

3. Methoden

3.1 Zellzahlbestimmung

Die Bestimmung der Zahl lebender Zellen erfolgte mittels Trypanblau, das in tote Zellen eindringen kann, von lebenden aber ausgeschlossen wird. In einer Neubauer-Zählkammer wurden die nicht blau erscheinenden Zellen unter dem Mikroskop bei 40facher Vergrößerung gezählt. Die Zellzahl pro ml ergab sich nach Auszählung von 16 Quadranten mit Hilfe folgender Formel:

$$\text{Anzahl der gezählten Zellen} \times \text{Verdünnung} \times 100$$

3.2 Gewinnung von Lymphknotenzellen

Sämtliche in dieser Arbeit beschriebenen Experimente wurden mit primären T-Zellen der Ratte durchgeführt, die aus Lymphknotenzellen gewonnen wurden. Dazu wurden acht bis zwölf Wochen alte Lewis-Ratten durch CO₂-Begasung und anschließendem Genickbruch getötet, die cervikalen, inguinalen, mesenterialen sowie axilären Lymphknoten herauspräpariert und in eiskaltes BSS gegeben. Unter sterilen Bedingungen wurden die Lymphknoten durch ein engmaschiges Sieb gerieben. Die entstandene Zellsuspension wurde in einem Zentrifugenröhrchen zum Absetzen von Zelltrümmern und Geweberesten für 10min auf Eis gestellt. Die im Überstand befindliche Zellsuspension wurde in ein weiteres Röhrchen überführt und mit BSS gewaschen. Dies bedeutete eine 5minütige Zentrifugation mit 1600 U/min, Absaugen des Überstandes und Resuspendieren des Pellets in BSS.

3.3 T-Zellaufreinigung durch Nylonwollsäule

Lymphknoten enthalten nur zu etwa 60% T-Zellen, der Rest setzt sich aus B-Zellen, Makrophagen und NK-Zellen sowie anderen akzessorischen Zellen zusammen, die entfernt werden sollten. Dazu werden die Zellen über Nylonwolle passagiert. B-Zellen und Makrophagen adhärieren in einem temperaturabhängigen Prozess aus unverständlichen Gründen an die Nylonwolle, während T- und NK-Zellen nicht binden.

Das folgende Protokoll lehnt sich an das in (Mishell und Shiigi, 1980) beschriebene an. Für bis zu 5×10^8 Zellen wurden 2,4g locker gezupfte Nylonwolle in eine 50ml Einmalspritze gestopft und diese autoklaviert. Die folgenden Schritte wurden unter sterilen Bedingungen ausgeführt. Vor der Filtration wurde die Nylonwolle mit dreifachem Säulenvolumen BSS gewaschen, wobei durch Klopfen Luftblasen entfernt wurden, sowie mit BSS/5% FCS äquilibriert und mindestens 45min bei 37°C vorgewärmt. Die, wie unter 3.2 beschrieben, vorbereiteten Zellen wurden in 5ml

BSS/FCS-Lösung (ebenfalls auf 37°C vorgewärmt) aufgenommen und auf die Säule aufgetragen. Nach kurzem Einlaufenlassen der Zellen wurden diese mit warmem BSS/FCS überschichtet und für 30-45min im 37°C-Raum inkubiert. Danach konnten die nicht-adhären Zellen mit einem Säulenvolumen warmer BSS/FCS-Lösung bei einer Tropfgeschwindigkeit von etwa 1ml/min eluiert werden. Nach einmaligem Waschen wurden die Zellen weiterverarbeitet oder in RPMI-Medium (mit SC) aufgenommen und über Nacht im Brutschrank (5,6% CO₂, 37°C, H₂O-Sättigung) inkubiert.

3.4 *In vitro*-Zellstimulation

Nylonwoll-gereinigte T-Zellen wurden in RPMI-Medium (mit SC) und zum Teil mit 20mM HEPES bei 37°C im Brutschrank in Plastikschaalen kultiviert und stimuliert.

Für TZR-Stimulation wurden die Platten über Nacht bei 4°C mit 500µg/ml Schaf anti-Maus Ig (sheep anti-mouse Ig = ShaMIg) in 0,1M Bicarbonatpuffer (pH 9,5) beschichtet. Nach intensivem Waschen mit BSS wurde durch mindestens 30minütige Inkubation bei Raumtemperatur (RT) 2µg/ml anti-TZR mAb R73 auf den Platten immobilisiert, ebenfalls gefolgt von sorgfältigem Waschen. Für Kostimulation wurden immobilisierter R73 und 0,5µg/ml löslicher kostimulatorischer anti-CD28 mAb JJ319 benutzt. Direkte CD28-Stimulation wurde erreicht durch immobilisierten ShaMIg und 5µg/ml löslichen mitogenen anti-CD28 mAb JJ316; als Kontrolle wurde zum Teil der mitogene mAb durch JJ319 (ebenfalls 5µg/ml) ersetzt.

