



Institut für Biochemische Pflanzenphysiologie

Masterarbeit

Heterologe Expression und Reinigung der Pyruvat-Phosphat Dikinase
aus der C4 Pflanze *Flaveria trinervia*

Zur Erlangung des akademischen Grades
Master of Science (M. Sc.) - Biochemistry

vorgelegt von

B. Sc. Alexander Ralph Michael Minges
(1804535)

im August 2011

Erstprüfer: Univ. Prof. Dr. G. Groth

Institut für Biochemische Pflanzenphysiologie
Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Zweitprüfer: Univ. Prof. Dr. H. Gohlke

Institut für Pharmazeutische und Medizinische Chemie
Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

<Widmung>

Inhaltsverzeichnis

Abstract	5
Zusammenfassung	5
1. Einleitung	7
2. Material und Methoden	8
2.1. Material	8
2.1.1. Geräte und Hilfsmittel	8
2.1.2. Verbrauchsmaterialien	9
2.1.3. Chemikalien	9
2.1.4. Standards für Proteine und Nukleinsäuren	10
2.1.5. Antikörper	10
2.1.6. Kommerzielle Kits	10
2.1.7. Restriktionsenzyme	11
2.1.8. Bakterienstämme	11
2.1.9. Plasmide	11
2.1.10. Kulturmedien	11
2.1.11. Puffer für den Zellaufschluss	11
2.1.12. Puffer und Lösungen für die Reinigung	12
2.2. Molekularbiologische Methoden	13
2.2.1. Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren	13
2.2.2. Isolierung von Plasmid-DNA	13
2.2.3. Extraktion von DNA aus Agarosegelen	13
2.2.4. Restriktionsverdau von DNA	13
2.2.5. Polymerase-Kettenreaktion	14
2.2.6. Sequenz und Ligase unabhängige Klonierung (SLIC)	15
2.3. Mikrobiologische Methoden	16
2.4. Präparative Methoden	16
2.5. Analytische Methoden	16
2.6. Bioinformatische Methoden	16

Inhaltsverzeichnis

3. Ergebnisse	17
4. Diskussion	18
Abbildungsverzeichnis	19
Tabellenverzeichnis	20
Literaturverzeichnis	21
A. Anhang	24

Abstract

Zusammenfassung

1. Einleitung

2. Material und Methoden

2.1. Material

2.1.1. Geräte und Hilfsmittel

Bezeichnung	Hersteller
Analysen-/Präzisionswaagen	Sartorius, Göttingen
Autoklav	Thermo Fisher Scientific, Bonn
Automatische Pipetten	Gilson, Bad Camberg
CD-Spektrometer J-715	JASCO Corp., Gross-Umstadt
Chromatographiesystem	GE Healthcare, Freiburg
ÄKTAprime plus	
DNA-Gelkammersystem PerfectBlue	PEQLAB Biotechnologie, Erlangen
Elektroblotter PerfectBlue 'Semi-Dry'	PEQLAB Biotechnologie, Erlangen
Gelsysteme für große Gele	Zentralwerkstatt, Uni Düsseldorf
Inkubationsschüttler INNOVA 44R	New Brunswick, Nürtigen
Kühlzentrifuge Avanti J-26 XP	Beckman Coulter, Krefeld
Kühlzentrifuge Eppendorf 5810 R	Eppendorf, Hamburg
Image Analyzer LAS-4000 mini	Fujifilm, Düsseldorf
Magnetrührer MR 3000/3001	Heidolph, Schwabach
Microplate Reader Infinite 200 PRO	Tecan, Crailsheim
Mikrozentrifuge Minispin	Eppendorf, Hamburg
Milli-Q-gradient Wasserfilteranlage	Millipore, Schwalbach
Minishaker MS 2	IKA, Staufen
Rotoren: JA-10, JA-25.50, Type 70.1 Ti	Beckman Coulter, Krefeld
Taumelschüttler Polymax 1040	Heidolph, Schwalbach
Thermomixer compact/comfort	Eppendorf, Hamburg
Ultrazentrifuge Optima L-80 XP	Beckman Coulter, Krefeld
Zellaufschlusssystem 'One-Shot'	Constant Systems, Daventry, UK

2. Material und Methoden

2.1.2. Verbrauchsmaterialien

Bezeichnung	Hersteller
Chromatographiepapier 3MM Chr	Whatman, Maidstone, UK
Entsalzungssäulen PD10/MidiTrap G-25	GE Healthcare, Freiburg
Falconröhrchen 15 mL und 50 mL	Orange Scientific, Braine-l'Alleud, BE
IMAC-Säule HisTrap HP 5 mL	GE-Healthcare, Freiburg
Mikrotiterplatten	Hartenstein, Würzburg
Petrischalen	Hartenstein, Würzburg
Pipettenspitzen	Brand, Wertheim
Reaktionsgefäße 1,5 mL und 2 mL	Greiner-Bio One, Frickenhausen
Spritzenvorsatzfilter (0,2 µm)	Merck, Bruchsal

