysozym
Complete
Benzonase

Waschpuffer (1.0 Liter):

50 mM NaH₂PO₄ / NaOH pH 7.5
500 mM NaCl
10 mM Imidazol

Elutionspuffer (1.0 Liter) :

50 mM NaH₂PO₄ / HCl pH 7.5
500 mM NaCl
1 M Imidazol

Superdex 200 – Puffer (1.0 Liter) :

50 mM NaH₂PO₄ / NaOH pH 7.5
100 mM NaCl

Stabilisierungspuffer:

Superdex 200 – Puffer + 50% Saccharose

3.3.2 SDS-Elektrophorese

Sample Buffer (2X) (reduzierend, 0.1 M DTT) (2.0 ml)

Running Buffer (20X)

Fixierlösung:

Für 2 Gele benötigt man:
 80 ml H₂O dest.
 100 ml Methanol
 20 ml Essigsäure

Färbelösung:

Für 2 Gele benötigt man:
 110 ml H₂O dest.
 40 ml Methanol
 40 ml Stainer A Colloidal Blue Stain Kit
 10 ml Stainer B Colloidal Blue Stain Kit

4. Methoden**4.1 Affinitätschromatographie (Nickel-Chelat)**

- Gefrorene Biomasse (10.9 g) mit 50 ml Lysepuffer 2 mit Hilfe eines Plümpers homogenisiert, so dass eine homogene Suspension entstand. 30 Minuten im Eisbad gerührt.
- Suspension mittels French Press komplett aufgeschlossen.
- zentrifugation des Aufschlusses (12000xg, 30 min, 4°C).
- Quantitative Überführung des Überstandes in einen 100 ml Messzylinder (V = 52 ml). Verwerfen des Pellets.
- Rückmuster von 200 µl für die Analytik (bei -20°C eingefroren).
- Überstand 1:5 mit Lysepuffer 1 verdünnt.
 Filtration mittels VacuCap 90 0.8/0.2 µm V = 255 ml.
- Rückmuster von 200 µl für die Analytik (bei -20°C eingefroren).
- HisTrap HP 5 ml Gelbett mit Lysepuffer 1 eingespült (Flussrate 2 ml/min, 10 SV).
- Filtrierter Überstand mit einer Flussgeschwindigkeit von 2 ml/min aufgetragen.
- Sammeln des Durchlaufs.
- Spülen mit 4 SV Lysepuffer 1 und einer Flussgeschwindigkeit von 2 ml/min.

- Gespült mit 10 SV Waschpuffer (10 mM Imidazol) und einer Flussgeschwindigkeit von 2 ml/min.
- Sammeln des Durchlaufs
- Elution des gesuchten Proteins mit Imidazolgradient (0.01 bis 1M Imidazol; 20 SV , 2ml/min).
- Sammeln von 2 ml Fraktionen.
- Bestimmung des Proteingehalts von allen Protein-haltigen Lösungen und Fraktionen in einer geeigneten Verdünnung bei OD 280 nm.
- Folgende Formel zur Berechnung der Proteinkonzentration bei den Fraktionen verwendet:

$$\text{OD (Abs 280nm)} \times 0.329^{-1} \times \text{Verdünnung}$$
- Anfertigen eines SDS-Gels von sämtlichen Proben.
- Wo nötig Verdünnung der Proben auf 1 mg/ml (mit 50 mM NaH₂PO₄ / NaOH pH 8.0).
- Poolen der Skp-p53(11-35)-His6-Fraktionen.
- Rückmuster des Pools für Analytik, 300 µl.
- Einkonzentrieren der Lösung auf 500µl mittels Centrifugation Filter Devices bei 4000 x g für 12 Minuten.
- Rückmuster für Analytik, 20 µl.

4.2 Gelfiltration (Superdex 200)

- Einspülen der Säule (Superdex 200 HR 10/30) mit Superdex 200 – Puffer, Flussgeschwindigkeit 1.0 ml/min.
- 50 µl HPLC-Standard mit einer Flussgeschwindigkeit von 1.0 ml/min aufgetragen.
- Testlauf mit 20 µl Probe.
- Reinigung des Pools (auf zwei Läufe aufgeteilt, pro Lauf ca 200 µl injiziert).
- Sammeln von zwei geeigneten Pools:
 Pool 1: 11.0 – 12.8 min
 Pool 2: 12.8 – 13.8 min

- Proteinbestimmung der beiden Pools in geeigneter Verdünnung bei 280 nm.
- Anfertigen eines SDS-Gels von allen vier Proben.
- Eikonzentrieren des Pools 11.0 – 12.8 ca. um den Faktor 10 mittels Centrifugation Filter Devices bei 2500xg für 10 min. Verdünnung der übrigen Proben auf 1 mg/ml (mit 50 mM NaH₂PO₄ / NaOH pH 8.0).
- Stabilisierung dieses Pools durch Zugabe von 6% Saccharose.
Zugabe von 136.4 µl Stabilisierungspuffer pro ml Proteinlösung.
- Aliquotiert à 250 µl und bei -80°C eingelagert.

5. Ergebnis

5.1 Affinitätschromatographie (Nickel-Chelat)

Das Fusionsprotein Skp-p53(11-35)-His6 wurde in E. coli exprimiert. Die Biomasse wurde mittels Frenchpress aufgeschlossen. Nach Zentrifugation wurde der Überstand auf eine Nickel-Chelat-Säule aufgetragen. Nach Auswaschen der E. coli Proteine wurde das Fusionsprotein mittels eines Imidazol-Gradienten eluiert und mit Hilfe eines Fraktionssammlers aufgefangen. Das Elutionsprofil ist in Abb. 4 wiedergegeben.

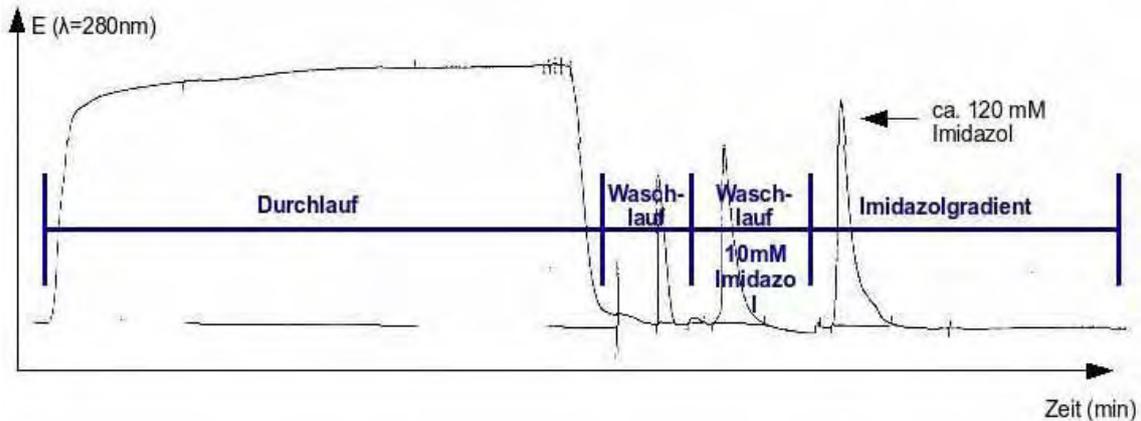


Abb. 4: Elutions-Chromatogramm der Affinitätschromatographie mittels Nickel-Chelat von Skp-p53(11-35)-His6 auf His Trap HP 5 ml Gelbett

Chromatographiebedingungen: Puffer: 50 mM NaH_2PO_4 / NaOH pH 7.5
500 mM NaCl
Flow: 2 ml/min
 λ : 350 nm

Durchlauf: Auftrag mit Lysepuffer 1 mit einem Fluss von 2ml/min

Waschlaufl: 4 SV Lysepuffer 1 (2ml/min)

Waschlaufl mit 10mM Imidazol: 10 SV Waschpuffer (2ml/min)

Elution mittels Imidazolgradient: 0.01 bis 1M Imidazol; 20 SV , 2ml/min

(siehe „Abbildungsverzeichnis“ 2)

Der Verlauf der Chromatographie wurde mittels SDS-Gelelektrophorese bewertet. Es wurde der Auftrag, der Durchlauf und jede einzelne Fraktion von der Elution in einer geeigneten Konzentration aufgetragen. Im Auftrag (Spur 3 aus Abb. 5) ist keine prominente Bande im Bereich von 25000 Dalton zu sehen. Die Analyse der einzelnen Fraktionen zeigt, dass sich ein Protein mit dem erwarteten Molekulargewicht von 25000 Dalton in den Fraktionen 49 -53 stark angereichert hat.