Die Stimulation in 96-Napf-Flachbodenplatten erfolgte bei einer Zellkonzentration von $2,5 \times 10^4$ /ml in einem Gesamtvolumen von 0,2 ml, für Western Blots und Kinase Assays wurden $1-2 \times 10^7$ T-Zellen in 5ml Medium in nicht beschichteten Bakterienpetrischalen (9,6 cm Durchmesser) stimuliert.

3.5 Proliferationsassay

Für Proliferationsversuche erfolgte, wie unter 3.4 beschrieben, die Stimulation in 96-Napf-Flachbodenplatten bei einer Zellkonzentration von $2,5 \times 10^5$ /ml in einem Gesamtvolumen von 0,2 ml. Proliferation wurde bestimmt durch Zugabe von [³H]-Thymidin (0,5µCi/ml) zu Triplikaten kultivierter Zellen für die letzten 12-16 h (über Nacht) der Stimulation. Danach wurden die Zellen geerntet (96-well harvester, Pharmacia) und dadurch die DNA auf Filtermatten appliziert. Nach dem Trocknen der Matten wurde diese in einer Szintillationsflüssigkeit in Plastik eingeschweißt. Die Messung der Menge des Thymidins, das bei den Zellteilungen in die DNA inkorporiert wurde, erfolgte durch β-Szintillation.

Für Proliferationsversuche in Anwesenheit von Inhibitoren wurden die Zellen zunächst ohne stimulierende Reagentien mit dem jeweiligen Inhibitor 30-60min bei 37°C im Brutschrank vorinkubiert und dann in Platten in Gegenwart des Inhibitors stimuliert.

3.6 Herstellung von Pervanadat und Pervanadat-Stimulation

Neben Aktivierung mit spezifischen Antikörpern wurden teilweise auch Zellen mit Pervanadat stimuliert: Pervanadat löst starke Tyrosin-Phosphorylierungen in behandelten Zellen aus und wurde deshalb als Positivkontrolle für Phosphorylierungen in einigen Experimenten eingesetzt.

Zur Herstellung von Pervanadat wurden 30µl 10mM Na₃VO₄ (siehe 3.7) mit 10µl 1M H₂O₂ vermischt und 10min bei RT belassen. Danach wurden 110µl PBS zugegeben. 5µl dieses Pervanadats wurden zu 1-2x10⁷ Lymphknoten-T-Zellen gegeben, die in 100µl Medium/20mM HEPES resuspendiert und auf 37°C aufgewärmt waren. Die Stimulation bei 37°C wurde nach der gewünschten Zeitdauer durch Zentrifugation (einige Sekunden „Quick-Spin“) der Zellen, Abnehmen des Überstandes und Resuspendieren des Zellpellets in Lysepuffer gestoppt. Die durch Pervanadat verursachten starken Phosphorylierungen konnten im Western Blot im Gesamtlysat oder nach Präzipitation detektiert werden.

3.7 Herstellung einer Natrium-Orthovanadat-Lösung

Natrium-Orthovanadat (Na₃VO₄) wurde in 70% des Volumens in H₂O gelöst, das zur Herstellung einer 10mM Lösung nötig ist. Der pH-Wert wurde auf 10 mit HCl eingestellt. Die dadurch gelb gewordene Lösung wurde so lange gekocht, bis sie wieder klar war. Nach Abkühlen (auf Eis) wurde wieder der pH-Wert mit HCl auf 10 eingestellt und die erneute Gelbfärbung durch Kochen rückgängig gemacht. Dieser Vorgang wurde solange wiederholt, bis die Lösung auch nach Zugabe von HCl klar blieb. Mit H₂O wurde dann auf das Endvolumen aufgefüllt. Die Na₃VO₄-Lösung kann über Monate bei 4°C im Kühlschrank aufbewahrt werden, größere Mengen wurden jedoch bei -20°C gelagert.

