

Protokoll Versuch A2

Expressionstests von D1D2 in
verschiedenen *E. coli*-Stämmen

Gruppe 8

Susanne Duncker und Friedrich Hahn

Einleitung und Aufgabenstellung

In Versuch A1 stellten wir einen das Gen für Tyro3-D1D2 enthaltenden Expressionsvektor her. Mit Hilfe von Expressionstests untersuchten wir in diesem Versuch, wie das Tyro3-D1D2-Protein in verschiedenen Bakterienstämmen exprimiert wird.

Teilversuch 1: Transformation der drei *E. coli*-Stämme

Bevor wir mit dem Versuch beginnen konnten, mussten wir geeignete *E. coli*-Stämme für unser Experiment auswählen. Im Skript auf S. 27 sind die möglichen, uns zur Verfügung stehenden Stämme aufgelistet.

Wir entschieden uns für die folgenden drei Stämme:

- BL21(DE3)
 - o F⁻: Stamm enthält kein F-Plasmid → Gene werden nicht horizontal übertragen
 - o ompT: Stamm besitzt keine *outer membrane protease* → fremde / exprimierte Proteine werden nicht abgebaut
 - o hsdS_B(r_B⁻m_B⁻): verhindert Methylierung und Restriktion bestimmter Sequenzen
 - o gal: kann keine Galaktose verwerten → Fähigkeit wird nur durch evtl. aufgenommenen Vektor erbracht
 - o dcm: keine Methylierung der Cytosine in der Sequenz CCWGG
 - o (DE3): enthält einen Lambda-Prophagen, in dem das Gen für die T7-Polymerase unter der Kontrolle des lacUV5-Promotors steht
- BL21(DE3) pREP4::groESL
 - o F⁻: Stamm enthält kein F-Plasmid → Gene werden nicht horizontal übertragen
 - o ompT: Stamm besitzt keine *outer membrane protease*
 - o hsdS_B(r_B⁻m_B⁻): verhindert Methylierung und Restriktion bestimmter Sequenzen
 - o gal: kann keine Galaktose verwerten → Fähigkeit wird nur durch evtl. aufgenommenen Vektor erbracht
 - o dcm: keine Methylierung der Cytosine in der Sequenz CCWGG
 - o (DE3) : enthält einen Lambda-Prophagen, in dem das Gen für die T7-Polymerase unter der Kontrolle des lacUV5-Promotors steht
 - o pREP4::groESL (Kan^R): enthält Vektor mit Kanamycinresistenz
- Rosetta(DE3)
 - o F⁻: Stamm enthält kein F-Plasmid → Gene werden nicht horizontal übertragen
 - o ompT: Stamm besitzt keine *outer membrane protease*
 - o hsdS_B(r_B⁻m_B⁻): verhindert Methylierung und Restriktion bestimmter Sequenzen
 - o gal: kann keine Galaktose verwerten → Fähigkeit wird nur durch evtl. aufgenommenen Vektor erbracht
 - o dcm: keine Methylierung der Cytosine in der Sequenz CCWGG
 - o (DE3) : enthält einen Lambda-Prophagen, in dem das Gen für die T7-Polymerase unter der Kontrolle des lacUV5-Promotors steht
 - o pRARE2 (Cam^R): enthält ein Cam^R-Plasmid, das die tRNA-Gene für in *E. coli* selten verwendete Codons trägt → fremde Proteine können exprimiert werden

Mit diesen drei Stämmen, im folgenden nur noch BL21 (für BL21(DE3)), pREP (für BL21(DE3) pREP4::groESL) und Rosetta (für Rosetta(DE3)) genannt, führten wir unsere weiteren Experimente durch.

Die drei Stämme wurden nach der Anleitung im Skript auf S. 28 transformiert und auf Agarplatten ausplattiert, so dass während der Inkubation der Platten über Nacht im Brutschrank bei 37 °C transformierte Kolonien wachsen konnten.