2.1.3. Chemikalien

Bezeichnung	CAS-Nummer	Hersteller
Agar		Becton Dickinson, Heidelberg
Ampicillin-Natriumsalz	69-52-3	AppliChem, Darmstadt
Bromphenolblau	62625-28-9	Sigma-Aldrich, München
Coomassie Blue (CB250)		
Dikaliumhydrogenphosphat	16788-57-1	Grüssing, Filsum
Dithiothreitol (DTT)	3483-12-3	Sigma-Aldrich, München
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	60-00-4	AppliChem, Darmstadt
Ethanol	64-17-5	VWR, Darmstadt
Glycerin	56-81-5	Carl Roth, Karlsruhe
Hefeextrakt		Becton Dickinson, Heidelberg
Imidazol	288-32-4	AppliChem, Darmstadt
Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid (IPTG)	367-93-1	PEQLAB Biotechnologie, Erlangen
Kaliumdihydrogenphosphat	7778-77-0	Grüssing, Filsum
Magnesiumchlorid	7791-18-6	VWR, Darmstadt
Magnesiumsulfat-Heptahydrat	10034-99-8	
Natriumchlorid	7647-14-5	VWR, Darmstadt

2. Material und Methoden

Natriumdodecylsulfat (SDS)	151-21-3	Serva, Heidelberg
Natriumhydrogencarbonat	144-55-8	VWR, Darmstadt
Nickelsulfat	10101-97-0	AppliChem, Darmstadt
Pepton		Becton Dickinson, Heidelberg
Phosphorsäure	7664-38-2	Grüssing, Filsum
Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF)	329-98-6	Merck, Bruchsal
Polysorbat 20 (Tween® 20)	9005-64-5	Sigma-Aldrich, München
Rotiphorese® Gel 30		Carl Roth, Karlsruhe
Saccharose	57-50-1	Carl Roth, Karlsruhe
Salzsäure	7647-01-0	VWR, Darmstadt
Tris(hydroxymethyl)-aminomethan (Tris)	77-86-1	VWR, Darmstadt

2.1.4. Standards für Proteine und Nukleinsäuren

Bezeichnung	Hersteller
BSA-Standard (2 mg mL ⁻¹)	Qiagen, Hilden
DNA 1 kb/100 bp Ladder	New England Biolabs, Frankfurt
PageRuler Protein Ladder (Prestained/Unstained)	Fermentas, St. Leon-Rot

2.1.5. Antikörper

Bezeichnung	Hersteller
Anti-His-HRP	Carl Roth, Karlsruhe

2.1.6. Kommerzielle Kits

Bezeichnung	Hersteller
illustra GFX PCR DNA and Gel Band Purification kit	GE Healthcare, Freiburg
QIAprep Spin Miniprep	Qiagen, Hilden
Roti-Quant® (Bradford)	Carl Roth, Karlsruhe

2. Material und Methoden

2.1.7. Restriktionsenzyme

Bezeichnung	Hersteller	Erkennungssequenz (5' – 3')
<i>Bam</i> HI	New England Biolabs, Frankfurt	CA/TATG
<i>Nde</i> I	New England Biolabs, Frankfurt	G/GATCC

2.1.8. Bakterienstämme

Bezeichnung	Hersteller	Genotyp
BL21 (DE3)	Agilent Technologies, Waldbronn	<i>E. coli</i> B F ⁻ <i>ompT hsdS</i> (r _B ⁻ m _B ⁻) <i>dcm gal</i> λ(DE3)
BL21 Gold (DE3)	Agilent Technologies, Waldbronn	<i>E. coli</i> B F ⁻ <i>ompT hsdS</i> (r _B ⁻ m _B ⁻) <i>dcm Tet</i> ^r <i>gal</i> λ(DE3) <i>endA Hte</i>
XL1-Blue	Agilent Technologies, Waldbronn	<i>E. coli</i> <i>recA1 endA1 gyrA96 thi-1</i> <i>hsdR17 supE44 relA1 lac</i> [F' <i>pro-</i> <i>AB lacI</i> ^q <i>ZΔM15 Tn10</i> (Tet ^r)]

2.1.9. Plasmide

Bezeichnung	Hersteller	Marker
pET-16b	Novagen, Darmstadt	Ampicillinresistenz

2.1.10. Kulturmedien

2YT (pH 7,5)

