

Protokoll Versuch C1

Präparative Rückfaltung und Reinigung von Tyro3-Mutanten

Gruppe 8

Susanne Duncker und Friedrich Hahn

Versuch C1: Präparative Rückfaltung, Reinigung von Tyro3-Mutanten

Ziel des Versuchs

In diesem Versuch soll das Tyro3-D1D2-Fragment als Wildtyp- und zwei Mutantenformen aus Inclusion Bodies von E. coli isoliert werden. Anschließend wird dieses solubilisiert und wieder zurückgefaltet. Durch Anionenaustauschchromatographie wird das Protein gereinigt und schließlich in einer analytischen Gelfiltration bezüglich seines Dimerisierungsverhaltens untersucht.

Teilversuch 1: Zellaufschluss und Isolierung der Inclusion Bodies

Da sich das heterolog exprimierte Tyro3-Fragment in E. coli als Inclusion Bodies anreichert, muss das Protein aus diesen extrahiert werden. Unter Inclusion Bodies versteht man eine Aggregation von überexprimiertem Fremdprotein, welche aber gut zu isolieren sind und das gewünschte Protein in hoher Reinheit und großer Menge enthalten. Unsere Gruppe arbeitet mit der Ile59Arg-Mutante. Für den Aufschluss wird Zellpaste aus 2 Liter Zellkultur in Aufschlusspuffer mit Ultraschall im Eisbad behandelt, fünf mal mit Pause in 30 Zyklen (S. 76). Danach werden mehrere Wasch- und Zentrifugationsschritte gemacht bis man die Inclusion Bodies gereinigt von löslichen Proteinen, welche sich im Überstand befinden, im Pellet hat. Beim zweiten Mal Zentrifugieren werden, anders als im Skript beschrieben, 20ml Zellaufschlusspuffer verwendet. Eine kleine Menge von dem Pellet wird für später abgezweigt und eingefroren.

Die Solubilisierung des Pellets geschieht im Solubilisierungspuffer und noch bestehende Verunreinigungen werden durch Zentrifugation entfernt.

Teilversuch 2: Rückfaltung

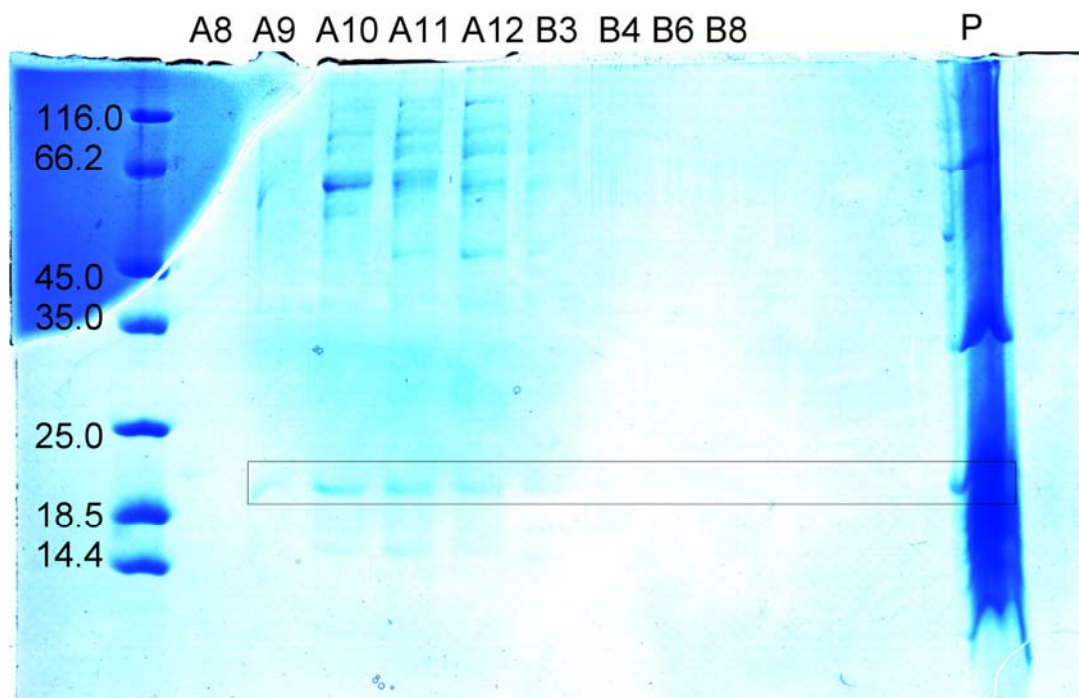
Nach dem schrittweisen Dazupipettieren der Inclusion Body-Lösung zum Rückfaltungspuffer geheimer Zusammensetzung wird nach eingehender Diskussion über die Mondumlaufrichtung von den beiden Rollenspielern (Andrea Thorn und Susanne Duncker) mit dem Assistenten zusammen der kaukasische Beschwörungstanz durchgeführt. Für die Rückfaltung werden die Inclusion Bodies über Nacht bei 4°C inkubiert. Am nächsten Tag ist unsere Lösung klar, es scheint als ob die Rückfaltung bevorzugt zur Aggregation abgelaufen ist.

