

# FUNKTIONELLE PROTEOMICS

EIN LEITFADEN FÜR ERFOLGREICHE PROTEIN-ANALYSEN



Promega

Proteomics ist ein schnell wachsender Teilbereich der modernen Biologie, der durch die Entwicklung von Technologien geprägt ist, die das Studium von Proteinen und deren Funktionen ermöglicht. Sie gliedert sich auf in die Teilbereiche strukturelle, komparative und funktionelle Proteomics. Letzteres hat mit der Aufklärung der Funktionsweise der Proteine und wie sie sich in komplexe Netzwerke der zellulären Prozesse einfügen zu tun und stellt derzeit eine der großen Herausforderungen der Bio-Wissenschaften dar.

## INHALT

<b>1 PROTEIN-EXPRESSION</b>	3
1.1 Optimierte Proteinexpression in <i>E.coli</i>	3
1.2 Regulierte Expression in Säugerzellen	4
1.3 Expression funktioneller Proteine	5
<b>2 PROTEIN-AUFREINIGUNG</b>	8
2.1 HaloLink™ Resin	8
2.2 Proteolytische Spaltung von Fusionsproteinen	9
ProTEV Protease	9
<b>3 ANALYSE VON PROTEINFUNKTIONEN</b>	10
HaloTag® Technologie	
– Proteindetektion ohne Antikörper oder Radioisotope	10
<b>3.1 Imaging von Proteinen in lebenden Zellen</b>	11
<b>3.2 Protein-Protein-Interaktionen</b>	13
GST Pull-down Assays	13
HaloTag®-basierte Pull-down Assays in Säugerzellen	13
<i>In vitro</i> Pull-Down Assays	14
CheckMate™ Mammalian Two-Hybrid System	15
<b>3.3 Protein-DNA-Interaktionen</b>	16
HaloCHIP™ System	16
<b>4 PROTEINCHARAKTERISIERUNG</b>	17
Reagenzien für die massenspektroskopische Probenvorbereitung	17
<b>4.1 Protease™ MAX</b>	17
<b>4.2 Trypsin Gold</b>	18
<b>5 VEKTOREN FÜR PROTEIN-EXPRESSION UND -AUFREINIGUNG</b>	19
<b>6 PRODUKTLISTE</b>	20
<b>7 ANHANG</b>	23
Vergleich der Expression von 55 humanen Proteinen	23

# 1 PROTEIN-EXPRESSION

## 1.1 OPTIMIERTE PROTEINEXPRESSION IN *E. coli*

### Ein Stamm für Klonierung und Expression – Single Step (KRX) Competent Cells

KRX Zellen sind sowohl für die Klonierung als auch für die Proteinexpression hervorragend geeignet. Neben den Eigenschaften eines guten Klonierungsstamms – wie ein teilweise defektes Restriktionssystem, Rekombinationsdefizienz und die Möglichkeit der blau/weiß Selektion – sind sie auch für die Expression sehr gut einsetzbar. Bei diesem *E. coli* Stamm wird die T7 RNA Polymerase durch einen Rhamnose Promotor kontrolliert, der vollständig durch Glukose abschaltbar ist (Katabolitrepression). Die Rhamnose kann aufgrund einer Gendeletion nicht metabolisiert werden – so wird das Wunschprotein konstant exprimiert. Außerdem besteht der Vorteil, dass auch toxische Proteine exprimiert werden können.

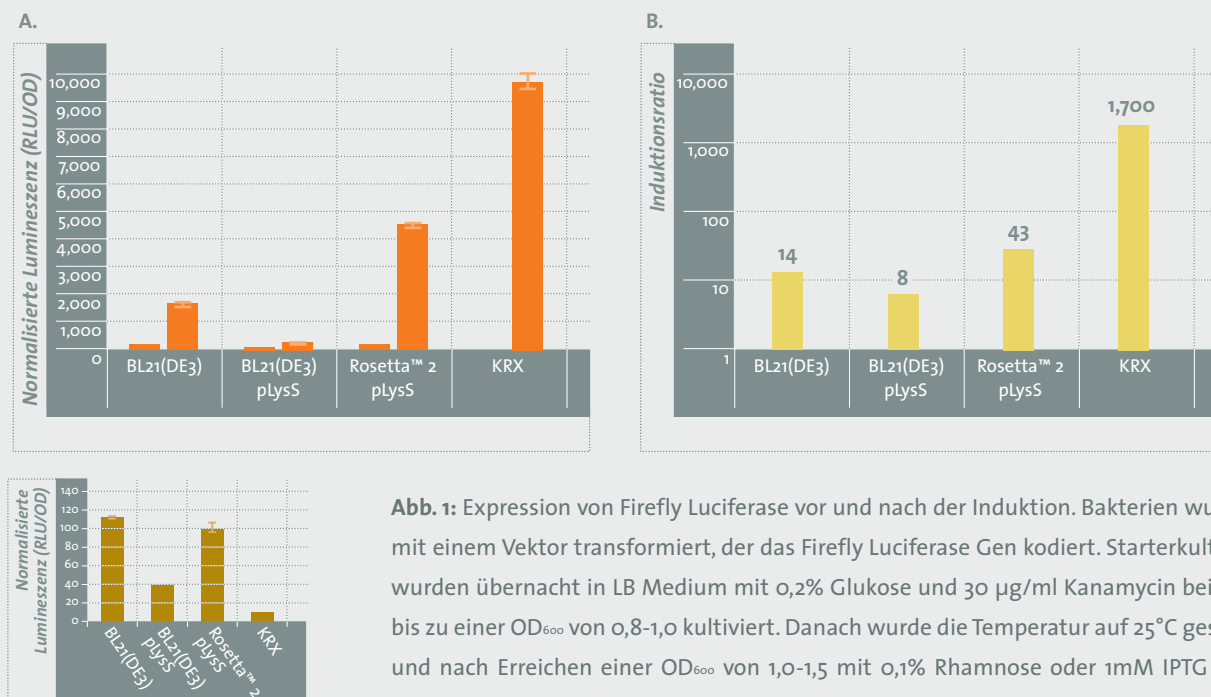
#### Anwendungen

Klonierung von Plasmid-DNA

Kontrollierte Expression von Proteinen

#### Technische Daten

Genotype: [F<sup>-</sup>, traD36, \_ompP, proA<sup>+</sup>B<sup>+</sup>, lacI<sup>s</sup>, \_(lacZ)M15] \_ompT, endA1, recA1, gyrA96 (Nal<sup>r</sup>), thi-1, hsdR17 (r<sup>k-</sup>, m<sup>k+</sup>), e14<sup>-</sup> (McrA<sup>-</sup>), relA1, supE44, \_(lac-proAB), \_(rhaBAD)::T7 RNA polymerase.



**Abb. 1:** Expression von Firefly Luciferase vor und nach der Induktion. Bakterien wurden mit einem Vektor transformiert, der das Firefly Luciferase Gen kodiert. Starterkulturen wurden übernacht in LB Medium mit 0,2% Glukose und 30 µg/ml Kanamycin bei 37°C bis zu einer OD<sub>600</sub> von 0,8-1,0 kultiviert. Danach wurde die Temperatur auf 25°C gesenkt und nach Erreichen einer OD<sub>600</sub> von 1,0-1,5 mit 0,1% Rhamnose oder 1mM IPTG über Nacht unter Schütteln induziert. Luciferase Aktivität wurde mit Bright-Glo™ Luciferase Assay Reagenz ermittelt. (A) Dargestellt sind die relativen Lumineszenzen der Proben vor und nach Induktion dividiert durch die OD<sub>600</sub> Werte. (B) Die relativen Lumineszenzen nach der Induktion wurden durch die relativen Lumineszenzen vor der Induktion dividiert, um die Induktionsrate zu berechnen.

## Features und Benefits

Schnell	Nur ein Bakterienstamm für Klonierung und Proteinexpression
Robust	Expression toxischer Proteine möglich
Konstante Expression	Die Expression der T7 RNA Polymerase bleibt bei gleichem Rhamnose-Gehalt konstant hoch

## 1.2 REGULIERTE EXPRESSION IN SÄUGERZELLEN

### Das Regulated Mammalian Expression System (RMES)

Das RMES ermöglicht eine sehr genau Regulierung der Proteinexpression in Säugerzellen. Dies wird durch die Transfektion zweier Plasmide ermöglicht. Das eine trägt das zu exprimierende Gen, dem ein Operator ( $12x\lambda Op$ ) vorgeschaltet ist. Das andere kodiert für einen chimeren Transaktivator, der aus zwei Gyrase B Untereinheiten besteht; auch diesem Gen ist der gleiche Operator vorgeschaltet.

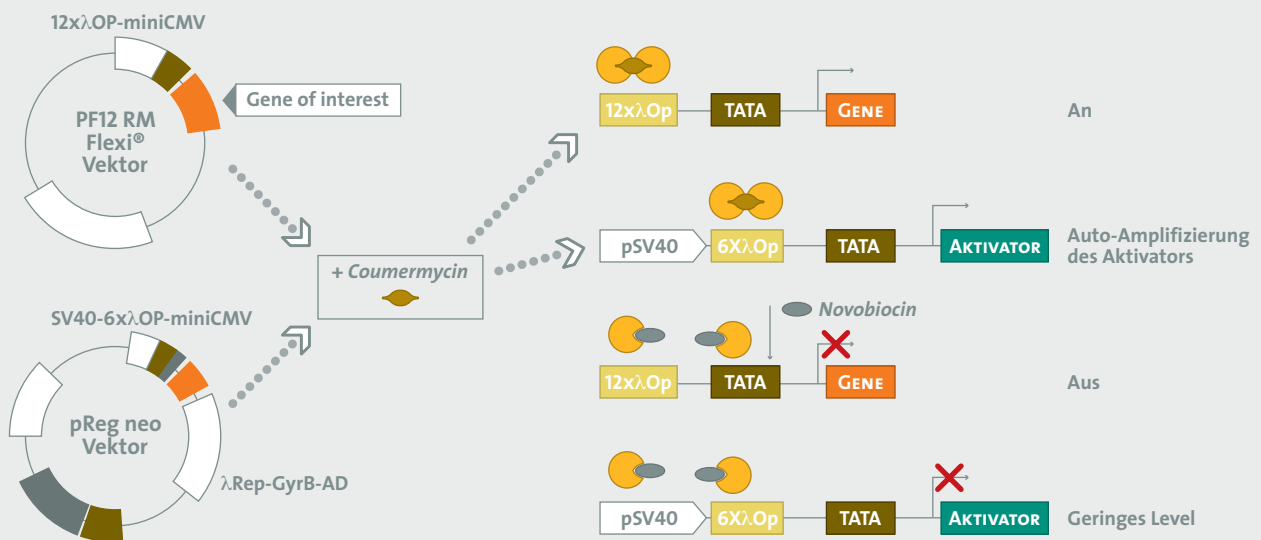


Abb. 2

Durch einen minimalen SV40 Promotor wird eine geringe Basalexpression des Transaktivators erreicht, der erst durch die Zugabe von Coumermycin in seine aktive Form homodimerisiert. Er bindet nun an den Operator, der dem zu exprimierenden Gen und dem Transaktivator vorgeschaltet ist und leitet eine positive Autoregulation des Transaktivators ein.