- 1,6 % (w/v) Pepton
- 1 % (w/v) Hefeextrakt
- 0,5 % (w/v) Natriumchlorid

2.1.11. Puffer für den Zellaufschluss

Aufschlusspuffer

- 50 mM Tris/HCl, pH 7,5
- 300 mM Natriumchlorid
- 10 mM Imidazol

2. Material und Methoden

5 mM Magnesiumsulfat
5 mM DTT
10 % (w/v) Glycerin
0,002 % (w/v) PMSF

2.1.12. Puffer und Lösungen für die Reinigung

Nickelsulfatlösung

100 mM Nickelsulfat

Waschpuffer

50 mM Tris/HCl, pH 7,5
300 mM Natriumchlorid
5 mM Magnesiumsulfat
5 mM DTT
10 % (w/v) Glycerin
0,002 % (w/v) PMSF

Elutionspuffer

50 mM Tris/HCl, pH 7,5
300 mM Natriumchlorid
500 mM Imidazol
5 mM Magnesiumsulfat
5 mM DTT
10 % (w/v) Glycerin
0,002 % (w/v) PMSF

Lagerungspuffer

50 mM Tris/HCl, pH 8
10 mM Magnesiumchlorid
0,1 mM EDTA
5 mM DTT
0,002 % (w/v) PMSF

2.2. Molekularbiologische Methoden

2.2.1. Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

Nucleinsäuren besitzen aufgrund der aromatischen Basen ein Absorptionsmaximum bei einer Wellenlänge von 260 nm. Die DNA-Konzentration kann daher spektrometrisch durch eine Absorptionsmessung bestimmt werden. Es gilt hierbei:

$$OD_{260} \equiv 50 \mu\text{g mL}^{-1} \text{ DNA} \quad (2.1)$$

2 μL der Probe und des verwendeten Puffers werden hierbei auf einer NanoQuant-Platte im Mikroplatten-Lesegerät vermessen und die Konzentration aus der Differenz aus Probe und Puffer gemäß Gleichung 2.1 berechnet.

2.2.2. Isolierung von Plasmid-DNA

Die Isolierung von Plasmiden erfolgte aus 5 mL Übernachtskulturen mit Hilfe des „QIAprep® Spin Miniprep“-Kits nach Herstellerangaben. Die isolierte Plasmid-DNA wurde in 10 mM Tris/HCl pH 8,5 bei -20°C gelagert.

2.2.3. Extraktion von DNA aus Agarosegelen

Die Extraktion von DNA aus Agarosegelen erfolgte mit dem „illustra GFX PCR DNA and Gel Band Purification Kit“ nach Herstellerangaben.

2.2.4. Restriktionsverdau von DNA

Im Zuge der Klonierung wurde der Zielvektor pET-16b über die beiden Restriktionsenzyme *Bam*HI und *Nde*I linearisiert. Der Verdau erfolgte in einem Ansatzvolumen von 25 μL bei 37°C über einen Zeitraum von 2 h.

Ansatz Restriktionsverdau

4 μg Vektor-DNA

2. Material und Methoden

2 μL NEBuffer 4 (New England Biolabs, Frankfurt)
10 U *Bam*HI
10 U *Nde*I
ad 25 μL dH₂O

2.2.5. Polymerase-Kettenreaktion

Mit Hilfe der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) können Nukleinsäurefragmente gezielt vervielfältigt werden. Die Spezifität der Reaktion ist hierbei durch die Auswahl der eingesetzten Primer gegeben. Eine PCR gliedert sich grundsätzlich in drei aufeinanderfolgende Phasen: Während der Denaturierung bei 95 °C wird der Doppelstrang in die beiden Einzelstränge aufgespalten. Das Annealing bei 50 °C bis 60 °C führt zur Anlagerung der Primer an die komplementären Sequenzabschnitte der Einzelstränge des Templates. Die exakte Temperatur ist hierbei von den Schmelztemperaturen der eingesetzten Primer abhängig. Während der Elongationsphase erfolgt die Synthese neuer Komplementärstränge ausgehend von den Primern durch eine DNA-Polymerase. Durch eine mehrfache Wiederholung kann die Ziel-DNA in kurzer Zeit exponentiell vervielfacht werden.

Herstellung von Inserts für die SLIC

Die Synthese von Inserts für eine SLIC (vgl. 2.2.6) wurde mittels einer PCR nach folgendem Ansatz durchgeführt:

PCR-Ansatz (50 μL)

1 μL DNA (Templat)
2 μL 3'-Primer (10 μM)
2 μL 5'-Primer (10 μM)
5 μL Pwo-Puffer „complete“
0,5 μL Pwo-Polymerase (peqlab, Erlangen)
0,5 μL dNTPs (10 mM)
ad 50 μL dH₂O

2. Material und Methoden

Tabelle 2.3.: Cyclerprogramm für die Synthese von Inserts zur SLIC

Temperatur [°C]	Zeit [min]	Zyklen
95	5	
95	1	10
46	1	
72	5	
95	1	20
65	1	
72	5	
95	10	1

Das verwendete Cyclerprogramm ist in Tabelle 2.3 aufgeführt. Bei der Berechnung der Annealing-Temperatur wurde im Fall der ersten zehn Zyklen die Schmelztemperatur des zum Pyruvat-Phosphat Dikinase (PPDK)-Gen homologen Primerabschnitts zu Grunde gelegt. In den letzten zwanzig Zyklen die Schmelztemperatur des zum Zielvektor homologen Primerbereichs.

