

Praktikum Biochemie

„Biotechnologie“

(Molekularbiologie & Biochemie)

Bettina Siebers

Biotechnology

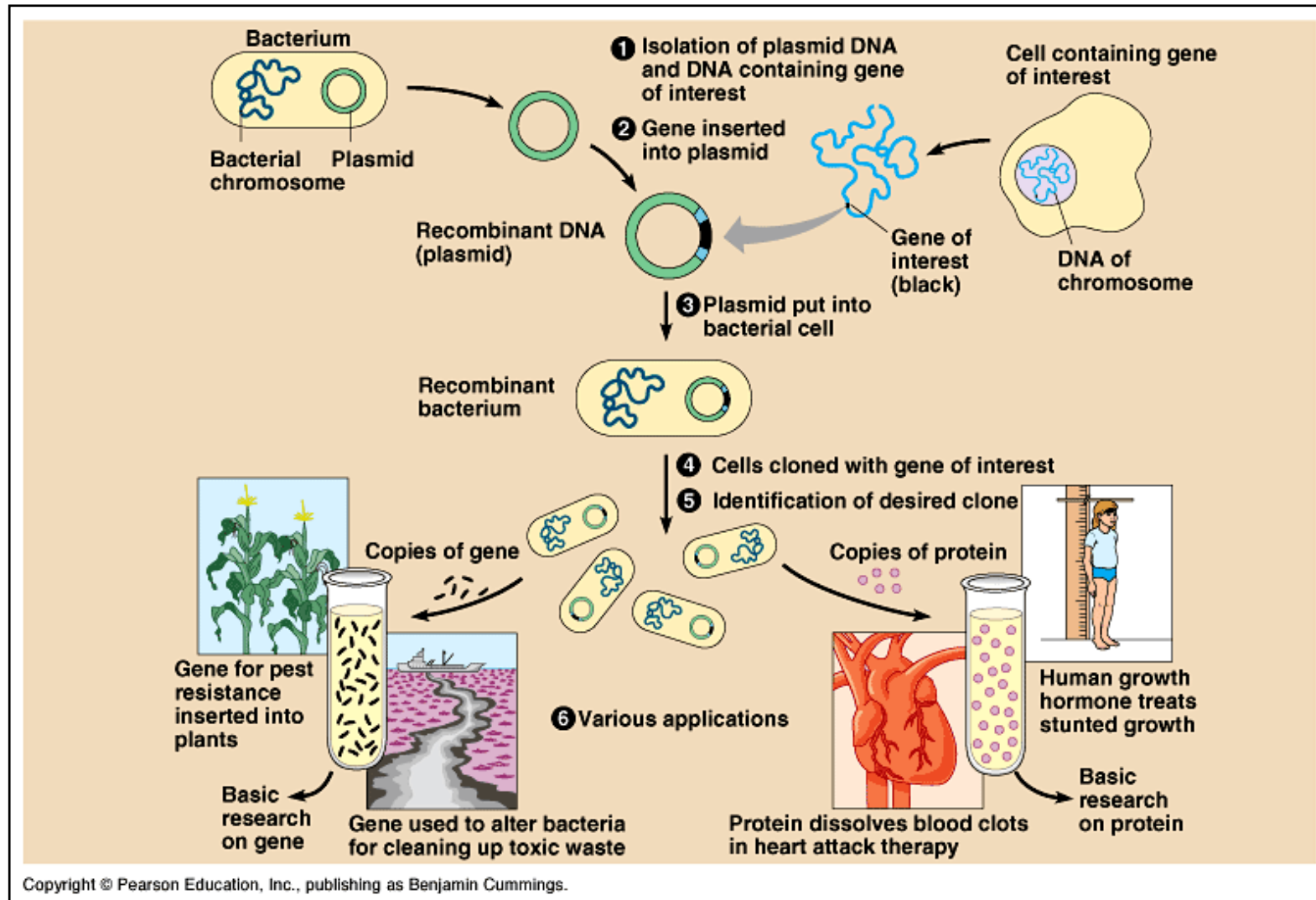
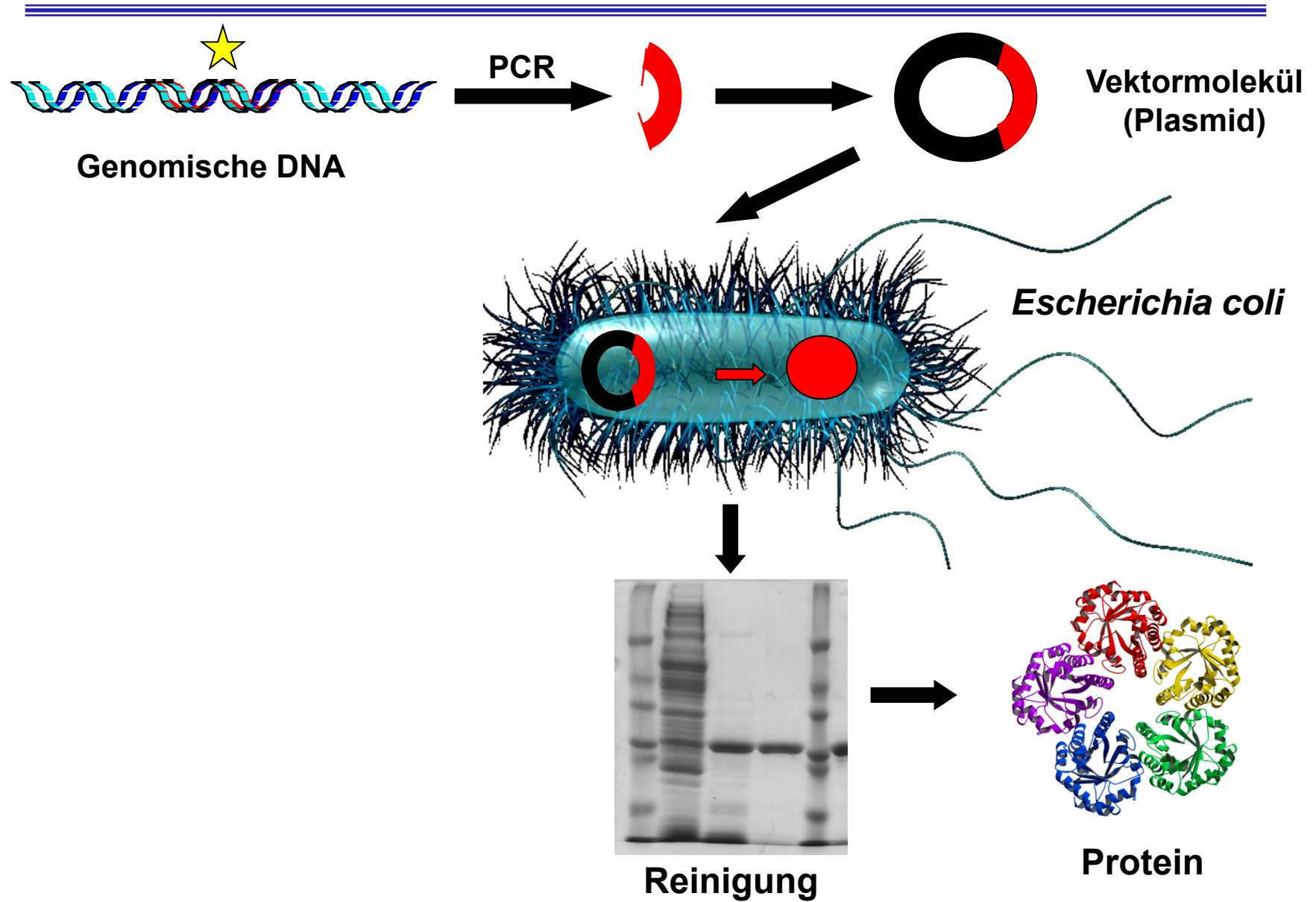