Teilversuch 2: Expressionstest

Aus jedem transformierten Stamm waren Kolonien gewachsen (s. Tabelle 1). Von jeder Platte wurden zwei Kolonien gepickt und gemäß der Anleitung im Skript auf S. 28 für die Animpfung von Vorkulturen verwendet. Die Vorkulturen wurden am nächsten Tag photometrisch vermessen und gemäß der Angabe im Skript für das Animpfen von jeweils 8 ml Hauptkultur mit einer oD_{600} (optische Dichte bei 600 nm Absorption) von 0,08 verwendet (s. Tabelle 2). Die Hauptkulturen wurden laut Skript drei Stunden lang im Schüttler bei 37 °C inkubiert.

Stamm	Anzahl Kolonien
BL21	39
pREP	13
Rosetta	42

Tabelle 1: Koloniezahlen nach Transformation

Stamm	oD_{600} Vorkultur	Menge zum Animpfen der Hauptkultur
BL21.1	1,38	0,464 ml
BL21.2	1,34	0,478 ml
pREP.1	1,30	0,492 ml
pREP.2	1,42	0,450 ml
Rosetta.1	1,04	0,615 ml
Rosetta.2	0,99	0,646 ml

Tabelle 2: photometrische Daten der Vorkultur

Nach dreistündiger Inkubation wurde die oD_{600} der Hauptkultur gemessen (s. Tabelle 3).

Inkubationsansatz	oD_{600}
BL21.1	1,029
BL21.2	0,936
pREP.1	1,068
pREP.2	0,915
Rosetta.1	0,763
Rosetta.2	0,727

Tabelle 3: photometrische Daten der Hauptkultur

Es wurde weiter laut Skript S. 29 verfahren, sprich: Abnehmen der Proben 1, Induktion und Inkubation der Hauptkulturen, Abnehmen der Proben 2 und 3.

Die Aufarbeitung der abgenommenen 18 Proben (pro Klon drei Proben) erfolgte nach den Anweisungen im Skript, wobei die Proben nicht in Puffer aufgenommen und aufgekocht, sondern direkt eingefroren wurden.

Am nächsten Tag wurden die eingefrorenen Proben aufgetaut und für die SDS-Gelelektrophorese vorbereitet. Die Proben 1 und 2 wurden, wie laut Skript eigentlich am Tag vorher geplant, mit Probenpuffer versetzt, aufgekocht und bis zum Auftragen auf das SDS-Gel wieder eingefroren.

Mit den Proben 3 wurde laut Skript verfahren (Aufschluss der Zellen, Trennung von löslichem (→ Proben 3a) und in den Inclusion Bodies enthaltenem unlöslichem Protein (→ Proben 3b)).

Teilversuch 3: SDS-Gelelektrophorese

Die SDS-Gele wurden nach den Anweisungen im Skript vorbereitet, beladen, laufen gelassen sowie ge- und entfärbt. Das Ergebnis unserer SDS-Gelelektrophorese ist in den Abbildungen 1a und 1b zu sehen.