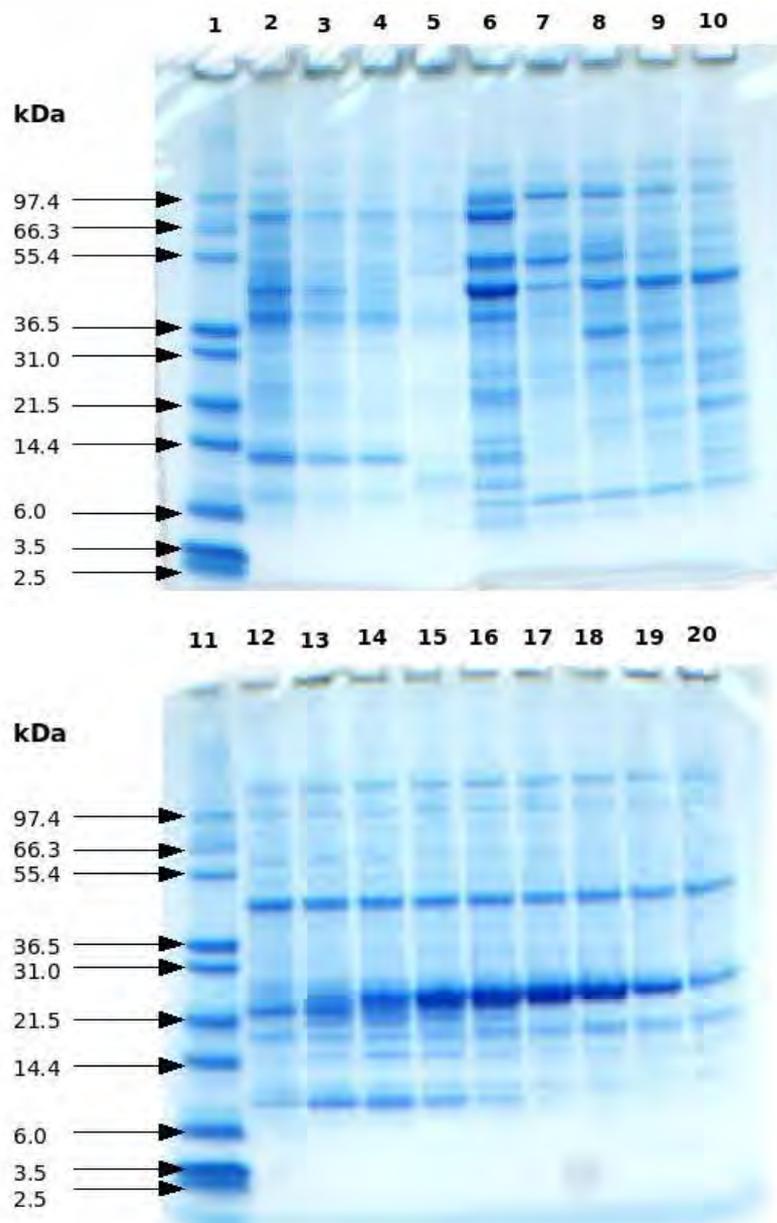


Abb. 5: SDS-Gele des Auftrags, Durchlaufs und der gesammelten Fraktionen der Affinitätschromatographie mittels Nickel-Chelat

Reihe 1 und 11: Mark12 unverdünnt

Reihe 2: Aufschluss

Reihe 3: Auftrag

Reihe 4: Durchlauf

Reihe 5: Waschlauf mit Lysepuffer

Reihe 6: Waschlauf mit Waschpuffer (10mM Imidazol)

Reihe 7 – 20: Fraktionen 42 – 54

(siehe „Abbildungsverzeichnis“ 2)

Auf der Basis der Gelanalytik wurden die Fraktionen 49 – 53 vereinigt und konzentriert. Eine Zusammenfassung der Reinigung ist in Tab. 1 wiedergegeben.

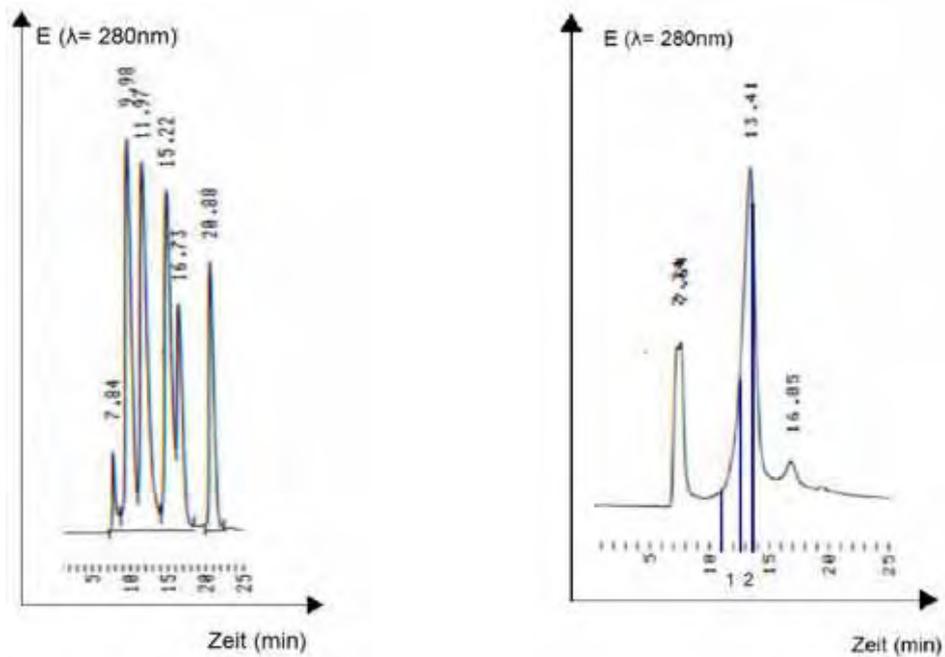
Tab. 1: Messwerte der Affinitätschromatographie mittels Nickel-Chelat.

	Volumen ml	Konzentration mg/ml	Gesamter Proteingehalt mg
Auftrag	255	13.3	~3400
Durchlauf / Wash mit Lysepuffer	304	10	3040
Waschlauf mit Waschpuffer (10mM Imidazol)	44	0.9	39.6
Pool Fraktion 49 - 53	10	1.45	14.5
Fraktion 49 – 53 konz	0.5	18.6	9.3

(siehe „Abbildungsverzeichnis“ 2)

5.2 Gelfiltration (Superdex 200)

Das SDS-Gel zeigt, dass die Expression des Fusionsproteins (Spur 3, Auftrag) überraschenderweise sehr niedrig war. Im Original war eine schwache Bande gerade noch sichtbar. Trotz des sehr schlechten Verhältnisses zwischen E. coli-Proteinen und Fusionsprotein gelang es durch die effiziente Affinitätschromatographie mittels Nickel-Chelat das Zielprotein dramatisch anzureichern. Da das Protein nicht bandenrein war wurde eine Gelfiltration mittels Superdex 200 als weiterer Reinigungsschritt durchgeführt. Die Proteine des Gemischs wurden nach Molekulargewicht aufgetrennt und somit das Zielprotein von den Verunreinigungen abgetrennt. Das Elutionsprofil des Eichmixes und des Laufs sind in Abb. 6 wiedergegeben. Die Gelfiltration wurde auf zwei Läufe aufgeteilt. Zur beispielhaften Veranschaulichung wird hier nur ein Chromatogramm aufgeführt.



A) Eichmix

B) beispielhaftes Chromatogramm

Abb. 6: Chromatogramm des Eichmixes der Aufreinigung des Nickel-Chelat-Pools 49 - 53

Chromatographiebedingungen:

Säule	:	Superdex 200 HR 10/30
Puffer	:	50 mM NaH ₂ PO ₄ / NaOH pH 7.5, 100 mM NaCl
Fluss	:	2 ml/min
λ	:	350 nm

A) Eichmix: 50 µl HPLC-Standard mit einer Flussgeschwindigkeit von 1.0 ml/min

9.98:	465 000 Da
11.97:	150 000 Da
15.22:	50 000 Da
16.73:	17 000 Da
20.88:	283 Da

B) Auftrag von 2 mal 200 µl Pool 49-53.