FIGURE 20.1 Biology 6/e

Protein Expression



The flow of genetic information

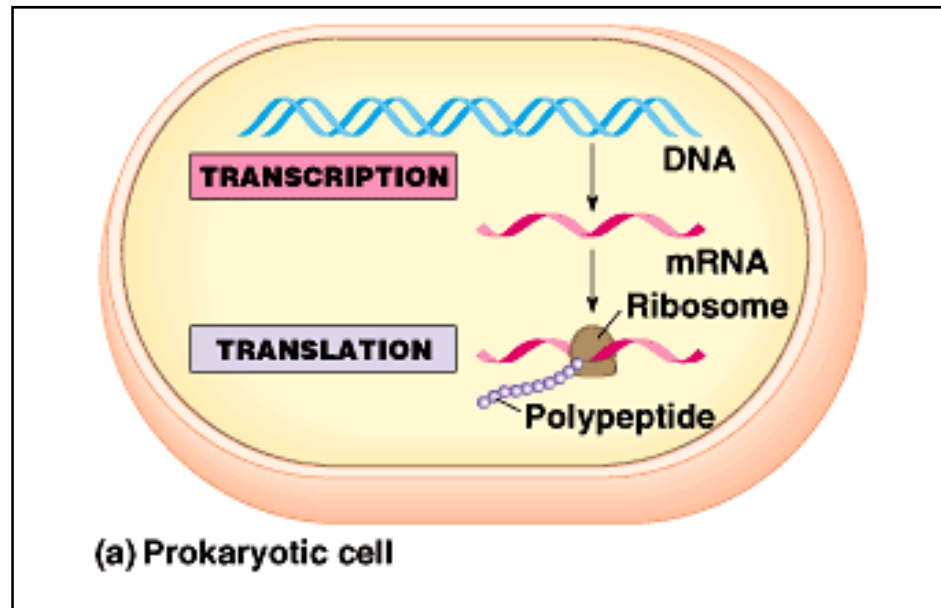
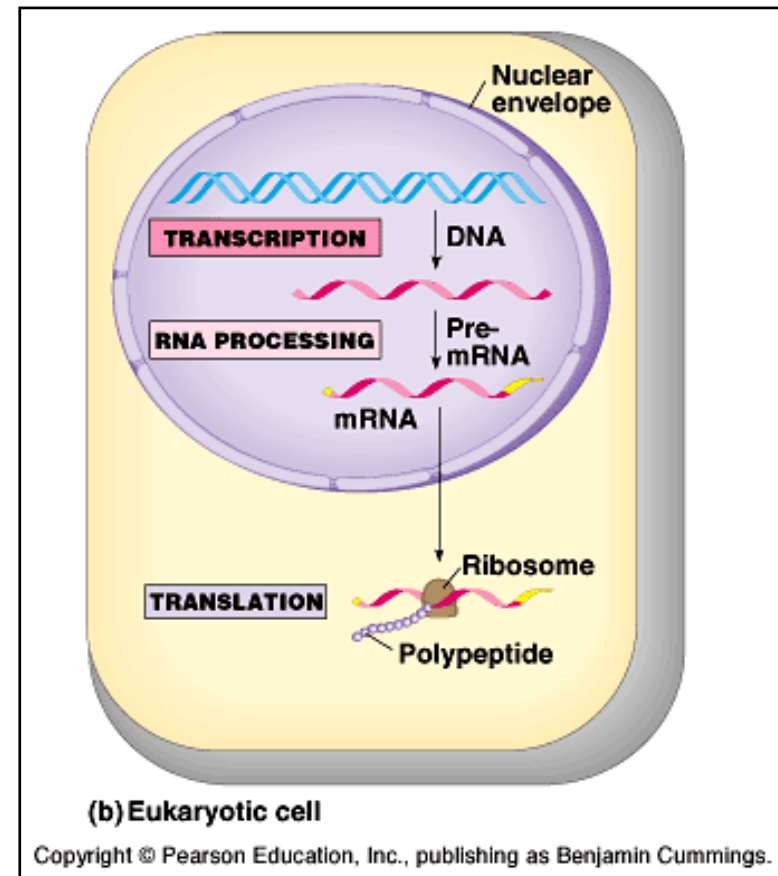
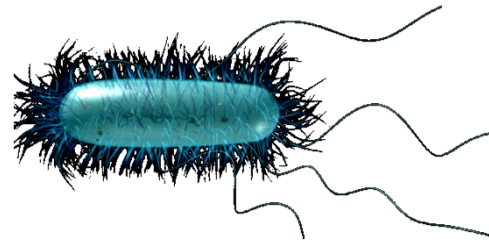