Novobiocin blockiert die Dimerisierung des Transaktivators. Damit wird die Expression des Zielproteins verhindert, da der Operator ( $12x\lambda Op$ ) nicht mehr gebunden werden kann. Coumermycin und Novobiocin wirken stöchiometrisch, daher kann durch unterschiedliche Mengen der beiden Substanzen die Konzentration des Zielproteins beeinflusst werden.

Technische Daten

SCHNELLE HEMMUNG DER COUMERMYCIN-INDUZIERTEN PROTEINEXPRESSION DURCH NOVOBIOCIN:

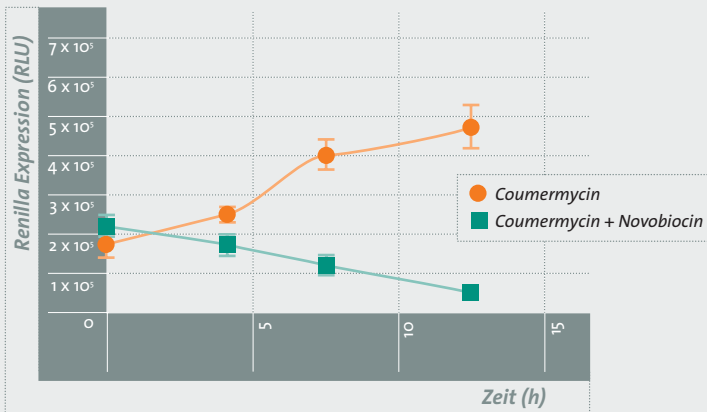


Abb. 3: CHO Zellen, die eine regulierte *Renilla* Luciferase stabil exprimieren, wurden in 96-Well Platten ausplattiert. Im nächsten Schritt wurden EnduRen™ Live Cell Substrate und 5 nM Coumermycin zu den Zellen pipettiert und *Renilla* Luciferase Aktivität nach 14 h ermittelt. Dieser Wert entspricht dem Zeitpunkt t=0. Danach wurde 10 µM Novobiocin zu einem Teil der Wells gegeben und *Renilla* Luciferase Aktivität gemessen. Jeder abgebildete Datenpunkt entspricht dem Durchschnitt von 12 Messpunkten.

Features und Benefits

- Regulierbar Die Expression kann an- und ausgeschaltet werden
- Viel Protein Hohe Expression des Zielproteins durch positive Autoregulation

1.3 EXPRESSION FUNKTIONELLER PROTEINE

TnT® *In Vitro* Transkriptions- /Translationssysteme

Untersucht man die Funktion und die Struktur von Proteinen, ist es wichtig, die Proteine nativ zu exprimieren. Der klassische Versuchsansatz hierbei ist die Expression von Proteinen in lebenden Zellen, wie z.B. in *E.coli* oder in Säugerzellkulturen.

Promega bietet mit den TnT® Systemen eine einfache und schnelle Methode, direkt funktionelle Proteine zu exprimieren – ohne den Umweg über eine Expression in Zellkultur. Ribosomen, t-RNAs, Aminosäuren, Nukleotide und Polymerasen sind im Lysat vorhanden und jede Art von kodierender Nukleinsäure als Ausgangsmaterial ist einsetzbar: RNA, Plasmid-DNA oder PCR Produkt. Allerdings ist der passende Promotor wichtig. Das TnT *In Vitro* Expressionssystem besteht aus einem zellfreien Extrakt, der alle Komponenten für die Proteintranskription und -translation enthält.

SCHEMA DER TnT® – GEKOPPELTEN TRANSKRIPTION UND TRANSLATION

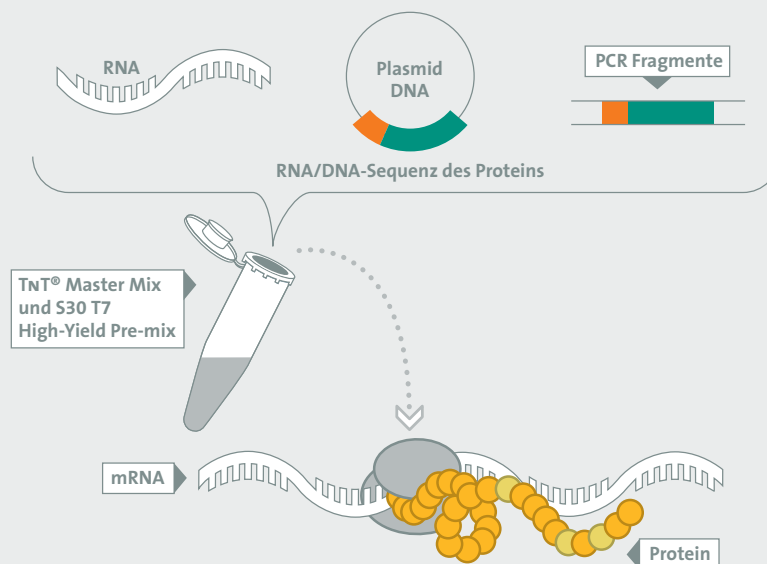


Abb. 4

Eine Proteinexpression ist mit den TnT® Systemen sehr leicht durchzuführen. Sie sind als gekoppelte Transkriptions- und Translationsreaktionen erhältlich und beruhen auf gängigen Organismen, wie z.B. Säuger, Pflanzen oder Insekten.

Das TnT® Quick System vereinfacht diesen Prozess noch weiter, indem die RNA Polymerase, Nukleotide, Salze und RNase Inhibitor mit dem Lysat als Mastermix vorliegen.

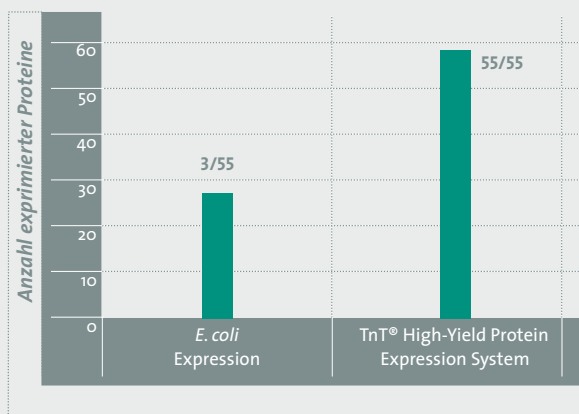
Diese zellfreien Expressionssysteme bieten dem Wissenschaftler das notwendige Werkzeug, Proteine nativ zu exprimieren und ihre Wechselwirkungen mit anderen Molekülen zu analysieren.

## Anwendungen

Analyse von Protein-Protein Interaktionen (näheres s. Kapitel 3.2)

Analyse von Protein-DNA Interaktionen (näheres s. Kapitel 3.3)

## VERGLEICH DER EXPRESSION VON 55 HUMANEN PROTEINEN



**Abb. 5:** Zur Untersuchung von Proteineigenschaften ist es häufig notwendig, das vollständige Protein zu exprimieren. Das TnT® High-Yield Protein Expression System basiert auf einem eukaryotischen System und bietet optimale Voraussetzungen für die Expression von Vollängen-Proteinen. Eine Auflistung der 55 Proteine ist im Anhang dargestellt.

### Features und Benefits

Schnell	Expression funktioneller Proteine innerhalb von 90 Minuten
Flexibel	Proteine können für verschiedene Applikationen verwendet werden
Funktionelle Proteine	Posttranskriptionelle Modifikationen werden eingefügt
Einfach	Zusätzliche Aufreinigung ist nicht notwendig

## IN VITRO EXPRESSIONSSYSTEME IM VERGLEICH:

Promega zellfreie Expressionssysteme	Template				Proteinmenge	Ausgangsmaterial	Vektorempfehlungen
	RNA	DNA	RBS notwendig	Kozak notwendig			
S30 T7 High Yield Protein Expression System	ja	ja	ja	–	bis zu 500 µg/ml	Plasmid-DNA mit T7 Promotor	Plasmid-DNA mit T7 Promotor
TnT® T7 Insect Cell Extract Protein Expression System	ja	ja	–	ja	bis zu 75 µg/ml	pF25A/K ICE T7 Flexi® Vector	pF25A/K ICE T7 Flexi® Vector
TnT® SP6 High Yield Protein Expression System	ja	ja	–	ja	bis zu 100 µg/ml	Plasmid-DNA mit SP6 Promotor	pF3 WG (BYDV) Flexi® Vectors
TnT® Coupled Transcription/ Translation System	ja	ja	–	ja	bis zu 6 µg/ml	Plasmid-DNA mit T7 oder SP6 Promotor, PCR-Produkte mit T7 oder SP6 Promotor	pTNT vector, pcmv TNT vector

## Referenzen

- [1] Muik, M. et al., (2008) Dynamic coupling of the putative coiled-coil domain of ORA1 with STIM1 mediates ORA1 channel activation. *J. Biol. Chem.* 283, 8014–8022.
- [2] Rolfs, A., et al. (2008) Production and sequence validation of a complete full length ORF collection for the pathogenic bacterium *Vibrio cholerae*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 105, 4364-4369.
- [3] Besemer, J. et al. (2007) Selective inhibition of cotranslational translocation of vascular cell adhesion molecule 1. *Nature* 436, 290–293.
- [4] Poleskaya, A. et al., (2007) Lin-28 binds IGF-2 mRNA and participates in skeletal myogenesis by increasing translation efficiency. *Genes Dev.* 21, 1125–1138.
- [5] Guasparri, J. et al. (2006) The KSHV oncoprotein vFLIP contains a TRAF-interacting motif and requires TRAF2 and TRAF3 for signalling. *EMBO Rep.* 7, 114–9.
- [6] Dunoyer P. et al. (2004) Probing the microRNA and small interfering RNA pathways with virus-encoded suppressors of RNA silencing. *Plant Cell.* 16(5), 1235-1250.