Flussgeschwindigkeit von 1.0 ml/min.

1) Pool 1: Minute 11.0 bis 12.8

2) Pool 2: Minute 12.8 bis 13.8

(siehe „Abbildungsverzeichnis“ 2)

Das oben beschriebene Verfahren führte zu einem zufriedenstellenden Ergebnis, was folgendes SDS-Gel beweist (Abb. 7). Es zeigt, dass das gesuchte Protein nun mit keinen anderen E.coli-Proteinen verunreinigt ist. Dies veranschaulicht auch die nachfolgende Tabelle (Tab.2).

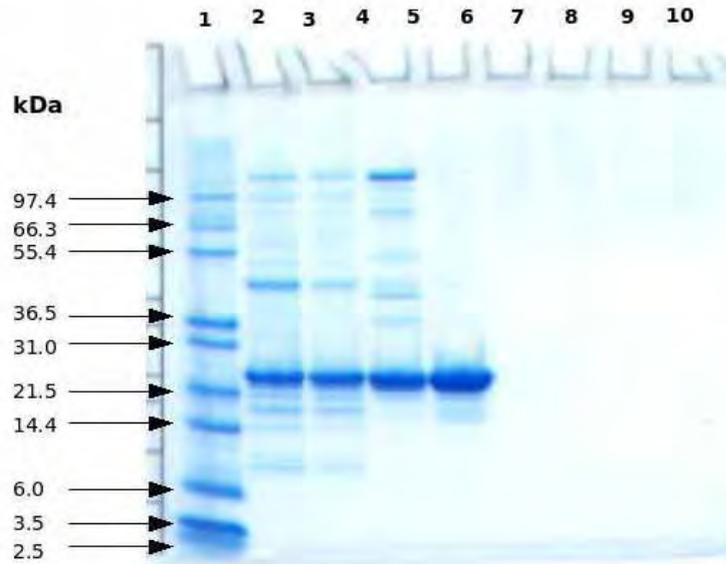


Abb. 7: SDS-Gel verschiedener Pools

Reihe 1: Mark12 unverdünnt

Reihe 2: Nickel-Chelat, Pool 49 – 53

Reihe 3: Nickel-Chelat, Pool 49 - 53 konzentriert

Reihe 4: Superdex 200, Pool 11.0 – 12.8

Reihe 5: Superdex 200, Pool 12.8 – 13.8

Reihe 6 – 10: Sample Buffer (2x)

(siehe „Abbildungsverzeichnis“ 2)

Tab. 2: Messwerte der Gelfiltration mittels Superdex 200

	Volumen ml	Konzentration mg/ml	Gesamter Proteingehalt mg
Fraktion 49 – 53 konz	0.4	18.6	7.2
Pool 11.0 – 12.8	3.6	0.179	0.644
Pool 12.8 – 13.8	2.0	1.17	2.34

(siehe „Abbildungsverzeichnis“ 2)

Als Ergebnis meines Praktikums habe ich 2.11 ml des gesuchten Proteins in der Konzentration 1.03 mg/ml erhalten.

6. Diskussion

Skp-Fusionsproteine sind dafür bekannt, dass sie in E. coli eine extrem hohe Expressionrate zeigen. Um so überraschender war, dass im Aufschluss das Fusionsprotein nur in sehr geringer Konzentration vorlag. Experimente im Anschluss an die Facharbeit haben gezeigt, dass es offensichtlich bei der Herstellung der Biomasse ein technisches Problem gab. Bei der Wiederholung war eine sehr prominente Bande bei 25000 Dalton zu sehen. Trotz der niedrigen Expression - wodurch die Reinigung aufgrund des ungünstigen Verhältnisses zwischen E. coli-Proteinen und Zielprotein sehr erschwert wurde - konnte das Fusionsprotein in einem Reinigungsschritt sehr stark angereichert werden. Im Pool 49 – 53 der Nickel-Chelat-Chromatographie zeigte sich das Zielprotein als prominenteste Bande.

Auffällig war des weiteren, dass das Protein schon bei sehr niedriger Imidazolkonzentration von der Säule gelöst wurde. Mit einem flacheren Imidazolgradienten stünde zu erwarten, dass man die kontaminierenden E. coli-Proteine besser abtrennen kann.

Um zu einem bandenreinen Protein zu kommen, wurde ein Molekularsieb angeschlossen. Dieser Reinigungsschritt führte zu der gewünschten Reinheit.

Es konnte gezeigt werden, dass trotz niedriger Expression das Zielprotein mit nur zwei Reinigungsschritten isoliert werden konnte. Bei hohen Expressionraten steht zu erwarten, dass die gewünschte Reinheit sogar nur mit dem affinitätschromatographischen Schritt erreicht werden kann.

7. Zusammenfassung

- Die vorliegende Arbeit beschreibt die Reinigung des rekombinanten Proteins Skp-p53(11-35)-His6 aus E.coli-Bakterien.
- Das rekombinante Skp-p53(11-35)-His6 stellt ein Fusionsprotein dar, welches aus vier Funktionseinheiten (Domänen) auf der DNA-Ebene zusammengefügt wurde.

Domäne 1	Domäne 2	Domäne 3	Domäne 4
Protein „Skp“	Linker	Teilsequenz von p53	Reinigungs-Tag

Das Protein „Skp“ ist ein Chaperon („Faltungshelfer“) aus E.coli-Bakterien, welches spontan ein Homotrimer bildet. Die Domäne 2 besteht aus 6 – Wiederholungen des Aminosäurenmotives Glycin-Glycin-Glycin-Serin-, welches eine flexible Verbindung („Linker“) zwischen Domäne 1 und Domäne 3 schafft.. Die dritte Domäne ist eine Teilsequenz des Tumor Suppressor Proteins mit Namen p53. Die Teilsequenz umfasst die Aminosäuren 11 bis 35. Die vierte Domäne besteht aus 6 aufeinanderfolgende (konsekutiven) Histidinen, welche eine Affinitätsreinigung mittels Nickel-Chelat-Chromatographie ermöglichen,.

- Die Reinigung des Fusionsproteines beinhaltete folgende Schritte:
Lyse der E.coli-Bakterien und Gewinnung des Skp-p53(11-35)-His6-haltigen Überstandes durch Zentrifugation.
Affinitätsreinigung mittels Nickel-Chelat-Chromatographie.
Gelfiltration mittels Superdex 200.
- Die Reinheit des Proteins wurde mit Hilfe einer analytischen Gelelektrophorese gezeigt.

8. Abkürzungen

Da	Dalton
DTT	Dithiothreitol
E	Extinktion
E. coli	Escherichia coli
Gly	Glycin
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
OD	Optische Dichte
Ser	Serin
SDS	Sodium Dodecyl Sulfate

9.Quellen

9.1. Literaturverzeichnis

Hochuli E., Döbeli H., Schacher A.: New metal chelat adsorbent selective for proteins and peptides containing neighbouring histidine residues. *Journal of Chromatography*, 411: S. 177 – S. 184 (1987)

Lubin R., Schlichtholz B., Bengoufa D., Zalzman G., Tredaniel J., Hirsch A., Caron de Fromental C., Preudhomme C., Fenaux P., Fournier G., Mangin P., Laurent-Puig P., Pelletier G., Schlumberger M., Desgrandchamps F., Le Duc A., Peyrat J.P., Janin N., Bressac B., Soussi T.: Analysis of p53 antibodies in patients with various cancer define B-Cell epitopes of human p53: Distribution on primary structure and exposure on protein surface. *Cancer research* 53: S. 5872 – S. 5876 (1993)

Russo A., Bazan V., Iacopetta B., Kerr D., Soussi T., Gebbia N.: The TP53 Colorectal Cancer International Collaborative Study on the prognostic and predictive significance of p53 mutation: Influence of tumor site, type of mutation, and adjuvant treatment. *Journal of Clinical Oncology*: S. 7518 – S. 7528 (2005)