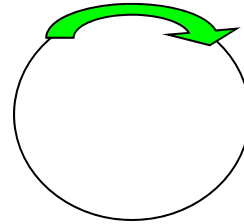
FIGURE 17.2 Biology 6/e



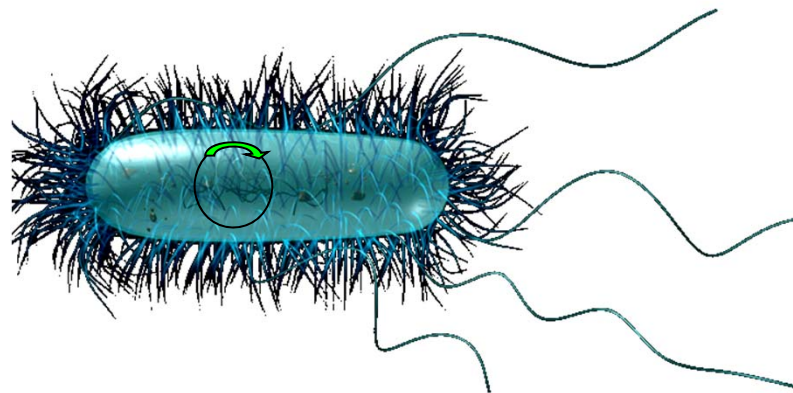
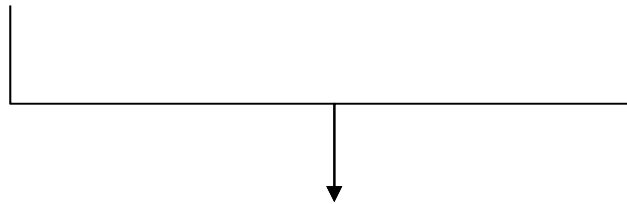
Transformation des Expressionsstammes