Weitere Referenzen finden Sie unter [www.promega.com/citations](http://www.promega.com/citations)

## 2 PROTEIN-AUFREINIGUNG

### 2.1 HALOLINK™ RESIN

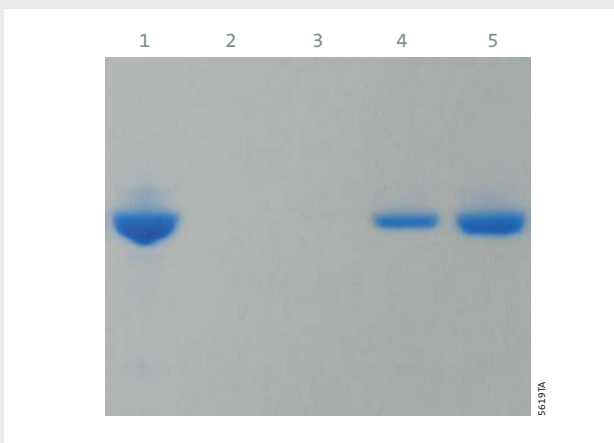
Die Oberflächen-basierte Proteomics befasst sich mit Methoden, Proteine an festen Oberflächen in bekannter Richtung zu immobilisieren, ohne die Proteinstruktur bzw. die Funktion zu zerstören. Desweiteren muss diese Immobilisierung eine hohe Bindekapazität und eine minimale unspezifische Adsorption aufweisen. HaloLink™ Resin ermöglicht die spezifische, kovalente und gerichtete Immobilisierung von Proteinen auf Oberflächen. Es besteht aus einem HaloTag® Liganden, der an Sepharose® Beads gebunden ist und spezifisch und schnell HaloTag® Fusionsproteine bindet. HaloTag® Fusionsproteine besitzen eine ProTEV Erkennungssequenz, die es ermöglicht, das zu exprimierende Protein von der HaloTag® Fusion zu trennen.

#### Anwendung

Kovalente Immobilisierung von HaloTag® Fusionsproteinen (näheres s. Kapitel 3)

#### Technische Daten

#### SPEZIFISCHE UND STABILE BINDUNG VON HALOTAG® FUSIONSPROTEINEN AN HALOLINK™ RESIN



**Abb. 6:** Äquivalente Mengen von HaloLink™ Resin und GSH Beads wurden mit 160 mg HaloTag®-GST Fusionsprotein inkubiert. Beide Säulen wurden bei 4°C gelagert und der jeweilige Überstand für die SDS-PAGE Analyse verwendet. Spur 1: 10% Input HaloTag®-GST Fusionsprotein, Spur 2-3: Überstand HaloLink™ Resin nach 10 Minuten und 24 h Inkubation, Spur 4-5: Überstand GSH Beads nach 10 Minuten und 24 h Inkubation.

#### Features und Benefits

Geringer Background

Gerichtete Immobilisierung

Hohe Bindungskapazität

Stringentes Waschen wegen kovalenter Bindung möglich

Maximale Enzymaktivität der gebundenen Proteine

1ml Resin bindet >7mg HaloTag® Fusionsprotein

#### Referenz

Hata, T. and Nakayama, M. (2007) Rapid single-tube method for small-scale affinity purification of polyclonal antibodies using HaloTagtrade Technology. J. Biochem. Biophys. Methods 70 , 679-682 .

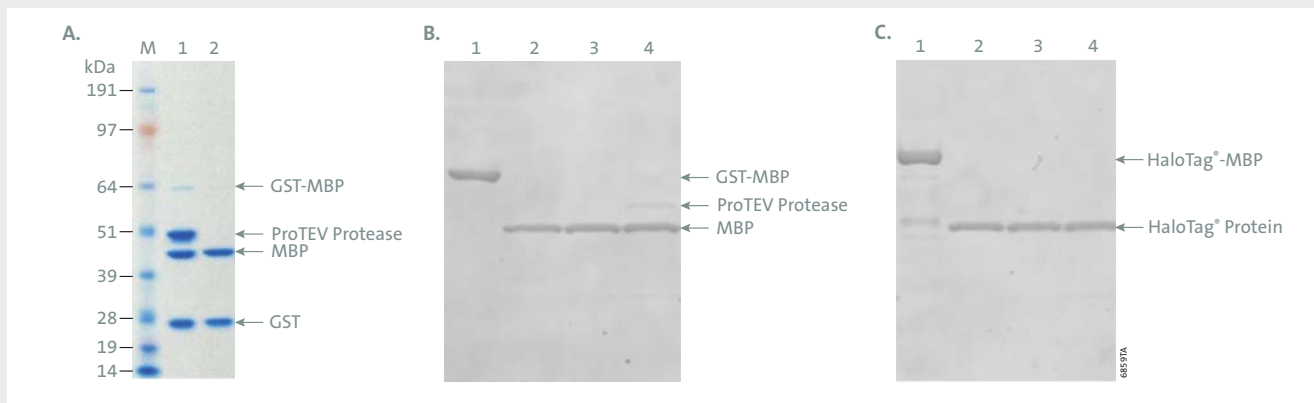
## 2.2 PROTEOLYTISCHE SPALTUNG VON FUSIONSPROTEINEN

### ProTEV Protease

Die ProTEV Protease spaltet Affinitätstags von Fusionsproteinen mit ProTEV Erkennungsmotiven während oder nach der Aufreinigung.

### Technische Daten

#### PROTEV PROTEASE AFFINITÄTSTAG ALS HELFER BEI DER PROTEINAUFREINIGUNG



**Abb. 7:** (A) GST-MBP Fusionsproteine wurden mit 10 U ProTEV Protease für 45 Minuten bei 30°C inkubiert. Anschließend wurde die Protease mit MagneHis™ Ni-Partikel entfernt. Spur M: Proteinmarker, Spur 1-2: Verdau vor und nach Entfernung der Protease. (B) GST-MBP Fusionsproteine wurden an das MicroSpin® GST Purification Module gebunden. Die Säule wurde anschließend mit unterschiedlichen Mengen ProTEV Protease rotierend übernacht bei 4°C inkubiert. Spur 1: GST-MBP Fusionsprotein, Spur 2-4: GST-MBP inkubiert mit 5, 10, 20 U ProTEV Protease. (C) HaloTag®-MBP Fusionsproteine wurden an Halolink™ Magnetic Beads gebunden und gewaschen. Die Beads wurden wie in (B) mit den entsprechenden Mengen ProTEV Protease behandelt und der Verdau mittels Gelelektrophorese detektiert.

#### Features und Benefits

Hohe Spezifität	Fusionsproteine mit einer TEV Erkennungsstelle werden zuverlässig gespalten
Flexibel	Das Protein kann in Lösung vorliegen oder an eine Affinitätsfläche gebunden sein
Robust	Funktionalität von ProTEV im pH Bereich von 5,5-8,5 und bei 4°C bis 34°C nachgewiesen

### 3 ANALYSE VON PROTEINFUNKTIONEN

Eines der spannendsten Arbeitsfelder in der Biowissenschaft beschäftigt sich mit der Frage nach der Funktion von Proteinen in einer lebenden Zelle. Es geht hier beispielsweise um Fragen, wo Proteine lokalisiert sind, wohin Proteine transportiert werden und ob Proteine mit anderen Proteinen interagieren.

## HALOTAG<sup>®</sup> TECHNOLOGIE – EIN PROTEIN-TAG FÜR UNIVERSELLE ANWENDUNGEN

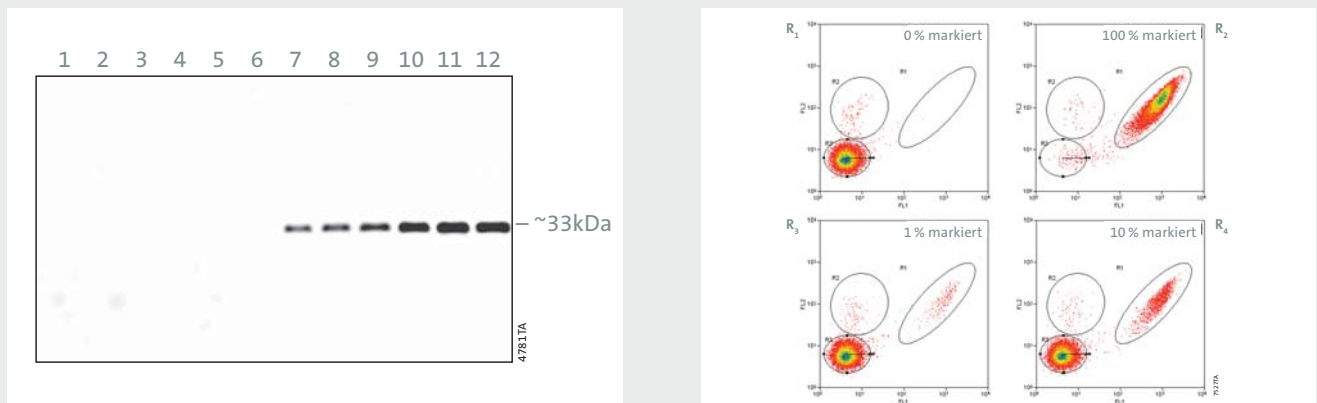
Basis der HaloTag<sup>®</sup> Technologie ist das HaloTag<sup>®</sup> Protein, welches bekannte Affinitätstags (His, GST, HA etc.) ersetzt. Das HaloTag<sup>®</sup> Protein bindet Liganden mit unterschiedlichen funktionellen Gruppen und ist damit für viele verschiedene Applikationen zugänglich. Unter physiologischen Bedingungen bindet das HaloTag<sup>®</sup> Protein innerhalb von Sekunden kovalent an den HaloTag<sup>®</sup> Liganden. Die Bindung ist irreversibel sodass der Komplex auch unter stringenten Waschbedingungen stabil bleibt. HaloTag<sup>®</sup> wird nicht endogen in Säugerzellen oder in *E. coli* exprimiert und ist nicht toxisch. Die HaloTag<sup>®</sup> Liganden bestehen aus einem reaktiven Linker und einem funktionellen Teil, der aus Fluoreszenzfarbstoffen, Biotin-Affinitätstag oder einem festen Trägermaterial bestehen kann.

Mit HaloTag<sup>®</sup> getaggte Proteine können nach Bindung an HaloTag<sup>®</sup> Fluoreszenz-Liganden direkt per SDS-PAGE oder im FACS<sup>®</sup> nachgewiesen werden.

### Anwendungen

Imaging, Protein-DNA-Interaktionsanalysen, Protein-Protein-Interaktionsanalysen, Proteinaufreinigung, Enzymaktivitäts-Assays

### Technische Daten



**Abb. 8 links:** Schnelle und spezifische Detektion des HaloTag<sup>®</sup> Proteins in lebenden Zellen. CHO-K1 Zellen wurden ohne (Spur 1-6) und mit dem HaloTag<sup>®</sup> pHT2 Vektor (Spur 7-12) transfiziert. Zellen wurden mit 5mM HaloTag<sup>®</sup> TMR Ligand bei 37°C 0,5 (Spur 1, 7), 1 (Spur 2, 8), 2 (Spur 3, 9), 5 (Spur 4, 10), 15 (Spur 5, 11) oder 30 (Spur 6, 12) Minuten inkubiert. Zellen wurden lysiert und die HaloTag<sup>®</sup> Proteine nach SDS-PAGE Elektrophorese mit einem Fluoreszenz Imaging System detektiert.