3.8 Zellyse

Die *in vitro* Stimulation in Platten mit spezifischen Antikörpern wurde durch Lyse der Zellen beendet. Dazu wurde das Stimulationsmedium mit darin befindlichen, nicht-adhärennten Zellen möglichst vollständig von den Platten abgenommen, jeweils in ein vorbereitetes Röhrchen mit kaltem PBS gegeben und die Zellen pelletiert.

Die über die immobilisierten Antikörper an die Platten gebundenen Zellen wurden in der Platte durch Zugabe von 600µl (bei Herstellung von Gesamtzelllysaten) oder 1ml Lysepuffer (bei nachfolgender Immunpräzipitation) 30min auf Eis lysiert. Dabei wurden die Platten zwischenzeitlich geschwenkt, um eine gleichmäßige Bedeckung der Platte mit Lysepuffer zu gewährleisten. Das Pellet der nicht-adhären Zellen wurde mit Lysepuffer aus der Platte des zugehörigen Ansatzes ebenfalls lysiert und mit diesem in der Platte vereinigt. Nach Beendigung der Lyse wurde die Lösung der lysierten Zellen von der Platte in ein Reaktionsgefäß überführt und für 10min mit 15000 U/min in einer Tischzentrifuge bei 4°C zentrifugiert. Das Pellet, das die detergentunlösliche Fraktion enthielt, wurde verworfen, der Überstand mit den zytoplasmatischen Proteinen entweder als Gesamtlysat im Western Blot analysiert oder zur Immunpräzipitation eingesetzt.

Lysepuffer

- 1% Brij96 oder NP40
- 150mM NaCl
- 10mM Tris pH 8.0
- 1mM EGTA
- 1mM Na₃VO₄
- 20mM NaF
- 1mM Pefabloc
- 2µg/ml Leupeptin
- 2µg/ml Aprotinin

Die angegebenen Konzentrationen sind Endkonzentrationen.

3.9 Immunpräzipitation

Durch Immunpräzipitation mit spezifischen Antikörpern oder -seren lassen sich gezielt Proteine isolieren, analysieren und identifizieren. Zur Vorbereitung wurden zunächst die zum Präzipitieren notwendigen Antikörper an Protein A- oder G-Sepharose-Kügelchen (Beads) gekoppelt. Dazu wurde der Antikörper - als Richtschnur können 2-5µg eines monoklonalen Antikörpers und 5µl eines polyklonalen Serums pro Ansatz gelten - mit 200µl einer 10prozentigen Protein A- oder G-Sepharoselösung (in PBS) in ein Reaktionsgefäß gegeben (die Entnahme der Sepharose-Kügelchen geschah mit einer blauen oder abgeschnittenen gelben Spitze), mit kaltem PBS aufgefüllt sowie auf einem Überkopfschüttler meist über Nacht, mindestens aber 1h, bei 4°C inkubiert. Nach Beendigung der Kopplungsreaktion wurden die Kügelchen vorsichtig bei nicht mehr als 5000 U/min für einige Sekunden in der Tischzentrifuge pelletiert und mehrmals mit kaltem PBS gewaschen, um überschüssigen, nicht gekoppelten Antikörper zu beseitigen. Fand die Kopplungsreaktion für mehrere Präzipitationen in einem Reaktionsgefäß statt,

wurden mit dem letzten Waschschrift die Kügelchen auf einzelne Reaktionsgefäße verteilt.

Die nach Zellstimulation gewonnenen Lysate (3.8) wurden zu den an Kügelchen gekoppelten Antikörpern gegeben. Zur Präzipitation zytoplasmatischer Proteine wurde das Gemisch über Nacht oder mindestens zwei Stunden bei 4°C auf einem Überkopfschüttler rotiert.

3.10 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Präzipitierte Proteine (von 1×10^7 - 2×10^7 T-Zellen) oder Gesamtlysate von 6×10^5 T-Zellen wurden denaturiert durch 5minütiges Kochen bei 95°C in reduzierendem (in seltenen Fällen auch nicht-reduzierendem) Probenpuffer. Die denaturierten Proteine wurden durch SDS-PAGE in Gel-Laufpuffer bei 200V aufgetrennt.

2x reduzierender Probenpuffer

Tris 1M pH 6,8	3,4 ml
Glyzerin	2ml
SDS 20%	3ml
Bromophenolblau 0,75%	0,5 ml
EDTA 0,5M	0,2 ml
β-Mercaptoethanol	1 ml

Für den nicht-reduzierenden Probenpuffer wird β-Mercaptoethanol durch H₂O ersetzt.