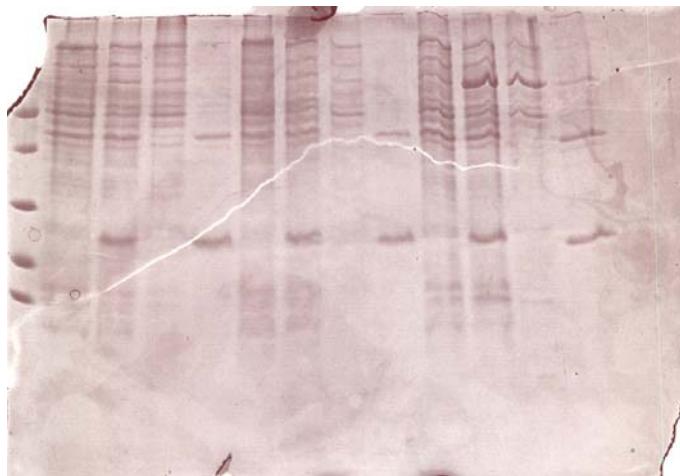


Abb. 1a: SDS-Gelelektrophorese, Gel 1

Auftragsschema: 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13

- 1) peqlab Proteinmarker 1 als Standard
- 2) BL21(DE3).1, Probe 1 (vor Induktion)
- 3) BL21(DE3).1, Probe 2
- 4) BL21(DE3).1, Probe 3a
- 5) BL21(DE3).1, Probe 3b
- 6) BL21(DE3).2, Probe 1 (vor Induktion)
- 7) BL21(DE3).2, Probe 2
- 8) BL21(DE3).2, Probe 3a
- 9) BL21(DE3).2, Probe 3b
- 10) BL21(DE3) pRER4::groESL.1, Probe 1 (vor Induktion)
- 11) BL21(DE3) pRER4::groESL.1, Probe 2
- 12) BL21(DE3) pRER4::groESL.1, Probe 3a
- 13) BL21(DE3) pRER4::groESL.1, Probe 3b

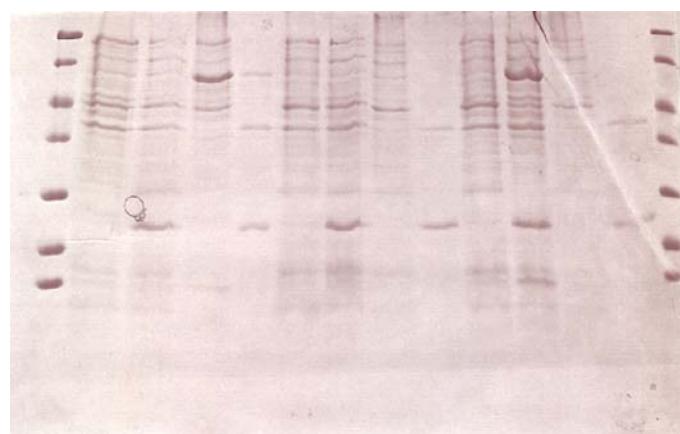


Abb. 1b: SDS-Gelelektrophorese, Gel 2

Auftragsschema: 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15

- 1) leer
- 2) peqlab Proteinmarker 1 als Standard
- 3) BL21(DE3) pRER4::groESL.2, Probe 1 (vor Induktion)
- 4) BL21(DE3) pRER4::groESL.2, Probe 2 *

- 5) BL21(DE3) pRER4::groESL.2, Probe 3a
- 6) BL21(DE3) pRER4::groESL.2, Probe 3b
- 7) Rosetta(DE3).1, Probe 1 (vor Induktion)
- 8) Rosetta(DE3).1, Probe 2
- 9) Rosetta(DE3).1, Probe 3a
- 10) Rosetta(DE3).1, Probe 3b
- 11) Rosetta(DE3).2, Probe 1 (vor Induktion)
- 12) Rosetta(DE3).2, Probe 2
- 13) Rosetta(DE3).2, Probe 3a
- 14) Rosetta(DE3).2, Probe 3b
- 15) peqlab Proteinmarker 1 als Standard

Ergebnis

Betrachtet man die beiden Gele, fällt auf, dass vor der Induktion mit IPTG (jeweils die Spur, in der Probe 1 läuft) keine Proteinbande bei ca. 20 kDa zu sehen ist. Die Spuren, die jeweils Probe 2 enthalten, zeigen zu den Proben 1 bis auf die ca. 20 kDa-Bande keinen Unterschied, was nahe legt, dass es sich bei dieser Bande um das exprimierte Tyro3-D1D2-Fragment handelt. Die Proben 3a und 3b unterscheiden sich jeweils sehr deutlich und würden bei Überlagerung die Spur von Probe 2 ergeben – hier haben sich also lösliche von unlöslichen Proteinen getrennt, die in Probe 2 noch beide in der gleichen Spur zu sehen sind. Hier zeigt sich auch, dass das von uns eingebrachte Tyro3-D1D2-Fragment ein unlösliches Protein ist, welches in den (für die Proben 3b jeweils aufgereinigten) Inclusion Bodies enthalten war. Vergleicht man nun die verschiedenen Stämme, so zeigt sich, dass das Fragment in allen drei Stämmen gleich gut exprimiert worden ist.