E. coli BL21 (DE3)

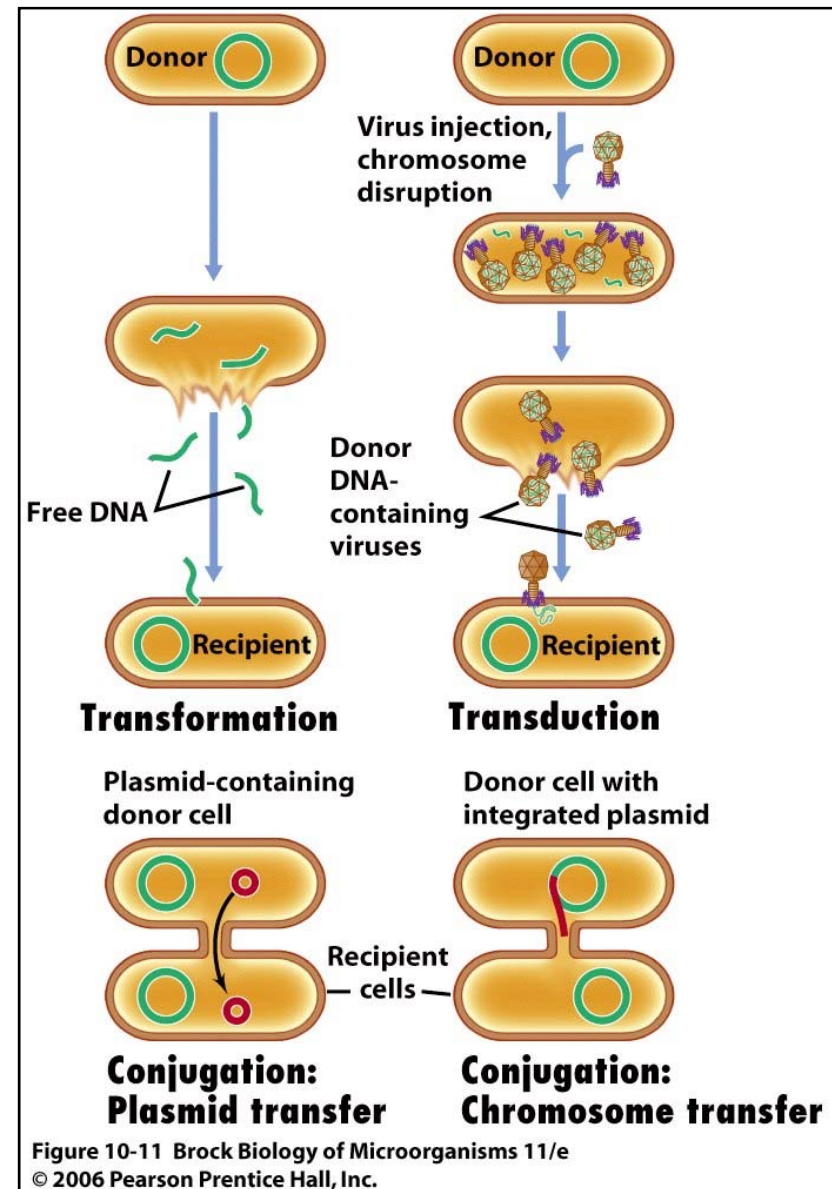


pET19b::*EstCE*



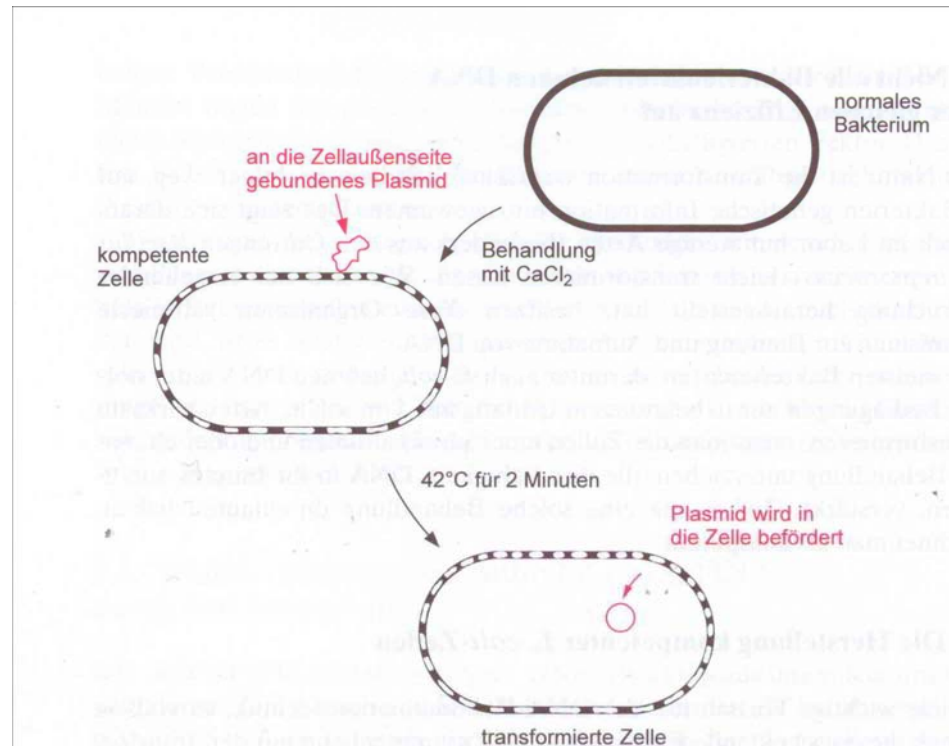
Genetischer Austausch bei Prokaryonten

- **Transformation**, Aufnahme freier DNA (von Donor-Zelle freigesetzt) und Einbau in das Genom einer Empfänger-Zelle → genetische Veränderung
- Fragmente von etwa **10 kbp** (entspricht etwa 10 Genen)
- Zellen, die DNA aufnehmen und transformiert werden = **kompetent**.
- **Nur best. Stämme oder Arten sind transformierbar**



Kompetente Zellen: CaCl₂ Methode

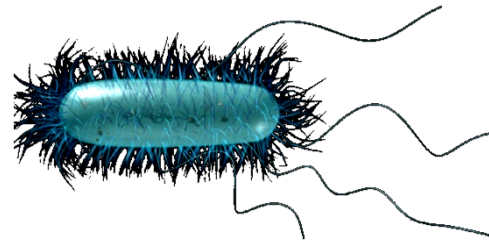
- **Chemische Methode**
- Eisgekühlte Salzlösung (50 mM CaCl₂), Funktionsweise nicht genau bekannt
- CaCl₂ → Anheftung der DNA an der äußeren Zellhülle
- Hitzeschock (42°C) → Aufnahme der DNA
- Physikalische Methode → Elektroporation



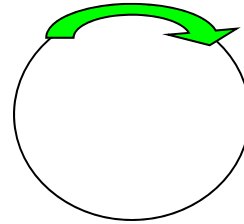
Transformation

- 2 plates of LB agar media containing ampicillin and IPTG.