SDS-PAGE Gel (für zwei 0,75mm Minigele)

Trenngel

	7,5 %	10%	12%	15%
30% Acrylamid/0,8% Bisacrylamid	2,5 ml	3,33 ml	4 ml	5 ml
1,5 M Tris pH 8,8	2,5 ml	2,5 ml	2,5 ml	2,5 ml
10% SDS	0,1 ml	0,1 ml	0,1 ml	0,1 ml
H ₂ O	4,85 ml	4,0 ml	3,35 ml	2,35 ml
TEMED	10µl	10µl	10µl	10µl
10% APS	50µl	50µl	50µl	50µl

3% Sammelgel

30% Acrylamid/0,8% Bisacrylamid	650µl
1M Tris pH 6,8	625µl
10% SDS	50µl
H ₂ O	3,7ml
TEMED	10µl
10% APS	50µl

TEMED und APS werden erst direkt vor dem Gießen zu den jeweiligen Lösungen hinzugegeben.

Gel-Laufpuffer

25mM Tris
192mM Glyzin
0,1% SDS

3.11 Western Blot

Nach der Elektrophorese wurden die Proteine vom Gel auf eine Membran transferiert. Dazu wurde das Gel, von dem das Sammelgel mit den Taschen entfernt wurde, in ein „Blot-Sandwich“ bestehend aus Schaumstoff, einem Whatman-Papier, Gel, Membran, einem Whatman-Papier, Schaumstoff eingebettet. Diese Anordnung wurde so in eine Blotapparatur mit Transferpuffer eingespannt, daß das Gel zwischen Anode und Membran lag. Der Transfer erfolgte im 4°C-Raum bei 80V für 2h oder über Nacht bei 40V.

Anschließend wurde der Erfolg des Transfers durch Schwenken der Membran in PonceauS überprüft. PonceauS erlaubt eine reversible Anfärbung von Proteinen. In größeren Mengen vorhandene Proteine wie Albumin, präzipitierender Antikörper oder Proteinstandard können so auf der Membran nachgewiesen und gegebenenfalls markiert werden.

Zur Absättigung unspezifischer Bindungsstellen der Membran wurde diese danach mindestens 1h bei RT in 5% Milchpulver in TBS/T geschwenkt. Anschließend erfolgte die Inkubation mit dem ersten Antikörper in geeigneter Verdünnung in TBS/T, je nach Antikörper 1h bei RT oder über Nacht bei 4°C auf dem Schüttler. Überschüssiger Antikörper wurde in drei 10minütigen Waschsritten mit einem möglichst großen Volumen TBS/T entfernt. Nach diesem Waschen wurde die Membran mit dem sekundären, an Meerrettich-Peroxidase gekoppelten Antikörper für 45 min bei RT inkubiert und danach erneut gewaschen. Zuletzt wurde der Western Blot mit dem ECL (= enhanced chemoluminescence)-System nach Herstellerangaben entwickelt.

Transferpuffer

25mM Tris
192mM Glyzin
20% Methanol
Der pH-Wert sollte 8,3 betragen.

PonceauS-Lösung

0,2% PonceauS
5% Essigsäure

TBS/T

20mM Tris
137mM NaCl
0,1% Tween 20

3.12 „Stripping“ von Membranen

Bereits im Western Blot eingesetzte Membranen können erneut mit anderen Antikörpern entwickelt werden, nachdem die zuvor benutzten Antikörper entfernt wurden bzw. die Membran „gestripped“ wurde. Häufig wird diese Methode auch eingesetzt, um nach Analyse des Phosphorylierungsstatus eines Proteins gleiche Mengen des Proteins in allen Ansätzen zu belegen. Der Nachteil der Methode besteht in einem teilweisen Verlust membrangebundener Proteine (nicht nur des zu entfernenden Antikörpers) und einer Zunahme der unspezifischen Bindung, des Hintergrunds.

Nach der ECL-Entwicklung wurde die Membran kurz mit TBS/T zur Entfernung noch verbliebener ECL-Reagentien gewaschen und 30min bei 56°C auf einem Schüttler bzw. im Schüttelwasserbad mit „Stripping“-Puffer inkubiert (möglichst in einem geschlossenen Behälter - der „Stripping“-Puffer enthält β -Mercaptoethanol!). Danach wurde mindestens zweimal 20min mit TBS/T gewaschen, um überschüssiges β -Mercaptoethanol zu entfernen, bevor wieder mit 5% Milchpulver in TBS/T unspezifische Bindung blockiert und der Blot nach dem unter 3.11 beschriebenen Vorgehen mit erstem und zweitem Antikörper erneut entwickelt wurde.

