

Aufbereitung von Proteinproben in Eppendorf Tubes® 5.0 mL

DÖRTE POBURSKI, ANNETT MÜLLER UND RENÉ THIERBACH,
 FRIEDRICH-SCHILLER-UNIVERSITÄT, INSTITUT FÜR ERNÄHRUNGSWISSENSCHAFTEN, JENA
 RAFAL GRZESKOWIAK, EPPENDORF AG, HAMBURG

Zusammenfassung

Die Analyse von Proteinen aus Zellkulturen erfordert häufig eine Aufbereitung in größeren Volumina. Typische Beispiele sind die Isolierung von Zellfraktionen aus Homogenisaten und die Bestimmung von Enzymaktivitäten sowie die Proteingewinnung aus Kulturen geringer Zelldichte. Die neuen Eppendorf Tubes 5.0 mL stellen das ideale Gefäßformat für diese Anwendungen dar. Neben der Bearbeitung größerer Volumina bieten sie hohe Zentrifugationsbeständigkeit und eine verbesserte Handhabung.

Einleitung

Über die letzten Jahrzehnte haben sich Reaktionsgefäße im Mikroliterbereich als feste Größe im Labor etabliert. Meist werden die Volumenformate 0,5 mL, 1,5 mL und 2,0 mL eingesetzt. Bei der Proteinisolierung und -analyse hingegen sind viele Arbeitsschritte in größeren Volumina erforderlich: Isolierung von Zellfraktionen oder Proteinen aus spärlich gewachsenen Zellen, Bestimmung von Enzymaktivitäten oder Immunoblots von isolierten Proteinen.

Die neuen Eppendorf Tubes 5.0 mL sind hierfür optimal geeignet. Sie ermöglichen die Bearbeitung größerer

Volumina, auch bei hohen Zentrifugalkräften, und eine einfache, komfortable Handhabung mit nur einer Hand.

In dieser Application Note wurde der Einsatz der Eppendorf Tubes 5.0 mL bei der Aufbereitung von Proteinproben unter Berücksichtigung folgender Fragestellungen untersucht:

- 1) Lassen sich die Arbeitsschritte einfach an das neue Format anpassen, und stellen Temperaturunterschiede während der Aufbereitung größerer Volumina möglicherweise ein Problem dar?
- 2) Führt der Einsatz verschiedener Gefäßformate zu quantitativen Unterschieden (z. B. durch Probenverlust)?
- 3) Führt der Einsatz eines größeren Gefäßes zu verminderter Proteinqualität oder -aktivität?

Hierzu wurde eine vergleichende Proteinaufbereitung in verschiedenen Gefäßformaten durchgeführt.

Material und Methoden

Vergleichende Aufbereitung von Zellysats für Immunoblot

Humane Zellen (HT29) wurden bis zu einer Konfluenz von ca. 70 % kultiviert, geerntet und in 600 µL Lysepuffer (Cell

Signaling Technology®, Inc.) aufgenommen. Die Zellsuspensionen wurden vereint, mit Lysepuffer auf 20 mL angeglichen und in Eppendorf Safe-Lock Tubes 1,5 mL und 2,0 mL sowie Eppendorf Tubes 5.0 mL verteilt.

Die Proben wurden in flüssigem Stickstoff* schockgefroren und über Nacht bei -80°C gelagert. Nach dem Auftauen auf Eis wurden die Proben mittels Ultraschall homogenisiert, und der Membrananteil wurde abzentrifugiert (3.200 x g, 4°C, 10 min). Die Überstände wurden in frische Reaktionsgefäße pipettiert. Die Proteinquantifizierung erfolgte nach der BCA-Methode (Absorptionsmessung bei 562 nm in einem photometrischen Mikroplattenleser). Darüber hinaus wurden die Proben mit Laemmli-Puffer versetzt und mittels SDS-PAGE und Immunoblot analysiert.

Bestimmung der Aconitase-Aktivität

Murine Embryo-Fibroblasten wurden bis zu einer Konfluenz von ca. 50 % kultiviert, geerntet und in 600 µL Tris-Puffer (50 mM) aufgenommen. Die Proben wurden in 5,0-mL- oder 1,5-mL-Eppendorf-Gefäße überführt, resuspendiert und in flüssigem Stickstoff* schockgefroren.

