

2 METHODEN

2.1 Zellfreie Proteinsynthese

2.1.1 Das Batchsystem

Die zellfreie Proteinsynthese wurde im gekoppelten Transkriptions-/Translations-Batchverfahren durchgeführt. Dazu werden alle Komponenten auf Eis pipettiert und bei 37°C unter leichtem Schütteln inkubiert. Ein typischer Ansatz enthält die in Tabelle 5 enthaltenen Bestandteile. S-Mix, T-Mix und E-Mix sind definierte Mischungen von Einzelkomponenten, die als Stammlösungen bei -80°C aliquotiert eingefroren werden (Zusammensetzung siehe Tabelle 2,3,4). Der E-Mix enthält die Energiekomponenten und wird bei -20°C aufbewahrt, der T-Mix beinhaltet im Wesentlichen die Aminosäuren und der S-Mix das *E.coli*-Lysat. Die Endkonzentrationen aller Komponenten sind in Tabelle 6 zusammengefasst.

Tabelle 2: Zusammensetzung des S-Mixes

Komponente	Konzentration der Stammlösung	Konzentration in der Reaktion
Aprotinin	2 g/l	2 mg/l
Leupeptin	1 g/l	1 mg/l
Pepstatin	1 g/l	1 mg/l
RNase-Inhibitor	40 U/ μ l	100 U/ml
Gesamt-tRNA (<i>E.coli</i>)	20 g/l	100 mg/l
Pyruvatkinase	10 g/l	8 mg/l
S30-Lysat	100 %	30 %

Tabelle 3: Zusammensetzung des E-Mixes

Komponente	Konzentration der Stammlösung	Konzentration im E-Mix	Konzentration in der Reaktion
ATP	100 mM	12,5 mM	1 mM
GTP	100 mM	12,5 mM	1 mM
CTP	100 mM	6,25 mM	0,5 mM
UTP	100 mM	6,25 mM	6,25 mM
Phosphoenolpyruvat	1 M	375 mM	30 mM
Acetylphosphat	1 M	125 mM	10 mM

Tabelle 4: Zusammensetzung des T-Mixes

Komponente	Konzentration der Stamm-lösung	Konzentration in der Reaktion
TLM-Puffer	10x	0,7 x
Magnesiumchlorid	2 M	4 mM
MESNA	2 M	2 mM
Polyethylenglykol 2000	50 %	4 %
Rifampicin	20 g/l	20 mg/l
Folsäure	10 mM	100 µM
19 Aminosäuren ohne Leucin	5 mM	400 µM
Leucin	5 mM	150 µM

Tabelle 5: Zusammensetzung einer Reaktion zur zellfreien Proteinbiosynthese

Komponente	Konzentration der Stamm-lösung	Konzentration in der Reaktion
S-Mix	3-3,2x	1x
T-Mix	2-3,2x	1x
E-Mix	12,5x	1x
DNA-Matrize	100 nM	2 nM
¹⁴ C-Leucin (bei Bedarf)	1 mM (100 dpm/pmol)	50 µM
T7-RNA-Polymerase	50 U/µl	500 U/ml

Die Herstellung des S-Mixes war nicht Gegenstand dieser Arbeit. Trotzdem sollen die Aufarbeitungsschritte kurz skizziert werden. Das sogenannte S30-System unter Verwendung des *E.coli*-Stammes D10 wurde im Labor von Prof. Dr. V.A. Erdmann durch Dr. Stiege und Mitarbeiter optimiert. Zur Herstellung des *E.coli*-Lysates werden Zellen in Flüssigmedium angezüchtet und innerhalb der logarithmischen Wachstumsphase geerntet. Anschließend werden sie in der French-Press einem Druck von 500-900 bar ausgesetzt und zerstört. Noch intakte Zellen und Zelltrümmer sowie der größte Teil der chromosomalen DNA werden durch zwei Zentrifugationen bei 30.000 x g aus dem Lysat entfernt. Der so erhaltene S30-Überstand enthält bereits alle für die *in vitro* Translation benötigten Proteine (außer T7-RNA-Polymerase) und die Ribosomen. Durch eine kurze Inkubation des S30-Überstandes mit ATP/GTP wird die Termination aktiver Translationskomplexe ermöglicht und endogene mRNA von den Ribosomen freigesetzt. Die ungeschützte mRNA sollte dabei durch endogene Ribonukleasen degradiert werden. Mit Hilfe einer Gelfiltration werden die zelleigenen niedermolekularen Bestandteile entfernt und definierte Bedingungen durch Elution mit 1 x TLM-Puffer (Tab. 6) eingestellt.

Komponente	Endkonzentration in der Reaktion
TLM-Puffer:	
HEPES (pH 7,6)	50 mM
KOAc	70 mM
NH ₄ Cl	30 mM
MgCl ₂	10 mM*
EDTA	100 µM
NaN ₃	0,02 %
Magnesiumchlorid	4 mM (*Σ 14 mM)
MESNA	2 mM
Polyethylenglycol 2000	4 %
Rifampicin	20 µg/ml
Folsäure	100 µM
19 Aminosäuren ohne Leucin	400 µM
Leucin	150 µM
¹⁴ C-Leucin (100 dpm/pmol)	50 µM
Gesamt-tRNA (<i>E.coli</i>)	100 µg/ml
Matrize (Plasmid)	2 nM
ATP und GTP	je 1 mM
CTP und UTP	je 0,5 mM
Phosphoenolpyruvat	30 mM
Acetylphosphat	10 mM
Pyruvatkinase	8 µg/ml
T7 RNA-Polymerase	500 U/ml
RNase-Inhibitor	100 U/ml
Aprotinin	2 µg/ml
Leupeptin	1 µg/ml
Pepstatin	1 µg/ml
S30-Lysat	30 %
Aqua dest.	ad Endvolumen

Tabelle 6: Gesamtübersicht aller Komponenten und Endkonzentrationen bei der *in vitro* Proteinbiosynthese

2.1.2 Analyse der exprimierten Proteine und der mRNA

2.1.2.1 TCA-Fällung

Die TCA-Fällung dient der Quantifizierung sowohl der radioaktiv markierten Proteinprodukte als auch der transkribierten mRNA. Proteine und Nukleinsäuren denaturieren und präzipitieren im sauren Milieu der Trichloressigsäure (TCA). Die Präzipitate werden durch Filtration von löslicher Radioaktivität abgetrennt und im Scintillationszähler vermessen.

Gleiche Volumenteile (in der Regel 5-20 μ l) Reaktionsansatz und 0,5% BSA werden pipettiert, mit 3 ml 10% TCA / 2% Pepton Nr.5 versetzt und 15 min bei 90°C inkubiert. Anschließend lässt man die Ansätze 30 min auf Eis stehen. Die aufgerührten Suspensionen werden über Filter abgesaugt, Reaktionsgefäß und Absaugkammer mit 5% TCA gut gespült und die Filter zuletzt durch Spülen mit Aceton getrocknet. Das die Radioaktivität enthaltende Filterplättchen wird in ein Scintillationsgefäß überführt, mit 3,5 ml Scintillationsflüssigkeit überschichtet und 30 min leicht geschwenkt. Danach kann die Radioaktivität im Szintillationszähler gemessen werden. Diese Arbeitsvorschrift bezieht sich auf radioaktiv markierte Proteine. Mit radioaktiv markierter mRNA kann ähnlich verfahren werden: In diesem Fall wird der Reaktionsansatz zu Beginn mit einer Stopplösung (25 mM EDTA, 1g/l Hefe-RNA) versetzt. Die TCA-Lösung enthält an Stelle von Pepton 50 mM Natriumpyrophosphat. Der Inkubationsschritt bei 90°C entfällt.

2.1.2.2 Eindimensionale, denaturierende Gelelektrophorese

Das Prinzip dieser Polyacrylamidgelelektrophorese besteht darin, dass Proteine von SDS, einem anionischen Detergenz umschlossen werden. SDS wirkt denaturierend, indem es räumliche Strukturen aufbricht und die Polypeptidketten in eine gestreckte Konformation zwingt (Laemmli,1970). Es lagert sich in einem Massenverhältnis von 1,4 g SDS zu 1 g Protein an. Die Eigenladung der Proteine wird abgeschirmt und eine Negativladung proportional zum Molekulargewicht angelegt. Die Laufstrecke verhält sich annähernd linear zum Logarithmus des Molekulargewichts (Weber and Osborn, 1969).

Die eindimensionale Gelelektrophorese wurde in dieser Arbeit sowohl zur Analyse der mit ^{14}C -Leucin-markierten Produkte der *in vitro* Translation, als auch der ^{35}S - und ^{32}P -markierten mRNA (ohne SDS, mit 7M Harnstoff) herangezogen. Die Pufferbedingungen und die Gelzusammensetzung sind in nachstehender Übersicht zusammengefasst.

Zur Verbesserung der Bandenschärfe dient ein Sammelgel, welches über dem Trenngel gegossen wird, sobald dieses fest geworden ist. Das Sammelgel wird mit Probenaschen versehen, indem in die noch flüssige Gellösung ein Probenkamm eingeführt und nach dem Erstarren des Gels entfernt wird.

Probenvorbereitung

Das zu trennende Proteingemisch aus der *in vitro* Reaktion wird mit Aceton gefällt, dadurch aufkonzentriert und von niedermolekularen Substanzen, wie Salzen weitgehend befreit. Der Niederschlag wird anschließend im Probenpuffer gelöst und in die Probenaschen pipettiert.