Teilversuch 3: Anionenaustauschchromatographie mittels Q-Sepharose

Um das durch die Rückfaltungslösung verdünnte Protein wieder zu konzentrieren und weiter aufzureinigen wird die Lösung auf eine Anionenaustauschersäule gegeben. Die Rückfaltungslösung wird dazu filtriert und über Nacht die Säule damit beladen. Die Säule war bereits gegossen und equilibriert. Unser gewünschtes Protein und auch andere Proteine binden dort während die Rückfaltungslösung durchläuft. Die Elution der Proteine geschieht mittels steigendem Salzgradienten. Verschiedene Proteine werden bei unterschiedlichen spezifischen Salzkonzentrationen abgelöst. Die Elution erfolgt so:

- 1. Schritt: Auswaschen nichtgebundener Probe mit 4 Säulenvolumen Puffer A
- 2. Schritt: Gradient 1 von 0 auf 60% Puffer B über 10 Säulenvolumen
- 3. Schritt: Gradient 2 von 60% auf 100% Puffer B über 5 Säulenvolumen
- 4. Schritt: Waschen der Säule mit 100% Puffer B über 5 Säulenvolumen
- 5. Schritt: Reequilibrieren der Säule mit Puffer A (5 Säulenvolumen)

Während der Elution werden 5ml Fraktionen gesammelt und der Durchfluss mittels UV-Detektor untersucht (vgl. Anlage 1). Aus den Fraktionen, die eine hohe Absorption zeigen, werden 15µl Proben entnommen und auf ein SDS-Gel aufgetragen:



Generell kann man sehen, dass relativ wenig Protein vorhanden ist, am meisten in den Fraktionen A10 bis A12 (entspricht dem ersten peak in der UV-Messung). Außerdem sind im ersten peak mehrere Banden zu erkennen, was auf Verunreinigungen schließen lässt. Die gewünschte Bande mit 19,6 kDa ist schwarz markiert und sehr undeutlich. In der P-Spur ist die vorher abgezweigte Pelletprobe aufgetragen. Die Probe ist überladen, man kann aber erkennen, dass dort verschiedene Proteine in unterschiedlichen Größen vorhanden sind. Im zweiten peak ist auf dem Gel nur eine sehr geringe Proteinmenge auszumachen. Wegen der relativ hohen Absorption des zweiten peaks bei 258 nm handelt es sich hier wohl um eine DNA-Kontamination, man sieht dort auch kein Protein im Gel. So arbeiten wir mit dem ersten

peak weiter. Wir poolen die Fraktionen und bestimmen die Proteinkonzentration 2.4 g/l. Die Proben werden mit Hilfe von Zentrifugationskonzentratoren auf etwa 250 µl eingeeengt. Proben dieser Konzentrate werden für alle acht Gruppen auf ein Gel aufgetragen:

Gel einkleben

Die Bande des Tyro3-Fragmentes ist mit einem Kasten markiert. Gruppe 3 hat demnach die höchste Aufreinigung erzielt, es sind kaum andere Bahnen als die des Tyro3-Fragmentes zu erkennen. Bei Gruppe 6 und 8 sind die Tyro3-Banden relativ schwach im Vergleich zu den unerwünschten Proteinen.

Die Beladung und Einstellungen an der Äkta erfolgen durch den Betreuer. Für die Trennung wird eine Superose 12 Säule verwendet, kleinere Proteine brauchen länger um durch diese zu wandern und werden so erst später aus der Säule eluiert.

Gruppen 1 und 2 haben somit den Wildtyp, welcher dimerisiert und so schneller durch die Säule wandert. Gruppen 5 und 7 haben die Ile59Arg-Mutante und Gruppen 4, 6, 3 und 8 die Ile51Arg-Mutante. Die Mutanten dimerisieren nicht und werden so später erst eluiert. Bei Gruppe 8 ist bei etwa 15ml ein großer peak, welcher durch Verunreinigungen entstanden ist. Der peak des gewünschten Proteins ist dabei sehr niedrig ausgefallen (vgl. Anhang 2).