Schlapschy M., Dommel M.K., Hadian K., Fogarasi M., Korndörfer I.P., Skerra A.: The periplasmic E.coli chaperon Skp as a trimer in solution: biophysical preliminary crystallographic characterisation. Biol Chem., 385(2): S. 137 – S. 143 (2004)

Walton T.A., Sousa M.C.: Crystal structure of Skp, a prefoldin-like chaperone that protects soluble and membrane protein from aggregation. Moll Cell. 15(3): S. 367 – S. 374 (2004)

9.2. verwendete Internetseiten

1)

http://en.wikipedia.org/wiki/Fusion_protein

2)

<http://www.chemgapedia.de/vsengine/vlu/vsc/de/ch/8/bc/vlu/proteinanalytik/chromatographie.vlu/Page/vsc/de/ch/5/bc/gentechnik/methoden/proteinisolierung/proteinisolierung.vscml.html>

3)

http://www.chemgapedia.de/vsengine/vlu/vsc/de/ch/8/bc/vlu/proteinanalytik/chromatographie.vlu/Page/vsc/de/ch/8/bc/proteinanalytik/methoden_protein/affin2.vscml.html

4)

http://www.chemgapedia.de/vsengine/vlu/vsc/de/ch/8/bc/vlu/proteinanalytik/proteinreinigung.vlu/Page/vsc/de/ch/8/bc/proteinanalytik/methoden_protein/groesse_gelchrom.vscml.html

5)

<http://en.wikipedia.org/wiki/P53>

6)

<http://de.wikipedia.org/wiki/Autoantik%C3%B6rper>

9.3. mündliche Quellen

Sonja Freiburghaus, Roche Diagnostics GmbH, New Reagents, Penzberg

Dr. Herbert Andres, Roche Diagnostics GmbH, New Reagents, Penzberg

9.4 Abbildungsverzeichnis

- 1.) In Besitz von **Dr. Herbert Andres**, Roche Diagnostics GmbH, New Reagents, Penzberg
- 2.) Claudia Ott

10. Danksagung

Ich danke der Firma Roche Diagnostics GmbH, die mir ein zweiwöchiges Fachpraktikum in ihrem Werk in Penzberg ermöglichte.

Ich danke dem Hauptabteilungsleiter Dr. Bernhard Risse für die Bereitstellung der finanziellen Mittel, die zur Durchführung der Facharbeit nötig waren.

Dem Abteilungsleiter Dr. Johann Karl danke ich für die Überlassung des Themas und die Bereitstellung des Laborplatzes.

Besonders bedanken möchte ich mich bei Herrn Dr. Herbert Andres, der sich für die gute Einführung in die gegebene Themenstellung viel Zeit nahm, mich sehr unterstützte sowie immer Geduld und Verständnis zeigte.

Des weiteren geht mein großer Dank an Frau Sonja Freiburghaus für Ihre hervorragende Betreuung während meines Fachpraktikums vom 04.08.2008 bis zum 14.08.2008. Die freundschaftliche und äußerst gute Atmosphäre im Labor haben mir ermöglicht, mich während des Fachpraktikums sehr wohl zu fühlen.

11. Selbstständigkeitserklärung

Ich erkläre hiermit, dass ich die Facharbeit ohne fremde Hilfe angefertigt und nur die im Literaturverzeichnis angeführten Quellen und Hilfsmittel benutzt habe.

_____, den _____

Ort

Datum

Unterschrift der Schülerin

12. Anhang

Inhaltsverzeichnis:

1. Praktikumsprotokoll
2. Praktikumsfotos
3. Verwendete Internetseiten

1.) Praktikumsprotokoll:

Bearbeiter : Claudia Ott / Sonja Freiburghaus

Marker : p53

Projektbezeichnung : Autoantikörper CRC

Projekt-Nummer : E.00302

Bearbeitungszeitraum : vom 04.08.08 bis 13.08.08

Protokollseiten : von 99429 bis 99434

Anlagen : 6

Anzahl Anlagenseiten : 12

Versuchstitel:

Isolieren von SKP-p53(11-35) aus Biomasse (E.coli).

Aufgabenstellung:

Die Zellen werden mittels French Press aufgeschlossen. Das gesuchte Protein wird unter physiologischen Bedingungen mittels Nickelchelat-chromatographie und Gelfiltration isoliert.

Ergebnisse:

Die Expression von SKP-p53(11-35) war wider Erwarten sehr gering.
 Aus 10.9 g Biomasse wurden 2.18 mg SKP-p53(11-35) isoliert.
 Das Protein wurde mit 6% Saccharose stabilisiert, à 250 µl aliquotiert und bei -80°C eingefroren.

Materialliste:

Produktname	Lieferant	Ident.nummer	Lotnummer
Biomasse SKP-P53 (11-35) 10.9g	Roche		vom
Complete EDTA-free	Roche	11 873580 001	13137200
Lysozyme from hen egg white	Fluka	62970	15018/1
Benzonase (Konz.=250U/ μ l)	Merck KGaA	1.01654.0001	K37141454 713
NaCl (MW=58.44g/mol)	Merck KGaA	1.06404.1000	
NaH ₂ PO ₄ (MW=137.99g/mol)	Merck KGaA	1.06346.1000	
Imidazol (MW=68.08g/mol)	Fluka	56749	
VacuCap 60 Filter Unit 0.2 μ m	Pall Corporation	4632	
VacuCap 60 Filter Unit 0.45 μ m	Pall Corporation	4634	
VacuCap 90 Filter Unit 0.8/0.2 μ m	Pall Corporation	4628	
HisTrap HP 5 ml Gelbett	GE Healthcare	17-5248-01	10001608-2
Methanol z.A.	Merck KGaA	1.06018.2500	
Essigsäure	Fluka	45731	
1 M DTT	Roche	708 984	70136021
MES SDS Running Buffer (20X)	Invitrogen NuPAGE	NP0002	373713
Stainer A Colloidal Blue Stain Kit	Invitrogen NOVEX	46-7015	319006
Stainer B Colloidal Blue Stain Kit	Invitrogen NOVEX	46-7016	319007
LDS Sample Buffer (4X)	Invitrogen NuPAGE	NP0007	363755
Mark 12 Unstained Standard	Invitrogen	LC5677	371111
4-12% Bis-Tris Gel 1,0mm X 10 well	Invitrogen NuPAGE	NP0321	7110872
Gel-Dry Drying Solution	Invitrogen	LC4025	273415
HPLC Standard	Mannheim Boehringer	1213776	
Superdex 200 HR 10/30	Amersham Biosciences	17-1088-01	0246100
Amicon Ultra Centrifugal Filter Devices 30000 MWCO	Millipore	UFC803024	R4DN22415
D(+)-Saccharose	Fluka	84100	

Lösungen:**1. Chromatographie**Lysepuffer 1:

50 mM NaH₂PO₄ / NaOH pH 7.5
 500 mM NaCl
 1.5 Liter werden hergestellt.
 Einwaage: 10.4 g NaH₂PO₄
 43.8 g NaCl
 Zugabe von 1400 ml H₂O dest.
 pH eingestellt mit 10 M NaOH auf 7.5
 ad 1500 ml mit H₂O dest.
 Vakuumfiltration mit VacuCap 60 0.2 µm

Lysepuffer 2 (täglich frisch ansetzen):

1 mg/ml Lysozym
 Complete
 Benzonase
 50 ml werden hergestellt.
 Einwaage: 50 mg Lysozym (ad 1 mg/ml)
 2 Complete Tabletten
 1 µl Benzonase
 ad 50 ml mit Lysepuffer 1

Waschpuffer:

50 mM NaH₂PO₄ / NaOH pH 7.5
 500 mM NaCl
 10 mM Imidazol
 1.0 Liter wird hergestellt.
 Einwaage: 6.9 g NaH₂PO₄
 29.2 g NaCl
 0.681 g Imidazol
 Zugabe von 900 ml H₂O dest.
 pH eingestellt mit 10M NaOH auf 7.5
 ad 1000 ml mit H₂O dest.
 Vakuumfiltration mit VacuCap 60 0.2 µm

Elutionspuffer:

50 mM NaH₂PO₄ / HCl pH 7.5
 500 mM NaCl
 1 M Imidazol
 1.0 Liter wird hergestellt.
 Einwaage: 6.9 g NaH₂PO₄
 29.2 g NaCl
 68.1 g Imidazol
 Zugabe von 900 ml H₂O dest.
 pH eingestellt mit HCl (25%) auf 7.5
 ad 1000 ml mit H₂O dest.
 Vakuumfiltration mit VacuCap 60 0.2 µm

Superdex 200 - Puffer:

50 mM NaH₂PO₄ / NaOH pH 7.5
 100 mM NaCl
 1.0 Liter werden hergestellt.
 Einwaage: 6.9 g NaH₂PO₄
 5.84 g NaCl
 Zugabe von 900 ml H₂O dest.
 pH eingestellt mit 10M NaOH auf 7.5
 Vakuumfiltration mit VacuCap 60 0.2 µm

Stabilisierungspuffer:

Superdex 200 – Puffer + 50% Saccharose

2.SDS-ElektrophoreseSample Buffer (2X) (reduzierend, 0.1 M DTT):

2.0 ml werden hergestellt

1.0 ml Sample Buffer (4X)

0.8 ml H₂O dest.

