

## Überexpression von Proteinen in E. coli

- **Zur Expression eines Fusionsproteins Konstrukt in E. coli-Zellen transformieren. Für jedes Experiment unbedingt mit frischer Transformation starten. Platte nicht kalt werden lassen. Immer Einzelkolonie picken und in vorgewärmtes Medium geben.**
- 1 Einzelkolonie mit dem gewünschten Plasmid zum Animpfen einer Übernachtskultur mit dem entsprechenden Antibiotikum (hohe Konzentration) animpfen und diese bei 280 rpm und 37 °C inkubieren. Aus der Vorkultur eine 20 ml bis 500 ml große Expressionskultur inokulieren und bei 37 °C und 280 rpm bis zu einer  $OD_{600} = 0.5-1.2$  inkubieren.  **$OD_{600} = 0.8$  guter Startpunkt!**
- Vor Induktion eine Probe der Kultur von 2 ml als nicht-induzierte Negativkontrolle abnehmen und bis zur weiteren Verwendung bei 4 °C aufbewahren.
- Induktion der Expression durch Zugabe des entsprechenden Induktors (oft IPTG; 0.1 – 1 mM; **mit 1 mM starten!**). Nach Zugabe Inkubation der Kultur für 1 - 4 h bei 37 °C und 280 rpm fortsetzen. Zu verschiedenen Zeitpunkten jeweils 0.5 ml entnehmen und für Analyse abzentrifugieren.

### **Verbesserung der Expressionseffizienz und Löslichkeit:**

Grundregel: bei unlöslichen Proteinen weniger Induktor, geringere Dichte, kurze Expressionszeit. Dann geringe Ausbeute.

Induktorkonzentration von 0.1 – 2 mM IPTG variieren (**Standard 1 mM**).

$OD_{600}$  der Vorkultur (0.3-1.2; **Standard 0.8 mM**).

Variation der Expressionszeit (1-5 h; **Standard 2-3h**).

Variation der Temperatur (20, 25, 30, 37°C; **Standard 37°C**).

Verwendung unterschiedlicher Bakterienstämme (BL21, BL21 Rosetta, BL21 Codon plus, BL21 pLyS).

## Herstellung von Gesamtproteinextrakten aus E. coli:

- 2 ml einer E. coli-Kultur wurden pelletiert, einmal mit ddH<sub>2</sub>O waschen
- Pellet in 200 µl ddH<sub>2</sub>O resuspendieren.
- 50 µl Lämmli-Probenpuffer hinzugeben
- Die Probe für 15 min in kochendem Wasser denaturieren, darf nicht mehr viskös sein; ggf. länger kochen und zwischendurch kurz vortexen.
- 5-10 µl auf ein SDS-Polyacrylamidgel auftragen.

## Zellaufschluss der Expressionskulturen

**Art des Fusionsproteins und der Löslichkeit bestimmen Puffer. GST-Fusionsproteine können nur in nativen Puffern gereinigt werden; His- in nativen und denaturierenden.**

- Die Expressionskulturen wurden nach der Inkubation durch Zentrifugation bei 4.000 x g ernten.
  - a) Zellpellet in einem nicht denaturierenden Puffer resuspendieren

- b) Zellen durch mehrmaliges Einfrieren in flüssigem Stickstoff und Auftauen bei 37 °C, gefolgt von einer Ultraschallbehandlung, aufschliessen
- Zugabe von Lysozym (ca. 30 mg/Pellet einer 500 ml-Kultur) und DNase I (ca. 15 U/Pellet einer 500 ml- Kultur) zu einem nicht-denaturierenden Puffer und Zellpellet darin resuspendieren. Nachfolgende Ultraschallbehandlung. Bei Bedarf mehrfach.
  - Nach vollständigem Aufschluss der Zellen: Zentrifugation für 15 min bei 27.000 x g.