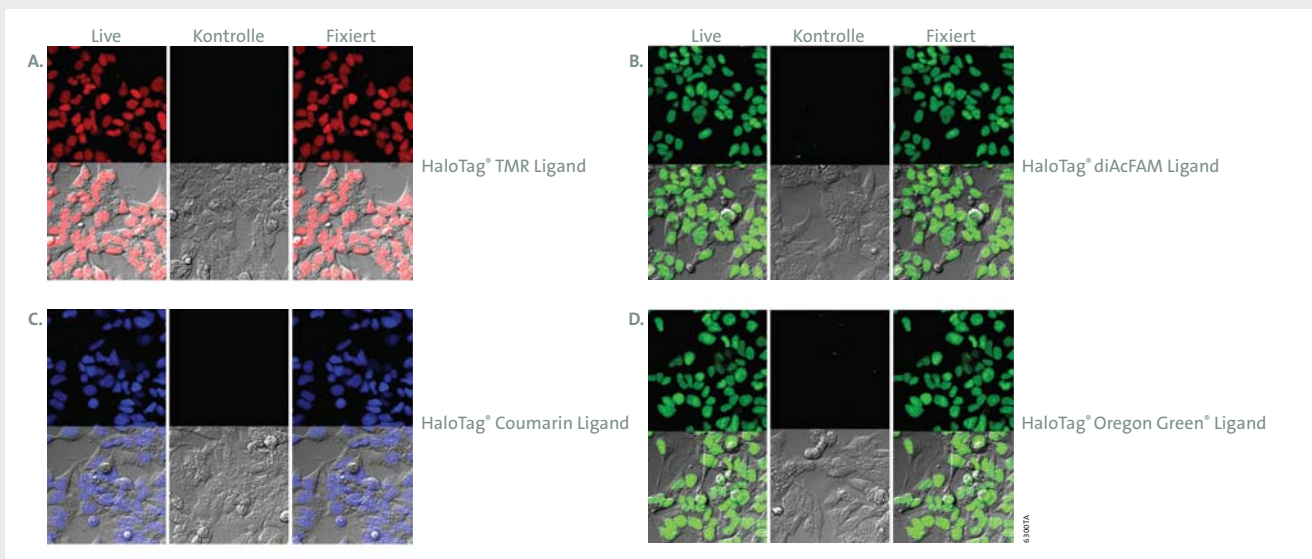
**Abb. 9 rechts:** HaloTag<sup>®</sup> exprimierende Zellen sind mittels FACS<sup>®</sup> Analysen nachweisbar. U2OS Zellen wurden mit einem HaloTag<sup>®</sup> Protein stabil exprimiert, das mit einer nukleären Lokalisationssequenz fusioniert ist. Anschließend wurde die FACS<sup>®</sup> Analyse mit ca. 20000 Zellen durchgeführt und graphisch dargestellt. Zellen wurden zuvor mit dem HaloTag<sup>®</sup> R110 Direct™ Ligand inkubiert und 1, 10 oder 100% der gelabelten wurden von den nicht-gelabelten Zellen sortiert. R1 bzw. R3 repräsentieren Zellen, die mit HaloTag<sup>®</sup> R110Direct™ Ligand gelabelt oder nicht gelabelt sind, R2 enthält tote Zellen, die Propidiumiodid-positiv sind.

## Features und Benefits

Schnelle Analyse	Das HaloTag® Protein kann direkt im SDS Gel detektiert werden
Hohe Signalspezifität	Spezifische Bindung, keine endogene Expression
Robust	Kovalente Bindung ermöglicht stringentes Waschen

### 3.1 IMAGING VON PROTEINEN IN LEBENDEN ZELLEN

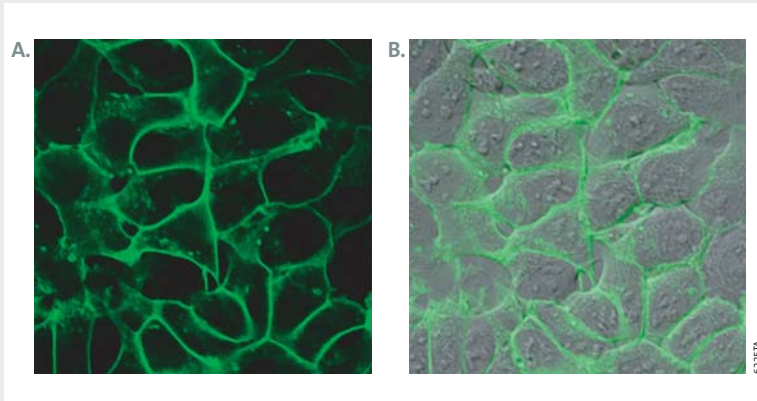
Um Proteine in lebenden Zellen sichtbar zu machen, werden sie gewöhnlich mit einem fluoreszenten Fusionsprotein wie z.B. GFP fusioniert und exprimiert. Bei der Bildung des Chromophors werden bei den Fluoreszenzproteinen vom GFP-Typ reaktive Sauerstoff-Spezies freigesetzt, die für Zellen toxisch sein können. Durch Überexpression verstärkt sich dieser Effekt zusätzlich und kann sich nachteilig auf die Ergebnisse auswirken. Weder HaloTag® Fusionsproteine noch die HaloTag® Fluoreszenzliganden haben Einfluss auf die Zellphysiologie oder sind für die Zellen toxisch. Da HaloTag® selbst keine Eigenfluoreszenz aufweist, ist der Zeitpunkt der Detektion frei wählbar. Im Experiment werden die Fluoreszenz-Liganden direkt ins Kulturmedium gegeben und werden nach einer kurzen Inkubation mikroskopisch analysiert. Darüber hinaus ist die HaloTag® Technologie mit herkömmlicher Immunocytochemie kompatibel.



**Abb. 10:** Färbung von lebenden Zellen mit HaloTag® Liganden und anschließende Fixierung. HEK 293 Zellen wurden mit einem HaloTag® Protein stabil exprimiert, das mit einer nukleären Lokalisationssequenz fusioniert ist. Diese und Kontrollzellen wurden mit (A) HaloTag® TMR Ligand, (B) HaloTag® diAcFAM Ligand, (C) HaloTag® Coumarin Ligand oder (D) HaloTag® Oregon Green® Ligand inkubiert. Nach Waschen wurden die Bilder mit einem Konfokalmikroskop oder einem Epifluoreszenzmikroskop mit den entsprechenden Filtersets aufgenommen. Abgebildet ist die Fluoreszenz (jeweils obere Reihe) oder DIC mit Fluoreszenz überlagert (jeweils untere Reihe). Man erkennt, dass die Färbung der stabil transfizierten Zellen lediglich auf den Zellkern beschränkt ist, während die Zellkerne der Kontrollzellen ungefärbt bleiben. Die anschließende Fixierung hat keine signifikanten Einflüsse auf die Fluoreszenzsignale der Proben.

## Analyse von Oberflächenproteinen

Der HaloTag® Alexa Fluor® 488 Ligand ist nicht zellpermeabel und somit für die Detektion von Zelloberflächenproteinen konzipiert. In Kombination mit einem zellgängigen andersfarbigen Liganden eignet er sich für die Real-time Untersuchung des Proteintransportes vom Zellinneren an die Zelloberfläche und umgekehrt.



**Abb. 11:** Live Cell Imaging eines Zellmembranproteins. HEK 293 Zellen wurden mit einem HaloTag®- $\beta$ 1-Integrin Fusionsplasmid stabil transfiziert. Diese wurden mit dem HaloTag® Alexa Fluor® 488 Ligand inkubiert und die Lokalisation des Fusionsproteins per Konfokalmikroskopie mit dem entsprechenden Filterset detektiert. (A) Fluoreszenzaufnahme, (B) DIC mit Fluoreszenz überlagert. Die Abbildungen zeigen deutlich, dass das Fusionsprotein ausschließlich auf der Zellmembran lokalisiert ist.

### Features und Benefits

Flexibel	Ein Protein-Tag – verschiedene Applikationen durch die Verwendung unterschiedlicher Liganden
Einfach	Liganden müssen lediglich ins Medium gegeben werden
Variabel	Zeitpunkt der Zugabe der Liganden und Farbe frei wählbar

## Imaging von intrazellulären Proteinen

Für die unterschiedlichen Fragestellungen sind sieben HaloTag® Fluoreszenzliganden erhältlich:

Anwendung	Bezeichnung	Eigenschaften	Anregung
Proteinlokalisierung und -transport	HaloTag® TMR Ligand	zell-permeabel	555nm <sub>Ex</sub> /585nm <sub>Em</sub>
	HaloTag® Oregon Green Ligand	zell-permeabel	496nm <sub>Ex</sub> /516nm <sub>Em</sub>
	HaloTag® diAcFAM Ligand	zell-permeabel	494nm <sub>Ex</sub> /526nm <sub>Em</sub>
	HaloTag® Coumarin Ligand	zell-permeabel	353nm <sub>Ex</sub> /434nm <sub>Em</sub>
	HaloTag® Alexa Fluor® 488 Ligand	zell-impermeabel	494nm <sub>Ex</sub> /517nm <sub>Em</sub>
Proteinlokalisierung und -transport, High-Content Imaging	HaloTag® TMRDirect™ Ligand	zell-permeabel schnelles Protokoll ohne zusätzliche Waschschrte	555nm <sub>Ex</sub> /585nm <sub>Em</sub>
	HaloTag® R110Direct™ Ligand	zell-permeabel schnelles Protokoll ohne zusätzliche Waschschrte	502nm <sub>Ex</sub> /527nm <sub>Em</sub>

## 3.2 PROTEIN-PROTEIN-INTERAKTIONEN

Pull-down Assays werden häufig verwendet, um die Wechselwirkung zwischen einem bekannten Protein (Bait Protein) und einem Interaktionspartner (Prey Protein) zu untersuchen. Dabei wird das Bait-Protein meist als Fusionsprotein mit einem Tag exprimiert.

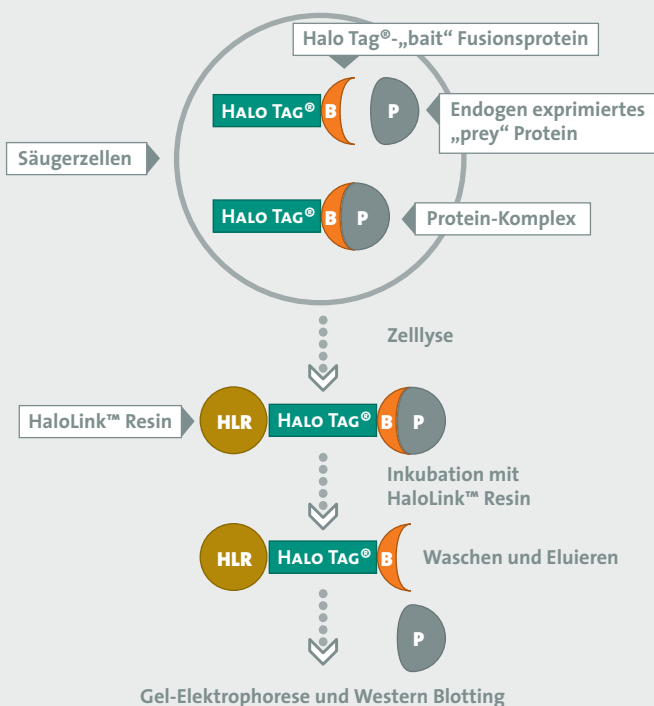
### GST Pull-down Assays

Das Bait-Protein wird über den Proteintag an einem festen Trägermaterial immobilisiert (z.B. GST an Glutathion-Partikel) und anschließend mit dem Prey Protein inkubiert. Nach mehreren Waschschritten kann der gesamte Komplex eluiert und die Interaktionspartner per SDS-PAGE analysiert werden.