0.2 ml 1M DTT

2.0 ml

Running Buffer:

Running Buffer (20X) wird vor Gebrauch 1:20 mit H₂O dest. Verdünnt.

Fixierlösung:

Für 2 Gele benötigt man:

80 ml H₂O dest.

100 ml Methanol

20 ml Essigsäure

Färbelösung:

Für 2 Gele benötigt man:

110 ml H₂O dest.

40 ml Methanol

40 ml Stainer A Colloidal Blue Stain Kit

10 ml Stainer B Colloidal Blue Stain Kit → wird zeitversetzt zugegeben (nach Packungsbeilage)

Vorgehen:

- 50 ml Lysepuffer 2 werden auf 2 Gefäße mit gefrorener Biomasse (6.6 g und 4.3 g) aufgeteilt. Die Biomasse wird mit einem Plastikspatel von der Gefäßwand gelöst. Die beiden Lösungen werden gepoolt und mit einem Plümper homogenisiert, so dass eine homogene Suspension entsteht. Diese wird 30 Minuten im Eisbad gerührt.
- Anschließend wird die Suspension mittels French Press komplett aufgeschlossen. Da pro Durchgang maximal 8 ml aufgeschlossen werden können, wird die Suspension in mehreren Durchgängen aufgeschlossen.
- Zentrifugation der trüben Flüssigkeit, 12000 x g, 30 min, 4°C.
- Überstand wird quantitativ in einen 100 ml Messzylinder überführt (V = 52 ml). Das Pellet wird verworfen.
- Vom Überstand wird ein Rückmuster von 200 µl für die Analytik entnommen (→ bei -20°C eingefroren).
- Der Überstand wird nun 1:5 mit Lysepuffer 1 verdünnt. Filtration mittels VacuCap 60 0.45 µm → sehr zäh. Gewechselt auf VacuCap 90 0.8/0.2 µm → V = 255 ml.
- Rückmuster von 200 µl für die Analytik (→ bei -20°C eingefroren).
- HisTrap HP 5 ml Gelbett mit Lysepuffer 1 eingespült (Flussrate 2 ml/min, 10 SV).
- Aufschluss mit einer Flussgeschwindigkeit von 2 ml/min aufgetragen.
- Durchlauf wird gesammelt.
- Anschließend wird mit 4 SV Lysepuffer 1 und einer Flussgeschwindigkeit von 2 ml/min gespült.
- Säule wird über Nacht bei Raumtemperatur stehen gelassen → kein Fluss.
- Gespült mit 10 SV Waschpuffer (10 mM Imidazol).
- Durchlauf wird gesammelt.
- Elution des gesuchten Proteins mit Imidazolgradient bis 1 M Imidazol (Gradient: 20 SV und 2ml/min).
- Es werden 2ml Fraktionen gesammelt.
- Chromatogramm siehe Anlage 1.
- Proteinpeak bei 11 % Elutionspuffer → keine weitere Elution über den restlichen Gradienten.
- Das Protein befindet sich in einer ungefähren Imidazolkonzentration von 120 mM.

- Regenerierung von Ni-NTA:
 1. 15 SV Puffer (Gua) pH 7.0, 50 mM EDTA
 2. 15 SV H₂O (destilliert und gefiltert)
 3. 15 SV 0.5 M NaOH
 4. 15 SV H₂O(destilliert und gefiltert)
 5. 3 SV 100mM NiCl₂
 6. 15 SV H₂O(destilliert und gefiltert)
 7. H₂O, 0.095 % NaN₃
- Von allen Proteinhaltigen Lösungen und Fraktionen wird der Proteingehalt bei OD 280 nm bestimmt.

1.	Durchlauf	Verdünnung 1:100
2.	Waschlauf mit Lysepuffer	unverdünnt
3.	Waschlauf mit Waschpuffer (10mM Imidazol)	unverdünnt
4.	Fraktion Nummer 42	unverdünnt
5.	Fraktion Nummer 43	Verdünnung 1:100
6.	Fraktion Nummer 44	Verdünnung 1:100
7.	Fraktion Nummer 45	Verdünnung 1:100
8.	Fraktion Nummer 46	Verdünnung 1:100
9.	Fraktion Nummer 47	Verdünnung 1:20
10.	Fraktion Nummer 48	Verdünnung 1:20
11.	Fraktion Nummer 49	Verdünnung 1:20
12.	Fraktion Nummer 50	Verdünnung 1:20
13.	Fraktion Nummer 51	Verdünnung 1:20
14.	Fraktion Nummer 52	Verdünnung 1:20
15.	Fraktion Nummer 53	Verdünnung 1:20
16.	Fraktion Nummer 54	Verdünnung 1:20
17.	Fraktion Nummer 55	Verdünnung 1:20

- Originaldaten der Proteinbestimmung siehe Anlage 2.
- Zur Berechnung der Proteinkonzentration bei den Fraktionen 42-55 wird folgende Formel verwendet:

$$\frac{\text{OD (Abs 280nm)}}{0.329} \quad \times \text{Verdünnung}$$

Bei den anderen Lösungen setzt man gleich 1.

Ergebnis

Id.	Konzentration mg/ml	Volumen ml	Gesamter Proteingehalt mg
Durchlauf	10	276	2760
Waschlauf mit Lysepuffer	10	28	280
Waschlauf mit Waschpuffer (10mM Imidazol)	0.9	44	39.6
Fraktion Nummer 42	1.65	2	3.30
Fraktion Nummer 43	8.39	2	16.8
Fraktion Nummer 44	10.5	2	21.0
Fraktion Nummer 45	9.48	2	19.0
Fraktion Nummer 46	6.41	2	12.8
Fraktion Nummer 47	4.75	2	9.50
Fraktion Nummer 48	2.94	2	5.88
Fraktion Nummer 49	2.20	2	4.40
Fraktion Nummer 50	1.62	2	3.24
Fraktion Nummer 51	1.48	2	2.96
Fraktion Nummer 52	0.981	2	1.96
Fraktion Nummer 53	0.592	2	1.18
Fraktion Nummer 54	0.425	2	0.850
Fraktion Nummer 55	0.340	2	0.680

- Von sämtlichen Proben wird ein SDS-Gel angefertigt (siehe Anlage 3).
Wo nötig werden die Proben auf 1 mg/ml verdünnt (mit 50 mM NaH₂PO₄ / NaOH pH 8.0).
- Poolen der Fraktionen 49-53.
- Das Material ist laut SDS-Gel nicht sehr rein und muss in einem zusätzlichen Schritt nochmals gereinigt werden.
- Rückmuster des Pools für Analytik, 300 µl.
- Einkonzentrieren der Lösung auf 500µl mittels Centrifugation Filter Devices bei 4000 x g für 12 Minuten.
- Rückmuster für Analytik, 20 µl.