### **Zu beachten:**

Mittels SDS-PAGE untersuchen, ob sich das exprimierte Protein in löslicher Form im Überstand oder als Inklusionskörper im Pellet befindet.

### **Befindet sich das Fusionsprotein in Form von Inklusionskörpern im Pellet:**

Um die Inklusionskörper zu waschen das Pellet in Inclusion body-Waschpuffer I resuspendieren

Für 15 min bei 27.000 x g pelletieren

Der Überstand verwerfen

Pellet erneut in Inclusionbody-Waschpuffer I resuspendieren

Für 15 min bei 27.000 x g pelletieren

Der Überstand verwerfen

Das Pellet in Inclusionbody-Waschpuffer II aufnehmen

Für 15 min bei 27.000 x g zentrifugieren

Denaturierung der Inklusionskörper mit einem 6 M Guanidin-haltigen Puffer (Inclusionbody Puffer I). Unlösliche Bestandteile wurden für 30 min bei 27.000 x g abzentrifugieren

Überstand für die Chromatographie einsetzen.

Benötigte Puffer:

**Inclusionbody-Waschpuffer I:** 50 mM Tris-HCl, pH 8,0; 100 mM NaCl, 5 mM EDTA, 0,5 % Triton X-100 (v/v) in ddH<sub>2</sub>O; vor Gebrauch 1 mM DTT hinzugeben

**Inclusionbody-Waschpuffer II:** 50 mM Tris-HCl, pH 8,0; 100 mM NaCl, 5 mM EDTA in dH<sub>2</sub>O; vor Gebrauch 1 mM DTT hinzugeben

**Inclusionbody-Puffer I:** 50 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH 8,0; 300 mM NaCl, 6 M Guanidin-HCl, 0,1 % Triton X-100 (v/v), 10 mM Imidazol in dH<sub>2</sub>O, vor Gebrauch 10 mM beta-Mercaptoethanol hinzugeben

**Inclusionbody-Puffer II:** 50 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH 8,0; 300 mM Natriumchlorid, 6 M Guanidin-HCl, 0,1 % TritonX-100 (v/v), 10 mM Imidazol in ddH<sub>2</sub>O

**Elutionspuffer (IB):** 50 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH 8,0; 300 mM Natriumchlorid, 5 M Guanidin-HCl, 250 mM Imidazol in dH<sub>2</sub>O

### **Zu beachten:**

Erzielte Reinheit dieser Methode ist sehr hoch.

Denaturierende Puffer (mit 6 M Guanidin oder 8 M Harnstoff) nicht für alle Chromatographien geeignet. Herstellerangaben beachten. Geeignet für Aufreinigung über IMAC.

## **Reinigung von His-Fusionsproteinen:**

### **Metallaffinitätschromatographie (IMAC)**

#### **Aufreinigung eines Fusionsproteins mit 6 x His-Tag**

**Aufreinigungen löslicher Proteine:**

Äquilibrieren der Säule mit zwei Säulenvolumen Waschpuffer

Zugabe des Lysats des Zellaufschlusses

Waschen mit einem Imidazolgradienten zur Minimierung unspezifischer Bindungen.

Sukzessive mit je 15 Säulenvolumen Waschpuffer mit 5 mM, 10 mM, 20 mM, 40 mM

Imidazol waschen

Elution mit Elutionspuffer (250 mM Imidazol) in sechs Fraktionen des 1,5fachen Säulenvolumens.

**Aufreinigung unter denaturierenden Bedingungen:**

Säule mit 2 Säulenvolumen Inclusionbody-Puffer II äquilibrieren

Proteinprobe auftragen

Säule mit 20Säulenvolumen Inclusionbody-Puffer II waschen

Elution mit Elutionspuffer (IB) in sechs Fraktionen des 1,5fachen Säulenvolumens.

**Verbesserung der Reinheit:**

Waschen mit einem Imidazolgradienten.

Erhöhte Salzkonzentration im Waschpuffer