Nach Lagerung bei -80 °C wurden die Proben auf Eis aufgetaut und sonifiziert; der Zellrückstand wurde durch Zentrifugation abgetrennt. Der Überstand wurde mit Hilfe der Bradford-Methode auf 1,1 µg/µL Gesamtprotein eingestellt und Aliquots (130 µg Gesamtprotein) wurden mit Hilfe von Tris-Puffer auf ein Endvolumen von 150 µL verdünnt. Nach Zusatz von 150 µL Reaktionspuffer (50 mM Tris, 60 mM Natriumcitrat, 1 mM MnCl₂, 0,4 mM NADP⁺) wurde das Entstehen von NADPH in einem photometrischen Mikroplattenleser gemessen (37°C, 340 nm) und die relative Aconitase-Aktivität entsprechend berechnet.

Ergebnisse und Diskussion

Für die Proteinisolierung und -aufbereitung eingesetzte Gefäße müssen hohe Anforderungen erfüllen. So müssen sie neben einer einfachen Handhabung einen breiten Temperaturanwendungsbereich, ausreichende Beständigkeit



Aufbereitung von Proteinproben in Eppendorf Tubes® 5.0 mL

	Eppendorf Safe-Lock Tubes 1,5 mL	Eppendorf Safe-Lock Tubes 2,0 mL	Eppendorf Tubes 5.0 mL
Füllvolumen mit Zellsuspension (ca. 2/3 max. Vol.)	1,0 mL	1,3 mL	3,3 mL
Zeit bis zum Auftauen auf Eis	60 min	70 min	90 min
Nach der Zentrifugation überführtes Volumen	0,9 mL	1,2 mL	3,0 mL
Zusatz von Laemmli-Puffer	0,45 mL	0,6 mL	1,5 mL

Tabelle 1: Vergleich der Probenaufbereitungsschritte zur Immunoblot-Analyse unter Verwendung verschiedener Eppendorf-Gefäßformate: 1,5 mL, 2,0 mL und 5,0 mL

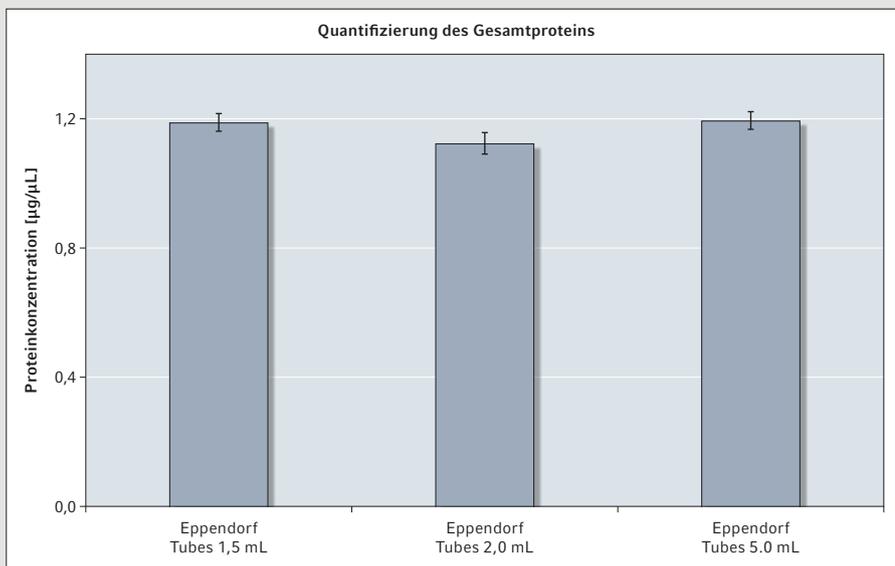


Abb. 1: Quantifizierung des Gesamtproteins mit Hilfe der BCA-Methode aus Zellsuspensionen, welche in den verschiedenen Eppendorf-Gefäßformaten aufbereitet wurden. Die Ergebnisse aus den verschiedenen Formaten zeigten keine signifikanten Unterschiede (t-Test).

gegenüber hohen Zentrifugalkräften und einen dichten Deckelverschluss aufweisen. Im Rahmen dieser Anwendungen haben wir den Einsatz verschiedener Eppendorf-Gefäßformate (1,5 mL, 2,0 mL und 5,0 mL) zur Proteinaufbereitung aus Zelllysaten verglichen.