### HaloTag®-basierte Pull-down Assays in Säugerzellen

In vielen Fällen eines Pull-down Assays stören unspezifische Bindungen die Identifizierung des Prey Proteins. Die kovalente Bindung von HaloTag® Fusionsproteinen an HaloLink™ Resin ermöglicht ein stringentes Waschen der Bait/Prey-Komplexe. Dadurch werden unspezifisch bindende Proteine besser entfernt. In diesem Fall werden Zellen mit einem zu untersuchenden HaloTag® Fusionsprotein (Bait) transfiziert, das mit potentiellen endogenen Proteinen interagiert. Zellen werden lysiert und die Komplexe mit HaloLink™ Resin immobilisiert. Nach Waschen werden die Prey Proteine per SDS-PAGE identifiziert.

### Technische Daten



**Abb. 12:** Schematische Darstellung des HaloTag® Pull-Down Assays in Säugerzellen. Zunächst wird die kodierende Sequenz des ‚bait‘ Proteins in einen HaloTag® Expressionsvektor kloniert und anschließend in eine geeignete Säugerzelllinie transfiziert. Das HaloTag®-‚bait‘ Fusionsprotein interagiert daraufhin mit dem endogenen ‚prey‘ Protein. Nach der Zelllyse wird der gesamte Komplex mit HaloLink™ Resin immobilisiert und gewaschen, um unspezifisch bindende Proteine zu entfernen. Zuletzt wird das ‚prey‘ Protein eluiert und mittels SDS-PAGE Gelelektrophorese/Western Blotting oder massenspektroskopisch identifiziert.

#### Features and Benefits

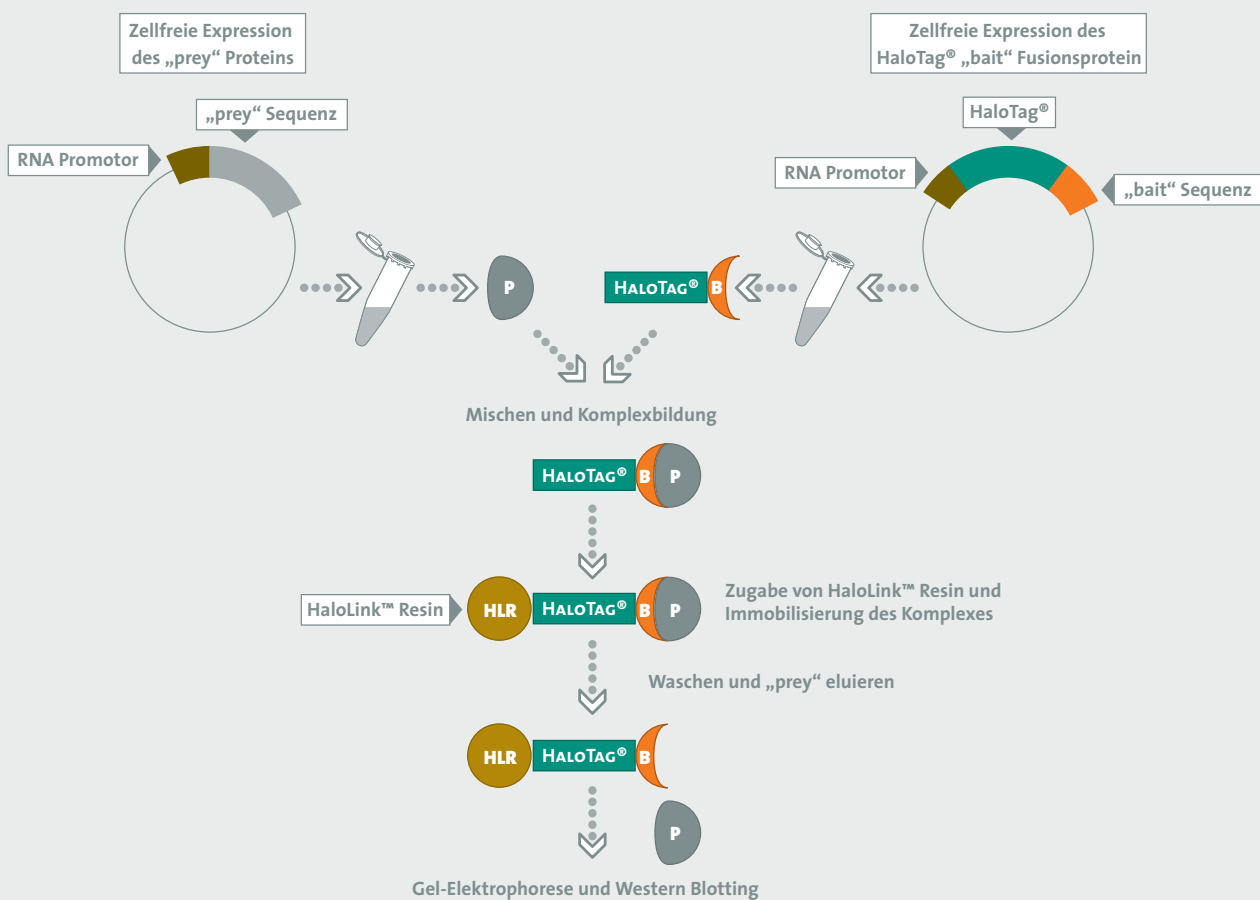
Expression in Säugerzellen  
Weniger Hintergrund

HaloTag® Proteine sind nicht endogen vorhanden, weniger Hintergrund  
Kovalente Bindung ermöglicht stringentes Waschen

## IN VITRO PULL-DOWN ASSAYS

Störend bei der zellfreien Expression von GST oder His getaggten Bait Proteinen kann der hohe Hintergrund sein. Durch Verwendung des HaloTag® Proteintags kann dies einfach umgangen werden. Der Nachweis des Prey Proteins wird durch [35S] markierte oder mit Fluoreszenzfarbstoffen gelabelte Aminosäuren erbracht, so dass ein Tag nicht mehr notwendig ist. Im Laufe des Experiments werden durch Mischen von Bait und Prey Proteinen die Proteinkomplexe gebildet und mit Hilfe von HaloLink™ Resin immobilisiert. Nach Waschen wird das Prey Protein aus dem Komplex eluiert, elektrophoretisch aufgetrennt und detektiert.

### Technische Daten



**Abb. 13:** Schematische Darstellung eines HaloTag® Pull-Down Assays mittels zellfreier Expression. Zunächst werden die kodierenden Sequenzen der „bait“ und der „prey“ Proteine in zwei unterschiedliche Vektoren kloniert. Die „bait“ kodierende Sequenz wird in einen HaloTag® Expressionsvektor kloniert, während die „prey“ kodierende Sequenz in einen beliebigen Vektor mit den entsprechenden Expressionselementen kloniert werden kann. Die Proteine werden exprimiert und ein Aliquot von jeder Reaktion für die Bildung des Proteinkomplexes miteinander gemischt. Danach wird der gesamte Komplex mit HaloLink™ Resin (HLR) immobilisiert und gewaschen, um unspezifisch bindende Proteine zu entfernen. Zuletzt wird das „prey“ Protein eluiert und mittels SDS-PAGE Gelelektrophorese/Western Blotting analysiert. Alternativ kann das „prey“ Protein mit [35S] gelabelt und direkt im Gel nachgewiesen werden.

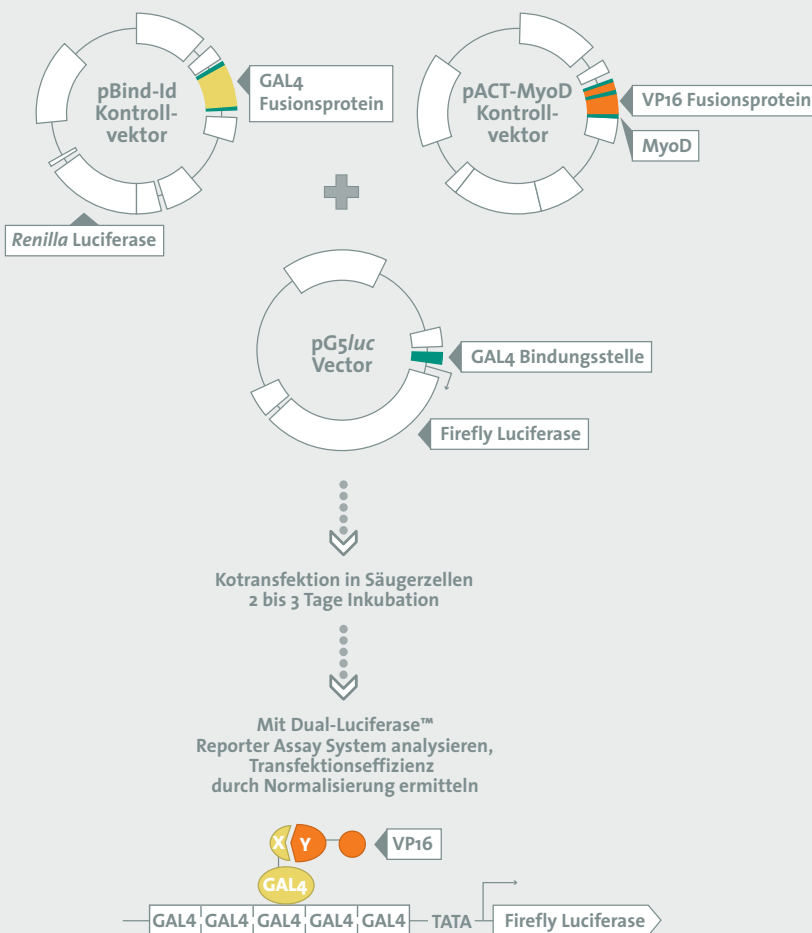
### Features und Benefits

Schnelle Ergebnisse      Expression innerhalb von 90 min

## CHECKMATE™ MAMMALIAN TWO-HYBRID SYSTEM

Die grundlegenden Elemente eines Two-Hybrid Systems sind eine spezifische DNA-bindende Domäne und eine Aktivierungsdomäne, die mit dem Transkriptionsapparat interagiert. Die Wechselwirkung einer Aktivierungsdomäne mit einer DNA-bindenden Domäne führt zur Bildung des RNA Polymerase II Komplexes und zu einer erhöhten Transkription. Im CheckMate™ Mammalian Two-Hybrid System stammt die DNA-bindende Domäne (GAL4) aus der Hefe und die Aktivierungsdomäne (VP16) aus dem Herpes simplex Virus. Diese befinden sich auf zwei separaten Vektoren, die jeweils mit einem CMV Promotor ausgestattet sind. Ein dritter Vektor enthält GAL4 Bindungsstellen sowie das Reporterogen Luciferase. Proteinkodierende Sequenzen, die in die erstgenannten beiden Vektoren kloniert sind und nach Expression in Zellen miteinander wechselwirken, binden somit an den Vektor mit dem Reporterogen, was zu einer Expression der Luciferase führt.