- Make sure the heat block is set to 42°C
- Thaw cells on ice (100 µl, at least 5 min).
- Add 2µl of plasmid DNA and mix carefully
- Leave on ice for 30 min.
- Heat shock the cells for **EXACTLY 80 s at 42°C**.
- Transfer the cells back to ice for 2 min.
- Add 400 µl LB medium.
- Incubate at 37°C for 45 min
- Warm up the LB-agar plates to 37°C
- Pipette **100 µl** of the cell suspension on **plate 1**. Carefully spread the cellular suspension over the surface of the plates using a **COOLED**, sterilised Drigalski spatula. Centrifuge the residual cell suspension as well as the control (1 ml) at 4,000 rpm at room temperature for 2 min.
- Remove supernatant leaving approx. 100 µl in the tube, resuspend cells and plate as described above on **plate 2**
- The plates are incubated overnight at 37°C.

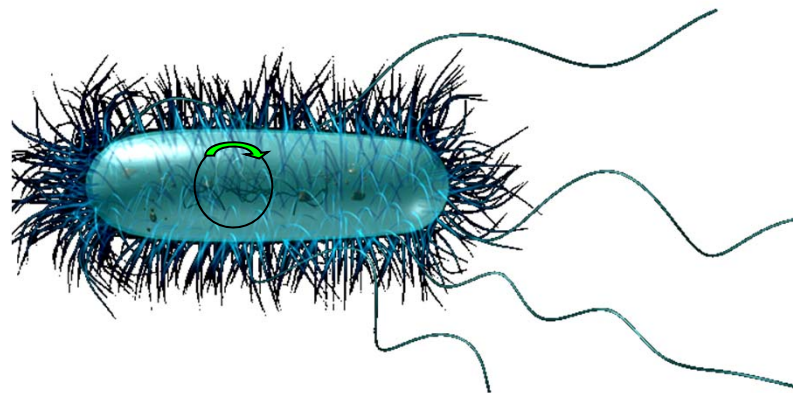
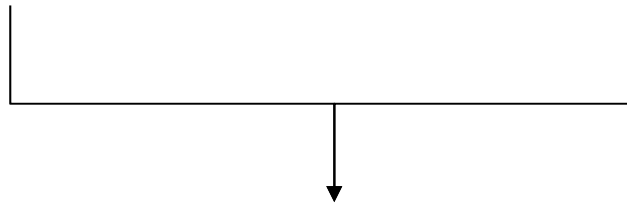
Transformation des Expressionsstammes