Tabelle 1 zeigt den Vergleich der wichtigsten Aufbereitungsschritte.

Die 5,0-mL-Gefäße boten bei der durchgeführten Applikation im Vergleich zu kleineren Gefäßformaten mehrere Vorteile: optimierte Homogenisierung durch Ultraschall, minimierter Probenverlust aufgrund von Materialverschüttung oder Adhäsion am Ultraschallstab.

Auch während der nachfolgenden Zentrifugation zeigten die Eppendorf Tubes 5.0 mL ebenfalls klare Vorteile gegenüber den kleineren Gefäßen: Zahlreiche

Rotoren und Zubehör für die Eppendorf Tubes 5.0 mL ermöglichen einen einfachen Einsatz in den meisten Zentrifugen sowie die Anwendung hoher Zentrifugalkräfte zum Erhalt klarer Lysate (bis zu 25.000 x g). Auch bei der Handhabung ließen sich Optimierungen feststellen: Das Abnehmen des Überstandes war weniger kontaminationsgefährdet und konnte schneller durchgeführt werden.

Zusätzlich zu den erwähnten Vorteilen blieb die Qualität der in den Eppendorf Tubes 5.0 mL aufbereiteten Zelllysate unverändert. Wie in Abb. 1 gezeigt, konnten keine signifikanten Unterschiede in der Proteinkonzentration zwischen den verschiedenen Gefäßformaten festgestellt werden. Die Ergebnisse zeigen, dass die Aufbereitung größerer Volumina in dem 5,0-mL-Format keine quantitativen Probenverluste zur Folge hat.

Um zusätzlich zu untersuchen, ob die Verwendung des 5,0-mL-Formates die Proteinqualität beeinträchtigen könnte, wurde ein Vergleich der enzymatischen Aktivität (Aconitase) in den Zelllysaten, welche in 1,5-mL- oder 5,0-mL-Gefäßen aufbereitet worden waren, durchgeführt. Es konnten keinerlei Unterschiede zwischen den Enzympräparationen aus den 1,5-mL- und 5,0-mL-Gefäßen festgestellt werden (Daten nicht gezeigt). Dies zeigt, dass die Aufbereitung von Proben in Eppendorf Tubes 5.0 mL weder die Qualität noch die Aktivität von Proteinen in den untersuchten Zelllysaten negativ beeinflusst.

Schlussfolgerung

Im Vergleich zu kleineren Gefäßformaten ermöglichen die neuen Eppendorf Tubes 5.0 mL bei der Aufbereitung von Proteinproben in größeren Volumina eine deutliche Optimierung wesentlicher Arbeitsschritte. Die neuen Gefäße können problemlos für Volumina zwischen 1,0 mL und 5,0 mL eingesetzt werden. Ihre größere konische Form sorgt für gründliche Homogenisierung, minimierten Probenverlust aufgrund von Materialverschüttung sowie für eine optimale Handhabung: Die Pipettierung des Überstandes konnte schneller und mit weniger Kontaminationen durchgeführt werden.

Die Experimente zeigten, dass sich alle notwendigen Probenaufbereitungsschritte einfach auf die neuen Gefäße übertragen ließen und dass starke Temperaturschwankungen kein Problem bei der Probenverarbeitung darstellten. Weiterhin konnte keinerlei qualitative oder quantitative Minderung der gewonnenen Proteine festgestellt werden.

***Sicherheitswarnung:** Der Temperaturanwendungsbereich der Eppendorf Tubes 5.0 mL liegt zwischen -86°C und +100°C. Arbeiten mit flüssigem Stickstoff erfolgt auf eigene Gefahr. Details sind in der Bedienungsanleitung nachzulesen.

Leserservice

Eppendorf Tubes® 5.0 mL • Kennziffer 264