### Technische Daten



**Abb. 14:** Das CheckMate™ Mammalian Two-Hybrid System für die Analyse von Protein-Protein-Interaktionen.

Für die Reaktion wurden die Vektoren pBIND-Id, pACT-MyoD und pG5luc in Säugerzellen transfiziert. Der pG5luc Vektor enthält fünf GAL4 Bindungsstellen upstream einer TATA Box, die wiederum upstream einer Firefly Luciferase lokalisiert ist. Der pBIND-Id Vektor enthält zur Normalisierung die kodierende Sequenz für eine *Renilla* Luciferase. Drei Tage nach der Transfektion wurden die Zellen lysiert und Firefly und *Renilla* Luciferase Aktivität mit dem Dual-Luciferase™ Reporter Assay System gemessen. Eine erhöhte Firefly Luciferase Aktivität ist ein Indikator für die Interaktion der beiden Proteine Id und MyoD.

### Features and Benefits

Flexibel	Zelllinie für die Analyse frei wählbar
Expression in Säugerzellen	Funktionelle Proteine mit nativer Konformation, posttranslationale Modifikationen möglich
Sicher	Reproduzierbare Daten durch interne <i>Renilla</i> Luciferase Kontrolle
Schnell	Ergebnisse 2 Tage nach Transfektion, gegenüber 3-4 Tagen in Hefen

### Referenzen

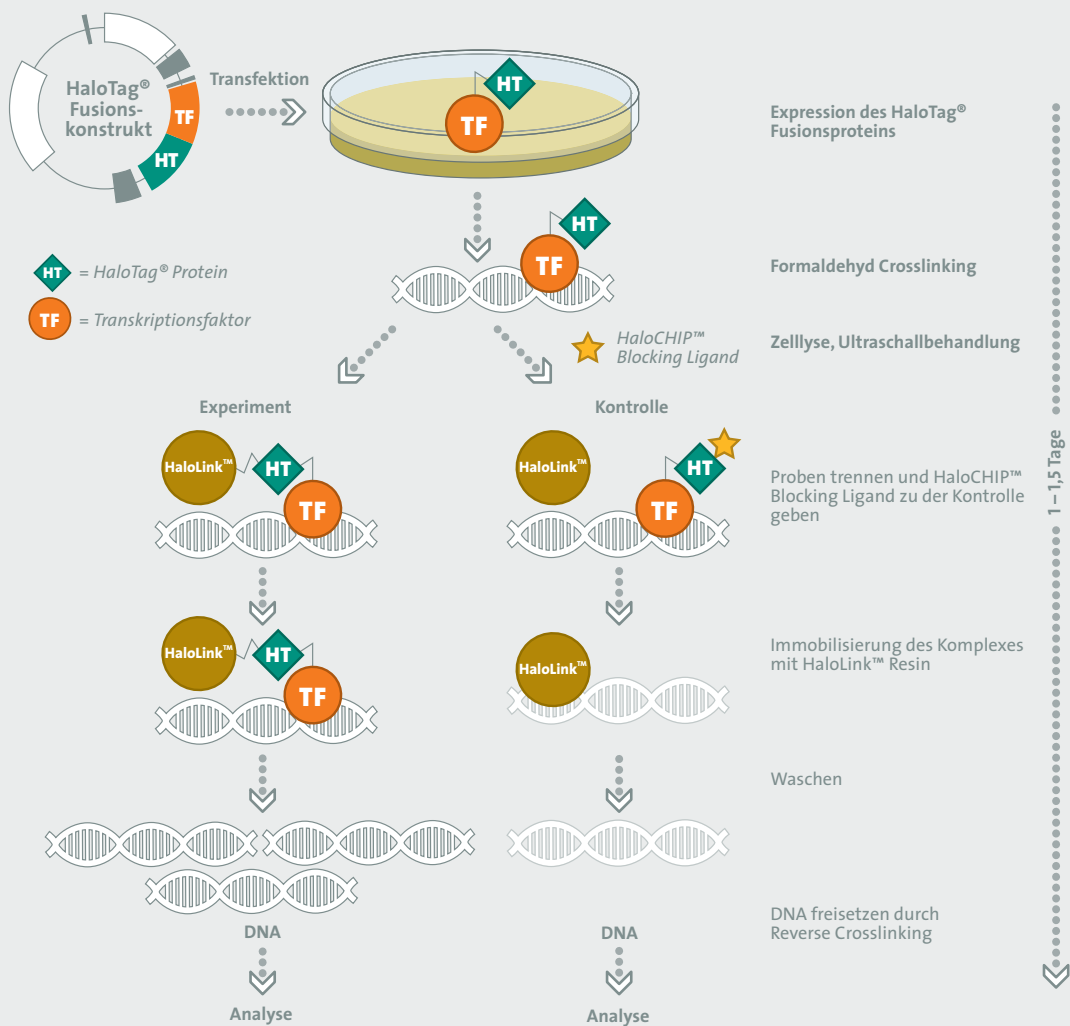
- [1] Sadowski, I. et al. (1988) Nature 335, 563–4.
- [2] Fearon, E.R. et al. (1992) Proc. Natl. Acad. Sci. 89, 7958–62.
- [3] Cheng, G. et al. (2006) J. Biol. Chem, 281, 17718–26.

### 3.3 PROTEIN-DNA-INTERAKTIONEN

Die Regulation von Chromatinstrukturen im Zusammenspiel mit einer regulierten Genexpression ist eine wichtige Voraussetzung für die Gewebeerwicklung und das Zellwachstum. Transkriptionale Ereignisse werden räumlich und zeitlich exakt durch spezifische Protein-DNA-Interaktionen gesteuert. Die Identifizierung der verantwortlichen Proteinbindungsstellen im Chromatin wird mit Hilfe von Chromatinimmunopräzipitation (ChIP) durchgeführt.

## HALOCHIP™ SYSTEM

### SCHEMATISCHER ABLAUF EINES HALOCHIP™ EXPERIMENTS



**Abb. 15:** Das neue HaloCHIP™ System ist eine robuste und effiziente Alternative zu den Standardmethoden zur Chromatinimmunopräzipitation. Es zeichnet sich dadurch aus, dass die Präzipitation von Protein-DNA Komplexen durch eine kovalente Bindung erfolgt und somit ganz ohne Antikörper auskommt. Die zu untersuchenden DNA-bindenden Proteine werden als HaloTag® Fusionsproteine in Zellen exprimiert. Nach Crosslinking mit der DNA werden die Komplexe mit HaloLink™ Resin präzipitiert, das eine spezifische und kovalente Bindung mit HaloTag® einght. Die kovalente Bindung an HaloLink™ Resin ermöglicht ein intensives und stringentes Waschen, so dass unspezifisch bindende DNA und Proteine im Vergleich zur Co-Immunopräzipitationen wesentlich besser entfernt werden. Das Crosslinking wird rückgängig gemacht und die aufgereinigten DNA Fragmente per PCR oder Microarray analysiert.

### Features und Benefits

Schnell	DNA Proben schon nach 1,5 Tagen bereit für weitere Analysen
Einfach	Protein-DNA Komplexe direkt ohne Antikörper präzipitieren

## 4 PROTEINCHARAKTERISIERUNG

Die Proteincharakterisierung stellt einen wichtigen Arbeitsbereich in der Proteomics Forschung dar. Durch die immer besser werdenden Instrumente und die immer leistungsfähigere Datenverarbeitung hat die Massenspektroskopie (MS) Einzug in Anwendungen wie Protein-Protein-Interaktionen, Proteom Profiling, Identifizierung von Biomarker und Analysen von posttranslationalen Proteinmodifikationen gehalten.

### REAGENZEN FÜR DIE MASSENSPEKTROSKOPISCHE PROBENVORBEREITUNG

Eines der größten Probleme bei der Probenvorbereitung ist nach wie vor der unvollständige Proteinverdau. Dies macht es schwierig, aussagekräftige MS Daten zu erzeugen. Additive wie Harnstoff, Guanidin oder SDS, die vor dem Trypsinverdau zugegeben werden, sollen hier den Proteinverdau unterstützen. Sie ermöglichen einen besseren Zugang der Protease zu ihren Erkennungssequenzen, haben aber einen negativen Einfluss auf die MS Analyse.

#### 4.1 PROTEASEMAX™

Der ProteaseMAX™ Surfactant, Trypsin Enhancer ist ein neues Reagenz, das den Trypsinverdau insbesondere bei Membranproteinen verbessert und die Peptidausbeute bei Gelextraktionen erhöht. ProteaseMAX™ ist so konzipiert, dass es über den Verlauf eines Trypsinverdaus degradiert und daher die MS Analyse nicht stört.

#### Anwendungen

Probenvorbereitung für die Massenspektroskopie

### Features und Benefits

Schnell	Verkürzt den Trypsinverdau auf 3 h, verbesserte Peptidausbeute
Zuverlässig	Bessere Sequenzabdeckung und höhere MASCOT scores
Anwenderfreundlich	Keine nachträgliche Inaktivierung notwendig, beeinflusst nicht die MS Analyse

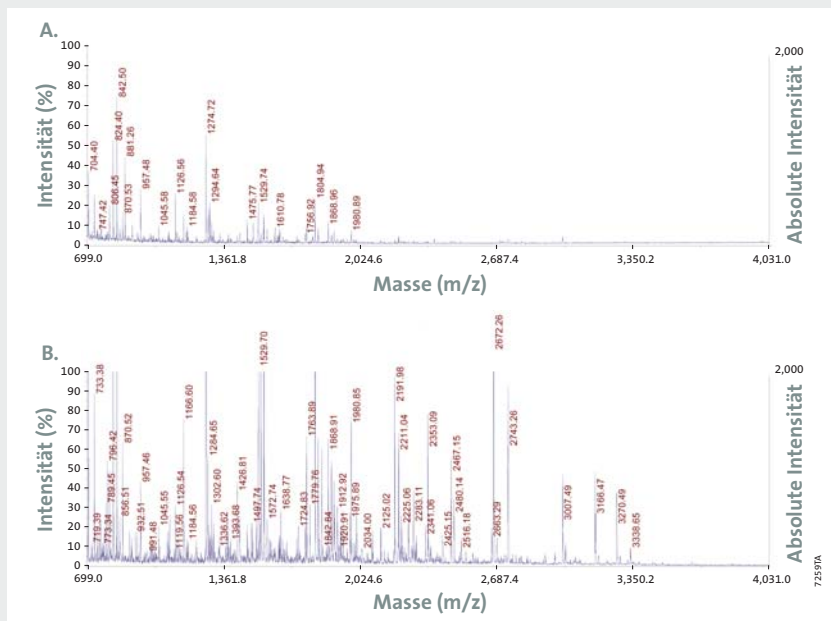
## 4.2 TRYPsin GOLD

Die Qualität der Proteasen ist ein weiterer Baustein für eine erfolgreiche Probenvorbereitung. Trypsin von geringer Qualität unterliegt häufig einer Autoproteolyse, die zur Bildung von Pseudotrypsin mit Chymotrypsin-ähnlicher Aktivität führt. Eine solche Aktivität in einem Probenansatz würde zusätzliche Peptidfragmente generieren, die mit der späteren Datenbankanalyse interferieren können. Zusammen mit ProteaseMAX™ bilden die Trypsinpräparationen ein unschlagbares Team bei der Proteinprobenvorbereitung für die MS Analyse.