„Stripping“-Puffer

100mM β -Mercaptoethanol

2% SDS

62,5mM Tris pH 6,8

3.13 *In vitro*-Kinase-Assay

Die Aktivität von Kinasen läßt sich in einem *in vitro*-Kinase-Assay bestimmen, in dem die Kinase radioaktiv-markierte Phosphatgruppen auf ein Substrat überträgt. Das Substrat kann die Kinase selbst sein, wenn sie Fähigkeit zur Autophosphorylierung besitzt, oder aber ein von außen zugegebenes.

Für einen *in vitro* Kinase-Assay wurden nach Lyse der Zellen (mit NP40 für Ick- und mit TritonX-100 für JNK-Kinase-Assays) und Präzipitation der jeweiligen Kinase mit an Kügelchen (Beads) gekoppelten Antikörpern die Beads zunächst gewaschen.

Für Ick-Kinase-Tests wurde zweimal mit NP40-Lysepuffer (siehe 3.8) und zweimal mit Ick-Assay-Puffer gewaschen, für JNK-Kinase-Tests zweimal mit TritonX-100-Lysepuffer, zweimal mit LiCl-Waschlösung und zweimal mit JNK-Assay-Puffer. Danach wurde möglichst viel Flüssigkeit aus den Reaktionsgefäßen mit einer Hamiltonspritze gesaugt (die Kügelchen wurden getrocknet). Die mit den Kügelchen präzipitierten Immunkomplexe wurden für 20min bei 30°C mit 30 μ l „Final-Assay“-

Puffer inkubiert, der neben 5 μCi [γ - ^{32}P]-ATP und Substraten 10mM MnCl_2 als Kofaktor für lck oder 10mM MgCl_2 als Kofaktor für JNK enthielt. Die Kinasereaktion wurde mit 30 μl doppelt konzentriertem SDS-PAGE Probenpuffer gestoppt. Die Proben wurden für 5min bei 95°C gekocht, die Produkte mit Hilfe von SDS-PAGE aufgetrennt und nach Trocknen der Gele durch Autoradiographie sichtbar gemacht.

Lysepuffer

NP-40	siehe 3.8
TritonX-100	
	20mM HEPES pH7,2
	2mM EDTA
	50mM β -Glyzerophosphat
	1% TritonX-100
	10% Glyzerin

LiCl-Waschlösung

500mM LiCl
100mM Tris-Cl pH 7.6
0.1% Triton X-100
1mM DTT

„Assay“-Puffer

lck:	20mM HEPES pH 7.4
	0.1% Brij96
JNK:	20mM Mops pH 7.2
	2mM EGTA
	1mM DTT
	0.1% TritonX-100

„Final-Assay“-Puffer

lck:	lck-Assay-Puffer +
	10mM MnCl_2
	0.5 μl [γ - ^{32}P]-ATP = 5 μCi
	ad libitum: 5 μg Enolase (siehe 3.14)
JNK:	JNK-Assay-Puffer +
	10mM MgCl_2
	0.5 μl [γ - ^{32}P]-ATP = 5 μCi
	5 μg GST-c-Jun

2x SDS-Probenpuffer siehe 3.10

3.14 Enolase-Denaturierung (Feder und Bishop, 1990)

Säure-denaturierte Enolase wurde teilweise als exogenes Substrat für die src-Kinase lck in Kinase-Assays eingesetzt. Zur Denaturierung wurde unmittelbar vor der Kinasereaktion die gewünschte Menge Enolase mit dem gleichen Volumen 50mM Essigsäure für 5min bei 30°C inkubiert. Der pH-Wert wurde danach mit einem halben Volumen (bezogen auf die zugegebene Menge an Essigsäure) 1M HEPES pH 7,4 neutralisiert. In dieser Form konnte Enolase in der Kinasereaktion verwendet werden.

3.15 IL-2-ELISA (enzyme linked immunoabsorbance assay)

Mit Hilfe eines ELISAs können sezernierte Stoffe wie Interleukin-2 nachgewiesen und quantifiziert werden. Dazu wird zunächst IL-2 aus einem Zellkulturüberstand mit einem spezifischen, immobilisierten Antikörper in einer Platte gebunden. Detektiert wird das immobilisierte Protein mit einem weiteren IL-2-spezifischen, biotinylierten Antikörper, an den Streptavidin gekoppelt mit Alkalischer Phosphatase bindet. Die Zugabe eines Substrates der Alkalischen Phosphatase führt zu einer Farbreaktion, deren Intensität proportional zur Menge des sezernierten IL-2 ist.