Molekularsiebreinigung des Pools auf Superdex 200 HR 10/30:

- Einspülen der Säule (Superdex 200) mit Superdex 200 – Puffer, Flussgeschwindigkeit 1.0 ml/min.
- 50 µl HPLC-Standard mit einer Flussgeschwindigkeit von 1.0 ml/min aufgetragen.
- Testlauf mit 20 µl Probe.
- Reinigung des Pools (auf zwei Läufe aufgeteilt, pro Lauf ca 200 µl injiziert).
- Chromatogramme siehe Anlage 4.
- Es werden zwei Pools gesammelt: Pool 1: 11.0 – 12.8 min
Pool 2: 12.8 – 13.8 min
- Regeneration der Säule:
5 ml 50 mM NaH₂PO₄ / NaOH pH 7.5, 6 M Guanidin
Anschließend mit 10 SV H₂O, 0.095% NaN₃

- Proteinbestimmung der beiden Pools sowie der Rückmuster bei 280 nm.
 1. Rückmuster des Pools der Proben 49-53 Verdünnung 1:10
 2. Rückmuster des konzentrierten Pools der Proben 49-53 Verdünnung 1:100
 3. Fraktion 11.0-12.8 unverdünnt
 4. Fraktion 12.8-13.8 unverdünnt

Originaldaten der Proteinbestimmung siehe Anlage 5.

- Zur Berechnung der Proteinkonzentration wird folgende Formel verwendet:

$$\frac{\text{OD (Abs 280nm)}}{0.329} \times \text{Verdünnung}$$

- Ergebnis:

Id.	Konzentration mg/ml	Volumen ml	Gesamter Proteingehalt mg
Rückmuster des Pools der Fraktionen 49-53	1.45	0.3	0.435
Rückmuster des konzentrierten Pools der Fraktionen 49-53	18.6	0.02	0.375
Pool 11.0 – 12.8	0.179	3.6 ml	0.644
Pool 12.8 – 13.8	1.17	2 ml	2.34

- Von allen vier Proben wird ein SDS-Gel angefertigt (siehe Anlage 6).
- Hierfür wird der Pool 11.0 – 12.8 ca. um den Faktor 10 mittels Centrifugation Filter Devices bei 2500 x g für 10 min einkonzentriert. Die übrigen Proben werden auf 1 mg/ml verdünnt (mit 50 mM NaH₂PO₄ / NaOH pH 8.0).
- Das gesuchte Protein befindet sich im Pool 12.8-13.8 und ist laut SDS-Gel relativ rein.
- Dieser Pool wird durch Zugabe von 6% Saccharose stabilisiert. Pro ml Proteinlösung werden 136.4 µl Stabilisierungspuffer zugegeben.

Vol. SKP-p53 (11-35): 1860 µl
Zugabe Stabilisierungspuffer: 254 µl

→ 2.114 ml mit einer Proteinkonzentration von 1.03 mg/ml

- Aliquotiert à 250 µl und bei -80°C eingelagert

SKP-p53(11-35)-h6

Lot 080805SF24_10

1.03 mg/ml x 0.25 ml

in 50 mM NaH₂PO₄/NaOH pH 7.5, 100 mM NaCl, 6% Saccharose

13.08.08 C.Ott

Fixed Wavelength

Company: Roche Diagnostics GmbH
 Office: Penzberg

Name:
 Rev.:
 Project :

User: Besitzer
 Dept.: DXR-NR3
 Photometer: 281
 Wavelength: 280,00 nm
 Date of Acquisition: 06.08.2008 14:32:27 UTC+02:00
 Method: U_E280_Halbmikro
 Rev.: 0
 Average: 1 s
 Delay: 0
 Factor: 1,0000
 Temp: 0,0

ID	Description	Multiplier	Divisor	Abs 1	Result
S1	Durchlauf			0,0951	0,095
S2	Wash			0,4855	0,485
S3	Imidazol			0,8883	0,888
S4	42			0,5436	0,544
S5	43 1:100			0,0276	0,028
S6	44 1:100			0,0347	0,035

Remark :

Anlage Nr.: 3... Seite A... von 4...
 Folie Nr.: 10... Ordner Nr.: 24...
 Protokollseiten: 33 bis 34
 Datum : 06.08.08
 Bearbeiter: S. Freiburghaus

Fixed Wavelength

Company: Roche Diagnostics GmbH
Office: Penzberg

Name:
Rev.: **Project :**

User: Besitzer Method : U_E280_Halbmikro
Dept.: DXR-NR3 Rev.: 0
Photometer: 281 Average : 1 s
Wavelength: 280,00 nm Delay: 0
Date of Acquisition 06.08.2008 14:38:00 UTC+02:00 Factor: 1,0000
Temp: 0,0

ID	Description	Multiplier	Divisor	Abs 1	Result
S1	45 1:100			0,0312	0,031
S2	46 1:100			0,0211	0,021
S3	47 1:20			0,0782	0,078
S4	48 1:20			0,0483	0,048
S5	49 1:20			0,0362	0,036
S6	50 1:20			0,0267	0,027

Remark :

Anlage Nr.: 2 Seite 2 von 4
Folie Nr.: 10 Ordner Nr.: 24
Protokollseiten: 24 bis 34
Datum : 06.08.08
Bearbeiter: S. Freiburghaus

Fixed Wavelength

Company: Roche Diagnostics GmbH
 Office: Penzberg

Name:
Rev.: **Project :**

User: Besitzer
 Dept.: DXR-NR3
 Photometer: 281
 Wavelength: 280,00 nm
 Date of Acquisition: 06.08.2008 14:41:24 UTC+02:00
 Method: U_E280_Halbmikro
 Rev.: 0
 Average: 1 s
 Delay: 0
 Factor: 1,0000
 Temp: 0,0

ID	Description	Multiplier	Divisor	Abs 1	Result
S1	51 1:20			0,0212	0,021
S2	52 1:20			0,0143	0,014
S3	53 1:20			0,0084	0,008
S4	54 1:20			0,0053	0,005
S5	55 1:20			0,0047	0,005

Remark :

Anlage Nr.: 3... Seite 3... von 4
 Folie Nr.: 10... Ordner Nr.: 24
 Protokollseiten: 224 bis 224
 Datum : 06.08.08
 Bearbeiter: S. Freiburghaus

Fixed Wavelength

Company: Roche Diagnostics GmbH
 Office: Penzberg

Name:
Rev.: **Project :**

User: Besitzer
 Dept.: DXR-NR3
 Photometer: 281
 Wavelength: 280,00 nm
 Date of Acquisition: 06.08.2008 15:02:46 UTC+02:00
 Method : U_E280_Halbmikro
 Rev.: 0
 Average : 1 s
 Delay: 0
 Factor: 1,0000
 Temp: 0,0

ID	Description	Multiplier	Divisor	Abs 1	Result
S1	51			0,4858	0,486
S2	52			0,3227	0,323
S3	53			0,1947	0,195
S4	54			0,1399	0,140
S5	55			0,1118	0,112

*Diese Fraktionen wurden unverdünnt
 nochmal nachgemessen.*

Remark :

Anlage Nr.: 2 Seite 4 von 4
 Folie Nr.: 10 Ordner Nr. 24
 Protokollseiten: 34 bis 34
 Datum : 14.08.08
 Bearbeiter: S. Freiburghaus

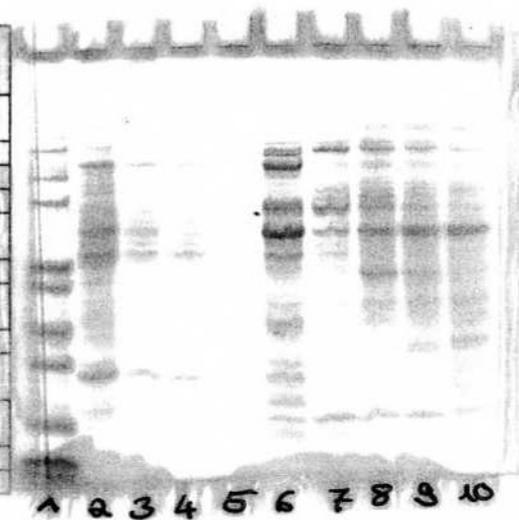
SDS-Gel Analytik SKP-p53(11-35)

SDS-Gel	NuPage 4-12% Bis-Tris , INVITROGEN, NP0321
Laufpuffer	NuPage MES SDS 20 x, INVITROGEN, NP0002
Marker	Mark12 Unstained Standard Invitrogen , LC5677
Sample Buffer	NuPage LDS Sample Buffer 4x, INVITROGEN, NP0007 wird mit H ₂ O verdünnt; +/- Zugabe von 100 mM DTT
Running Conditions	35 min, 200 V, 120 mA
Färbung	Novex Stainer A INVITROGEN Nr. 46-7015
	Novex Stainer B INVITROGEN Nr. 46-7016