### Features und Benefits

Anwenderfreundlich	Kompatibel mit ProteaseMAX™ Surfactant, Trypsin Enhancer
Stabil	Resistent gegenüber milden denaturierenden Bedingungen
Zuverlässig	Reduktive Methylierung verhindert den autolytischen Verdau
Sicher	Behandlung mit TPCK inaktiviert Chymotrypsin

### Technische Daten



### MASSENSPEKTRUM EINES ZYTOPLASMISCHEN MAUSPROTEIN-EXTRAKTS

Abb. 16: Ein zytoplasmatischer Proteinextrakt aus dem Herzen einer Maus wurde auf einem 4-20 % SDS-PAGE Gel elektrophoretisch aufgetrennt. Anschließend wurde die Proteinbande mit der Masse von 47 kDa aus dem Gel ausgeschnitten, tryptisch verdaut und massenspektroskopisch untersucht. (A) Standardverdauprotokoll ohne ProteaseMAX™ übernacht bei 37°C und (B) mit ProteaseMAX™ über 3 h bei 37°C.

## 5 VEKTOREN FÜR PROTEIN-EXPRESSION UND -AUFREINIGUNG

Der erste Schritt im Proteomics Workflow beinhaltet im Allgemeinen die Expression und Reinigung der Proteine. Für diese Zwecke wurden in der Vergangenheit verschiedene Proteintags entwickelt. Die heutzutage am häufigsten verwendeten Proteintags sind GST, MBP and His tag, welche alle zu den Affinitätstags zu zählen sind. Unlängst wurde eine Serie von Expressionsvektoren eingeführt, die das neue Proteintag HaloTag® beinhalten. Das HaloTag® Protein ist ein genetisch verändertes Derivat einer Hydrolase das sehr effektiv kovalente Bindungen mit HaloTag® Liganden eingeht. Diese kovalente Bindung erfolgt schnell, ist hoch spezifisch, irreversibel und bildet selbst unter denaturierenden Bedingungen einen stabilen Komplex, der den HaloTag® Tag zu einer echten Alternative für Proteinexpression und -aufreinigung macht. Durch die Bindung von HaloTag® Liganden an eine feste Phase, die wiederum HaloTag® Proteine bindet, wird eine effektive Reinigung ermöglicht. Das 33 kDa monomere HaloTag® Protein kann dazu dienen, N- or C-terminale Fusionsproteine in Säugerzellen, *E. coli* oder zellfreien Expressionssystemen herzustellen. Abhängig vom gewünschten Expressionssystem sind dazu verschiedene HaloTag® Vektoren erhältlich:

mögliche Anwendungen	Vektor	Expression	Promotor	Selektionsmarker	Katalog Nr.	
Protein-DNA Interaktionsanalyse mit HaloCHIP™ System, Imaging mit HaloTag® fluoreszenten Liganden	pFC14A (HaloTag® 7) CMV Flexi® Vector	Expression von <b>carboxy</b> -terminalen HaloTag® Fusionsproteinen in Säugerzellen und zell-freien Translations-systemen	CMV, T7	Ampicillin	G9651	
	pFC14K (HaloTag® 7) CMV Flexi® Vector			Kanamycin	G9661	
	pFN21A (HaloTag® 7) CMV Flexi® Vector	Expression von <b>amino</b> -terminalen HaloTag® Fusionsproteinen in Säugerzellen und zell-freien Translations-systemen		Ampicillin	G2821	
	pFN21K (HaloTag® 7) CMV Flexi® Vector			Kanamycin	G2831	
Strukturcharakterisierung, Antikörper Produktion, Funktionale assays, Protein: Protein Wechselwirkungsstudien	pFN18A (HaloTag® 7) T7 Flexi® Vector	Expression von <b>amino</b> -terminalen HaloTag® Fusionsproteinen in <i>E. coli</i>	T7	Ampicillin	G2751	
	pFN18K (HaloTag® 7) T7 Flexi® Vector			Kanamycin	G2681	
	pFN19A (HaloTag® 7) T7 SP6 Flexi® Vector	Expression von <b>amino</b> -terminalen HaloTag® Fusionsproteinen in zell-freien Translations-systemen	T7, SP6	Kanamycin	G1841	
	pFN19K (HaloTag® 7) T7 SP6 Flexi® Vector			Ampicillin	G1681	
	pFC20A (HaloTag® 7) T7 SP6 Flexi® Vector			Expression von <b>carboxy</b> -terminalen HaloTag® Fusionsproteinen in zell-freien Translations-systemen	Kanamycin	G1691
	pFC20K (HaloTag® 7) T7 SP6 Flexi® Vector					

Ausführliche Vektorkarten finden Sie auf unserer Webseite unter

[http://www.promega.com/catalog/catalogproducts.aspx?categoryname=productleaf\\_2180](http://www.promega.com/catalog/catalogproducts.aspx?categoryname=productleaf_2180).

Ein Primer Design Tool finden Sie unter <http://www.promega.com/techserv/tools/flexivector/>.

## 6 PRODUKTLISTE

Produkt	Katalog Nr.	Menge
<b>Protein-Expression</b>		
Single Step (KRX) Competent Cells	L3001	5 x 200µl
	L3002	20 x 50µl
L-Rhamnose Monohydrate	L5701	10g
	L5702	50g
Regulated Mammalian Expression System	C9470	1 system
pReg neo Vector	C9421	20µg
pF12A RM Flexi® Vector	C9431	20µg
pF12K RM Flexi® Vector	C9441	20µg
Coumermycin A1	C9451	5mg
Novobiocin Sodium Salt	C9461	1g
TNT® SP6 Coupled Reticulocyte Lysate System	L4600	40 reactions
TNT® SP6 Coupled Reticulocyte Lysate System, Trial Size	L4601	8 reactions
TNT® T7 Coupled Reticulocyte Lysate System	L4610	40 reactions
TNT® T7 Coupled Reticulocyte Lysate System, Trial Size	L4611	8 reactions
TNT® T3 Coupled Reticulocyte Lysate System	L4950	40 reactions
TNT® T7/T3 Coupled Reticulocyte Lysate System	L5010	40 reactions
TNT® T7/SP6 Coupled Reticulocyte Lysate System	L5020	40 reactions
TNT® T3 Coupled Wheat Germ Extract System	L4120	40 reactions
TNT® SP6 Coupled Wheat Germ Extract System	L4130	40 reactions
TNT® T7 Coupled Wheat Germ Extract System	L4140	40 reactions
TNT® T7/SP6 Coupled Wheat Germ Extract System	L5030	40 reactions
TNT® T7/T3 Coupled Wheat Germ Extract System	L5040	40 reactions
TNT® SP6 High-Yield Wheat Germ Protein Expression System	L3260	4 x 300µl
	L3261	1 x 300µl
TNT® T7 Insect Cell Extract Protein Expression System	L1101	10 reactions
	L1102	40 reactions
pF25A ICE T7 Flexi® Vector	L1061	20µg
pF25K ICE T7 Flexi® Vector	L1081	20µg
S30 T7 High-Yield Protein Expression System	L1110	24 reactions
	L1115	8 reactions
<b>Protein-Aufreinigung</b>		
ProTEV Protease	V6051	1,000u
	V6052	10,000u
HaloLink™ Resin	G1911	2ml
	G1912	5ml
<b>Analyse von Proteinfunktionen</b>		
pFC14A (HaloTag® 7) CMV Flexi® Vector	G9651	20µg
pFC14K (HaloTag® 7) CMV Flexi® Vector	G9661	20µg
pFC15A (HaloTag® 7) CMVd1 Flexi® Vector	G1611	20µg
pFC15K (HaloTag® 7) CMVd1 Flexi® Vector	G1601	20µg
pFC16A (HaloTag® 7) CMVd2 Flexi® Vector	G1591	20µg
pFC16K (HaloTag® 7) CMVd2 Flexi® Vector	G1571	20µg
pFC17A (HaloTag® 7) CMVd3 Flexi® Vector	G1551	20µg
pFC17K (HaloTag® 7) CMVd3 Flexi® Vector	G1321	20µg
pFN21A (HaloTag® 7) CMV Flexi® Vector	G2821	20µg
pFN21K (HaloTag® 7) CMV Flexi® Vector	G2831	20µg
pFN22A (HaloTag® 7) CMVd1 Flexi® Vector	G2841	20µg
pFN22K (HaloTag® 7) CMVd1 Flexi® Vector	G2851	20µg
pFN23A (HaloTag® 7) CMVd2 Flexi® Vector	G2861	20µg
pFN23K (HaloTag® 7) CMVd2 Flexi® Vector	G2871	20µg
pFN24A (HaloTag® 7) CMVd3 Flexi® Vector	G2881	20µg
pFN24K (HaloTag® 7) CMVd3 Flexi® Vector	G2981	20µg
HaloTag® 7 Flexi® Vectors-CMV Deletion Series Sample Pack	G3780	9 x 2µg
pFN18A (HaloTag® 7) T7 Flexi® Vector	G2751	20µg
pFN18K (HaloTag® 7) T7 Flexi® Vector	G2681	20µg
pFN19A (HaloTag® 7) T7 SP6 Flexi® Vector	G1891	20µg