96-Napf-Platten wurden über Nacht bei 4°C mit anti-IL-2 (3µg/ml in PBS) beschichtet. Am nächsten Tag wurde die Antikörperlösung dekantiert und unspezifische Bindungsstellen mit 5% BSA in PBS für 2h bei Raumtemperatur blockiert. In die dreimal mit 0,05% Tween in PBS gewaschenen Näpfe wurde der zu analysierende Überstand in zwei verschiedenen Verdünnungen bzw. ein Standard (rekombinantes Ratten IL-2, 7,8-1000pg/ml) gegeben und über Nacht bei 4°C inkubiert. Die Platten wurden dann viermal mit PBS/Tween gewaschen, bevor biotinylierter anti-IL-2 mAb (1mg/ml in PBS/0,05% Tween/1% BSA) für 1h bei RT zugegeben wurde, gefolgt von erneutem viermaligen Waschen mit PBS/Tween. Danach erfolgte die Zugabe von Streptavidin gekoppelt an Alkalische Phosphatase (1: 500 in PBS/0,05% Tween/1% BSA) für 1h bei RT. Zuletzt wurde das in Diethanolaminpuffer gelöste Substrat pNPP zugegeben und die Reaktion für 30 min im Dunkeln stehen gelassen. Die bei Vorhandensein von IL-2 entstandene Gelbfärbung wurde durch die Bestimmung der optischen Dichte bei 405nm quantifiziert.

Diethanolaminpuffer

1M Diethanolamin

0,05M MgCl₂

0,05% NaN₃

Der pH-Wert muß mit HCl auf 9,8 eingestellt werden.

3.16 Aufreinigung von GST-Fusionsprotein

Zur Gewinnung von GST-Fusionsproteinen wurde eine 25ml Übernachtskultur aus dem Glyzerinstock in LB-Medium mit Ampicillin (100µg/ml) angesetzt. Am nächsten Tag wurden 15ml der Übernachtskultur in 500ml LB-Ampicillin-Medium überführt und bei 37°C und 180 U/min bis zu einer optischen Dichte von 600 wachsen gelassen. Dann wurde IPTG (0,4mM Endkonzentration) zugegeben, um die Expression des Fusionsproteins zu induzieren, und die Kultur für weitere 90min inkubiert. Anschließend wurden die Bakterien geerntet (5000 U/min bzw. 4500g,

20min, 4°C), das Pellet in 10ml PBS mit 1% TritonX-100, 2mM EDTA, 1mM Pefabloc und 5mM DTT resuspendiert und auf Eis sonifiziert (55%, Stufe 6, 1x35 Pulse, 2x30 Pulse). Das Sonifikat wurde für 30min mit 10000U/min bzw. 12000g bei 4°C zentrifugiert und der Überstand mit 300µl Glutathion-Sepharose-Kügelchen 2h bei 4°C auf einem Überkopfschüttler inkubiert. Danach wurden die Beads mit PBS gewaschen. Aliquots des an die Kügelchen gekoppelten Fusionsproteins wurden mit Probenpuffer aufgekocht und mit Hilfe von SDS-PAGE und Coomassie-Färbung analysiert. Für einige Tage wurde das Protein im Kühlschrank aufbewahrt, für längere Lagerung wurde die Lösung mit 50% Glycerin versetzt und bei -20°C weggefroren. Allerdings ist auch dieser Lagerung ein Aktivitätsverlust zu beobachten, so daß es sich empfiehlt, für jede Präzipitation das Fusionsprotein erneut aufzureinigen.

3.17 Proteingelfärbung mit Coomassie Blue

Proteine können nach SDS-PAGE im Gel mit dem Farbstoff Coomassie Blue angefärbt werden. Dazu wurde das Gel mindestens 30min bei RT in Färbelösung geschwenkt und anschließend die Hintergrundfärbung durch mehrstündiges Inkubieren in Entfärbelösung entfernt. Der Entfärbungsprozess wird in Anwesenheit von etwas Schaumstoff erheblich beschleunigt, der überschüssigen Coomassie-Farbstoff aufnehmen kann.

Färbelösung

Coomassie	1,25g
Methanol	455ml
Essigsäure	92ml
H ₂ O	455ml

Vor dem Gebrauch filtrieren. Die Lösung kann wiederholt verwendet werden.

Entfärbelösung

Essigsäure	375 ml
Methanol	250 ml
Mit H ₂ O auf 5l auffüllen.	