

Naturwissenschaftliche Fakultät II der
Friedrich-Alexander-Universität
Erlangen-Nürnberg

Untersuchungen an gezielt hergestellten Mutanten der Protease
Thermolysin aus Bacillus thermoproteolyticus rokko

Diplomarbeit
durchgeführt bei der Hoechst AG, Frankfurt am Main
Zentralforschung I (Hauptlabor III)

vorgelegt von
Julia Goetzmann
aus
La Jolla/Calif./USA

Erlangen, im März 1990

INHALTSVERZEICHNIS

ABKÜRZUNGEN UND EINHEITEN

1.	ZUSAMMENFASSUNG	1
2.	EINLEITUNG	2
3.	MATERIAL UND METHODEN	11
3.1.	Material	11
3.1.1.	Chemikalien	11
3.1.2.	Proteine, Enzyme und Aminosäuren	12
3.1.3.	Gebrauchsmaterialien	13
3.1.4.	Geräte	13
3.2.	Puffer und Medien	14
3.2.1.	Puffer und Lösungen	14
3.2.2.	Nährmedien	16
3.2.3.	Enzymlösungen, Antibiotika, Indikatoren und Induktoren	18
3.3.	Bakterienstämme, Plasmide und Phagen	19
3.3.1.	Verwendete Bakterienstämme	19
3.3.2.	Verwendete Plasmide und Phagen	19
3.4.	Methoden	20
3.4.1.	Gebräuchliche Methoden	20
3.4.2.	Bereitung kompetenter Zellen von <u>B. subtilis</u>	21
3.4.3.	Transformation kompetenter <u>B. subtilis</u> Zellen	21
3.4.4.	Präparation von Plasmid-DNA	22
3.4.5.	Isopyknische CsCl-Zentrifugation	23
3.4.6.	Gelelektrophoresen	24
3.4.7.	Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen	27
3.4.8.	Vorbereitung von DNA für die Sequenzierung	28
3.4.9.	Sequenzierung von DNA	29
3.4.10.	Oligonukleotidgerichtete Mutagenese	29
3.4.11.	Hitzeinduktion des Lambda-Promotors	30
3.4.12.	Aufschluß von Bakterienzellen zur Gewinnung von Rohextrakten	30
3.4.13.	Reinigung von Thermolysin	31
3.4.14.	Ammonsulfatfällung von Proteinen	32
	Aktivitätstests für Thermolysin	33

4.	ERGEBNISSE	35
4.1.	Expression des Thermolysingenes in <u>B. subtilis</u>	36
4.1.1.	Konstruktion von geeigneten Vektoren für die Expression von Thermolysin in <u>B. subtilis</u>	36
4.1.2.	Transformation und Expression der neuen Plasmide in <u>B. subtilis</u>	41
4.2.	Expression des Thermolysingenes in <u>E. coli</u>	43
4.2.1.	Konstruktion von pAG 9 und pAG 6	44
4.2.2.	Konstruktion von pAG 15 und pAG 15T	49
4.3.	Herstellung der Mutanten von Thermolysin durch oligonukleotidgerichtete Mutagenese	53
4.4.	Konstruktion der mutierten Thermolysingene	58
4.4.1	Versuch der Umklonierung über <u>SphI/AccI</u> und <u>HpaI/StuI</u>	60
4.4.2.	Versuch der Umklonierung über <u>SphI/StuI</u>	61
4.4.3.	Rückklonierung der mutierten Fragmente über <u>SphI/Eco47III</u>	62
4.5.	Austestung der Proteaseaktivität der Mutanten auf CCA-Platten	65
4.6.	Aufreinigung von Thermolysin und dessen Mutanten	66
4.7.	Überprüfung der Aktivität der Mutanten	72
4.7.1.	Casein-Test	73
4.7.2.	FAGLA-Test	74
5.	DISKUSSION	76
6.	LITERATURVERZEICHNIS	89