Probenanordnung SDS-Gel 1

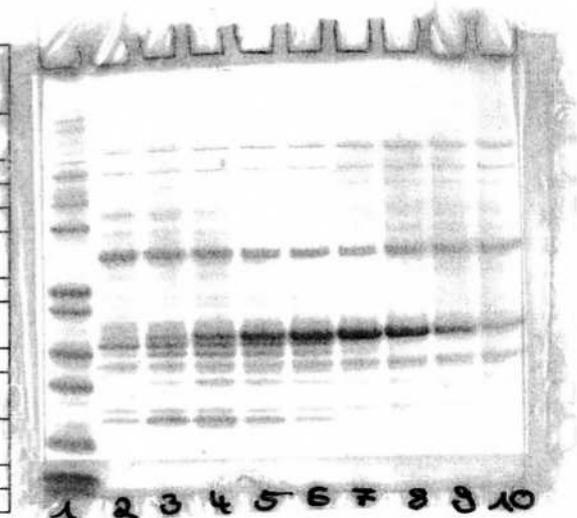
Bahn	Probe	Vol µl
1	Mark12 unverd.	15
2	Aufschluss	20
3	Auftrag	20
4	Durchlauf	20
5	Waschlauf mit Lysepuffer	20
6	Waschlauf mit 10mM Imidazol	20
7	Fraktion Nummer 42	20
8	Fraktion Nummer 43	20
9	Fraktion Nummer 44	20
10	Fraktion Nummer 45	20

Protein	Appr..Mol. Weight (kDa)
Myosin	200
β-galactosidas	116.3
Phosphorylase B	97.4
BSA	66.3
Glutamic dehydrogenase	55.4
Lactate dehydrogenase	36.5
Carbonic anhydrase	31.0
Trypsin inhibitor	21.5
Lysozyme	14.4
Aprotinine	6.0
Insulin B chain	3.5
Insulin A chain	2.5

**Probenanordnung SDS-Gel 2**

Bahn	Probe	Vol µl
1	Mark12 unverd.	15
2	Fraktion Nummer 46	20
3	Fraktion Nummer 47	20
4	Fraktion Nummer 48	20
5	Fraktion Nummer 49	20
6	Fraktion Nummer 50	20
7	Fraktion Nummer 51	20
8	Fraktion Nummer 52	20
9	Fraktion Nummer 53	20
10	Fraktion Nummer 54	20

Protein	Appr..Mol. Weight (kDa)
Myosin	200
β-galactosidas	116.3
Phosphorylase B	97.4
BSA	66.3
Glutamic dehydrogenase	55.4
Lactate dehydrogenase	36.5
Carbonic anhydrase	31.0
Trypsin inhibitor	21.5
Lysozyme	14.4
Aprotinine	6.0
Insulin B chain	3.5
Insulin A chain	2.5



Anlage Nr.: 3 Seite 1 von 1
 Folie Nr.: 10 Ordner Nr.: 24
 Protokollseiten: 99429 bis 99434
 Datum: 14.08.08
 Bearbeiter: S. Freiburghaus

Superdex 200 HR 10/30

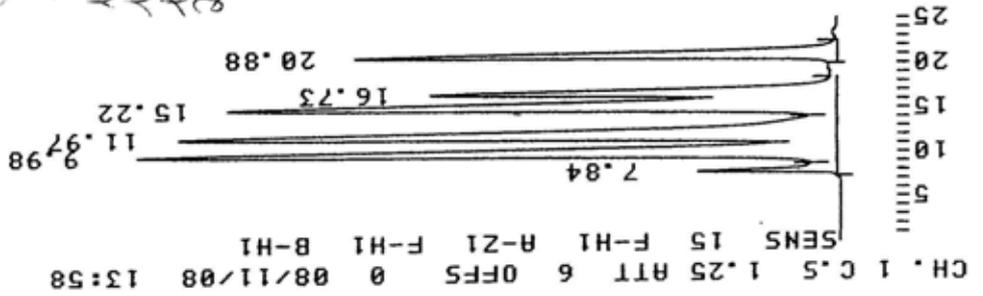
Flow: 1 ml/min

λ: 280 nm

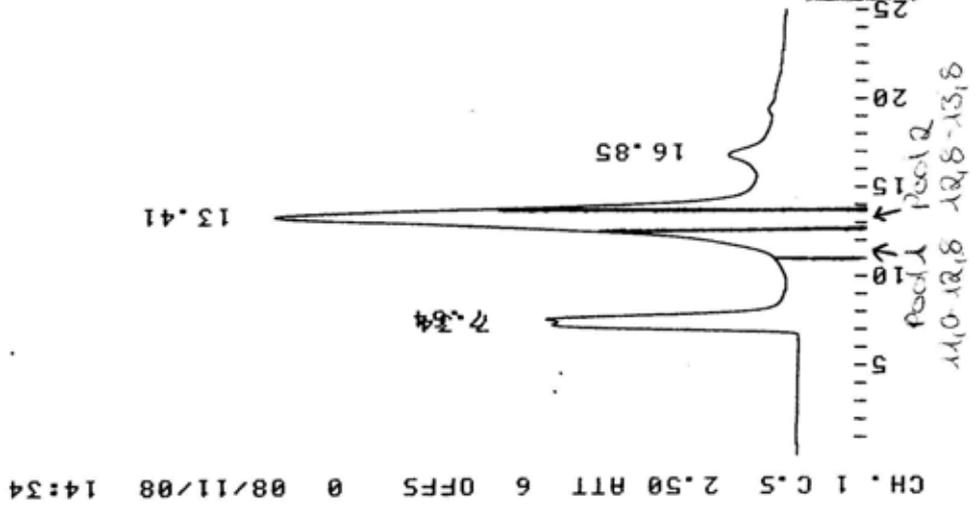
Buffer: 50 mM NaH_2PO_4 / NaOH pH 7,5
100 mM NaCl

50 µl · Eichmisch:

9,98: 465 000 Da
11,97: 150 000 Da
15,22: 50 000 Da
16,73: 14 000 Da
20,88: 238 Da



Probelauf mit 20 µl Pool 49-53 konz.



Anlage Nr.: 4... Seite 1... von 2...
Folie Nr.: 10... Ordner Nr.: 24...
Protokollseiten: 824-83 bis 884-89
Datum: 11.08.08
Bearbeiter: S. Freiburghaus

Superdex 200 HR 10/30

Flow 1ml/min
280 nm
Puffer 50 mM NaH₂PO₄ | NaOH pH 7,5
100 mM NaCl

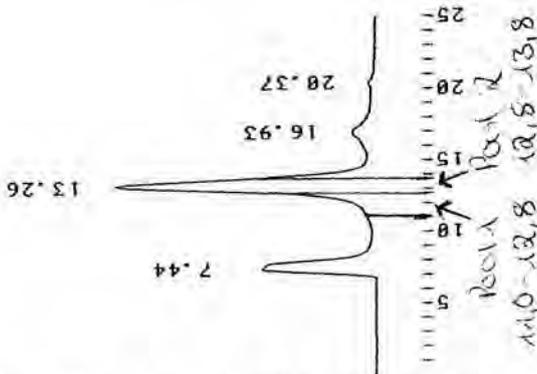
250 ul injiziert

08/11/08 15:25

METHOD: TSK TAG: 57 CH: 1
FILE: 1 CALC-METHOD: AREA TABLE: 0 CONC: AREA

NO.	RT	AREA	CONC	BC
1	7.44	7335075	24.234	
2	13.26	19580516	64.693	
3	16.93	2957032	9.769	
4	20.37	394032	1.301	
TOTL		30266655		100.000

PERK REJ : 250



CH. 1 C.5 2.50 RTT 10 OFFS 0 08/11/08 15:25

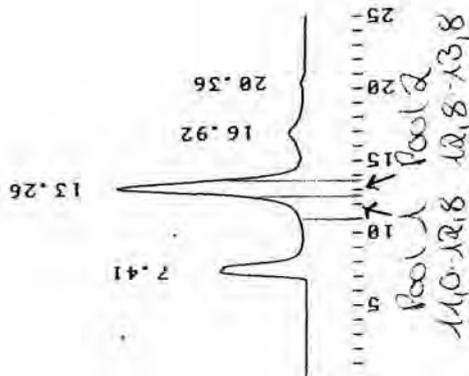
210 ul injiziert

08/11/08 15:55

METHOD: TSK TAG: 58 CH: 1
FILE: 1 CALC-METHOD: AREA TABLE: 0 CONC: AREA

NO.	RT	AREA	CONC	BC
1	7.41	5753728	25.069	
2	13.26	14644227	63.805	
3	16.92	2227630	9.705	
4	20.36	325734	1.419	
TOTL		22951319		100.000