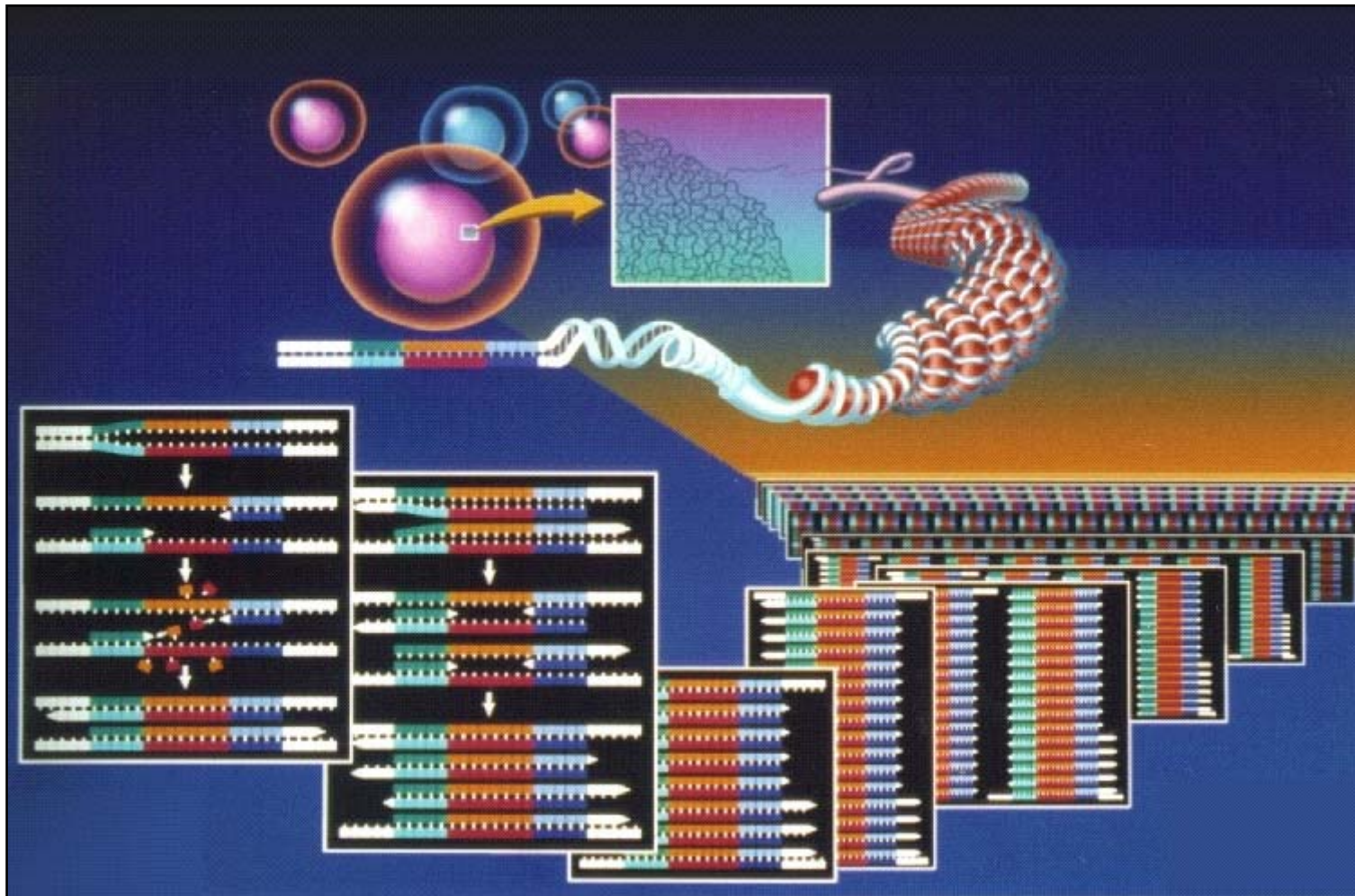
E. coli BL21 (DE3)