Produkt	Katalog Nr.	Menge
<b>Analyse von Proteinfunktionen</b>		
pFN19K (HaloTag® 7) T7 SP6 Flexi® Vector	G1841	20µg
pFC20A (HaloTag® 7) T7 SP6 Flexi® Vector	G1681	20µg
pFC20K (HaloTag® 7) T7 SP6 Flexi® Vector	G1691	20µg
HaloTag® pHT2 Vector	G8241	20µg
HaloTag® Cloning Starter System	G6050	1 each
HaloTag® TMR Ligand	G8251	30µl
	G8252	15µl
HaloTag® diAcFAM Ligand	G8272	30µl
	G8273	15µl
HaloTag® Coumarin Ligand	G8581	30µl
	G8582	15µl
HaloTag® Biotin Ligand	G8281	30µl
	G8282	15µl
HaloTag® PEG-Biotin Ligand	G8591	30µl
	G8592	15µl
HaloTag® Alexa Fluor® 488 Ligand	G1001	30µl
	G1002	15µl
HaloTag® Oregon Green® Ligand	G2801	30µl
	G2802	15µl
HaloTag® TMRDirect™ Ligand	G2991	30µl
HaloTag® R110Direct™ Ligand	G3221	30µl
HaloLink™ Magnetic Beads	G9311	40 reactions
Anti-HaloTag® pAb	G9281	200µg
HaloTag® Amine (O4) Ligand	P6741	5mg
HaloTag® Succinimidyl Ester (O4) Ligand	P6751	5mg
HaloTag® Thiol (O4) Ligand	P6761	5mg
HaloTag® Iodoacetamide (O4) Ligand	P6771	5mg
HaloTag® Succinimidyl Ester (O2) Ligand	P1691	5mg
HaloTag® Amine (O2) Ligand	P6711	5mg
HaloTag® Iodoacetamide (O2) Ligand	P1681	5mg
CheckMate™ Mammalian Two-Hybrid System	E2440	1 system
CheckMate™/Flexi® Vector Mammalian Two-Hybrid System	C9360	1 each
pFN10A (ACT) Flexi® Vector	C9331	20µg
pFN11A (BIND) Flexi® Vector	C9341	20µg
pGL4.31[Luc2P/GAL4UAS/Hygro] Vector	C9351	20µg
CheckMate™ Positive Control Vectors	C9370	1 set
CheckMate™ Negative Control Vectors	C9380	1 set
HaloCHIP™ System	G9410	20 reactions
pFC14A (HaloTag® 7) CMV Flexi® Vector	G9651	20µg
pFC14K (HaloTag® 7) CMV Flexi® Vector	G9661	20µg
pFC15A (HaloTag® 7) CMVd1 Flexi® Vector	G1611	20µg
pFC15K (HaloTag® 7) CMVd1 Flexi® Vector	G1601	20µg
pFC16A (HaloTag® 7) CMVd2 Flexi® Vector	G1591	20µg
pFC16K (HaloTag® 7) CMVd2 Flexi® Vector	G1571	20µg
pFC17A (HaloTag® 7) CMVd3 Flexi® Vector	G1551	20µg
pFC17K (HaloTag® 7) CMVd3 Flexi® Vector	G1321	20µg
pFN21A (HaloTag® 7) CMV Flexi® Vector	G2821	20µg
pFN21K (HaloTag® 7) CMV Flexi® Vector	G2831	20µg
pFN22A (HaloTag® 7) CMVd1 Flexi® Vector	G2841	20µg
pFN22K (HaloTag® 7) CMVd1 Flexi® Vector	G2851	20µg
pFN23A (HaloTag® 7) CMVd2 Flexi® Vector	G2861	20µg
pFN23K (HaloTag® 7) CMVd2 Flexi® Vector	G2871	20µg
pFN24A (HaloTag® 7) CMVd3 Flexi® Vector	G2881	20µg
pFN24K (HaloTag® 7) CMVd3 Flexi® Vector	G2981	20µg
HaloTag® 7 Flexi® Vectors-CMV Deletion Series Sample Pack	G3780	9 x 2µg
<b>Proteincharakterisierung</b>		
Trypsin Gold, Mass Spectrometry Grade	V5280	100µg
Sequencing Grade Modified Trypsin	V5111	100µg
Sequencing Grade Modified Trypsin, Frozen	V5113	100µg
ProteaseMAX™ Surfactant, Trypsin Enhancer	V2071	1mg

# 7 ANHANG

## Vergleich der Expression von 55 humanen Proteinen\*

Sample	Description	ACCN	Mol. Wt.	BL21	S30	WG
1	Androgen receptor (dihydrotestosterone receptor; AR)	NM_000044	99287	N*	I*	S*
2	Estrogen receptor 1 (ESR 1)	NM_000125	66315	N	N	S
3	5-hydroxytryptamine (serotonin) receptor 1A (HTR1A)	NM_000524	46206	N	I	S
4	Glutamate receptor, metabotropic 2 (GRM2)	NM_000839	95667	N	N	S
5	Glutamate receptor, metabotropic 3 (GRM3)	NM_000840	98979	N	I	S
6	Mitogen-activated protein kinase 14 (MAPK14)	NM_001315	41393	N	S	S
7	Heat shock factor binding protein 1 (HSBP1)	NM_001537	8643	N	N	S
8	B-cell translocation gene 1 anti-proliferative (BTG1)	NM_001731	19308	N	I	S
9	fms-related tyrosine kinase (FLT1)	NM_002019	150834	N	N	S
10	Integrin, alpha V, vitronectin receptor (ITGAV)	NM_002210	116151	N	I	S
11	Kinase insert domain receptor (a type III receptor tyrosine kinase; KDR)	NM_002253	151640	N	I	S
12	Protein kinase C, gamma (PRKCG)	NM_002739	78547	N	N	S
13	Mitogen-activated protein kinase 9 (MAPK9)	NM_002752	48238	N	S	S
14	Mitogen-activated protein kinase kinase 6 (MAP2K6)	NM_002758	37592	N	I	S
15	Mitogen-activated protein kinase kinase 4 (MAP2K4)	NM_003010	44387	N	I	S
16	Aurora kinase C (AURKC)	NM_003160	32287	N	I	S
17	Aurora kinase B (AURKB)	NM_004217	39380	N	I	S
18	cAMP responsive element binding protein 1 (CREB1)	NM_004379	35236	N	S	S
19	v-erb-b2 erythroblastic leukemia viral oncogene homolog 2 (ERBB2)	NM_004448	138026	N	N	S
20	MCM2 minichromosome maintenance deficient 2 mitotin (MCM2)	NM_004526	101996	N	I	S
21	MCM5 minichromosome maintenance deficient 5 cell division cycle 46 (MCM5)	NM_006739	82385	N	N	S
22	Calcium binding protein P22 (CHP)	NM_007236	22555	N	N	S
23	Nuclear receptor binding protein (NRBP)	NM_013392	59944	N	I	S
24	Mitogen-activated protein kinase 8 (MAPK8)	NM_139049	48395	N	I	S
25	MCM4 minichromosome maintenance deficient 4 (MCM4)	NM_182746	96657	N	I	S
26	Growth factor, augments of liver regeneration (GFER)	XM_034465	15495	N	S	S
27	Bruton agammaglobulinemia tyrosine kinase (BTK)	NM_000061	76381	N	I	S
28	Glutamate receptor, metabotropic 5 (GRM5)	NM_000842	128973	N	I	S
29	Spleen tyrosine kinase (SYK)	NM_003177	72066	N	I	S
30	tec protein tyrosine kinase (TEC)	NM_003215	34649	N	I	S
31	PTK2B protein tyrosine kinase 2 beta (PTK2B)	NM_004103	115935	N	I	S
32	EPH receptor B3 (EPHB3)	NM_004443	110429	N	I	S
33	Receptor tyrosine kinase-like orphan receptor 1 (ROR1)	NM_005012	104412	N	I	S
34	Colony stimulating factor 1 receptor (CSF1R)	NM_005211	108083	N	I	S
35	Discoidin domain receptor family, member 2 (DDR2)	NM_006182	96836	N	N	S
36	Cytochrome P450, family 3, subfamily A, polypeptide 4 (CYP3A4)	NM_017460	57542	N	S	S
37	Neurotrophic tyrosine kinase (NTRK3)	NM_002530	929015	N	N	S
38	fms-related tyrosine kinase 3 (FLT3)	NM_004119	112904	N	N	S
39	v-kit Hardy-Zuckerman 4 feline sarcoma viral oncogene homolog (KIT)	NM_000222	109964	N	I	S
40	Protein tyrosine phosphatase, receptor-type, Z polypeptide 1 (PTPRZ1)	NM_002851	254630	N	I	S
41	Protein tyrosine phosphatase receptor type T (PTPRT)	AB006621	165434	S	I	S
42	DnaJ (Hsp40) homolog, subfamily c, member 6 (DNAJC6)	AB007942	102887	S	I	S
43	Myotubularin-related protein 3 (MTMR3)	AB002369	154450	N	N	S
44	TAO kinase 1 (TAOK1)	AB037782	116533	N	I	S
45	Histone deacetylase (HD1)	U50079	55202	N	I	S
46	Caspase-6, apoptosis-related cysteine protease	BC000305	33409	N	I	S
47	Cysteine protease Yama (procaspase-3)	U26943	31707	N	S	S
48	Mineralocorticoid receptor (hMR)	M16801	107167	N	S	S
49	Cellular retinol binding protein II (CRBP1)	U13831	15747	S	I	S
50	Glucocorticoid receptor (GRL)	NM_000176	85759	N	S	S
51	Procaspase-7, cysteine protease CHM-1	U40281	34376	N	I	S
52	Melanoma antigen recognized by T cells (MAR1)	BC014423	13256	N	N	S
53	Small muscular protein (SMPX)	BC005948	9658	N	S	S
54	T-cell activation protein (Q9Y605)	BC022797	14749	N	I	S
55	T-cell tumor protein (TCTP)	BC003352	19695	N	S	S

\*Legende siehe Seite 23

Die Proteine 1-40 wurden von Origene (MD, USA) bezogen, die Proteine 41-44 stammten aus dem Kazusa DNA Research Center. Alle Proteine 1-44 wurden mit Flexi® Vektoren exprimiert. Die Protein-kodierenden Sequenzen 44-45 wurden als PCR Fragmente in die Flexi® Vektoren kloniert. Die cDNA stammt aus den IMAGE oder MGC Sammlungen von ATCC (VA, USA). BL21= *E. coli* BL21 (DE3)pLysS Competent Cells. S30= *E. coli* T7 S30 Extract System for Circular DNA. WG= Wheat Germ Extract Plus (TnT® High Yield Protein Expression System). ACCN= Zugangsnummer. N= Protein nicht exprimiert. I= Protein exprimiert, aber nicht löslich. S= Protein exprimiert und löslich. Löslichkeit ist definiert mit > 50 % der exprimierten Proteine verbleiben in Lösung nach Zentrifugation bei 16,000 g, 15 min, 22° C. (s. auch Abb. 5)



**Promega GmbH**  
High-Tech-Park  
Schildkrötstraße 15  
D-68199 Mannheim  
Telefon +49(0)621/8501-0  
Fax +49(0)621/8501-222