2.2.6. Sequenz und Ligase unabhängige Klonierung (SLIC)

Die SLIC (Li u. Elledge, 2007) macht sich die Exonukleaseaktivität der T4-DNA-Polymerase zu Nutze, um 5'-Überhänge zu generieren, welche anschließend in einer enzymunabhängigen Reaktion ligieren.

Der Zielvektor pET-16b wurde zunächst über die Restriktionsenzyme *NdeI* und *BamHI* linearisiert (vgl. 2.2.4). Der linearisierte Vektor wurde anschließend über ein Agarosegel gereinigt und die DNA aus dem Gel gelöst (vgl. 2.2.3). Die für die PPDK kodierende Sequenz wurde wie in 2.2.5 beschrieben amplifiziert und ebenfalls über ein Agarosegel gereinigt. Zur Generierung der 5'-Überhänge wurden 1000 ng Vektor- bzw. Insert-DNA in folgendem Ansatz gedaut:

Ansatz für SLIC-Dau (35 μL)

x μL DNA \equiv 1000 ng DNA

2 μL BSA (1 mg mL⁻¹)

2. Material und Methoden

4 μL NEBuffer 2 (New England Biolabs, Frankfurt)
1 U T4-DNA-Polymerase (New England Biolabs, Frankfurt)
ad 35 μL dH₂O

Ziel war ein Dau von etwa 30 bp Länge. Aus der Exonukleaseaktivität der T4-DNA-Polymerase von 10 bp min⁻¹ bei 22 °C ergab sich eine Inkubationsdauer von 40 min. Die Reaktion wurde durch Zugabe von $\frac{1}{10}$ des Ansatzvolumens 10 mM Desoxycytidintriphosphat (dCTP) gestoppt.

In das nachfolgende Annealing wurden 150 ng Vektor-DNA, sowie Insert DNA (2691 bp) im zweifachen molaren Verhältnis eingesetzt:

SLIC-Annealing (10 μL)

x μL Vektor-DNA \equiv 150 ng
y μL Insert-DNA \equiv 141 ng
1 μL T4-Ligase Puffer (New England Biolabs, Frankfurt)
ad 10 μL dH₂O

Der Ansatz wurde anschließend für 1 h bei 37 °C inkubiert. 5 μL der Ansätze wurden für die Transformation von *E. coli* XL1-Blue eingesetzt.

2.3. Mikrobiologische Methoden

2.4. Präparative Methoden

2.5. Analytische Methoden

2.6. Bioinformatische Methoden

3. Ergebnisse

4. Diskussion

Abbildungsverzeichnis

Tabellenverzeichnis

2.3. Cyclerprogramm SLIC	15
------------------------------------	----

Literaturverzeichnis

[Li u. Elledge 2007] LI, Mamie Z. ; ELLEDGE, Stephen J.: SLIC sub-cloning using T4 DNA polymerase treated inserts without RecA. In: *Protocol Exchange* (2007), Februar. <http://dx.doi.org/10.1038/nprot.2007.90>. – DOI 10.1038/nprot.2007.90. – ISSN 2043–0116

Abkürzungsverzeichnis

AA/BAA	Acrylamid/Bisacrylamid
APS	Ammoniumperoxodisulfat
BSA	Bovines Serumalbumin
CD	Circulardichroismus
CV	Säulenvolumen, engl. <i>column volume</i>
dCTP	Desoxycytidintriphosphat
DNA	Desocyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleinsäuretriphosphat
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
<i>F. trinervia</i>	<i>Flaveria trinervia</i>
HRP	Meerrettich-Peroxidase, engl. <i>horseradish peroxidase</i>
IMAC	Immobilisierte Metallionen Affinitätschromatographie
IPTG	Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid
p. a.	<i>pro analysi</i> (lat.), für die Analyse
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
PPDK	Pyruvat-Phosphat Dikinase
SDS	Natriumdodecylsulfat
SDS-PAGE	Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese
SLIC	Sequenz und Ligase unabhängige Klonierung
SOPMA	<i>self-optimized prediction method</i>
TEMED	Tetramethylethylendiamin

Abkürzungsverzeichnis

Tris Tris(hydroxymethyl)-aminomethan

A. Anhang