Der Reaktionsansatz wird zunächst mit dem dreifachen Volumen Wasser verdünnt und davon ausgehend mit dem fünffachen Volumen -20°C kalten Acetons vermischt und 15 min auf Eis inkubiert. Die gefällten Proteine werden bei 4°C und $15\ 000 \times g$ sedimentiert. Das vom Überstand befreite Pellet wird kurz in der Vakuumentrifuge getrocknet, in Lämmli-Probenpuffer aufgenommen, 3 min bei 90°C im Wasserbad inkubiert und ist nach kurzem Abkühlen bereit für den Gelauftrag.

Elektrophorese

Die Elektrophorese findet bei 180-200 V statt und wird beendet, wenn sich die Lauffront am unteren Gelrand befindet. Da sich das Gel während des Laufes erwärmt, ist es empfehlenswert, mit einem Ventilator zu kühlen oder die Elektrophorese in einem klimatisierten Raum laufen zu lassen.

Laufpuffer:	25 mM Tris 192 mM Glycin 0,1% SDS
Sammelgel:	5% Acrylamid-Mix (37,5 Teile Acrylamid : 1 Teil Bisacrylamid) 125 mM Tris-HCl, pH 6,8 0,1% SDS 0,1% APS 0,1% TEMED
Trenngel :	15% Acrylamid-Mix 375 mM Tris-HCl, pH 8,8 0,1% SDS 0,1% APS 0,1% TEMED
Laemmli-Probenpuffer :	62,5 mM Tris-HCl, pH 6,8 1% SDS 8,5% Glycerol 2,5% β -Mercaptoethanol 0,05% Bromphenolblau

2.1.2.3 Autoradiographie

Die qualitative und quantitative Auswertung von Banden radioaktiv markierter Proteine und Nukleinsäuren im Polyacrylamidgel erfolgt mit dem Phosphoimager-System. Das getrocknete Gel wird in der Regel über Nacht und in Einzelfällen mehrere Tage im Dunkeln auf eine Detektionsplatte (Phosphorscreen) gelegt, die Verbindungen aus dem Lanthanoid Europium enthält. Diese werden durch β -Strahlung in einen angeregten Zustand mit einer Halbwertszeit von 3 Tagen versetzt. Bei der Abtastung der Platte im Phosphoimager wird der angeregte Zustand mit Hilfe eines Lasers in den Grundzustand zurückversetzt. Die hierbei emittierten Lichtimpulse werden in Abhängigkeit von Ort und Intensität im Phosphoimager gezählt. Man erhält ein zweidimensionales Abbild eines Gels in digitaler Form. Das Verhältnis der zu detektierenden Radioaktivität zur Anzahl der gemessenen Lichtimpulse ist laut Herstellerangaben über fünf Zehnerpotenzen linear.

2.2 Hochoflösende zweidimensionale Gelelektrophorese (2-DE)

2.2.1 Proteinbestimmung

Für die 2-DE ist es essentiell, den Proteinauftrag pro Gel erstens konstant zu halten, um reproduzierbare Spotmuster zu erhalten und zweitens in den einzelnen Spots eine für die MALDI-Analyse ausreichende Proteinkonzentration zu erreichen.

Der Standardreaktionsansatz enthält zahlreiche, die Proteinbestimmung nach Bradford (1976) oder BCA-Methode (Firma Pierce) störende Substanzen, wie reduzierende Agenzien, hohe Salzkonzentrationen, hoher Anteil freier Aminosäuren usw., so dass eine direkte Proteinbestimmung der Probe nach Ablauf der Reaktion nicht möglich ist.

Daher wurden die einzelnen Chargen S30-Lysat vor ihrem Einsatz bei der *in vitro* Translation auf ihren Proteingehalt untersucht. Es wurde die Bradford-Methode angewandt und die ermittelte Konzentration entsprechend dem Anteil S30-Lysat am Reaktionsmix unter zusätzlicher Beachtung der Volumenzunahme bei der Probenvorbereitung für die 2-DE hochgerechnet. In den späteren präparativen HPLC-Läufen wurden die getrockneten Lysat-Fractionen ausgewogen. Es ergaben sich vergleichbare Proteinkonzentrationen zur Bradford-Methode bezogen auf das Volumen eingesetzten Reaktionsmixes.

Proteinbestimmung nach Bradford:

Die Proben werden mit deionisiertem Wasser auf 500 µl aufgefüllt, 500 µl Bradford-Reagenz zugesetzt und gevortext. Die Extinktion wird am Photometer bei 595 nm gemessen. Zum Vergleich wird eine Standardkurve mit BSA bekannter Konzentration herangezogen.

Bradford-Reagenz: 0,06% (w/v) Coomassie Brilliant Blue G250
3% (v/v) HClO₄

2.2.2 Probenvorbereitung

Aufarbeitung von Flüssigproben:

Der Reaktionsmix der Batchreaktion wird unmittelbar nach dem Zusammenpipettieren auf Eis (0 h Probe) bzw. nach Reaktionsende (2 h Probe) in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Kurz vor Gebrauch für die 2-DE werden die Proben auf Eis aufgetaut und 5 min bei 4°C und 13 000 rpm in der Eppendorff-Tischzentrifuge zentrifugiert. Der Überstand wird mit Harnstoff, DTT und Ampholyten des pH-Wertes 2-4 zu folgenden Endkonzentrationen ergänzt:

7 M Harnstoff
2 M Thioharnstoff
70 mM DTT
2% Ampholyte pH 2-4

Die Flüssigprobe wird 30 min bei Raumtemperatur gerührt. Dabei sollte sich der Harnstoff vollständig lösen. Infolgedessen verdoppelt sich das Ausgangsvolumens, was bei der Proteinkonzentration zu beachten ist. Anschließend wird 30 min bei Raumtemperatur und 50.000 rpm in der Ultrazentrifuge (Beckmann, Modell Optima TL, Rotor TLA 100) zentrifugiert. Der Überstand wird für die erste Dimension der Elektrophorese verwendet.

Aufarbeitung von Festproben:

Lyophilisierte Proben nach der Fraktionierung per HPLC werden in Puffern gelöst, die außer den oben genannten Bestandteilen Tris, KCl, EDTA und Proteasehemmer enthalten (genaue Zusammensetzung siehe unten). Diese Additive sind in den Flüssigproben ursprünglich schon enthalten.

Das Gewicht der Probe in mg wird mit dem 6 fachen in µl an Puffer AP und dem 0,02 fachen in µl an Puffer PP gemischt.

Puffer EP: 25 mM TrisBase pH 7,1
 50 mM KCl
 3 mM EDTA
 2,9 mM Benzamidin
 2,1 μ M Leupeptin

Puffer AP wird aus Puffer EP unter folgenden Zusätzen hergestellt:

500 μ l Puffer EP + 420 mg Harnstoff
 + 76 mg Thioharnstoff
 + 50 μ l DTT 1,4 mM
 + 50 μ l 40% Ampholyte 2-4

Puffer PP: 5 μ M Pepstatin
 50 mM PMSF

Die weiteren Arbeitsschritte erfolgen wie unter Flüssigproben angegeben.

2.2.3 2-DE

Das hier verwendete Protokoll basiert auf einer Arbeit von Klose und Kobalz (1995), in welchem der pH-Gradient der ersten Dimension durch Trägerampholyte im Laufe einer mehrstündigen Elektrophorese gebildet wird. Die zweite Dimension ist eine SDS-PAGE.

2.2.3.1 Erste Dimension – Isoelektrische Fokussierung (IEF)

Die in Glasröhrchen zu gießenden Gele werden mindestens einen Tag vor Gebrauch vorbereitet. Separations- und Capgellösung werden in größeren Mengen hergestellt und aliquotiert bei -80°C eingefroren und erst unmittelbar vor Gebrauch aufgetaut. Darin gelöste Luft wird durch 4 minütiges Entgasen mit Hilfe einer Wasserstrahlpumpe und des Ultraschallbades entfernt. Die gut gereinigten 23 cm langen Glasröhrchen mit einem Innendurchmesser von 0,9 oder 1,5 mm werden in eine Haltevorrichtung (Firma WITA) eingespannt und an der oberen Öffnung mit einem Stück Gummischlauch als Adapter und einer Plastikspritze versehen. Zu einem Aliquot von 975 μ l Gellösung werden 25 μ l 0,8% Ammoniumpersulfat-Lösung pipetiert und in die Gelwanne der Haltevorrichtung unter den Röhrchen gefüllt. (Je nach Bedarf werden größere Mengen eingesetzt.) Dieses Reservoir kann nach oben geschraubt werden, bis die Röhrchen in die Gellösung eintauchen. Dann wird die Lösung mit Hilfe der aufgesetzten Spritzen bis knapp unter die Oberfläche angesaugt und das Reservoir wieder heruntergeschraubt. Noch ca. 5 mm muss nachgezogen werden, damit später noch Capgel-

lösung in den Gelfuß gefüllt werden kann. Andererseits muss auch oben noch genug Platz sein, damit die Probe eingespritzt werden kann.

Nach 30 min Polymerisationszeit werden die Glasröhrchen aus der Halterung genommen, überschüssige Polymerisationslösung mit Hilfe einer Hamiltonpipette abgesaugt und die obere Öffnung mit einem Tropfen deionisiertem Wasser versehen und einem Stück Parafilm als eine Art feuchter Kammer abgeschlossen. 390 µl Capgel- und 10 µl 0,8% Ammoniumper-sulfatlösung werden gemixt und jeweils auf die untere Öffnung der Röhrchen geladen. Nach weiteren 30 min Polymerisationszeit wird wie bereits beschrieben eine feuchte Kammer angelegt.

Am nächsten Tag wird die Schutzhülle und Flüssigkeit an den Enden wieder entfernt. Die Röhrchen werden in den IEF-Apparat (Firma WITA) mit dem Capgel nach unten gespannt. Der Probe dient eine 2 mm dicke Schicht aus Sephadex (100 µl Sephadex mit 1,08 mg Harnstoff und 10 µl Ampholyten pH 2-11 gemischt) als Unterlage. Abhängig vom Durchmesser können 15–70 µl Probe pipettiert werden, die mit einer 2 mm dicken Schicht Overlay-Lösung (5,3 M Harnstoff, 0,7 M Glycin, 5% Servalyt pH 2-4) vom direkten Kontakt mit der Anodenlösung isoliert werden.

Bei den letzten präparativen Gelen (Fluoreszenz-gefärbte Gele) wurde eine Neuerung eingeführt. Anstelle der Sephadex-Lösung wurde eine 2% Agarosestammlösung in AP-Puffer (siehe Kap. 2.2.2) kurz vor Gebrauch 1:5 mit AP-Puffer verdünnt, die Probe mit AP-Puffer auf 35 µl ergänzt und mit 35 µl Agarose-AP gemischt. Da der Durchmesser dieser Röhrchen 1,5 mm betrug, konnte die gesamte Menge aufgetragen und wiederum mit Overlay überschichtet werden. Diese Methode verhindert eine Streifenbildung in der 1. Dimension.

Die Kathodenlösung wird in die untere, die Anodenlösung in die obere Pufferkammer gefüllt. Ein luftblasenfreier Übergang zwischen Glasröhrchen und Puffer muss gewährleistet sein. Die erste Dimension läuft bei Raumtemperatur unter den beschriebenen (siehe unten) Bedingungen.

Ist das Programm beendet, werden die Glasröhrchen aus der Halterung entnommen und Reste von Elektrophoresepuffer entfernt. Mit einer Wasser-gefüllten Spritze, die aufgesetzt wird, stößt man die Rundgele vorsichtig in eine Inkubationslösung (125 mM Tris/H₃PO₄, pH 6,8, 40% Glycerol, 3% SDS, 65 mM DTT) aus und lässt sie darin 10 min äquilibrieren. Danach können sie direkt in der zweiten Dimension eingesetzt oder bei -80 °C eingefroren werden.

Trenngellösung:	3,5% Acrylamid
	0,3% Piperazindiacrylamid
	4% WITAllyte, pH 2-11
	9 M Harnstoff
	5% Glycerol
	0,06% TEMED
Capgellösung:	12% Acrylamid
	0,13% Piperazindiacrylamid
	4% WITAllyte, pH 2-11
	9 M Harnstoff
	5% Glycerol
	0,06% TEMED
Kathodenlösung:	5% Glycerol
	9 M Harnstoff
	5% Ethylendiamin
Anodenlösung:	7,27% Phosphorsäure
	3 M Harnstoff

Programm zur Spannungsregulierung während der Elektrophorese:

1 h	100 V
1 h	200 V
17,5 h	400 V
1 h	650 V
30 min	1000 V
10 min	1500 V
5 min	2000 V

2.2.3.2 Zweite Dimension – SDS-PAGE

Es wird eine Großgelkammer mit den Maßen 23 x 30 cm benutzt (DESAVOR VA 300). Die Geldicke beträgt 0,75 mm für analytische und 1,5 mm für präparative Gele. Vor der Montage der Gelapparatur werden die Glasplatten und Spacer mit 70% Ethanol und einem fusselfreien Papiertuch gereinigt. Die Glasplatten und Spacer werden mit den seitlichen Klemmen fixiert und auf die mit Gummistreifen belegte Gießvorrichtung gespannt. Die zuvor aliquotierte und

bei -20°C eingefrorene Gellösung (73,5 ml für analytische Gele) und 1,28% Ammoniumpersulfat-Lösung (4,5 ml) wird aufgetaut, unter Vermeidung von Luftblasen gemischt, bis knapp unter den Rand in die Gelkammern gegossen und mit Isopropanol überschichtet. Wenn das Gel nach ca. 30 min polymerisiert ist, kann das Isopropanol wieder entfernt, mit etwas deionisiertem Wasser gespült und zur Aufbewahrung bei 4°C über Nacht mit SDS-Überschichtungslösung aufgefüllt werden.

Der Laufpuffer wird in die Elektrophoresekammern gefüllt und mit Hilfe eines Kryostaten auf 10°C vorgekühlt. Die Überschichtungslösung wird von der Geloberfläche entfernt und mit einem Stück Filterpapier von allen Rückständen befreit. Die Rundgele werden mit Hilfe einer besonderen Vorrichtung auf die Glasplatte aufgesetzt und mit einem Spatel in die Einfülltasche gleiten gelassen. Die auf 40°C erwärmte Agaroselösung wird über die Rundgele gegossen, um sie so mit dem Gel der 2. Dimension zu verschmelzen. Nach dem Erkalten dreht man das Gel um und wechselt dabei den Gummi (mit Öffnung), damit beide Gelseiten Kontakt zum Puffer haben. Die Halterung mit dem fixierten Gel kann so in die Elektrophoresekammer eingesetzt und Laufpuffer nachgefüllt werden. Die Elektrophorese erfolgt unter den unten angegebenen Bedingungen.

Gellösung:	15% Acrylamid
	0,2% Bisacrylamid
	375 mM Tris-HCl, pH 8,8
	0,03% TEMED
	0.01% SDS
SDS-Überschichtungslösung:	285 mM Tris-HCl
	90 mM Tris-Base
	3,5 mM SDS
Agaroselösung :	1% Agarose
	12,5% (v/v) Inkubationslösung (siehe 1. Dimension)
	0,1% SDS
Laufpuffer:	25 mM Tris-Base
	129 mM Glycin
	100 mM SDS

RNA- und Proteinanteilen im Ribosom) wird der gemessene Wert mit 20 (und dem Verdünnungsfaktor) multipliziert, um die Proteinkonzentration in $\mu\text{g/ml}$ zu erhalten.

Essigsäureextraktion

Die Essigsäureextraktion dient der Entfernung der ribosomalen Proteine aus dem rRNA-Gerüst. 1 Volumenanteil (Vol.) Ribosomensuspension wird mit 1/10 Vol. 1 M MgCl_2 und 2 Vol. Eisessig versetzt und 1 Stunde auf Eis gerührt. Die sich nun in Lösung befindenden ribosomalen Proteine werden durch eine 20 minütige Zentrifugation bei 4°C und 14.000 rpm von Niederschlägen abgetrennt. Anschließend werden die Proteine stufenweise jeweils für 1-2 Stunden gegen 20%, 5% und 2% Essigsäure mit 6 mM β -Mercaptoethanol dialysiert. Die Probenlösung wird schließlich in der Speed vac eingetrocknet.

Vorbehandlung der Dialyseschläuche

Die verwendeten Dialyseschläuche Spektraphor 3 (Firma: Spectrum Medical Industries, USA) werden vor Gebrauch folgendermaßen vorbehandelt: Die neuen Dialyseschläuche werden 2 mal für 1-2 Stunden in einer 0,1 M Na_2CO_2 / 0,01 M EDTA Lösung auf 60°C erhitzt und danach 3 mal mindestens 1 Stunde in frischem Aqua bidest. gewaschen. Anschließend bewahrt man sie in Aqua bidest mit einem Zusatz von 1 mM Natriumazid im Kühlschrank auf.

Zweidimensionale Polyacrylamidgelelektrophorese zur Auftrennung basischer ribosomaler Proteine

Für die 2D-PAGE standen 2 Formate zur Verfügung:

1. eine Gelkammer-Spezialanfertigung aus dem MPI für Molekulare Genetik Berlin und
2. für die 1. Dimension Glaskapillaren der Firma Wita (1,5 mm Innendurchmesser, 9,3 cm Länge) und passend dazu die Biorad-Kammer (MiniProtean) für die 2. Dimension

Letzteres System erforderte nur eine Proteinmenge von 25 μg und wurde für die Optimierungen verwendet, um Material zu sparen. Repräsentative Gele wurden mit einer Proteinmenge von ca. 80-100 μg im Gelsystem Nr.1 getrennt, das hier auch ausführlich beschrieben werden soll.

Die Auftrennung basischer ribosomaler Proteine geht auf eine Publikation von Geyl *et al.* (1981) zurück, in der die erste Dimension nach Mets und Bogorad (1974) mit der zweiten

Dimension nach Kaltschmidt und Wittmann (1970) kombiniert und verschiedene Modifikationen eingeführt worden sind. Prinzipiell trennt man in der ersten Dimension nach der Ladung der Proteine, während in der zweiten Dimension aufgrund des höheren Vernetzungsgrades verstärkt nach dem Molekulargewicht separiert wird.

Tabelle 7: Übersicht aller Komponenten für die 2-DE basischer ribosomaler Proteine

1. Dimension	
Gellösung	4% (w/v) Acrylamid
	0,1% (w/v) N,N'-Methylenbisacrylamid
	57 mM Bis-Tris
	6 M Harnstoff
	auf pH 5 mit Essigsäure eingestellt
	0,35% (v/v) TEMED
	0,07% (w/v) APS
Probenpuffer	10 mM Bis-Tris
	6 M Harnstoff
	10 mM DTT
	2% CHAPS
	auf pH 4 mit Essigsäure eingestellt
Elektrophoresepuffer (oben)	10 mM Bis-Tris, pH 4
Elektrophoresepuffer (unten)	1,8 M Kaliumacetat, pH 5
2. Dimension	
Gellösung	18,6% (w/v) Acrylamid
	0,56% (w/v) N,N'-Methylenbisacrylamid
	5,4% (v/v) Essigsäure
	6,2 M Harnstoff
	50 mM KOH
	0,6% (w/v) TEMED
	0,125% (w/v) APS
Elektrophoresepuffer	187 mM Glycin
	1,5% (v/v) Essigsäure

Die Komponenten für die Gele der ersten und zweiten Dimension (außer TEMED und APS) werden gemischt, durch einen Zellulosefilter der Porengröße 0,45 µm filtriert und als Stammlösungen aufbewahrt. Kurz vor Gebrauch werden sie entgast und mit TEMED und APS versetzt. Zur Herstellung der Trenngele der 1. Dimension werden Glasröhrchen (Ø 5 x

100 mm) an einer Seite mit Parafilm verschlossen, die Gellösung mit einer Spritze 8 cm hoch eingefüllt, mit etwas Puffer überschichtet und wiederum mit Parafilm abgedichtet. Nach dem Polymerisieren über Nacht wird der Parafilm entfernt, die Röhrchen in die Gummimuffen der Kammer eingeführt und die im Probenpuffer gelösten Proteine auf das Gelbett aufgetragen. Obere und untere Kammer werden mit den jeweiligen Puffern versehen. Die Proteine laufen bei 0,5 mA pro Röhrchen 30 min ein und für weitere 4,5 Stunden bei 4 mA pro Röhrchen bei 4°C. Nach 2,5 h wird der Probenpuffer erneuert.

Die Rundgele werden aus den Glasröhrchen gepresst und zur Vorbereitung auf die zweite Dimension in deren Elektrophoresepuffer 30 min äquilibriert. Beim Gießen der Flachbettgele (100 x 100 x 1,5 mm) werden sie auf deren Oberfläche direkt einpolymerisiert. Die Elektrophorese läuft mit einer Spannung von 40 V für 17 h bei Raumtemperatur. Das Gel wird abschließend mindestens eine halbe Stunde in Coomassie blue (Kap. 2.4.1) gefärbt und über Nacht entfärbt. (siehe Kap. 2.4.1)

2.4 Färben von Gelen

2.4.1 Coomassie-Färbung

Coomassie Brilliant Blue-Färbung nach Eckerskorn *et al.* (1988)

Fixierungslösung: 50% Ethanol, 10% Essigsäure, 40% deionisiertes Wasser

Färbelösung: Fixierungslösung, aber Methanol, statt Ethanol + 0,05% Serva Blue R-250

Entfärbelösung: 5% Methanol, 12,5% Essigsäure, 82,5% deionisiertes Wasser

Aufbewahrungslösung: 7% Essigsäure

Die Gele werden fixiert, anschließend für mindestens 5 h oder über Nacht unter leichtem Schütteln gefärbt. Um überschüssige Farbe zu entfernen wird zunächst 1 h lang in der Entfärbelösung gewaschen und dann für weitere 4 h in der Aufbewahrungslösung geschwenkt. Während dieser Zeit ist die Lösung mehrmals zu wechseln. Die Gele können bei 4°C in der Aufbewahrungslösung gelagert werden.

2.4.2 Silberfärbung

Silberfärbung nach Merril *et al.* (1981), Heukeshoven *et al.* (1985) und Jungblut *et al.* (1990) (siehe nächste Seite)

Fixierungslösung:	s.o.
Inkubationslösung:	30% Ethanol, 0,5 M Natriumacetat, 0,5% Glutaraldehyd, 0,2% Natriumthiosulfat
Silberlösung:	0,1% Silbernitrat, 0,01% Formaldehyd
Entwicklungslösung:	2,5% Natriumcarbonat, 0,05 mM Natriumthiosulfat, 0,01% Formaldehyd, pH 11,3
Stopplösung:	0,05 M EDTA, 0,02% Thimerosal

Nach der Elektrophorese werden die Gele in große weiße Plastikschaalen transferiert und für mindestens 1h oder über Nacht in der Fixierungslösung vorsichtig geschüttelt. Danach wird diese Lösung durch Inkubationslösung ersetzt und darin unter weiterem Schwenken 2h belassen. Dem schließt sich dreifaches Waschen mit deionisiertem Wasser für jeweils 20min an. Die Färbung in der Silberlösung benötigt 20 min, anschließend wird für maximal 30 sec mit deionisiertem Wasser gespült. Die Entwicklung erfolgt nach gewünschter Intensität, in diesem Fall wurde sie meist nach 10 min durch Überführen in die Stopplösung abgebrochen. Dort verbleiben die Gele ca. 15 min, die Lösung wird erneuert und die Gele können darin längere Zeit gelagert oder sofort getrocknet werden.

Silberfärbung nach Blum *et al.* (1987), modifiziert

Diese Färbung lehnt sich an die oben beschriebene mit kleinen Abweichungen an. Die Fixierungslösung enthält 40% statt 50% Ethanol. Ein Waschschrift wird zwischen Fixierung und Inkubationslösung eingeschoben: 2 x 20 min in 30% Ethanol, 1 x 20 min in deionisiertem Wasser schwenken, um die verbliebene Säure gründlich zu entfernen. Die Sensitivierung erfolgt nur 1 min in 0,02% Natriumthiosulfat. Die Silberlösung enthält kein Formaldehyd und die Entwicklerlösung kein Natriumthiosulfat. Der Färbeprozess wird abgebrochen, indem das Gel 20 sec in deionisiertem Wasser, 5 min in 5% Essigsäure und nochmals in Wasser (3 x 10 min) geschwenkt wird. Die Gele können in 1% Essigsäure bei 4°C aufbewahrt oder getrocknet werden.

2.4.3 Fluoreszenzfärbung

Fluoreszenzfärbung mit SYPRO-Ruby nach Steinberg *et al.* (1996 a,b)

Beim Umgang mit diesem Farbstoff ist zu beachten, dass er durch Tageslicht schnell ausbleicht.

Zum Fixieren werden die Gele in einem Bad aus 10% Methanol / 7% Essigsäure 30 min ge-

schwenkt. Die Färbung erfolgt mit unverdünnter SYPRO-Ruby Protein-Gelfärbelösung über Nacht, anschließend werden die Gele in deionisiertem Wasser gewaschen.

2.5 Identifizierung von Proteinen aus dem Gel

Proteine können aus Gelen eluiert werden. Dazu eignen sich folgende Gelfärbungen: Coomassie-Färbung, Silberfärbung nach Blum, Fluoreszenzfärbung, hier SYPRO Ruby.

Die Gele werden nach der Färbung zur Aufbewahrung bei 4°C in Folien eingeschweißt. Vor der Entnahme der Proben wird die Oberfläche der Folie sorgfältig mit niederprozentiger SDS-Lösung, Millipore-Wasser und Ethanol abgewischt, um anhaftendes Keratin, sowie weitere Fremdproteine und Partikel zu entfernen. Ebenso werden Hilfsmittel behandelt (Scherer, Skalpell). Mit Hilfe von gekürzten Pipettenspitzen, deren innerer Durchmesser ca. 1 mm beträgt, werden die zu untersuchenden Proteinspots ausgestochen und mit einer sterilen Injektionsnadel in ein 0,5 ml Eppendorfgefäß ausgestoßen. Spots aus Fluoreszenz-gefärbten Gelen werden auf dem UV-Tisch bei einer Wellenlänge von 254 nm entnommen.

2.5.1 In-Gel-Verdau

Der In-Gel-Verdau erfolgt zum Schutz vor Kontaminationen mit Fremdproteinen unter der clean bench. Die ausgeschnittenen Gelstückchen werden in Ammoniumbicarbonat-Lösung und Acetonitril nach folgender Prozedur gewaschen, um die jeweiligen Farbstoffe zu entfernen (Silberfärbung erfordert eine Sonderbehandlung, s.u.) und die Pufferbedingungen auf die Erfordernisse der Trypsinspaltung vorzubereiten:

Die Gelstückchen werden zuerst in 50 µl 100 mM NH_4HCO_3 für 15 min unter Schütteln bei 30°C gespült, die Flüssigkeit wird entfernt, anschließend 10 µl 100 mM NH_4HCO_3 zu den Gelstückchen pipettiert und unter den gleichen Bedingungen inkubiert. Danach werden 10 µl Acetonitril (HPLC-grade) hinzugefügt. Die Gelstückchen beginnen zu schrumpfen. Nach weiteren 15 min Inkubation wird der Überstand entfernt und durch 10 µl reines Acetonitril ersetzt. Hier wird dem Gel weiteres Wasser und darin gelöster Farbstoff entzogen. Die Gelstückchen werden milchig trüb. Nach Abnahme der Flüssigkeit sollte der Vorgang ab dem Schritt - Zugabe von 10 µl 100 mM NH_4HCO_3 - wiederholt werden.

Bei den nach Blum gefärbten Silbergelen wird dem eine Entfärbungsprozedur vorangestellt. Dazu wird das im Färbekit der Firma Invitrogen enthaltene Entfärbereagenz benutzt. Zwei Lösungen A und B werden kurz vor Gebrauch 1 : 1 gemischt, davon jeweils 100 µl auf die Gelstückchen gegeben, gemischt und 15 min bei Raumtemperatur stehen gelassen. Nach dem Entfernen des Überstandes wird mit jeweils 200 µl Millipore-Wasser 3 mal 10 min gespült. Um Reste von Silberionen aus den Gelstückchen vollständig diffundieren lassen zu können, wird die letzte Flüssigkeit über Nacht im Kühlschrank gelagert und erst dann entfernt. Obwohl der Hersteller keine genauen Angaben zum Inhalt der Reagenzien A und B macht, ist davon auszugehen, dass kolloidales Silber oxidiert und mit Kaliumhexacyanoferrat komplexiert wird. Das Löslichkeitsprodukt der im Allgemeinen schwer löslichen Silbersalze wird im Zuge der Komplexbildung unterschritten.

Die allgemeine Vorgehensweise für alle Färbemethoden soll hier weiterführend beschrieben werden:

Nach der Schrumpfung mit Acetonitril werden die Gelstückchen 2–5 min lyophilisiert. Um die Proteine für den Verdau mit Trypsin besser zugänglich zu machen, werden die Disulfidbrücken reduziert. 20 µl Reduktionslösung (10 mM DTT in 100 mM NH_4HCO_3) wirken 1 h bei 56°C unter Schütteln ein. Nach dem Abkühlen wird der Überstand entfernt und mit 10 µl Acetonitril geschrumpft, falls erforderlich auch 2 mal, und wieder entfernt. Die nachfolgende Behandlung mit Jodacetamid führt zur Alkylierung von Thiolgruppen, um die erneute Ausbildung von Disulfidbrücken dauerhaft zu verhindern. Die Alkylierung erfolgt am effektivsten bei einem pH-Wert von 8,8. 10 µl 55 mM Jodacetamid in 100 mM NH_4HCO_3 werden auf die Gelstückchen pipettiert und unter gelegentlichem Schütteln im Dunkeln und bei Raumtemperatur 20 min inkubiert. Nach dem Entfernen des Überstandes wird erneut in 100 µl 50 mM NH_4HCO_3 gespült, mit Acetonitril geschrumpft und lyophilisiert. Die nun für den Verdau präparierten Proteine werden mit der Endoprotease Trypsin fragmentiert. Trypsin spaltet spezifisch nach Lysin- und Arginin-Resten. Im Vergleich der gängigen Proteasen führt das zu einer relativ hohen Anzahl von Peptiden mit einer durchschnittlichen Länge von 9 Aminosäureresten (Kellner *et al.*, 1999).

Aliquots von 5 µl Trypsin-Stammlösung (3mg/ml) werden kurz vor Gebrauch mit 395 µl 25 mM NH_4HCO_3 verdünnt. Mit jeweils 8 µl Trypsingebrauchslösung werden die Proben 30 min auf Eis rehydratisiert, überschüssige Lösung wird entfernt und 2–5 µl 50 mM NH_4HCO_3 hinzupipettiert. Die Gelstückchen werden mit einer sterilen Injektionsnadel weiter zerkleinert, um einen gleichmäßigen Verdau und den Austritt von vielen Peptidfragmenten in den

Überstand durch Vergrößerung der Oberfläche zu ermöglichen. Die Proben werden über Nacht bei 37°C im Schüttelinkubator verdaut.

Bei genügend Ausgangsmaterial reicht häufig schon die vom Gel nicht aufgenommene Flüssigkeit zur MALDI-Analyse. Falls nicht, werden die Peptide wie nachfolgend beschrieben aus dem Gel eluiert.

2.5.2 Elution und Aufreinigung der Peptide über ZipTips

ZipTip_{C18} (Millipore) sind Pipettenspitzen, die C₁₈ gebundene Silica-Partikel von 15 µm Durchmesser und 200 Å Porengröße enthalten. Die Peptidfragmente werden mit Hilfe von Säure und organischen Lösungsmitteln durch passive Diffusion aus den Gelstückchen eluiert, an die reverse Phase der ZipTips gebunden und in konzentrierter Form eluiert.

Dazu folgende Arbeitsvorschrift:

Die Überstände des Verdauens entfernt man von den Gelstückchen und bewahrt sie separat auf, so wie alle anderen anfallenden Überstände. Die Gelstückchen bedeckt man mit dem 5 Fachen des Eigenvolumens mit 50 mM NH₄HCO₃ und schüttelt 15 min bei Raumtemperatur, dann fügt man das gleiche Volumen Acetonitril hinzu und schüttelt weitere 15 min. Der Überstand wird entfernt. Die Gele schrumpft man mit Acetonitril unter erneutem 15 minütigem Schütteln und entnimmt den Überstand. Mit 10% Ameisensäure rehydratisiert man die Gele wiederum unter 15 min Schütteln, gibt das gleiche Volumen Acetonitril hinzu und schüttelt. Alle vereinigten Überstände lyophilisiert man und nimmt den Rückstand zunächst in 1 µl 50% Methanol / 5% Ameisensäure und weiteren 9 µl 5% Ameisensäure auf. 5 min Behandlung in Ultraschallbad tragen zur vollständigen Lösung bei. Die ZipTips werden vor der Bindung der Peptide vorbehandelt, indem man 3 mal 10 µl 70% Methanol / 5% Ameisensäure, 3 mal 10 µl 5% Ameisensäure und 3 mal 5% Methanol / 5% Ameisensäure ansaugt und verwirft. Danach können die Trypsinfragmente durch 20 x auf- und abpipettieren an die Phase gebunden werden. Das Material wird durch 3 mal 10 µl 5% Ameisensäure gewaschen. Steigende Methanolkonzentrationen in 5% Ameisensäure ermöglichen, Peptide mit unterschiedlichen Affinitäten optimal zu lösen. Mit jeweils 4 µl 30%, 50% und 70% Methanol werden sie eluiert und die Fraktionen vereinigt.

2.5.3 Massenspektrometrie

2.5.3.1 Matrix-assisted Laser Desorption

Die massenspektrometrischen Daten wurden mit einem Gerät der Firma Bruker : Bruker-Reflex mit „delayed extraction“ gewonnen. Das Gerät ist mit einem Stickstoff-Laser der Wellenlänge 337 nm ausgerüstet. Die Peptide werden im Reflektormodus mit einer Spannung von 20 kV beschleunigt, die Reflektorspannung beträgt 23 kV. Die Datenübertragungsrate beträgt 1 GHz. Für jedes Spektrum wurden 200-300 Laserschüsse benötigt. Ionenmoleküle kleiner als 300 Da wurden unterdrückt. Die interne Kalibrierung erfolgte mit den Peptiden des Trypsineigenverdaus. Die Spektren wurden mit der x.mass5.1-Software gewonnen.

2.5.3.2 Präparierung der Matrix

Die Proben werden auf einen Träger aus rostfreiem Stahl mit 26 Plätzen aufgebracht. Die Matrix besteht aus einer gesättigten α -Cyano-4-Hydroxymizsäure-Lösung in Aceton. Eine Nitrozellulose-Lösung der Konzentration 10 mg/ml in 1:1 Isopropanol/Aceton wird im Verhältnis 1:4 mit der gesättigten Zimtsäure-Lösung gemischt. Davon werden 0,5 μ l pro Analyse zügig auf den Probenträger pipettiert. Dieser Tropfen wird mit 0,9 μ l 10% Ameisensäure überschichtet. In den noch nicht verdunsteten Tropfen wird 0,6 μ l Probe eingebracht. Mindestens 10 min sollten für die Kokristallisation eingeplant werden. Das gut getrocknete Material wird danach mit 6 μ l 0,1% kalter TFA-Lösung gespült, wobei die Flüssigkeit schnell wieder mit einem Pressluftgebläse entfernt werden muss. Die Probe ist nach der Trocknung zur Analyse bereit.

2.6 Zellanzucht von *E.coli* Zellen

2.6.1 Zellanzucht in Flüssigkultur

E.coli-Zellen werden in Luria-Bertani-Flüssigmedium (LB-Medium) angezogen. Dieses ist aus 10 g/l Caseinhydrolysat, 5 g/l Hefeextrakt und 10 g/l NaCl zusammengesetzt (pH-Wert auf 7,0–7,4 mit NaOH einstellen) und wird 20 min bei 120°C autoklaviert. Sollen Plasmidhaltige Bakterien mit Ampicillin-Resistenz selektiert werden, setzt man vor Gebrauch Ampicillin in einer Endkonzentration von 100 μ g/ml zu. Es wird von einer Einzelkolonie überimpft. Die Bakterienzellen wachsen über Nacht in der erforderlichen Menge Medium im verschlossenen Erlenmeyerkolben in einem Schüttelinkubator bei 37°C.

2.6.2 Zellanzucht in Einzelkolonien

Erfolgreich transformierte kompetente Zellen (siehe Kap. 2.6.3) wachsen auf LB-Agarplatten mit Antibiotikazusatz zu Einzelkolonien heran.

Dazu wird LB-Medium mit 1,5% (w/v) Agar versetzt und autoklaviert. Nach dem Abkühlen auf ca. 55°C wird Ampicillin in einer Endkonzentration von 50 µg/ml zugefügt und das Medium in sterile Petrischalen gegossen. Die Platten werden bei 4°C gelagert. 100 µl einer kurzzeitig kultivierten Bakteriensuspension nach der Transformation werden auf der Agarplatte mit einem Drigalskispatel ausgestrichen und bei 37°C über Nacht inkubiert.

2.6.3 Herstellung kompetenter *E.coli*-Zellen

Als kompetente Zellen bezeichnet man durch eine spezielle Salzbehandlung für Nukleinsäuren membrandurchlässig gemachte Bakterien (Cohen *et al.*, 1972; Sambrook *et al.*, 1989). Dadurch wird die Transformationseffizienz für Plasmide verbessert.

5 µl einer *E.coli*-XL1 blue-Zellsuspension (Firma Stratagene) werden in 10 ml LB-Medium über Nacht bei 37°C als Vorkultur angezogen. 220 ml SOB-Medium (Tab. 8) werden mit 1 ml dieser Vorkultur angeimpft und bei 18°C unter leichtem Schütteln weiterkultiviert. Die Bakterien sollen in der logarithmischen Wachstumsphase bei geringer Zelldichte geerntet werden. Daher beobachtet man das Wachstum durch Messen der optischen Dichte bei einer Wellenlänge von 600 nm. Bei einer Absorption von 0,5 wird die Wachstumsphase abgebrochen. Die in zwei Portionen aufgeteilte Kultur wird 10 min bei 3000 x g und 4°C zentrifugiert. Die Pellets resuspendiert man vorsichtig in jeweils 40 ml eiskaltem Transformationspuffer (Tab. 8) und lässt sie noch weitere 10 min auf Eis stehen.

Tabelle 8: Zusammensetzung von SOB-Medium und Transformationspuffer

SOB – Medium	Transformationspuffer
2 % Bactotrypton	10 mM Pipes
0,5 % Hefeextrakt	55 mM MnCl ₂
10 mM NaCl	15 mM CaCl ₂ · 2H ₂ O
2,5 mM KCl	250 mM KCl
10 mM MgCl ₂	
10 mM MgSO ₄	
(auf pH 6,7 – 7,0 mit NaOH einstellen)	

Es folgt eine zweite Zentrifugation, nach der das Pellet in 10 ml Transformationspuffer gelöst wird. 700 µl DMSO pro Pellet werden hinzugefügt. Sofort werden Aliquots von 200 µl abgefüllt und in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die kompetenten Zellen werden bei –80°C gelagert und sind ca. ein halbes Jahr verwendbar.

2.7 Molekularbiologische Methoden

2.7.1 Isolierung von DNA

2.7.1.1 Präparation genomischer DNA aus *E.coli*

Für die Präparation genomischer DNA wurde eine Methode unter Verwendung von Hexadecyltrimethylammoniumbromid (CTAB) ausgewählt (Ausubel FM *et al.*, 1994). Gramnegative Bakterien enthalten in großen Mengen Exopolysaccharide, die nachfolgende Reaktionen mit molekularbiologischen Enzymen stören können, beispielsweise Restriktionsendonukleasen oder Ligasen. CTAB bildet mit den Polysacchariden Komplexe, die extrahiert werden können.

10 ml einer über Nacht Kultur von *E.coli* wird in 1,5 ml Eppendorffgefäße aufgeteilt und 2 min zentrifugiert bis ein kompaktes Pellet zu erkennen ist. Der Überstand wird verworfen, das Pellet mit 567 µl TE-Puffer (Tris-EDTA Puffer: 10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 7,4) durch wiederholtes Auf- und Abpipettieren resuspendiert. Um die Bakterienzellwand aufzulösen und die Proteine zu verdauen werden 30 µl 10% SDS (Endkonzentration: 0,5%) und 3 µl einer 20 mg/ml Proteinase K enthaltenden Lösung (Endkonzentration: 100 mg/ml) hinzugefügt. Nach vorsichtigem Mischen wird die Suspension 1 h bei 37°C inkubiert. Anschließend werden 100 µl 5 M NaCl-Lösung pipettiert, um zu verhindern, dass CTAB unerwünscht Nukleinsäuren präzipitiert. Daraufhin werden 80 µl einer 10% CTAB in 0,7 M NaCl-Lösung dazugegeben, gemischt und 10 min bei 65°C inkubiert. Daran schließt sich eine Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol-Extraktion mit nachfolgender Alkoholpräzipitation an (Meade *et al.*, 1984; Silhavy *et al.*, 1982). Ein gleiches Volumen (0,7–0,8 ml) einer 24:1 Chloroform/Isoamylalkohol-Lösung wird mit der Probenlösung gründlich gemixt und 5 min zentrifugiert. Der wässrige, viskose, die DNA enthaltende Überstand wird in ein neues Eppendorffgefäß überführt, mit dem gleichen Volumen einer 25:24:1 Phenol/Chloroform/Isoamylalkohollösung versetzt und erneut extrahiert. Die im Überstand enthaltene DNA wird mit einem 0,6 fachen Volumen Isopropanol präzipitiert und abzentrifugiert. Das Pellet

wird mit 70% Ethanol gewaschen, 5 min zentrifugiert und nach dem Entfernen des Überstandes in 100 µl sterilem Aqua dest. resuspendiert.

2.7.1.2 Plasmidpräparation

Bei der Isolierung von Plasmiden aus Bakterienzellen kommt es neben der Entfernung von Proteinen und Lipiden darauf an, chromosomale von Plasmid-DNA zu trennen. Die SDS-alkalische Lyse ist hierfür die bevorzugte Methode (Birnboim and Doly, 1979). Sie nutzt die unterschiedlichen De- und Renaturierungscharakteristika von zirkulärer Plasmid- und chromosomaler DNA. Unter alkalischen Bedingungen werden beide denaturiert. Nach der anschließenden Neutralisation mit einem Hochsalzpuffer, wie Kaliumacetat bilden sich in der chromosomalen DNA innerhalb eines Stranges kovalente Basenpaarungen aus, die zu unlöslichen Aggregaten führen und ausfallen. Die Ringstruktur der Plasmide unterstützt eher die Rehybridisierung zwischen den Strängen, so dass diese in Lösung bleiben. Die darauf folgende Zentrifugation trennt die Plasmide von der übrigen DNA. Da anschließende molekularbiologische Methoden meist hochreine Plasmide erfordern, werden diese noch zusätzlich über Anionenaustauschersäulen aufgereinigt (van Huynh, 1993). Nukleinsäuren binden bei relativ niedriger Salzkonzentration und leicht saurem pH an das Säulenmaterial, bei mittlerer Salzkonzentration wird RNA und andere Verunreinigungen von der Säule gewaschen. Eine pH-Verschiebung in den alkalischen Bereich bewirkt eine Protonierung der Plasmid-DNA und erleichtert zusammen mit einer hohen Salzkonzentration die Elution der nun sauberen Plasmide. Die Salze können durch eine nachfolgende Ethanol-fällung entfernt werden.

Tabelle 9: Lösungen für die Plasmid-Isolierung

Lösung	Bestandteile
1. Zellresuspension	50 mM Tris / HCl pH 8,0 10 mM EDTA
2. Zelllysis	200 mM NaOH 1,0% SDS (w/v)
3. Neutralisation	3,2 M Kaliumacetat / Essigsäure pH 5,5
4. Säulenäquilibrierung	600 mM NaCl 100 mM Natriumacetat / Essigsäure pH 5,0 0,15% Triton X-100
5. Säulenwaschpuffer	800 mM NaCl 100 mM Natriumacetat / Essigsäure pH 5,0
6. DNA Elution	1250 mM NaCl 100 mM Tris / HCl pH 8,5

Es wurden Kits der Firmen Genomed und Macherey und Nagel verwendet und entsprechend deren Arbeitsvorschriften verfahren. Tab. 9 enthält beispielhaft die Zusammensetzung der einzelnen Lösungen aus dem Kit Jet-star der Firma Genomed.

2.7.2 PCR - Polymerasekettenreaktion

Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR; Mullis and Falloona, 1987) ermöglicht die exponentielle Vervielfältigung spezieller DNA-Sequenzen innerhalb eines Bereiches, der durch 2 zur Zielsequenz am 3'- bzw. 5'-Ende komplementäre DNA-Oligonukleotide (Primer) begrenzt wird. Drei Schritte werden dabei in ca. 20–30 Zyklen wiederholt. Zunächst wird der DNA-Doppelstrang durch kurzzeitiges Erhitzen auf 94°C in Einzelstränge aufgeschmolzen (Denaturierung). Bei niedrigerer Temperatur, die von der Zusammensetzung und Länge der Primer abhängt, lagern sich die Primer an ihre Zielsequenz an (Annealing). Im Polymerisations-schritt werden diese unter Mithilfe der thermostabilen DNA-Polymerase aus *Thermophilus aquaticus* (*Taq*-Polymerase) und Desoxynukleotidtriphosphaten bei 72°C verlängert. Die erste Runde hinterlässt Fragmente von nicht definierter Länge. Ab der zweiten Runde steigt die Konzentration des gewünschten Fragmentes exponentiell an.

Tabelle 10: Standardreaktionsansatz für die PCR

Reaktionskomponente	Endkonzentration für die <i>Taq</i> -Polymerase	Endkonzentration für die <i>Pwo</i> -Polymerase
10x Reaktionspuffer	20 mM Tris-HCl, pH 8,4	10 mM Tris-HCl, pH 8,85
	50 mM Kaliumchlorid	25 mM Kaliumchlorid
		5 mM Ammoniumsulfat
		2 mM Magnesiumsulfat
Magnesiumchlorid	1,5 mM	-
dNTP-Mix	0,2 mM je dNTP	0,2 mM je dNTP
Primer	0,5 µM jeweils	0,5 µM jeweils
DNA (genomisch o. Plasmid)	variabel (1-75 ng)	variabel (1-75 ng)
DNA-Polymerase	50 U/ml <i>Taq</i>	50 U/ml <i>Pwo</i>

In Abwandlung der hier beschriebenen Methode wurden die Enzyme *Pwo* (DNA-Polymerase aus *Pyrococcus woesei*) oder *Pfu*Turbo (DNA-Polymerase aus *Pyrococcus furiosus*) in der PCR eingesetzt. Diese verfügen über eine Korrekturfunktion, so dass deren Fehlerrate

sechsfach niedriger als die der *Taq*-Polymerase ist. Darüber hinaus ist die *Pfu*-Polymerase in der Lage, in kürzerer Zeit komplexe genomische DNA zu vervielfältigen.

Der Standardreaktionsansatz für eine PCR ist in Tab. 10 zusammengefasst. Die Temperaturprogramme sind im Ergebnisteil angegeben.

2.7.3 Klonierung

2.7.3.1 Spaltung von DNA mit Restriktionsenzymen

Restriktionsenzyme der Klasse II sind Endonukleasen, die palindromische Sequenzen von 4-6 bp Länge in Gegenwart von Magnesiumionen schneiden (Arber and Linn, 1969; Yuan, 1981). Sie hinterlassen überhängende oder glatte Enden. Außer für die *in vitro* Rekombination werden linearisierte Plasmide für die *in vitro* 'run-off-Transcription' benötigt.

Die benötigten Puffer werden vom Hersteller als zehnfach konzentrierte Lösungen mitgeliefert. Einige Enzyme zeigen in Gegenwart von 0,1 g/l Rinderserumalbumin eine erhöhte Aktivität. Kritische Faktoren sind, neben dem pH-Wert des Puffersystems und der Magnesiumkonzentration, hohe Enzym- und Glycerinkonzentrationen, sowie niedrige Konzentrationen an einwertigen Metallionen. Extreme Abweichungen können jeweils unspezifische Spaltungen oder minimale Enzymaktivitäten zur Folge haben. Im Allgemeinen besteht ein Ansatz aus der benötigten Menge zu schneidender DNA, dem verdünnten Puffer und einem oder mehreren Restriktionsenzymen, die die erforderliche Zeit bei 37°C inkubiert werden. Bei mehr als einem Restriktionsenzym ist auf die Kompatibilität der Puffer zu achten und gegebenenfalls nach einer Aufreinigung nacheinander in verschiedenen Puffern zu inkubieren. Für viele Zwecke kann ein Restriktionsansatz direkt, ohne Aufreinigung für Folgereaktionen eingesetzt werden. In einigen Fällen ist es jedoch nötig, das Restriktionsenzym durch Hitzedenaturierung zu inaktivieren oder mittels Säulenelektion zu entfernen. Zur Entfernung von Puffersalzen ist meist eine Ethanol-fällung ausreichend.

2.7.3.2 Dephosphorylierung

Um das Rezirkularisieren eines linearisierten Plasmids oder eine Multimerisierung eines DNA-Fragments über kompatible Enden bei Ligationen zu vermeiden, werden die 5'-Enden der DNA mit der zinkabhängigen alkalischen Phosphatase aus Kälberdarm entfernt (Sambrook *et al.*, 1989). Miteinander kompatibel sind stumpfe DNA-Enden und kohäsive Enden, deren einzelsträngige Überhänge zueinander komplementär sind. Ein Dephosphorylie-

rungsansatz basiert auf einem zinkhaltigen Reaktionspuffer, lässt sich aber auch in den gängigen Restriktionspuffern mit einer Salzkonzentration ≥ 50 mM durchführen. Es wird eine Einheit Enzym pro pmol 5'-Phosphatenden eingesetzt. Die Dephosphorylierung erfolgt für eine Stunde bei 37°C. Durch 10 minütige Inkubation bei 75°C oder 1 h bei 65°C in Gegenwart von 5 mM EDTA wird das Enzym inaktiviert. Es kann zusammen mit den Puffersalzen durch Phenolextraktion und Ethanolfällung entfernt werden. Muss das dephosphorylierte DNA-Fragment außerdem noch aus einem Gemisch weiterer DNAs abgetrennt werden, so kann die Entfernung aller Komponenten in einem Schritt durch Elution nach Agarosegel-Elektrophorese erfolgen.

2.7.3.3 Phosphorylierung

Zur Insertion synthetisch hergestellter DNA-Oligonukleotide in Plasmid-DNA muss zunächst die synthesebedingt fehlende 5'-Phosphatgruppe durch eine Phosphorylierungsreaktion mit Hilfe der T4 Polynukleotidkinase in Anwesenheit von ATP angefügt werden. Dabei wird die γ -ständige Phosphatgruppe von ATP auf die freie 5'-Hydroxylgruppe der DNA übertragen. Zwei zueinander komplementäre DNA-Oligonukleotide können in einem Ansatz phosphoryliert und anschließend hybridisiert werden. Der Hybridisierungsschritt, der eine einminütige Inkubation bei 94°C und eine anschließende Abkühlung auf 30°C innerhalb eines Zeitraums von mindestens 20 min umfasst, ersetzt den Hitzedenaturierungsschritt. Die Sequenzen der DNA-Oligomere werden so gewählt, dass an den Enden der Duplex-DNA nach Hybridisierung überhängende Einzelstränge verbleiben, die kompatibel für die Ligation mit einem entsprechenden Plasmid sind.

Ein Phosphorylierungsansatz setzt sich zusammen aus der einzel- oder doppelsträngigen DNA mit freier 5'-Hydroxylgruppe, 70 mM Tris-HCl (pH 7,6), 10 mM Magnesiumchlorid, 5 mM Dithiothreitol, 1 mM ATP und 30-100 U T4 Polynukleotidkinase je pmol 5'-Enden. Nach 30 minütiger Inkubation bei 37°C kann das Enzym durch 20 minütige Inkubation bei 65°C inaktiviert werden. Die Phosphorylierungsreaktion findet gewöhnlich in Gegenwart hoher DNA-Konzentrationen statt. Aufgrund der starken Verdünnung des Oligomers im Ligationsansatz kann auf eine Aufreinigung der phosphorylierten DNA verzichtet werden.

2.7.3.4 DNA-Ligation

Der letzte Schritt bei der *in vitro* Rekombination ist die Rezirkularisierung eines linearen Plasmidfragments unter Insertion eines DNA-Fragments mit Hilfe der DNA-Ligase. Formal entspricht die Ligation der Reparatur zweier Einzelstrangbrüche einer doppelsträngigen DNA. Die T4 DNA-Ligase kann unter Hydrolyse von ATP sowohl kohäsive als auch stumpfe Enden ligieren (Weiss *et al.*, 1968). Die linearen Plasmidfragmente werden mit 40 mM Tris-HCl (pH 7,8), 10 mM Magnesiumchlorid und 10-100 U T4 DNA-Ligase je μg DNA versetzt. Bei kohäsiven Enden wird mit ATP in einer Endkonzentration von 1 mM ergänzt. Da bei stumpfen Enden hohe ATP-Konzentrationen inhibierend wirken, beträgt hier die Endkonzentration 0,05-0,1 mM und der Ansatz wird mit Polyethylenglykol 4000 auf eine Konzentration von 5% gebracht. In der Regel wird eine Vormischung hergestellt, auf mehrere Ansätze verteilt und mit unterschiedlichen Mengen Insert-DNA versetzt. Als Religationskontrolle wird stets ein Ansatz ohne Insert-DNA mitgeführt. Für die meisten Ligationen ist eine Inkubation bei 22°C für 1h ausreichend.

2.7.3.5 Transformation von kompetenten *E.coli* Zellen

Das Einschleusen zirkulärer DNA in kompetente Zellen wird als Transformation bezeichnet (Cohen *et al.*, 1972). Die Zellanzucht auf Antibiotika-haltigem Nährboden erlaubt die Selektion auf Bakterienklone, welche ein Plasmid mit exprimierbarer Antibiotikaresistenz enthalten. 200 μl kompetente Zellen werden auf Eis aufgetaut, mit 10 μl Ligationsansatz oder 30 ng Plasmid-DNA versetzt und 30 min auf Eis inkubiert. Zur Erhöhung der Transformations-effizienz schließt sich ein Hitzeschock an, bei dem die Zellen 45 sec. im Wasserbad auf 42°C temperiert werden. Es folgt eine Inkubation auf Eis für 2 min, bevor der Ansatz mit 1 ml LB-Medium versetzt und zur Ausprägung der Antibiotikaresistenz 1h bei 37°C inkubiert wird. Danach wird 3 min bei 1.000 x g und Raumtemperatur zentrifugiert, der Überstand dekantiert und das Zellsediment in dem verbleibenden Medium resuspendiert. Die gesamte Zellsuspension wird auf einer Agarplatte ausgestrichen, sofern ein Ligationsansatz verwendet wurde. Es entstehen Einzelkolonien. Bei einer Transformation mit Plasmid-DNA wird nur etwa ein Viertel ausgestrichen.

2.7.4 Sequenzierung von DNA

Zur Kontrolle der erfolgreichen Klonierung wurden die Gensequenzen einiger differentieller Proteine ausgehend von den Primersequenzen M13 revers oder T7 innerhalb des Plasmids nach einer modifizierten Methode der DNA-Sequenzierung nach Sanger (Sanger *et al.*, 1977) überprüft.

Die mit Hilfe einer DNA-Polymerase synthetisierten komplementären Stränge, die wegen des statistisch verlaufenden, basenspezifischen Kettenabbruchs, verursacht durch eine Didesoxyribose, verteilt auf vier Ansätze alle möglichen Längenfragmente enthalten, werden auf einem hochauflösenden Harnstoff-Polyacrylamidgel aufgetrennt. Die Primer sind fluoreszenzmarkiert und daher können die Fragmente mit einem Laserstrahl detektiert werden.

Reaktionsansatz:

Die Reaktionskomponenten und die Arbeitsvorschrift enthält der Sequenzierkit SequiTherm EXCEL II (Fa. Epicentre Technologies).

Alle Komponenten werden auf Eis pipettiert. Zunächst wird ein Premix aus 3,5 µl 3.5x Sequencingbuffer, 1 µl Primer entsprechend 1 pmol DNA und 1 µg DNA-Template entsprechend ca. 300 fmol des Plasmids mit dem einklonierten Gen eines differentiellen Proteins mit deionisiertem Wasser auf 11,5 µl aufgefüllt. Weiterhin werden in vier PCR-Tubes je 1 µl des basenspezifischen Terminationsmixes vorgelegt, der jeweils zu einem geringen Anteil ein Nukleotid mit einer Didesoxyribose enthält, so dass der DNA-Strang an dieser Stelle nicht verlängert werden kann, wenn das Didesoxynukleotid eingebaut wird. Schließlich wird der Premix mit 0,5 µl DNA-Polymerase ergänzt. Je 2,5 µl des Premixes werden zum Terminationsmix pipettiert.

Dieser Reaktionsansatz durchläuft folgendes Programm :

- 5 min, 95°C Denaturierung des Templates
- 30 Zyklen mit den folgenden Parametern: 30 sec 95°C
 15 sec 50°C
 30 sec 70°C

Nach Reaktionsende wird in jeden Ansatz 2 µl Stop/Loadingbuffer gegeben.

Gelelektrophorese:

Die sorgfältig gereinigten 66 cm langen Glasplatten werden mit den 0,25 mm dünnen Spacern in die Spannvorrichtung eingebaut und zum Gießen des Geles in die geneigte Ebene gelegt.

Folgende Bestandteile werden gut miteinander vermischt und mit einer Spritze luftblasenfrei zwischen die Platten gegossen:

- 21 g Harnstoff in 32 ml deionisiertem Wasser aufgelöst
- 4,3 ml Long ranger Gel-Solution (Acrylamid/Bisacrylamid)
- 500 µl DMSO
- 350 µl APS (10%, frisch angesetzt)
- 50 µl TEMED

In das noch flüssige Gel wird ein Platzhalter für den Probenkamm eingeführt. Man lässt das Gel mindestens 1 h polymerisieren. Dann wird der Platzhalter entfernt, der Hohlraum mit TBE-Puffer (Tris-Borat-EDTA Puffer) gespült und ein Probenkamm eingesetzt. Das in die Apparatur eingesetzte Gel läuft nach dem Füllen der Pufferreservoirs mit TBE-Puffer eine halbe Stunde unter den folgenden Bedingungen vor: 45°C, 2200 V, 37 mA, 50 W. Dann können die Probenaschen mit je 1 µl Reaktionsmix gefüllt und die Elektrophorese gestartet werden.

Auswertung:

Anhand der aufgezeichneten Banden kann die Sequenzierung automatisch unter manueller Nachbearbeitung erfolgen.

Die erhaltene Sequenz kann unter <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/Blast.cgi> mit der Gensequenz verglichen werden.

2.8 Chromatografische Methoden

2.8.1 Dünnschichtchromatografie zur Untersuchung der Nukleotide

Zur Untersuchung der Stabilität von ATP und GTP wird dem Standardreaktionsansatz (Kap. 2.1.1) radioaktives α -³²P-ATP bzw. -GTP (1 µCi pro 500 µl Ansatz) zugefügt. Der Verlauf des Zerfalls wird mit einer Kinetik verfolgt. 25 µl Aliquots des Reaktionsansatzes werden nach Ablauf der entsprechenden Zeit in flüssigem Stickstoff eingefroren.

Die Anleitung zur Dünnschichtchromatografie wurde einem Protokoll nach Cashel (1969) entnommen. Polyethylenimincellulosefolien der Größe 20 x 20 cm (Polygram[®] CEL 300 PEI, Macherey-Nagel) lässt man zunächst in der Chromatografiekammer mit Millipore-Wasser vorlaufen und trocknet anschließend mit dem Fön. In der Zwischenzeit werden die auf Eis aufgetauten Proben mit 25 µl 2 M Ameisensäure versetzt und weitere 15 min auf Eis

inkubiert. Daran schließt sich eine 1 minütige Zentrifugation in der Eppendorf-Tischzentrifuge bei 13 000 rpm und Raumtemperatur an. Vom Überstand wird 1 µl auf die Platte aufgetragen. Als Laufmittel dient 1,5 M Kaliumdihydrogenphosphat-Lösung, pH 3,4. Der Lauf erfolgt bei Raumtemperatur. Danach wird die Platte wiederum zügig mit dem Fön getrocknet, um eine unerwünschte Diffusion zu vermeiden. Auf die Platten wird ein Screen für 3–5 h aufgelegt, der anschließend mit dem Phosphoimager detektiert wird.

2.8.2 Reversed Phase High-Performance Liquid Chromatography (RP-HPLC) zur Proteinfractionierung

Zur Fraktionierung der Proteine aus dem Reaktionsansatz des Batchsystems mit dem Ziel der Anreicherung von Proteinen geringer Kopienzahl und Reduzierung der Anzahl von Proteinen, die pro Gel geladen werden, dient ein modifiziertes Protokoll nach Badock *et al.* (2001).

Analytischer Maßstab

Der Standardreaktionsansatz ohne PEG (Kap. 2.1.1) und ohne ¹⁴C-Leucinmarkierung wird mit 8 M Harnstoff versetzt und auf eine Reversed Phase C₄ Vydac Säule der Größe 2,1 x 150 mm, 5 µM Partikelgröße, 300 Å Porengröße in unterschiedlichen Proteinkonzentrationen (Angaben siehe unter Ergebnisse - Etablierung der HPLC: Kap. 3.2.3; 3.2.4) aufgebracht. Ein Stufengradient bestehend aus dem Lösungsmittel A: 0,1% TFA in Millipore-Wasser und Lösungsmittel B: 0,1% TFA in Acetonitril wird wie folgt ausgeführt: Das Untersuchungsmaterial wird zunächst bei einer Konzentration von 5% Puffer B injiziert und die Säule 20 min gespült. Mit einer Flussrate von 0,5 ml/min und ansteigenden Konzentrationen Puffer B in den Stufen 26% 12 min, 34% 12 min, 38% 10 min, 42% 10 min, 48% 10 min und 90% 5 min werden Fraktionen pro Minute gesammelt, die entsprechend der Peakzugehörigkeit der gemessenen Absorption bei 220 nm nach der Gefriertrocknung gepoolt werden. Die gepoolten Fraktionen werden in 2-DE Probenpuffer aufgenommen. Für den analytischen Maßstab wird eine HPLC-Anlage der Firma Shimadzu (vgl.6.2) eingesetzt.

Präparativer Maßstab

Dem Standardreaktionsansatz wie oben beschrieben wird kein Harnstoff hinzugefügt. Als Säule dient eine Vorsäule Vydac C₄ der Größe 25 x 50 mm, 5 µM Partikelgröße, 300 Å Porengröße, in Verbindung mit einer HPLC-Anlage Waters Delta Prep 3000. Die oben

beschriebenen Konzentrationsstufen mit Puffer B werden jeweils 30 min gehalten. Die Flussgeschwindigkeit beträgt 4 ml/min. Die Fraktionen werden in zuvor gewogenen, eisgekühlten Glaskolben gesammelt - ein Poolen entfällt. Die Kolben werden bei -80 °C eingefroren und später wiederum lyophilisiert und gewogen. Das Gewicht der getrockneten Proteinfractionen wird durch Abzug des Gewichtes des Glaskolbens ermittelt.

2.8.3 RP-HPLC mit Nachsäulenderivatisierung zur Polyamin-Analyse

Biogene Amine werden zusammen mit den Aminosäuren und anderen freien Extraktstoffen mit verdünnter Perchlorsäure aus dem Reaktionsansatz extrahiert. Der Extrakt wird direkt zur HPLC-Untersuchung verwendet. Die biogenen Amine werden an einer Reversed Phase getrennt und nach online Derivatisierung mittels o-Phthaldialdehyd (OPA) durch Fluoreszenzdetektion quantitativ bestimmt (Seiler *et al.*, 1985; Veciana-Nogues *et al.*, 1995; §35 LMBG Lebensmittel- und Bedarfsgegenständegesetz, Amtliche Sammlung von Untersuchungsverfahren L 10.00-5, 1999).

25 µl des Standardreaktionsansatzes mit PEG (Kap.2.1.1), ohne ¹⁴C-Leucinmarkierung werden 1:10 mit 0,6 M Perchlorsäure verdünnt und kurz in der Eppendorfzentrifuge bei 13000 rpm und Raumtemperatur abzentrifugiert, um den groben Niederschlag zu entfernen. Der Überstand wird nochmals mit Hilfe eines Amiconröhrchens der Membranporengröße 5 kDa von feinen Partikeln befreit. 10 µl dieses Perchlorsäureauszuges werden auf eine analytische Reversed Phase C₈-Säule der Korngröße 5 µm und den Abmessungen 4,6 mm x 150 mm (Zorbax Eclipse XBD-C8) injiziert. Zur Trennung der biogenen Amine wird ein kontinuierlicher Gradient aus Eluent A: 100 mM Natriumacetat, 10 mM Natrium-1-octansulfonat, pH 4,5 mit steigender Konzentration Eluent B: 150 mM Natriumacetat, 10 mM Natrium-1-octansulfonat, pH 4,5 / 50 Vol% Acetonitril ausgeführt. Bei einer Flussrate von 1,5 ml/min wird innerhalb von 40 min von 5% B auf 50% B übergegangen.

Die Derivatisierung nach der Säule erfolgt über ein T-Stück. Die vorbereitete Derivatisierungslösung (Zusammensetzung s.u.) wird mit einem Fluss von 0,7 ml/min während der Analyse zugeführt. Von der Säule eluierende Amine werden auf einer etwa 50 cm langen Reaktionsschleife (innerer Durchmesser 0,25 mm) in fluoreszierende Derivate überführt. Die Fluoreszenzanregung ist bei 330 nm, die Emission bei 465 nm. Die Standardlösungen werden in einer Konzentration von 10 µg/ml aus Putrescindihydrochlorid und Spermidintrihydrochlorid hergestellt. Als interner Standard für die Retentionszeit dient 1,7 Diaminoheptan. Die Amingehalte werden durch Vergleich der Peakflächen mit den Standardsubstanzen ermittelt.

Derivatisierungslösung: 1,5 g BRIJ[®] 35 (Polyethylenlaurylether) werden in 5 ml Methanol gelöst. Anschließend werden 500 mg o-Phthaldialdehyd zugegeben. Die so erhaltene Lösung wird zu 500 ml Borat-Puffer (61,8 g Borsäure, 40 g Kaliumhydroxid in 1 l Wasser lösen) gegeben. Nach Zugabe von 1,5 ml β -Mercaptoethanol ist die Lösung gebrauchsfertig.