PERK REJ : 250



AWLAGE Nr.: 4... Seite 26... von 26
 Folle Nr.: 10... Ordnung Nr.: 26
 Protokollseiten: 20 bis 24
 Datum: 14.08.08
 Bearbeiter: S. Freiburghaus

Fixed Wavelength

Company: Roche Diagnostics GmbH
 Office: Penzberg

Name:
 Rev.:
 Project :

User: Besitzer Method : U_E280_Halbmikro
 Dept.: DXR-NR3 Rev.: 0
 Photometer: 281 Average : 1 s
 Wavelength: 280,00 nm Delay: 0
 Date of Acquisition: 12.08.2008 09:59:38 UTC+02:00 Factor: 1,0000
 Temp: 0,0

ID	Description	Multiplier	Divisor	Abs 1	Result
S1	Pool 1:10			0,0476	0,048
S2	kontroll: 1:100			0,0612	0,061

Remark :

Anlage Nr.: 5... Seite 3
 Folie Nr.: 10. Ordner Nr. 17
 Protokollseiten: 24 bis 27
 Datum : 12.08.08
 Bearbeiter: S. Freiburghaus

Fixed Wavelength

Company: Roche Diagnostics GmbH
 Office: Penzberg

Name:
 Rev.: **Project :**

User: Besitzer Method : U_E280_Halbmikro
 Dept.: DXR-NR3 Rev.: 0
 Photometer: 281 Average : 1 s
 Wavelength: 280,00 nm Delay: 0
 Date of Acquisition 12.08.2008 10:02:32 UTC+02:00 Factor: 1,0000
 Temp: 0,0

ID	Description	Multiplier	Divisor	Abs 1	Result
S1	11.0-12.8			0,0590	0,059
S2	12.8-13.8			0,3847	0,385

Remark :

Anlage Nr.: 5 Seite 2 von 3
 Folie Nr.: 10 Ordner Nr. 24
 Protokollseiten: 11 bis 12
 Datum : 12.08.08
 Bearbeiter: S. Freiburghaus

Scan

Company: Roche Diagnostics GmbH

Office: Penzberg

Name:

Rev.:

Project :

User: Besitzer

Method : Spektrum-Halbmikro Sonja

Dept.: DXR-NR3

Rev.: 0

Photometer: 281

Scan Interval: 1

Date of Acquisition 12.08.2008 15:57:29 UTC+02:00

Scan Speed: 200

Smooth: None

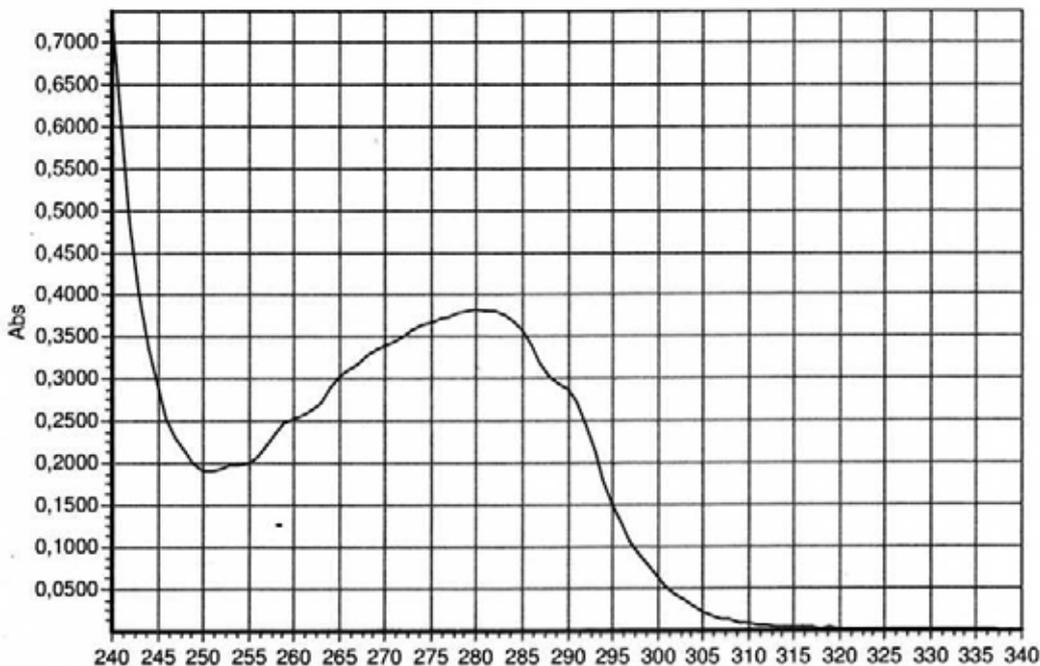
Temp: 0,0

Chart function:

Sample	Description		

Pool 12,8-13,8
 SKP-p53(11-35)-h6 unverdünnt

Remark:



Sample 1

Anlage Nr.: ... Seite ... von ...
 Folie Nr.: ... Ordner Nr. ...
 Protokollseiten: ... bis ...
 Datum: ...
 Bearbeiter: S. Freiburghaus

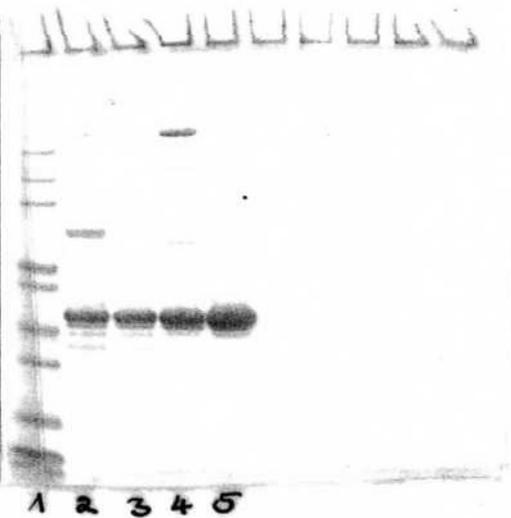
SDS-Gel Analytik SKP-p53(11-35)

SDS-Gel	NuPage 4-12% Bis-Tris , INVITROGEN, NP0321
Laufpuffer	NuPage MES SDS 20 x, INVITROGEN, NP0002
Marker	Mark12 Unstained Standard Invitrogen , LC5677
Sample Buffer	NuPage LDS Sample Buffer 4x, INVITROGEN, NP0007 wird mit H ₂ O verdünnt; +/- Zugabe von 100 mM DTT
Running Conditions	35 min, 200 V, 120 mA
Färbung	Novex Stainer A INVITROGEN Nr. 46-7015 Novex Stainer B INVITROGEN Nr. 46-7016

Probenanordnung SDS-Gel 1

Bahn	Probe	Vol µl
1	Mark12 unverd.	15
2	Pool 49 - 53	20
3	Pool 49 - 53 konz.	20
4	11.0 - 12.8	20
5	12.8 - 13.8	20
6	Sample Buffer (2x)	20
7	Sample Buffer (2x)	20
8	Sample Buffer (2x)	20
9	Sample Buffer (2x)	20
10	Sample Buffer (2x)	20

Protein	Appr..Mol. Weight (kDa)
Myosin	200
β-galactosidas	116.3
Phosphorylase B	97.4
BSA	66.3
Glutamic dehydrogenase	55.4
Lactate dehydrogenase	36.5
Carbonic anhydrase	31.0
Trypsin inhibitor	21.5
Lysozyme	14.4
Aprotinine	6.0
Insulin B chain	3.5
Insulin A chain	2.5



Anlage Nr.: 6 Seite 1 von 1
 Folie Nr.: 10 Ordner Nr.: 24
 Protokollseiten: 29 bis 34
 Datum: 14.08.08
 Bearbeiter: S. Freiburghaus

2.) Praktikumsfotos





3.) Verwendete Internetseiten: