

6 Material und Methoden

6.1 Methoden zur Proteinbestimmung

6.1.1 Bestimmung nach Bradford^[77]

Der Farbstoff Coomassie Brilliant Blue reagiert im sauren Milieu mit den Aminogruppen des zu bestimmenden Proteins. Es entsteht ein Konjugat, das bei der Wellenlänge 595 nm photometrisch vermessen wird. Störend wirken hier Detergentien und reduzierende Substanzen. Als Standard für die Eichung der Absorption wird eine Lösung von Rinderserumalbumin (BSA) mit einer Konzentration von 1 mg/ml verwendet. Die Eichreihe deckt einen Proteinmengen-Bereich von 2 bis 20 µg/Probe ab. Sowohl die Eichkurve (mindestens fünf Punkte) als auch die Probe werden erst mit bidestilliertem Wasser auf 500 µl aufgefüllt und mit 500 µl Bradford-Reagenz gemischt. Die Messung der Absorption sollte schnell danach erfolgen.

Bradford-Reagenz: 0,06 % (w/v) Coomassie Brilliant Blue G-250
3 % (v/v) HClO₄ (70-72 %)

6.1.2 Bestimmung nach der BCA-Methode^[78]

Bei dieser Methode wird das Protein unter alkalischen Bedingungen durch Cu²⁺-Ionen oxidiert. Die dadurch zu Cu⁺ reduzierten Ionen bilden mit dem aromatischen System der Bicinchoninsäure einen violetten Komplex, dessen Absorption bei einer Wellenlänge von 562 nm gemessen werden kann. Zwar stören bei diesem Test Detergentien nicht, es besteht jedoch eine starke Abhängigkeit von Temperatur und Inkubationsdauer.

Die Bestimmung wird mit einem Kit der Firma Pierce durchgeführt. Die Proben und eine Eichreihe mit BSA (im Bereich 1 bis 20 µg) werden mit bidestilliertem Wasser auf jeweils 50 µl aufgefüllt. Dazu wird 1 ml BCA-Reagenz pipettiert (Pierce-Lösungen A und B im Verhältnis 50:1). Es folgt eine Inkubation von 30 min im Thermoschüttler bei 60 °C. Nach dem Abkühlen der Proben wird die Absorption bei 562 nm gemessen.

6.2 Diskontinuierliche SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese^[79]

Es werden Flachgele im Hoefer-Gelsystem (10 x 14 cm) oder im Mini-Protean II-System von BioRad (9,5 x 6 cm) gegossen. Die Sammelgele enthalten 3 % Acrylamid, die Trenngele zwischen 10 und 15 % Acrylamid (und jeweils 2,6 % Bisacrylamid). Nach Einbau der Gele in die entsprechende Apparatur wird die Kammer mit Elektrophoresepuffer gefüllt. Die Proben werden nach Zugabe von Probenpuffer 5 min bei 95 °C erhitzt und danach kurz in der Tischzentrifuge zentrifugiert, um unlösliche Bestandteile abzutrennen. Die Überstände werden mit einer Hamilton-Spritze in die Taschen des Sammelgels gefüllt. Die Trennung erfolgt bei maximal 20 mA (0,75 mm Geldicke).

Trenngel (10 %): 10 % (w/v) Acrylamid/Bisacrylamid (37,5:1)
375 mmol/l Tris-HCl pH 8,8
0,1 % (w/v) SDS
750 µg/ml APS
1 µl/ml TEMED

Sammelgel: 3 % (w/v) Acrylamid/Bisacrylamid (37,5:1)
125 mmol/l Tris-HCl pH 6,8
0,1 % (w/v) SDS
750 µg/ml APS
1 µl/ml TEMED

Probenpuffer (4x): 62,5 mmol/l Tris-HCl pH 6,8
20 % (w/v) Glycerin
5 % (w/v) β-Mercaptoethanol
3 % (w/v) SDS
0,1 % (w/v) Bromphenolblau

Elektrophoresepuffer: 25 mmol/l Tris-HCl pH 8,3
190 mmol/l Glycin
0,1 % (w/v) SDS

Am Ende der Elektrophorese wird das Gel gefärbt und entfärbt.

Färbung mit Coomassie Brilliant Blue

Das Gel wird aus den Glasplatten der Elektrophorese-Apparatur entnommen und in eine Schale mit Färbelösung überführt. Die Färbung erfolgt unter leichtem Schütteln 30 bis 60 min lang. Danach wird das Gel solange mit Entfärbelösung behandelt, bis eine deutliche Blaufärbung der Proteinbanden zu erkennen ist, das restliche Gel aber

weitgehend entfärbt ist. Anschließend wird das Gel zwischen zwei Lagen Zellophan unter Vakuum getrocknet.

Färbelösung: 0,1 % (w/v) Serva Blue R-250

30 % (w/v) Isopropanol

10 % (w/v) Essigsäure

Entfärbelösung: wie die Färbelösung, aber ohne Serva Blue R-250

6.3 Western Blot

6.3.1 Elektroblothing nach dem Semi-dry-Verfahren

Bei dieser Methode werden die durch SDS-PAGE getrennten Proteine auf eine Nitrocellulose-Membran transferiert. Dies erfolgt in einer Carbonglas-Blotkammer. Es werden erst drei Lagen mit Transferpuffer getränktes Filterpapier der gleichen Abmessung wie das Gel luftblasenfrei auf die anodische Carbonglasplatte gelegt. Die Membran wird ebenfalls in Transferpuffer äquilibriert und auf die Filterpapiere gelegt, darauf das ungefärbte Gel. Weitere drei Lagen getränktes Filterpapier bilden den Abschluss des „Sandwich“. Die Kammer wird mit einem Deckel, der die kathodische Carbonglasplatte enthält, verschlossen. Der Deckel wird zusätzlich mit etwa 2 kg beschwert. Der Transfer der Proteine auf die Membran wird bei 1 mA/cm^2 für 1 h durchgeführt.

Transferpuffer: 48 mmol/l Tris-HCl pH 7,4

39 mmol/l Glycin

20 % (w/v) Methanol

0,037 % SDS

Filterpapier: Whatman 3 MM

Nitrocellulosemembran: Hybond (Amersham)

6.3.2 Proteinfärbung auf der Blotmembran

Die Proteine auf der Membran des Immunoblots werden reversibel mit Ponceau-Rot gefärbt und die Proteinbanden des Molekulargewichtsmarkers mit Bleistift markiert. Anschließend wird die Membran mit Wasser wieder entfärbt.

Färbung: 5 min in 0,2 % (w/v) Ponceau S (Sigma) in 7 % Trichloressigsäure

Entfärbung: mit bidestilliertem Wasser, bis die Proteinbanden sichtbar werden.

6.3.3 Immunfärbung eines Western Blots

Die Proteine werden wie oben beschrieben auf die Nitrocellulosemembran übertragen. Anschließend wird die Membran 1 h bei Raumtemperatur oder über Nacht bei 4 °C in 10 % Milchpulverlösung unter langsamem Schütteln blockiert. Anschließend wird die Membran 1 h bei RT mit dem gewünschten ersten Antikörper inkubiert. Danach wird die Membran dreimal gründlich mit PBS gewaschen. Zum Nachweis des gebundenen ersten Antikörpers wird die Membran dann 1 h bei RT mit dem entsprechenden zweiten Antikörper behandelt. Die Membran wird wieder dreimal gründlich mit PBS gewaschen. Schließlich erfolgt die Färbung je nach dem verwendeten zweiten Antikörper mit Hilfe der Alkalischen Phosphatase oder der Peroxidase und Chemilumineszenz.

Milchpulverlösung: 10 % (w/v) Magermilchpulver in PBS

PBS (Phosphate buffered saline): für 1 l 10xPBS

80 g NaCl

2 g KCl

2 g KH₂PO₄

14,4 g Na₂HPO₄·2H₂O (oder 12,74 g Na₂HPO₄·H₂O)

a) Alkalische Phosphatase:

In basischem Entwicklungspuffer werden die Substrate der alkalischen Phosphatase gemischt: Nitroblau-Tetrazolium und 5-Bromo-4-chloro-3-indolylphosphat.

Die Reaktion setzt sofort ein und wird bei Erreichen der gewünschten Färbung der Proteinbanden mit 20 mmol/l EDTA-Lösung gestoppt.

Entwicklungspuffer: 100 mmol/l NaHCO₃, pH 9,8

1 mmol/l MgCl₂

b) ECL (Enhanced chemiluminescence):

Für die Peroxidase-Reaktion werden zwei Lösungen benötigt, die direkt vor Verwendung gemischt und dann auf die Blotmembran gegeben werden. Es werden für eine Membran je 500 µl Lösung A und B gemischt und etwa eine Minute auf der Blotmembran gelassen. Anschließend wird die Membran leicht abgetrocknet, in eine Entwicklungskammer unter Zellophan gelegt und leicht fixiert. In der Dunkelkammer wird bei Rotlicht ein passendes Filmstück für einige Sekunden bis Minuten (je nach Intensität des Signals) auf den Blot gelegt und anschließend sofort entwickelt. Auf dem Film können dann die Lage

des Blots und die Proteinbanden des Standards markiert werden, um das geschwärzte Signal lokalisieren zu können.

Verwendete Antikörper:

Primärantikörper:

- Monoklonale Antikörper gegen Epitope des nAChR, aus Ratte, zur Verfügung gestellt von S. Tzartos (Hellenic Pasteur Institute, Athen, Griechenland)^[80]:

α -Untereinheit: mAb 5, mAb 8

β -Untereinheit: mAb 111, mAb 117

γ -Untereinheit: mAb 154

δ -Untereinheit: mAb 134, mAb 139

Verdünnung 1:2000

- anti-His₆-Tag, aus Maus, Firma Dianova (Hamburg, Deutschland)

Verdünnung 1:2000

- anti-V5-Tag, aus Maus, Firma Invitrogen (, Deutschland)

Verdünnung 1:5000

- anti-GST, aus Maus (monoklonal IgG), Firma

Verdünnung 1:2000

Sekundärantikörper:

- anti-Maus/Horse Radish Peroxidase, aus Schaf, Gesamtmolekül, Firma Dianova

Verdünnung 1:1000

- anti-Ratte/Alkalische Phosphatase, aus Ziege, Firma Dianova

Verdünnung 1:2000

6.4 Molekularbiologische Methoden

6.4.1 Agarose-Gelelektrophorese

Die Trennung von DNA-Fragmenten unterschiedlicher Größe erfolgt in Agarosegelelen. Gewöhnlich wurden Gele mit 0,8 bis 1,0 % Agarose in TAE-Puffer verwendet. Im Bereich von 0,6 bis 10 kB erzielt man mit Gelen dieser Konzentration ausreichende Trennungen. Alle Gele enthalten den DNA-interkalierenden Farbstoff Ethidiumbromid in einer Konzentration von 0,5 µg/ml. Ethidiumbromid ermöglicht durch UV-induzierte Fluoreszenz ein Sichtbarmachen der DNA-Banden. In Abhängigkeit von der Größe der Gele erfolgte die Elektrophorese bei 50 bis 120 V. Analytische Gele wurden unter UV-Licht von 302 nm fotografiert.

TAE-Puffer: 40 mmol/l Trisacetat, pH 8,0

2 mmol/l EDTA

Probenpuffer: 25 mmol/l EDTA, pH 8,0

50 mg/ml Blue Dextran

6.4.2 Anzucht von Bakterien

Für Vorkulturen wurden Einzelkolonien von entsprechenden Agarplatten entnommen und in 5 ml Medium angezogen, während für präparative Zwecke stets Vor- bzw. Glycerinkulturen zum Animpfen benutzt wurden. Die Bakterien wurden bei 30 °C oder 37 °C in LB oder TB-Medium unter starker Bewegung im Schüttelinkubator herangezogen. Bei Plasmid-enthaltenden *E. coli* wurden die dem Resistenzgen entsprechenden Antibiotika zugesetzt. Das Wachstum der Zellen wurde durch Trübungsmessung bei 600 nm verfolgt.

LB (Luria-Bertani)-Medium: 1 l in dest. H₂O

10 g Trypton (ICN, USA)

5 g Hefeextrakt (ICN, USA)

5 g NaCl

pH 7,0 mit NaOH einstellen

TB (Terrific broth)-Medium: 450 ml in dest. H₂O

6 g Trypton

12 g Hefeextrakt

2 g Glycerol

nach dem Autoklavieren: 50 ml TB-Salze zugeben, die getrennt hergestellt und autoklaviert werden müssen.

TB-Salze: 500 ml in dest. H₂O

11,55 g KH₂PO₄

62,7 g K₂HPO₄

Alle Medien werden 20 min bei 121 °C und 1,2 bar autoklaviert und nach dem Abkühlen verwendet.

6.4.3 Herstellung kompetenter *E. coli*

Ausgehend von einer Vorkultur (OD₆₀₀ ca. 0,5 bis 1,5) der gewünschten *E. coli* werden 400 ml SOC-Medium im Volumenverhältnis 1:500 angeimpft. Die Bakterien werden bei einer OD₆₀₀ von etwa 0,3 für 30 min auf Eis gestellt und danach 10 min bei 5000 g abzentrifugiert. Das Pellet wird in 200 ml eiskaltem Puffer K1 aufgenommen, erneut zentrifugiert und dann in 200 ml eiskaltem Puffer K2 resuspendiert. Nach weiterem Zentrifugieren erfolgt die Aufnahme der Zellen in 4 ml Puffer K2. Nach Zugabe von 0,8 ml Glycerol (87 %) wurden die Zellen in 200 µl-Aliquots in Eppendorff-Gefäßen in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80 °C gelagert.

SOC-Medium: 500 ml in dest. H₂O

10 g Trypton

2,5 g Hefeextrakt

0,25 g NaCl

5 ml 250 mmol/l KCl-Lösung

pH 7,0 mit NaOH

K1: 100 mmol/l MgCl₂; 5 mmol/l Tris-HCl, pH 7,4

K2: 100 mmol/l CaCl₂; 5 mmol/l Tris-HCl, pH 7,4

6.4.4 *E. coli*-Transformation

Zu je 100 µl auf Eis aufgetauten kompetenten *E. coli* werden 5 bis 500 ng Plasmid-DNA in maximal 10 µl Gesamtvolumen gegeben. Danach erfolgt eine Inkubation für 20 min auf Eis. Nach einem Hitzeschock von einer Minute bei 42 °C werden die Zellen mit 900 µl LB-Medium versetzt und 1 h unter Schütteln bei 37 °C zur Expression der entsprechenden Antibiotika-Resistenz(en) inkubiert. Gewöhnlich werden 200 µl der Probe auf LB-Agar-Platten mit den jeweiligen Antibiotika ausgestrichen. Wenn auf diese Weise nicht genügend Kolonien entstehen, werden die restlichen Bakterien der Probe bei 10000 g abzentrifugiert, in 200 µl LB aufgenommen und ausplattiert.

LB-Agar-Platten: 500 ml (für 20 bis 25 Platten)

5 g Trypton

2,5 g Hefeextrakt

5 g NaCl

6 g Agar select

Die Suspension in Wasser wird für 20 min bei 121 °C und 1,2 bar autoklaviert. Der Agar löst sich dabei, die Lösung wird langsam auf Handwärme abgekühlt, anschließend können Antibiotika hinzugefügt werden. Das Medium wird dann etwa 0,5 cm hoch in Kunststoff-Petrischalen gegossen und kurz mit dem Bunsenbrenner abgeflammt. Bei Raumtemperatur lässt man das Medium erkalten und damit erstarren. Die Platten können für einige Wochen im Kühlschrank aufbewahrt werden.

6.4.5 Analytische Plasmidisolierung aus *E. coli*

Zur Isolierung kleiner Plasmid-DNA-Mengen bis zu etwa 20 µg wird das QIAprep-Spin-Plasmid-Kit der Firma QIAGEN (Hilden, Deutschland) verwendet.

Es werden 2 bis 4 ml einer Bakterienkultur (OD_{600} ca. 1,5) durch Zentrifugation bei 10000 g für 5 min pelletiert. Nach Entfernung des Überstandes erfolgt die Re-suspension der Bakterien in 250 µl Puffer P1. Danach werden die Zellen mit 250 µl Aufschlusspuffer P2 lysiert (5 min bei RT). Der Aufschlusspuffer enthält SDS, das die zellulären Proteine denaturiert, und NaOH, das neben der Zelllyse die chromosomale und Plasmid-DNA denaturiert. Durch Zugabe von 350 µl Neutralisationspuffer N3 wird die Plasmid-DNA, die unter den bestehenden Hochsalzbedingungen in Lösung bleibt, renaturiert. Dagegen bleibt die chromosomale DNA aufgrund ihrer Größe denaturiert und bildet zusammen mit den Proteinen und SDS ein Präzipitat. Anschließend findet eine zehnminütige Zentrifugation bei 10000 g statt. Der Überstand enthält die Plasmid-DNA und wird auf eine QIAprep-Spin-Säule mit einer DNA-bindenden Silikat-Matrix gegeben. Die Säule wird 30 s bei 10000 g zentrifugiert. Nach zwei Waschschritten mit Ethanol-haltigem Puffer erfolgte die Elution der Plasmid-DNA mit 50 bis 100 µl TE-Puffer durch 1 min Zentrifugation bei 10000 g. Alle Lösungen, die für die analytische Plasmidisolierung benutzt werden, stammen von QIAGEN (Hilden, Deutschland). Die genaue Zusammensetzung der Lösungen wurde vom Hersteller nicht angegeben.

TE-Puffer: 10 mmol/l Tris-HCl, pH 8,0

1 mmol/l EDTA

6.4.6 Präparative Plasmidisolierung aus *E. coli*

Mit der präparativen Plasmidisolierung werden bis zu 1000 µg Plasmid-DNA gewonnen. Es wird der QIAfilter Maxi-Kit der Firma QIAGEN (Hilden, Deutschland) verwendet.

Es werden 100 ml einer Bakterienkultur (OD_{600} ca. 1,5) durch Zentrifugation bei 8000 g geerntet, das Pellet wird in 10 ml Puffer P1 aufgenommen und 5 min mit 10 ml Puffer P2 lysiert. Nach Zugabe von 10 ml Puffer P3 wird die Lösung mit den präzipitierten Proteinen in eine QIAfilter-Cartridge überführt und 10 min bei RT inkubiert. Währenddessen wird die Silikatmatrix der tip500-Säule mit 10 ml Puffer QBT äquilibriert. In diese Säule wird die Lösung mit der Plasmid-DNA durch den Filter der Cartridge gedrückt. Die DNA bindet an die Matrix und wird zweimal mit je 30 ml Puffer QC gewaschen. Die DNA wird mit 15 ml QF eluiert und mit 10,5 ml Isopropanol gefällt. Anschließend wird die DNA mit 70 % Ethanol gewaschen, getrocknet und in 200 bis 500 µl TE-Puffer aufgenommen.

Lösungen:

P1: 50 mmol/l Tris HCl, pH 8,0; 10 mmol/l EDTA; 100 µg/ml RNase A

P2: 0,2 mol/l NaOH; 1 % SDS

P3: 2,55 mol/l KCH_3COO , pH 4,8

QBT: 0,75 mol/l NaCl; 50 mmol/l MOPS, pH 7; 15 % Ethanol

QC: 1 mol/l NaCl; 50 mmol/l MOPS, pH 8,5; 15 % Ethanol

6.4.7 DNA-Elution aus Agarosegelen

Die Elution von DNA aus Agarosegelen erfolgt mit einem DNA-Extraktionskit der Firma peqLab (Erlangen, Deutschland) entsprechend den Angaben des Herstellers. Dabei wird die aus dem Gel unter UV-Licht ausgeschnittene DNA-Bande zunächst bei 50 °C im dreifachen Volumen einer 3 molaren NaI-Lösung gelöst. Die Lösung wird anschließend auf eine Spin-Säule mit Silikatmatrix aufgetragen und 1 min bei 10000 g zentrifugiert. Die gebundene DNA wird zweimal mit Waschpuffer gewaschen und schließlich mit 50 µl TE-Puffer eluiert.

6.4.8 DNA-Konzentrationsbestimmung

Kenntnisse über die Menge einzusetzender DNA sind vor allem beim Einsatz von DNA-Rekombinationstechniken wie Transformation oder Ligation nötig. Die Bestimmung erfolgt über die UV-Absorption von DNA-Molekülen bei 260 nm. Es gilt:

$A_{260}=1$ entspricht 50 $\mu\text{g/ml}$ dsDNA. Gleichzeitig lässt sich die Qualität der DNA durch Ermittlung des Quotienten A_{260}/A_{280} bestimmen. Proteinverunreinigungen vermindern den Quotienten, da die Peptidbindung bei 280 nm absorbiert. Hochgereinigte DNA weist einen A_{260}/A_{280} -Wert von 1,8 bis 2 auf.

6.4.9 Restriktionsverdau

Im analytischen Maßstab werden 0,1 bis 1 μg DNA mit 1 bis 5 U Restriktionsenzym pro μg DNA in 20 μl Restriktionspuffer 1 h bei 37 °C inkubiert. Präparativ verwendet man das gleiche Restriktionsenzym/DNA-Verhältnis, jedoch niemals mehr als 1/10 Volumen Enzymstammlösung, da das dort enthaltene Glycerol die Enzymspezifität stören kann. In Abhängigkeit von der verwendeten DNA kann es zu unvollständiger Spaltung kommen. In diesem Fall wird die Enzymkonzentration erhöht bzw. die Inkubationszeit verlängert, wobei nach vom Restriktionsenzym abhängigen Zeitabständen Enzymaliquots hinzugegeben werden müssen.

Restriktionspuffer: Enzymspezifischer 10-fach konzentrierter Puffer, der vom Hersteller mit dem Enzym geliefert wird.

6.4.10 Ligation von DNA-Fragmenten

Zur Verknüpfung (Ligation) von DNA-Fragmenten wird die T4-DNA-Ligase (NEB, England) verwendet. Es werden immer mehrere Ansätze mit unterschiedlichem Verhältnis von Vektor zu Insert pipettiert, da es von der DNA abhängt, in welchem Verhältnis die Ligation optimal funktioniert. Die gesamte, in einem Ansatz von 10 μl mit 1 Unit Enzym eingesetzte DNA-Menge variiert von 50 bis 150 ng. Der Ligase-Puffer darf nur auf Eis aufgetaut werden. Die Proben wurden pipettiert und anschließend über Nacht bei 16 °C inkubiert.

Beispiel-Pipettierschema:

3 μl Vektor	3 μl Vektor	3 μl Vektor
0,2 μl Insert	0,4 μl Insert	1 μl Insert
3,8 μl H ₂ O	3,6 μl H ₂ O	3 μl H ₂ O
2 μl 5xPuffer	2 μl 5xPuffer	2 μl 5xPuffer
1 μl Ligase	1 μl Ligase	1 μl Ligase

Negativkontrolle:

3 μl Vektor
4 μl H ₂ O
2 μl 5xPuffer
1 μl Ligase

6.4.11 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die PCR dient der *in vitro* Amplifikation von DNA. Dabei wird eine bestimmte Sequenz zwischen den spezifischen Bindungsstellen eines 5'- und eines 3'-terminalen Primers amplifiziert. Zur Amplifikation wurden 100 bis 500 ng Plasmid-DNA (Ursprungs-DNA) eingesetzt. Primer werden in einer Konzentration von 100 pmol/ μ l in sterilem H₂O oder TE-Puffer gelöst, dann 1:10 verdünnt und in dieser Verdünnung verwendet. Je nach Ziel der PCR kann Taq- oder auch Pfu-Polymerase verwendet werden. Letztere weist eine geringere Fehlerquote auf, arbeitet jedoch etwas langsamer. Die Annealing-Temperatur (die Temperatur, bei der sich die Primer an die Ursprungs-DNA anlagern) hängt von den verwendeten Primern ab, vor allem deren Länge und Nukleotid-Zusammensetzung.

Die Reaktion erfolgte in einem Thermocycler der Firma MWG Biotech (München, Deutschland). Die Proben werden nach der Reaktion entweder komplett auf ein Agarsegel aufgetragen, oder nur ein kleiner Aliquot wird über das Gel analysiert, und die Proben werden sofort zur nächsten Reaktion eingesetzt.

Pipettierschema eines PCR-Ansatzes:

- 0,5 μ l Ursprungs-DNA
- 5 μ l Primer forward 1:10
- 5 μ l Primer revers 1:10
- 5 μ l 10x Reaktionspuffer (entsprechend der verwendeten Polymerase)
- 10 μ l Q-Solution (bei Taq-Polymerase von QIAGEN)
- 2,5 μ l dNTPs
- 21 μ l H₂O
- 1 μ l Taq-Polymerase

Programm:

2 min 94 °C (Denaturierung der DNA)

25-mal:

- 30 s 94 °C (Denaturierung)
- 1 min 53 °C (Anlagerung der Primer, variiert je nach Primerpaar)
- 1,5 min 72 °C (Elongation der DNA)

danach:

15 min 72 °C (endgültige Elongation der amplifizierten DNA-Stücke)

Probe auf 4 °C kühlen

6.4.12 DNA-Sequenzierung^[81]

Die DNA-Sequenzierung erfolgt entsprechend folgender Methode:

Ausgehend von denaturierter dsDNA wird ein komplementärer Primer bei der Hybridisierungsreaktion gebunden. Anschließend synthetisiert eine Polymerase vom Primer in 5'→3'-Richtung eine wachsende Kette durch sukzessiven Einbau von Nucleosidtriphosphaten. Durch Verwendung aller vier Didesoxynucleosidtriphosphate in einem bestimmten Verhältnis zu den normalen Nucleotiden erhält man statistisch Abbrüche der Kette an jeder möglichen Stelle und somit nach Denaturierung der neuen dsDNA unterschiedlich lange Oligonucleotide, die sich durch eine Gelelektrophorese auftrennen lassen. Durch Verwendung von fluoreszenzmarkierten Didesoxynucleotiden in einer fertigen Reaktionslösung (ABI Prism BigDye Sequencing Kit) der Firma PE Biosystems (Weiterstadt, Deutschland) lassen sich die Nucleotide bei der anschließenden Trennung der Probe leicht detektieren. Die Reaktionslösung enthält bereits den notwendigen Puffer, die Nucleotide und das Enzym. Es muss nur noch ein Primer und die zu sequenzierende DNA zugegeben werden. Die PCR-Reaktion erfolgt im Thermocycler der Firma MWG Biotech (München, Deutschland) (siehe Kap. 5.5.11).

Die Analyse der Proben erfolgte bei der Firma GATC (Konstanz, Deutschland).

6.5 Proteinexpression in *E. coli*

Zur induzierbaren Expression von Proteinen in *E. coli* wurde ein Stamm verwendet, der den lacI-Repressor ($lacI^q$) konstitutiv exprimiert: BL 21 (DE3) (Invitrogen, Deutschland). Nach Transformation mit den entsprechenden Plasmiden, die T7-RNA-Polymerase-induzierbar sein müssen und die DNA für das zu exprimierende Protein enthalten, wurden die Zellen in LB- bzw. TB-Medium bei 30 °C bis zu einer OD_{600} von ca. 1,5 kultiviert. Die Bakterien wurden dann in frischem Medium in einem Verhältnis von 1:10 verdünnt. Nach Induktion der Expression mit 0,5 mmol/l IPTG wurden die Zellen drei weitere Stunden kultiviert und durch zehnmünütige Zentrifugation bei 5000 g geerntet. Der Zellaufschluss erfolgte in 2 bis 4 ml Homogenisationspuffer pro g Nassgewicht. Ausgehend von einer 500 ml-Kultur wurden 15 ml Homogenisationspuffer zum Resuspendieren der Bakterien verwendet.

Die Zellen wurden entweder durch Zugabe von Lysozym und Ruhen auf Eis für 20 min aufgeschlossen. Danach wird das Lysat gründlich mit Hilfe des Vortexers durchmischt. Sollte sich keine klare Lösung gebildet haben, kann als weitere Mög-

lichkeit (oder als alleinige Aufschluss-Methode) das Behandeln mit Ultraschall für bis zu 30 s (jeweils 5 s bei 50 % Leistung und einer Pause von 15 s, Sonorex TK 30, Firma Bandelin, Berlin) angewendet werden. Dabei ist zu beachten, dass die Probe ständig auf Eis gehalten wird, vor allem während der Ultraschallbehandlung. Bei zu intensivem Aufschluss der Zellen können die exprimierten Proteine zerstört werden und stark aggregieren. Die Prozedur muss daher sofort abgebrochen werden, wenn das Bakterienlysat klar wird.

Anschließend werden die Zelltrümmer durch 30-minütige Zentrifugation bei 16000 g sedimentiert und der Überstand zur Affinitätsreinigung eingesetzt.

Homogenisationspuffer zur Reinigung über His₆-Tag:

Möglichkeit 1:

PBS wird mit den folgenden Substanzen versetzt:

1 mmol/l EDTA

1 mmol/l EGTA

1 mmol/l PMSF

10 µg/ml Aprotinin

10 µg/ml Leupeptin

Möglichkeit 2: (nach Protokollen der Firma QIAGEN)

50 mmol/l NaH₂PO₄

300 mmol/l NaCl

10 mmol/l Imidazol

pH 8,0 mit NaOH

Homogenisationspuffer zur Reinigung über GST-Tag:

50 mmol/l Tris-HCl, pH 8,0

30 % (w/v) Sucrose

In diesem Puffer wird das Bakterienpellet resuspendiert, anschließend wird etwa 1 mg Lysozym zugegeben und die Mischung auf Eis 30 min stehen gelassen. Danach wird eine Konzentration von 1 % Triton X-100 eingestellt, die Lösung 5 min lang gevortext und über Nacht bei -20 °C gelagert. Am nächsten Morgen wird das Lysat auf Eis aufgetaut, eventuell noch einmal gevortext und DNase zugegeben. Nach 30 min Ruhen auf Eis sollte das Lysat vollkommen klar sein. Falls das nicht der Fall ist, kann die Lösung sehr vorsichtig unter ständiger Eiskühlung mit Ultraschall behandelt werden, bis das Lysat klar wird (siehe oben).

6.6 Zellkultur von Sf9-Insektenzellen

Die Sf9-Zellen entstammen dem Ovariumgewebe der Puppe des Heerwurmes *Spo-doptera frugiperda* Smith (einer Schmetterlingsraupe) und wurden von C. Harteneck aus dem Institut für Molekulare Pharmakologie (FB Humanmedizin, FU Berlin) zur Verfügung gestellt. Die Sf9-Zellen sind klonal aus der IPLBSF21-AE(Sf21)-Zelllinie isoliert worden.^[82] Sie besitzen eine Verdopplungsdauer von 18 bis 24 h und wachsen sowohl in Monolayer als auch in Suspensionskultur. Normalerweise werden sie in Medium mit fötalem Kälberserum (FCS oder FBS) kultiviert, sind aber auch adaptierbar zu serum-freiem Medium. Zum Wachstum benötigen die Sf9-Zellen keine CO₂-Supplementierung, eine konstante Temperatur von 27 °C sollte aber eingehalten werden. Es gibt außerdem noch die verwandten Zelllinien Sf21 und *High-Five*TM (Firma Invitrogen), die sich im bevorzugten Medium und in den Wachstums- und Proteinexpressions-Eigenschaften unterscheiden.

Die in dieser Arbeit verwendeten Sf9-Zellen sehen im Lichtmikroskop gleichmäßig kugelrund aus und heften sich innerhalb von 10 min an den Boden von Zellkulturflaschen. Bei Monolayer-Kultur bilden sich sog. konfluente Zellschichten, in denen die Zellen Ausläufer bilden. Besonders in alten oder nicht rechtzeitig subkultivierten Kulturen treten sog. „Floater“ auf. Das sind Zellen, die nicht mehr adherent wachsen. Daher ist es notwendig, die Zellen rechtzeitig zu subkultivieren, damit sie sich möglichst lange in ihrer logarithmischen Wachstumsphase befinden. In dieser Phase ist ihr Expressionssystem am aktivsten und die Transfektionsrate am größten. Infizierte oder transfizierte Zellen sind größer, unregelmäßiger geformt und entwickeln größere Zellkerne. Zellen in diesen Stadien sind anfälliger für Außeneinflüsse und haften weniger gut an ihrer Wachstumsoberfläche.

Die Anzucht von Suspensionskulturen und der Wechsel zwischen Monolayer- und Suspensionskultur ist in der Regel unproblematisch. Es muss aber beachtet werden, dass Insektenzellen gegenüber Scherkräften äußerst empfindlich sind. Antibiotika können in geringen Konzentrationen eingesetzt werden, wenn sie nicht zur Selektion verwendet werden sollen. Allerdings sind die Zellkulturen anfällig gegenüber bestimmten Pilzarten, die in den Suspensionskulturen als weiße Pilzkugeln auftreten können. Falls ein solcher Befall auftritt, sollte sofort neu angesetztes Medium mit eventuell einem Fungizid verwendet werden, und die befallenen Kulturen sollten nach Möglichkeit vernichtet werden.

Verwendetes Zellkulturmedium:

SF-900 II serumfreies Medium (Firma Life Technologies)

100 µg/ml Penicillin und Streptomycin (Life Technologies)

10 % FCS (Life Technologies, getestet für Insektenzellen)

falls benötigt: 1 % Lipid-Supplement für Suspensionskulturen (Life Technologies)

Das Medium wird vor jeder Verwendung im Wasserbad auf 27 °C vorgewärmt.

6.6.1 Anzucht und Pflege der Insektenzellen**6.6.1.1 Auftauen von Insektenzellen**

Das Gefäß mit den Zellen wird dem Kühlbehälter mit flüssigem Stickstoff entnommen und für 1 min (nicht länger!) im Wasserbad bei 37 °C unter Schwenken gewärmt. Die Außenseite des Gefäßes wird dann mit 70 % Ethanol desinfiziert und unter die Sicherheitswerkbank gestellt. In einer 25 cm²-Zellkulturflasche werden 5 ml Medium vorgelegt, und der Boden der Flasche wird damit benetzt. Die Zellsuspension wird mit 1 ml Medium in einer 5 ml-Pipette aufgenommen und in die Zellkulturflasche gegeben. Im Wärmeschrank bei 27 °C wird die Zellsuspension für etwa 30 min stehen gelassen, damit die Zellen sich an den Boden der Flasche heften können. Anschließend wird das DMSO-haltige Medium vollständig mit einer Pipette abgesaugt und durch 5 ml frisches Medium ersetzt. Dieser Austausch muss spätestens nach 1 h geschehen, da das DMSO den Zelltod verursacht. Nach 24 h wird das Medium erneut gewechselt und die Viabilität der Zellen bestimmt, die größer als 70 % sein sollte. Nachdem die Zellen eine konfluente Monolayer gebildet haben, werden sie in entsprechend größere oder mehrere Kulturflaschen subkultiviert.

6.6.1.2 Monolayer-Kultur

In einer 25 cm²-Kulturflasche werden etwa 10⁷ Zellen in 10 ml Medium ausgesät.

Nach Ausbilden eines konfluenten Zellrasens werden die Zellen mit einem sterilen Zellschaber vom Boden der Flasche gelöst und 3 min bei 500 g zentrifugiert. Nach Aufnahme in frischem Medium wird die Zelldichte und -viabilität mit einem Haematocytometer bestimmt. Anschließend werden entsprechend viele Kulturflaschen mit frischem Medium versehen und dort jeweils 10⁷ Zellen zugegeben. Leichtes Hin- und Herschwenken der Flasche bewirkt eine gleichmäßige Verteilung der Zellen vor dem Anwachsen. Die Zellen wurden bei 27 °C inkubiert, das Medium muss spätestens alle zwei bis drei Tage erneuert werden. Hierzu wird die Kulturflasche aufrecht gestellt und das Medium vollständig abgesaugt, ohne die Zellschicht zu berühren. Das frische Medium wird vorsichtig über die den Zellen gegenüber liegende Fla-

schenwand zugegeben. Sobald wieder eine konfluente Zellmonolayer im Lichtmikroskop zu erkennen ist, wird erneut subkultiviert.

6.6.1.3 Suspensionkultur

Um eine Schüttelkultur anzulegen, müssen sich die Zellen in der logarithmischen Wachstumsphase befinden und die Viabilität muss größer als 95 % sein. Die Zellen werden mit vorgewärmtem Medium auf eine Dichte von $0,5 \times 10^6$ Zellen/ml gebracht und in einen Schüttelkolben gegeben. Dabei sollten in einen 100 ml-Kolben nicht mehr als 30 ml gefüllt werden (250 ml-Kolben: 80 ml, 500 ml-Kolben: 200 ml). Die Inkubation erfolgt bei 27 °C und konstantem Schütteln mit 110 rpm. Wenn die Zellen eine Dichte von 2 bis $2,5 \times 10^6$ Zellen/ml erreicht haben, werden sie mit frischem Medium auf die ursprüngliche Dichte verdünnt. Es muss jeden Tag die Zelldichte und Viabilität bestimmt werden.

Dem Kulturmedium kann ein Lipid-Supplement zugegeben werden, um die Wirkung der Scherkräfte für die Zellen zu reduzieren. Bei empfindlichen Kulturen, die z. B. transfiziert wurden, ist die Zugabe von 1 % Supplement zu empfehlen.

6.6.1.4 Bestimmung der Viabilität

Zur Bestimmung der Viabilität der Zellen wird zu einem Aliquot der Zellsuspension 50 % Trypanblaulösung gegeben. Der blaue Farbstoff färbt nur Zellen mit geschädigter Zellwand an. Bei 100-facher Vergrößerung unter dem Lichtmikroskop wird die Gesamtzahl der Zellen und die der nicht blau gefärbten mit einem Haematocytometer bestimmt. Der Quotient aus beiden Werten ergibt die Viabilität der Kultur. Die Zahl der lebenden Zellen pro ml Kultur kann durch Multiplikation der in zwei Bereichen der Zählkammer gezählten Zellen mit 10^4 errechnet werden.

Trypanblau-Lösung: 20 mmol/l NaH_2PO_4 , pH 7,4

137 mmol/l NaCl

0,4 % (w/v) Trypanblau

6.6.1.5 Anlegen von Zellkonserven

Sf9-Zellen einer gesunden Kultur in der logarithmischen Wachstumsphase und mit bekannter Zelldichte werden 10 min bei 500 g abzentrifugiert. Längere Zentrifugation oder solche mit höherer Beschleunigung führen zu einer Schädigung der Zellen. Alle weiteren Schritte erfolgen auf Eis. Der Überstand wird mit einer Pipette abgenommen und das erforderliche Volumen des Einfriermediums auf das Zellpellet gegeben. Die finale Zelldichte soll 10^7 Zellen/ml betragen. Nachdem die Zellen durch vorsichtiges Auf- und Abpipettieren resuspendiert wurden, werden 1 ml-Aliquots in

spezielle Kryogefäße gefüllt und sehr langsam eingefroren. Hierzu werden die Röhren in eine Styroporbox gestellt und zunächst für eine Stunde bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$, anschließend über Nacht bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ gekühlt. Die so gefrorenen Zellen werden dann in flüssigem Stickstoff gelagert.

Einfriermedium: 60 % SF-900 II (Life Technologies)
Streptomycin und Penicillin ($100\text{ }\mu\text{g/ml}$) (Life Technologies)
30 % FCS (Life Technologies)
10 % DMSO (Sigma)

6.6.2 Transfektion der Sf9-Zellen mit Baculoviren

6.6.2.1 Herstellung der Baculovirus-DNA

Die Herstellung rekombinanter Baculoviren ist auf zwei verschiedenen Wegen möglich. Entweder müssen Sf9-Zellen mit Wildtyp-AcNPV-Baculovirus-DNA und rekombinanter DNA kotransfiziert werden, wobei die Transposition des Transferplasmids in die AcNPV-DNA innerhalb der Sf9-Zellen stattfindet.^[83] Die andere Möglichkeit geht den Umweg über einen *E. coli*-Stamm, der die Baculovirus-DNA als „Expressionskassette“ (Bacmid) enthält. Dieses BAC-TO-BAC-System (Firma Invitrogen) benötigt auch einen Vektor, in den die DNA für das zu exprimierende Protein inkloniert wird. Das rekombinante Plasmid (pFastBac) wird in die DH10BAC-*E. coli*-Bakterien, die das Bacmid enthalten, transformiert. Diese Bakterien enthalten auch ein Helferplasmid, das die Proteine kodiert, die zur Transposition der DNA notwendig sind. Die Bakterienkolonien, die das rekombinante Bacmid enthalten, werden durch die Unterbrechung des lacZ α -Gens über eine Blau-Weiß-Selektion identifiziert. Die Bacmid-DNA der ausgewählten Kolonien wird präpariert und zur Transfektion von Sf9-Zellen eingesetzt.

6.6.2.2 Herstellung kompetenter DH10BAC-*E. coli*

Eine Kultur von 5 ml 2XTY-Medium wird mit dem Bakterienstamm angeimpft und über Nacht bei $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ im Schüttler inkubiert. Am darauf folgenden Morgen wird diese Bakterienkultur in einem 2 l-Erlenmeyerkolben mit 300 ml 2XTY-Medium versetzt und im Schüttler bei $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ wachsen gelassen, bis eine OD₆₀₀ von etwa 0,5 erreicht ist. Nun wird die Kultur für mindestens 5 min auf Eis gekühlt, die Bakterien suspension für 5 min bei $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ und 2500 rpm abzentrifugiert. Alle folgenden Schritte müssen auf Eis durchgeführt werden. Das Bakterienpellet wird in 120 ml Tfb1 mit einer Pipette resuspendiert und erneut für 5 min bei $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ und 2500 rpm zentrifugiert.

Nach der Zentrifugation wird das Pellet in 12 ml Tfb2 resuspendiert und für 15 min auf Eis inkubiert. Die Bakteriensuspension wird in 420 µl-Portionen aliquotiert, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80 °C gelagert.

2XTY-Medium (300 ml): 4,8 g Trypton
3 g Hefeextrakt
3 g NaCl
20 min bei 121 °C und 1,2 bar autoklavieren

Tfb1: 30 mmol/l HCH₃COO, pH 5,8
100 mmol/l RbCl₂
10 mmol/l CaCl₂
50 mmol/l MgCl₂
15 % (v/v) Glycerol

Tfb2: 10 mmol/l MOPS, pH 6,5
10 mmol/l RbCl₂
75 mmol/l CaCl₂
15 % (v/v) Glycerol

Beide Lösungen müssen steril-filtriert (Porengröße 0,22 µm) werden.

6.6.2.3 Transformation des pFastBac-Plasmides in DH10BAC-*E. coli*

Die Bakterien werden auf Eis aufgetaut. Je 100 µl Bakteriensuspension werden zu je 1 ng Plasmid-DNA in maximal 5 µl Volumen H₂O gegeben. Nach 30 min Inkubation auf Eis werden die Zellen einem Hitzeschock bei 42 °C für 45 s unterzogen und anschließend für 2 min auf Eis abgekühlt. Danach werden je 900 µl SOC-Medium zu den Bakterien gegeben und die Kultur für 4 h unter leichtem Schütteln bei 37 °C inkubiert. Nach dieser Zeit werden verschiedene Volumina (zwischen 10 und 100 µl) auf die speziell präparierten Agarplatten ausplattiert. Die Inkubation der Platten bei 37 °C erfolgt so lange, bis die blauen Kolonien gut von den weißen unterscheidbar sind.

LB-Agarplatten (220 ml für 11 Platten): 2,5 g Trypton
1,25 g Hefeextrakt
2,5 g NaCl
20 min bei 121 °C autoklavieren,
vor dem Gießen der Platten hinzufügen
und gut mischen:
625 µl Kanamycin (10 mg/ml)
175 µl Gentamycin (10 mg/ml)
250 µl Tetracyclin (5 mg/ml)
1875 µl Bluo-Gal (20 mg/ml)
1560 µl X-Gal (100 mg/ml)
500 µl IPTG (0,1 mol/l)

6.6.2.4 Isolation der Bacmid-DNA

Die isolierten weißen Bakterienkolonien enthalten die gewünschte rekombinierte Bacmid-DNA. Es werden etwa zehn Kolonien in jeweils 2 ml LB-Medium über Nacht bei 37 °C geschüttelt. Am folgenden Morgen werden jeder Probe 1,5 ml Zellsuspension entnommen, in ein Eppendorfgefäß überführt und bei 10000 g 1 min zentrifugiert. Das Bakterienpellet wird wie im Kapitel 5.5.5 beschrieben aufgeschlossen, allerdings kann die Bacmid-DNA nicht mit Hilfe einer Silikatsäule isoliert werden. Die Bacmid-Moleküle sind wesentlich größer als normale Plasmide. Die DNA wird in Lösung gehalten, während alle Proteine und die chromosomale DNA der Bakterien pellettieren werden. Dann wird der Überstand in ein mit 800 µl Isopropanol gefülltes Eppendorfgefäß gegeben, gemischt und 10 min auf Eis inkubiert. Die gefällte DNA wird bei 10000 g 15 min abzentrifugiert. Nun wird der Überstand abgenommen, das Pellet in 500 µl 70 % Ethanol gewaschen und erneut zentrifugiert. Nachdem der Alkohol möglichst vollständig entfernt wurde, wird das Pellet an der Luft getrocknet und in 40 µl TE-Puffer aufgenommen. Die Bacmid-DNA wird bei -20 °C gelagert, wobei häufiges Auftauen zu vermeiden ist.

LB-Medium: wie unter 5.5.2 beschrieben, es werden folgende Antibiotika zugesetzt:
50 µg/ml Kanamycin
7 µg/ml Gentamycin
10 µg/ml Tetracyclin

6.6.2.5 Transfektion der Insektenzellen

Alle Schritte müssen unter sterilen Bedingungen durchgeführt werden. In einer Sechs-Loch-Platte werden 10^6 Zellen pro Loch in 2 ml Medium mit der halben Antibiotika-Konzentration (ohne Serum) ausgesät und bei 27 °C mindestens 1 h inkubiert. Während dieser Zeit werden in zwei Eppendorfgläsern je 100 µl Medium ohne Serum und ohne Antibiotika gegeben. In das eine werden 10 µl der Bacmid-DNA-Lösung gegeben, in das andere 10 µl Insectin-Liposomen (Invitrogen). Nachdem die beiden Lösungen miteinander vermischt wurden, werden sie etwa 30 min bei RT stehen gelassen. Die Zellen werden mit 2 ml Medium ohne Serum, ohne Antibiotika gewaschen. Zur DNA/Lipid-Lösung werden 800 µl Medium ohne Serum, ohne Antibiotika pipettiert. Jetzt wird das Waschmedium von den Zellen entfernt und die Transfektionslösung vorsichtig über die Zellen geschichtet. Es erfolgt eine Inkubation bei 27 °C für 5 Tage, wobei nach 5 h 4 ml komplettes Medium hinzugefügt werden.

Nach Ablauf der 5 Tage werden die Zellen mit Medium ab gespült und bei 500 rpm für 5 min abzentrifugiert. Der Überstand enthält den Virus und wird zur weiteren Vermehrung eingesetzt. Der rekombinante Baculovirus kann für kurz Zeit im Medium bei 4 °C im Dunkeln gelagert werden. Für längere Zeit empfiehlt sich die Aufbewahrung bei -80 °C in Aliquots.

6.6.2.6 Amplifikation rekombinanter Baculoviren

1. Amplifikation: 600 µl Transfektionsüberstand werden in eine 25 cm³-Zellkulturflasche mit 2×10^6 Zellen in 4 ml Medium gegeben.

2. Amplifikation: 1 ml Überstand der 1. Amplifikation werden in eine 75 cm³-Zellkulturflasche mit 7×10^6 Zellen in 15 ml Medium gegeben.

3. Amplifikation: 100 µl Überstand der 2. Amplifikation werden in eine 150 cm³-Zellkulturflasche mit 14×10^6 Zellen in 35 ml Medium gegeben.

Schüttelamplifikationen: Sf9-Zellen hoher Dichte (2 bis $2,5 \times 10^6$ Zellen/ml) werden nach Pelletierung der Zellen in einer Dichte von 0,2 bis $0,25 \times 10^6$ Zellen/ml in frischem Medium für Schüttelkultur angesetzt und 24 bis 48 h wachsen gelassen. Bei einer Zelldichte von etwa $0,5 \times 10^6$ Zellen/ml werden die Zellen in einem Virus-Zell-Verhältnis (MOI) von 0,1 bis 0,2 mit Virus angeimpft. Nach einer Inkubation von 3 bis 4 Tagen bei 27 °C und 100 rpm wird die Zellsuspension in sterile Zentrifugenbecher gefüllt, 30 min bei 4 °C abgekühlt und anschließend bei 10.000 g und 4 °C für 15 min abzentrifugiert. Der Virustiter muss nach jeder Amplifikation bestimmt werden.

6.6.2.7 Bestimmung des Virustiters

Zur Bestimmung der Viruskonzentration wurde das BacPAK Baculovirus Rapid Titer Kit™ der Firma Clontech (Heidelberg, Deutschland) verwendet. Diese Methode hat gegenüber dem herkömmlichen Plaque Assay den Vorteil, dass schon nach zwei Tagen die Ergebnisse vorliegen (beim Plaque Assay erst nach 7 Tagen). Nach Abschluss der Inkubation mit dem Virus wird das von den Zellen exprimierte Virusprotein gp64 mit Hilfe einer Antikörperreaktion nachgewiesen. Dieses Protein wird von den Zellen sehr viel früher hergestellt, als Plaques von infizierten Zellen gebildet werden.^[84] Daher ist der Nachweis der Virusinfektion schneller möglich. Dazu müssen die Zellen zunächst fixiert werden, anschließend wird mit dem Primärantikörper das Protein detektiert und mit dem Sekundärantikörper, der an Horse Radish Peroxidase gekoppelt ist, sichtbar gemacht. Die infizierten Zellen können unter dem Lichtmikroskop anhand der blauen Färbung identifiziert werden.

Für jede zu bestimmende Viruslösung wird in einer Mikrotiterplatte eine Reihe Sf9-Zellen ausgesät. Dazu werden pro Loch $6,5 \times 10^4$ Zellen in komplettem Medium benötigt. Die Zellen sollten eine Dichte von $0,3$ bis $0,4 \times 10^6$ besitzen und sich in der logarithmischen Wachstumsphase befinden. Die Lochreihen werden folgendermaßen beschriftet: Im ersten Loch befindet sich die Negativkontrolle ohne Virus, die Löcher 2 bis 4 werden mit einer Virusverdünnung von 10^{-3} versehen, Löcher 5 bis 8 mit 10^{-4} verdünnter Lösung, Löcher 9 bis 12 mit 10^{-5} verdünntem Virus. Als Positivkontrolle kann der mitgelieferte Wildtyp-Virus verwendet werden. Bei einer Verdünnung von 10^{-5} sollten deutliche „Foci“ sichtbar sein.

Die Mikrotiterplatte wird für 1 h bei 27°C in einer verschlossenen Plastiktüte inkubiert. In der Zwischenzeit werden die Virusverdünnungen hergestellt. Zu $900\ \mu\text{l}$ komplettem Medium werden je $100\ \mu\text{l}$ Viruslösung gegeben und gut gemischt. Es muss eine Verdünnungsreihe bis 10^{-5} für jeden zu bestimmenden Virus angefertigt werden. Mit einer Mehrkanalpipette wird das Medium von den Zellen in der Mikrotiterplatte vorsichtig abgesaugt. Je $25\ \mu\text{l}$ der Virusverdünnungen werden in die entsprechenden Löcher zu den Zellen gegeben, zur Negativkontrolle gibt man $25\ \mu\text{l}$ Medium. Die Platte bleibt 1 h bei RT stehen. Der Überstand wird vorsichtig mit der Mehrkanalpipette abgesaugt. Man gibt anschließend je $50\ \mu\text{l}$ Methylcellulose-Overlay-Lösung in jedes Loch auf die Zellen. Die Mikrotiterplatte wird mit einem feuchten Tuch eingewickelt und in der geschlossenen Plastiktüte für 45 h bei 27°C inkubiert.

Für jede zu bestimmende Viruslösung werden die folgenden Lösungen hergestellt:

2,3 ml PBS mit 80 µl Ziegen-Serum → verdünntes Serum

490 µl verdünntes Serum mit 10 µl anti-gp64 (aus Maus)

996 µl verdünntes Serum mit 4 µl anti-Maus/HRP (aus Ziege)

1,2 ml PBS mit 1 ml 37 % Formaldehyd und 1,8 ml Aceton

Mit diesen Lösungen werden die Zellen entsprechend dem Handbuch zum Kit behandelt, wobei die Zellen zunächst mit der Formaldehyd-Aceton-Lösung fixiert werden. Anschließend werden unspezifische Bindungsstellen für den Antikörper mit Ziegen-Serum blockiert und dann das Virusprotein mit dem Antikörper detektiert. Mit Hilfe des zweiten Antikörpers wird das Anfärben von infizierten Zellen über die Peroxidase-Reaktion möglich. Zellen, die Virusproteine exprimiert haben, werden blau angefärbt. Unter dem Mikroskop sind nach der insgesamt 4,5 h dauernden Entwicklungsprozedur diese Zellen als „Haufen“, sog. „Foci“, zu erkennen. Diese „Foci“ werden in jedem Loch der Mikrotiterplatte ausgezählt. Von den Ergebnissen werden die Durchschnittswerte für jede Virus-Verdünnung errechnet und nach folgender Formel die Viruskonzentration erhalten:

Virustiter (pfu/ml) = Zahl der Foci/Loch x Verdünnungsfaktor x 80

Die besten Ergebnisse erhält man bei einer durchschnittlichen Zahl von 5 bis 25 Foci pro Loch.

6.6.2.8 Expression durch rekombinante Baculoviren

Sf9-Zellen werden bei einer Dichte von $0,5 \times 10^6$ Zellen/ml mit der Viruslösung versetzt. Es wird ein Virus-Zell-Verhältnis (MOI) von etwa 10 durch Zugabe der entsprechenden Menge der Viruslösung bekannter Konzentration eingestellt.

Nach der Expression über 3 Tage bei 27 °C und 110 rpm wird die Zellkultur in sterile Zentrifugenbecher überführt und bei 8000 rpm, 4 °C für 10 min abzentrifugiert. Das Zellpellet wird in Homogenisationspuffer aufgenommen (100 µl für 2×10^6 Zellen) und resuspendiert. Mit Hilfe von Ultraschall in 3×10 Zyklen mit 50 % Leistung werden die Zellen unter ständiger Eiskühlung aufgeschlossen. Die entstehende Suspension wird dann bei 30.000 g bei 4 °C für 30 min zentrifugiert. Der Überstand sollte das lösliche exprimierte Protein enthalten. Das Pellet kann in etwas Homogenisationspuffer wieder aufgenommen werden.

<u>Homogenisationspuffer:</u>	20 mmol/l Triethanolamin
	10 mmol/l EGTA
	10 mmol/l EDTA
	1 mmol/l PMSF
	1 % (w/v) SDS
	10 µg/ml Aprotinin
	10 µg/ml Leupeptin

Der Homogenisationspuffer kann auch mit Harnstoff oder anderen Detergentien versehen werden, um die Löslichkeit des gesuchten Proteins zu verbessern.

6.6.3 Transiente Transfektion der Sf9-Zellen

Für jede Transfektion werden 2×10^6 Zellen in serumfreiem Medium in eine 60 mm-Petrischale ausgesät. Die Zellen sollten sich gut am Boden der Schale absetzen.

In der Zwischenzeit wird 1 ml serumfreies Medium mit 5 µl der Vektorlösung und 20 µl Insectin-Plus (Firma Invitrogen) versetzt und diese Mischung gut gevortext. Die Transfektionslösung ruht bei RT für 15 min. Von den Zellen wird das Medium möglichst komplett abgesaugt. Anschließend lässt man sehr langsam und vorsichtig die Transfektionslösung auf die Zellen tropfen. Dabei soll die Lösung über die gesamte Schalenfläche verteilt werden. Über 4 h werden die Schalen auf einem langsam schwenkenden Schüttler bei RT inkubiert. Danach werden in jede Schale 2 ml serumfreies Medium gegeben und die Schalen mit einem feuchten Papiertuch in Plastiktüten gepackt. Die Zellen werden bei 27 °C inkubiert und nach zwei bzw. drei Tagen werden sowohl das Medium als auch die Zellen auf die Expression des gesuchten Proteins hin mit Hilfe von SDS-PAGE und Western-Blot untersucht (siehe Kap. 6.2 und 6.3).

6.6.4 Stabile Transfektion der Sf9-Zellen

Um stabil transfizierte Insektenzellen zu erhalten, werden diese zunächst transient transfiziert (siehe Kap. 6.6.3). 48 h nach der Transfektion wird dann das Transfektionsmedium von den Zellen abgesaugt. Es wird frisches Medium zugegeben, die Zellen werden vom Boden der Schalen gelöst und 1:5 verdünnt in neue Petrischalen umgesetzt. Über Nacht werden die Zellen bei 27 °C inkubiert. Am nächsten Morgen wird das Medium wieder entfernt und durch Medium mit Blastocidin ersetzt.

Um die richtige Konzentration des Antibiotikums zu ermitteln, sollte eine sog. Kill-Kurve durchgeführt werden. Dazu werden Insektenzellen in einer 24-Loch-Platte ausgesät und am nächsten Tag mit Medium mit verschiedenen Blastocidin-Konzentrationen versetzt. Alle drei bis vier Tage wird das Medium der Zellen mit frischem Medium mit jeweils derselben Konzentration des Antibiotikums ersetzt. Unter dem Mikroskop wird jeden Tag der Anteil an überlebenden Zellen überprüft. Bei einer sinnvollen Konzentration des Blastocidin sterben die Zellen nach einer Woche komplett ab.

Die transfizierten Zellen werden alle drei Tage mit frischem Medium mit Blastocidin versorgt. Um eine monoklonale Zelllinie zu erhalten, müssen die überlebenden Zellen ständig weiter verdünnt werden (z. B. In 96-Loch-Platten) bis einzelne Zellen überleben, aus denen dann ein stabil transfizierter Klon heranwachsen kann. Für polyklonale transfizierte Zellen werden die selektierten Zellkulturen normal weiter kultiviert, bis sie sich auch unter dem Selektionsdruck gut vermehren. Die Zellen werden dann subkultiviert, wenn sie eine konfluente Dichte erreichen. Sie können auch in Suspensionskultur gehalten werden, um eine größere Menge des exprimierten Proteins zu erhalten. Bereits in einem frühen Stadium der Selektion sollte alle drei bis vier Tage die Expression des gesuchten Proteins mit SDS-PAGE und Western-Blot überprüft werden (siehe Kap. 6.2 und 6.3).

Es ist sehr wichtig, dass zur Subkultivierung der Zellen immer Medium ohne Blastocidin verwendet wird. Erst wenn die Zellen sich abgesetzt haben, kann das Medium gegen Antibiotikum-haltiges ausgetauscht werden. Sobald sich die stabil transfizierten Zellen gut vermehren, sollten einige Aliquots als Vorrat in flüssigem Stickstoff eingefroren werden (siehe Kap. 6.6.1.5).

Die Expression des gesuchten Proteins kann auch mit Hilfe der Immunfluoreszenz überprüft werden (siehe folgendes Kap.).

6.7 Indirekte Immunfluoreszenz von transfizierten Zellen

Die zu betrachtenden Zellen werden auf Deckgläschen in 12-Loch-Platten herangezogen. Wenn die gewünschte Zelldichte erreicht ist, werden die Deckgläschen aus den Löchern genommen und das Kulturmedium zweimal mit PBS abgewaschen. Die Zellen werden anschließend mit 3 % Paraformaldehyd-Lösung (PFA) für etwa 45 min bei RT fixiert. Das Gläschen wird mit PBS gewaschen. Die Zellen werden dann mit 0,4 % Triton X-100 in PBS für 10 min permeabilisiert. Innerhalb von 20 min wird dreimal 100 mmol/l Glycinlösung auf die Zellen gegeben. Damit wer-

den nicht abgesättigte Aldehyde abreagiert. Die Zellen werden dreimal für je 5 min mit PBS gewaschen, die Waschlösung wird gründlich abgesaugt. Mit 5 % NGS wird für 1 h bei RT blockiert. Anschließend wird der erste Antikörper in 5 % NGS für 1 h auf die Zellen gegeben, danach wird dreimal für je 5 min mit PBS gewaschen. Die Zellen werden mit dem zweiten (fluoreszenzgelabelten) Antikörper in 5 % NGS für 1 h im Dunkeln inkubiert. Danach wird dreimal mit PBS gewaschen.

Um die Zellkerne sichtbar zu machen, wird das Chromatin mit 4,6-Diamino-2-phenolindol-2HCl (DAPI) angefärbt. Dazu wird das Deckgläschen für einige Sekunden in einer 0,0004 %igen DAPI-Lösung benetzt und anschließend sofort in Wasser getaucht. Das Gläschen wird gut trocken gesaugt und auf einen mit Fluoromount G versehenen Objektträger gesetzt. Das Deckgläschen muss luftblasenfrei angedrückt werden, überschüssiges Einbettmittel kann vorsichtig abgetupft werden. Das Präparat muss über Nacht bei RT im Dunkeln aushärten. Anschließend können die Zellen und die angefärbten Proteine mit einem Fluoreszenzmikroskop betrachtet werden.

<u>3 % Paraformaldehyd:</u>	120 mmol/l Na ₂ HPO ₄ ·2H ₂ O, pH 7,2 mit H ₃ PO ₄ 15 g Paraformaldehyd auf 500 ml einrühren, erwärmen, bis alles gelöst ist, in Aliquots bei -20 °C lagern
<u>Glycinlösung:</u>	750 mg Glycin in 100 ml PBS 4 Tropfen 1 mol/l Tris, pH 8,0
<u>5 % NGS:</u>	5 % (v/v) Normal Goat Serum in PBS
<u>Sekundärantikörper:</u>	anti-Maus-Cy3, aus Ziege, Firma Dianova

6.8 Membranpräparation aus transfizierten Zellen

Zellen einer 500 ml-Suspensionskultur, die das gesuchte Protein exprimieren sollten, werden bei 8000 rpm bei 4 °C für 10 min abzentrifugiert. Die Zellen werden in 7 ml Homogenisationspuffer resuspendiert. Mit einem Douncer mittlerer Größe werden die Zellen durch 20x Douncen aufgeschlossen. Das Homogenat wird 10 min bei 500 g bei 4 °C zentrifugiert um nicht aufgeschlossenen Zellen und zu große Trümmer zu entfernen. Der Überstand wird auf einen diskontinuierlichen Sucrosegradienten aufgetragen. Über Nacht wird bei 22.000 rpm bei 4 °C für etwa 19 h zentrifugiert. Anschließend wird der Gradient von unten in 1 ml-Fraktionen fraktioniert. Von den Fraktionen werden Aliquots mit SDS-Probenpuffer versetzt und denaturiert, die Proteine werden über SDS-PAGE und Western-Blot analysiert.

Diese Aufarbeitung wurde mehrmals mit verschiedenen Homogenisationspuffern durchgeführt.

Homogenisationspuffer 1: 250 mmol/l Sucrose
10 mmol/l Tris-HCl, pH 7,4
10 µg/ml Aprotinin
10 µg/ml Leupeptin
20 µg/ml PMSF
1 mmol/l EDTA

Homogenisationspuffer 2: 400 mmol/l NaCl
250 mmol/l Sucrose
10 µg/ml Aprotinin
10 µg/ml Leupeptin

Homogenisationspuffer 3: 1 mol/l Harnstoff
250 mmol/l Sucrose
10 µg/ml Aprotinin
10 µg/ml Leupeptin

Sucrose-Gradient: 3 ml 2,0 mol/l Sucrose
4 ml 1,6 mol/l Sucrose
4 ml 1,2 mol/l Sucrose
4 ml 0,8 mol/l Sucrose
4 ml 0,4 mol/l Sucrose

Die Lösungen werden in der genannten Reihenfolge vorsichtig von unten nach oben in ein Zentrifugengefäß geschichtet. Das Zelllysat wird auf den Gradienten aufgetragen, wobei die Gefäße genau gegeneinander austariert werden.

6.9 Reinigung von exprimierten Proteinen

6.9.1 Ni-NTA-Chromatographie

Zur Isolierung des gesuchten Proteins über den His-Tag wird eine Ni²⁺-Nitrilotriessigsäure(NTA)-Agarose-Matrix der Firma QIAGEN (Hilden, Deutschland) verwendet. Dieses Material kann sowohl für Affinitäts-Säulenchromatographie als auch zur Reinigung des Proteins im Batch-Verfahren verwendet werden. Die an die Matrix gebundenen Proteine werden durch eine hohe Konzentration von Imidazol im Elutionspuffer wieder von den Ni²⁺-Ionen verdrängt und damit eluiert.

Zur Reinigung des Proteins unter nativen Bedingungen sollten die Zellen möglichst nur in Phosphatpuffer aufgeschlossen werden. Das Zellpellet wird dazu in Homogenisationspuffer resuspendiert (500 ml Puffer für 10^7 Zellen). Die Zellen werden durch Ultraschallbehandlung auf Eis aufgeschlossen (siehe Kap. 6.6.2.8). Das klare Lysat wird je nach Menge auf die Affinitätssäule gegeben oder für die Batch-Reinigung mit der Matrix versetzt und im Kühlraum 1 h geschüttelt.

Die Matrix wird anschließend sowohl in der Säule als auch im Batch (hier durch Abzentrifugieren der Matrix) mindestens zweimal mit Waschpuffer gewaschen. Zur Elution der an die Matrix gebundenen Proteine wird die Agarosematrix aus der Batch-Reinigung in eine Minisäule gefüllt. Die Elution erfolgt dann bei beiden Prozeduren identisch: Fünfmal wird je 1 ml Elutionspuffer auf die Säule gegeben und jeweils in einem Eppendorfgefäß aufgefangen. Spätestens in der zweiten Fraktion sollten die eluierten Proteine enthalten sein.

Homogenisationspuffer: 50 mmol/l NaH_2PO_4
300 mmol/l NaCl
10 mmol/l Imidazol
pH 8,0 mit NaOH

Waschpuffer: 50 mmol/l NaH_2PO_4
300 mmol/l NaCl
20 mmol/l Imidazol
pH 8,0 mit NaOH

Elutionspuffer: 50 mmol/l NaH_2PO_4
300 mmol/l NaCl
250 mmol/l Imidazol
pH 8,0 mit NaOH

6.9.2 Gluthation-Sepharose-Chromatographie

Um GST-Fusionsproteine isolieren zu können, wird eine Sepharose-Matrix mit kovalent gebundenem Glutathion verwendet. Die Zellen werden wie oben beschrieben aufgeschlossen und das klare Lysat wird auf die Affinitäts-Säule aufgetragen. Für eine Reinigung aus 500 ml Zellkultur wird 1 ml Sepharose benötigt.

Die Säule wird zunächst mit 2x 3 ml Homogenisationspuffer (siehe Kap. 6.6.2.8) äquilibriert. Dann wird das Zelllysate aufgetragen. Die Matrix sollte anschließend wieder zweimal mit je 3 ml Homogenisationspuffer gewaschen werden. Eluiert wird

in fünf Fraktionen mit je 0,5 ml Elutionspuffer. Die Säulenmatrix kann anschließend in PBS aufbewahrt und wieder verwendet werden.

Elutionspuffer: Homogenisationspuffer ohne Protease-Inhibitoren mit
10 mmol/l Glutathion

6.10 *In vitro*-Expression

6.10.1 System der Firma Roche

Mit Hilfe des Rapid Translation System™ RTS 100 E. coli HY Kit können in 50 µl-Ansätzen sowohl Expressionsvektoren zur prokaryontischen Expression als auch die vom Hersteller mitgelieferten Vektoren zur *In vitro*-Expression verwendet werden. Der Vektor muss den T7-Promotor und -Terminator enthalten und es sollte keine Sekundärstrukturen im Anfangsbereich der entstehenden RNA geben. Es ist dringend notwendig, bei allen Arbeitsschritten RNase-frei zu arbeiten.

Die im Kit enthaltenen Lösungen werden laut Herstellerangaben mit RNase-freiem Wasser rekonstituiert. Für jede durchzuführende Reaktion wird ein dünnwandiges 200µl-Eppendorf-Gefäßvorbereitet:

12 µl E. coli-Lysat
10 µl Reaction Mix
12 µl Aminosäuren
1 µl Methionin
5 µl Rekonstitutionspuffer

Zu dieser Reaktionsmischung werden dann je 0,5 µg des entsprechenden Vektors in maximal 10 µl Volumen gegeben. Als Positivkontrolle dient ein mitgeliefertes Vektorkonstrukt, das das Gen für GFP enthält. Die Mischung darf nicht gevortext werden!

Die Reaktionsgefäße werden in ein Wasserbad mit entsprechender Temperatur oder den Thermocycler gestellt. Nach 4 bis 6 h werden die Gefäße entnommen. Die Reaktionslösungen sollten entweder sofort weiter zur Analyse der Proteine verarbeitet oder bei 4 °C gelagert werden. Für die SDS-PAGE werden die Proteine der Lösung mit dem drei- bis zehnfachen Volumen eiskaltem Aceton (-20 °C) gefällt. Die Proben sollten 10 min auf Eis ruhen, dann 5 min bei 10000 g abzentrifugiert werden, um alle Proteine quantitativ zu erhalten. Das Pellet kann direkt in SDS-Probenpuffer aufgenommen werden (siehe Kap. 6.2).

6.10.2 System der Firma RiNA

Das zellfreie Expressionssystem der RiNA AG arbeitet ebenfalls mit einem *E. coli*-Lysat, allerdings wird ein anderer Bakterienstamm zur Herstellung dieses Lysate verwendet. Auch hier ist es notwendig, völlig RNase-frei zu arbeiten.

Für sechs Reaktionen werden folgende Lösungen zusammen pipettiert:

- 21 µl H₂O
- 48 µl prä-Mix S3/0
- 39 µl prä-Mix
- 12 µl Energie-Mix
- 3 µl 50 mmol/l EDTA
- 1,5 µl Rifampicin
- 1,5 µl T7 RNA-Polymerase
- 4,5 µl 5 mmol/l Leucin
- 7,5 µl 1 mmol/l ¹⁴C-Leucin

Je 23 µl dieser Mischung werden in Reaktionsgefäß gegeben. Anschließend werden je 2 µl des entsprechenden Vektors mit einer Konzentration von 25 nmol/l zugegeben. Die Reaktion findet bei 37 °C für 90 min statt. Anschließend werden die unlöslichen Proteine der Lösungen abzentrifugiert. Die löslichen Proteine werden in einem Aliquot mit TCA auf Nitrocellulose-Membranen gefällt und die radioaktiven Zerfälle pro Minute gezählt. Aus diesem Wert lässt sich über die eingesetzte Menge an ¹⁴C-Leucin die Menge des exprimierten Proteins errechnen. Aus einem anderen Aliquot werden mit dem fünffachen Volumen Aceton (-20 °C) ebenfalls die löslichen Proteine gefällt und mittels SDS-PAGE analysiert (siehe Kap. 6.2).

6.11 Massenspektrometrische Analyse von Peptiden

Die Massenanalyse von Peptiden erfolgt mit der Matrix-Assisted-Laser-Desorption-Ionisation-Massenspektrometrie (MALDI-MS). Hierfür wird die Probe in einem Überschuss einer kristallisierenden Matrix eingebettet. Durch die Interaktion mit der Matrix kommt es zur Abschwächung der intermolekularen Kräfte zwischen den Probenmolekülen und vermutlich zur Ionisierung. Die Matrix absorbiert Energie eines Lasers, wodurch ein Bruchteil der Matrixmoleküle in die Gasphase überführt wird. Dabei werden einige desorbierte Probenmoleküle mitgerissen. Die gasförmigen Ionen werden in der Ionenquelle durch Anlegen einer Spannung beschleunigt. Die

Detektion erfolgt in einem Time of Flight-Detektor (TOF), die Fluggeschwindigkeit der Ionen ist proportional zu ihrem Masse-Ladungsverhältnis (m/z).

Das zu untersuchende Protein wird mit Trypsin gespalten. Dadurch entstehen für jedes Protein bestimmte Peptide, die ein charakteristisches Massenspektrum ergeben. Diese Methode wird „Peptidmassen-Fingerprint“ genannt. Durch Vergleich der im Spektrum erhaltenen Peptidmassen mit Datenbank-Einträgen können Proteine identifiziert werden.

Die möglichst salz- und detergentienfreien Probe wird durch Lyophilisierung zur Trockne eingengt und in einem kleinen Volumen (1-2 μ l) 50 % Acetonitril / 0,1 % TFA aufgenommen. Dann wird das gleiche Volumen einer gesättigten Lösung der Matrix α -Cyanozimtsäure zugesetzt. Die Probe wird auf einen Probenteller pipettiert und bei RT getrocknet. Im Massenspektrometer wird mit einem UV-Laser ionisiert.

6.12 Peptidsequenzierung nach Edman

Das zu analysierende Protein wird mit dem Semi-dry-Verfahren (siehe Kap. 5.4.1) auf eine Polyvinylendifluorid (PVDF)-Membran geblottet. Die Membran wird mit Coomassie gefärbt und wieder entfärbt, bis die Proteinbanden deutlich sichtbar werden. Anschließend wird die Membran gewässert und getrocknet, die zu untersuchende Proteinbande wird ausgeschnitten und ohne weitere Vorbehandlung zur Sequenzierung eingesetzt. Die Sequenzierung erfolgt in einem automatischen Proteinsequenzer 473 A der Firma ABI.

6.13 Materialien

Geräte

Ultrazentrifuge	TGA-65, Kontron, München, Deutschland
Kühlzentrifuge	Centricon H-401, Kontron-Hermle, München, Deutschland
Tischzentrifuge	UEC Mikro 14B, Cotech, Berlin, Deutschland
Photometer	Modell UV-1202, Shimadzu Corp., Kyoto, Japan
Peristaltische Pumpe	Gilson Abimed Miniplus 2, Abimed, Düsseldorf, Deutschland
Fraktionssammler	Modell Gilson 203, Gilson Med. Electronics, Villiers Le Bel, Frankreich
Ultraschallgerät	Sonorex TK 30, Bandelin, Berlin

Elektrophorese-System	Flachgel-Apparatur Mini Protean II, BioRad, Richmond, CA, USA
Blot-Apparatur	Schleicher&Schuell, Dassel, Deutschland
Spannungsquellen	BioRad Power Pac 300, BioRad, München, Deutschland Elektrophoresis constant power supply ECPS 3000/150, Pharmacia, Freiburg, Deutschland
pH-Messgerät	Modell 643, Knick, Berlin, Deutschland
Vakuumkonzentrator	Evaporatorzentrifuge Univapo VUC 150 H, Lyophilisator GT 2, Leybold-Heraeus, Köln, Deutschland
Massenspektrometer	Bruker Reflex, Bruker Daltonik, Bremen, Deutschland
Peptidsequenzer	Modell 473 A, ABI, Foster City, CA, USA
<u>Zelllabor:</u>	
Sicherheitswerkbank	Herasafe HS12, Heraeus, Hanau, Deutschland
Kühlzentrifuge	Biofuge PrimoR, Heraeus, Hanau, Deutschland
Wärmeschrank	Incucell111R, MMM Medcenter, Planegg, Deutschland
Schüttelinkubator	Certomat RO/Certomat H, Braun Biotech, Melsungen, Deutschland
Mikroskop	CK30 Invers-Mikroskop, Olympus, Hamburg, Deutschland
<u>Molekularbiologie:</u>	
Schüttelinkubator	HT, Infors AG, Bottmingen, Schweiz
Wärmeschrank	Modell 300, Memmert, Schwabach, Deutschland
PCR-Gerät	Primus 25, MWG Biotech, München, Deutschland
Autoklav	Tuttnauer 3870 EL, Systec, Wetzlar, Deutschland

Chemikalien und Enzyme

Alle Chemikalien wurden in höchster verfügbarer Qualität von verschiedenen Firmen bezogen.

Molekularbiologische Enzyme wurden, wenn nicht anders angegeben, von der Firma New England Biolabs, England, bezogen. Andere molekularbiologischen Verbrauchsmaterialien wurden von den jeweils angegebenen Firmen erworben.