pET19b::*EstCE*

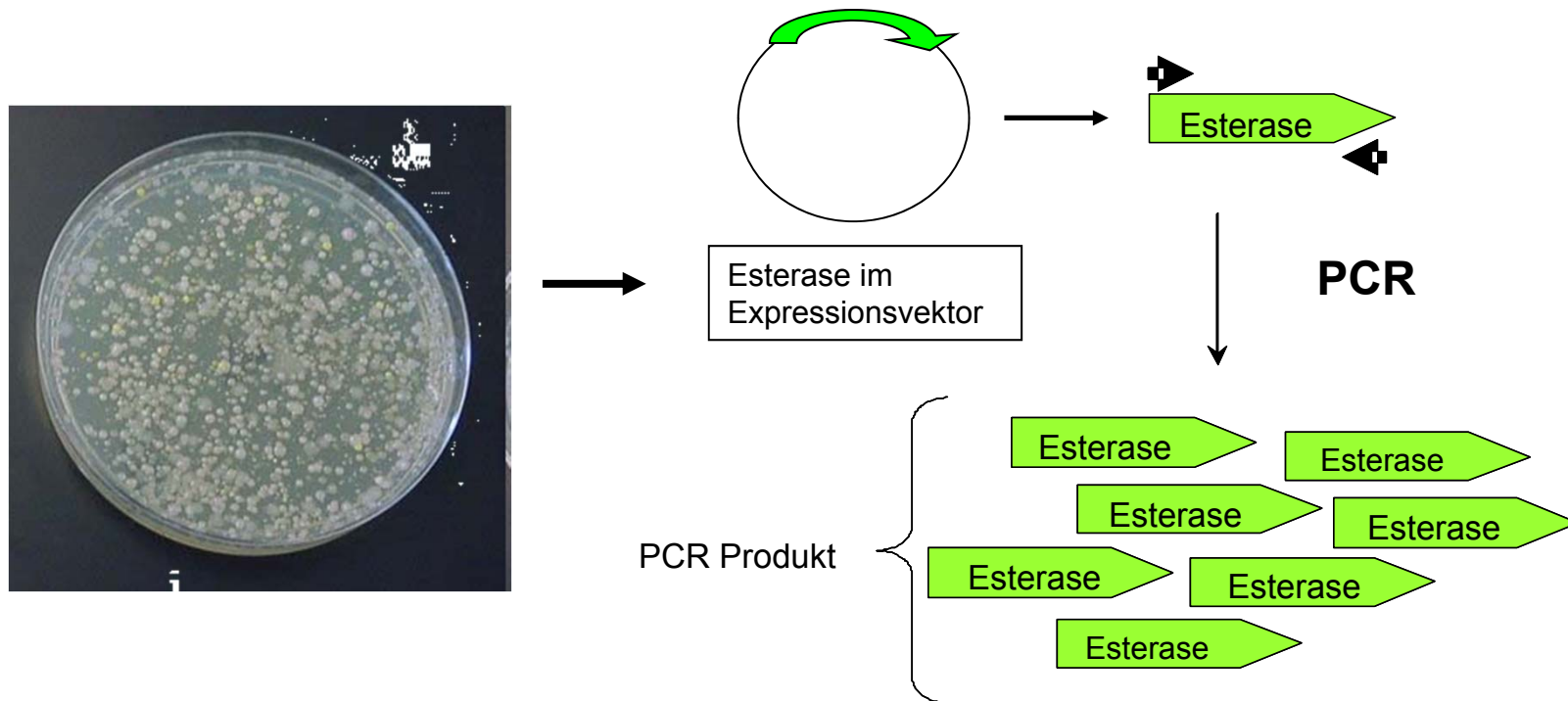


(1) Kolonie-PCR Polymerase Chain Reaction

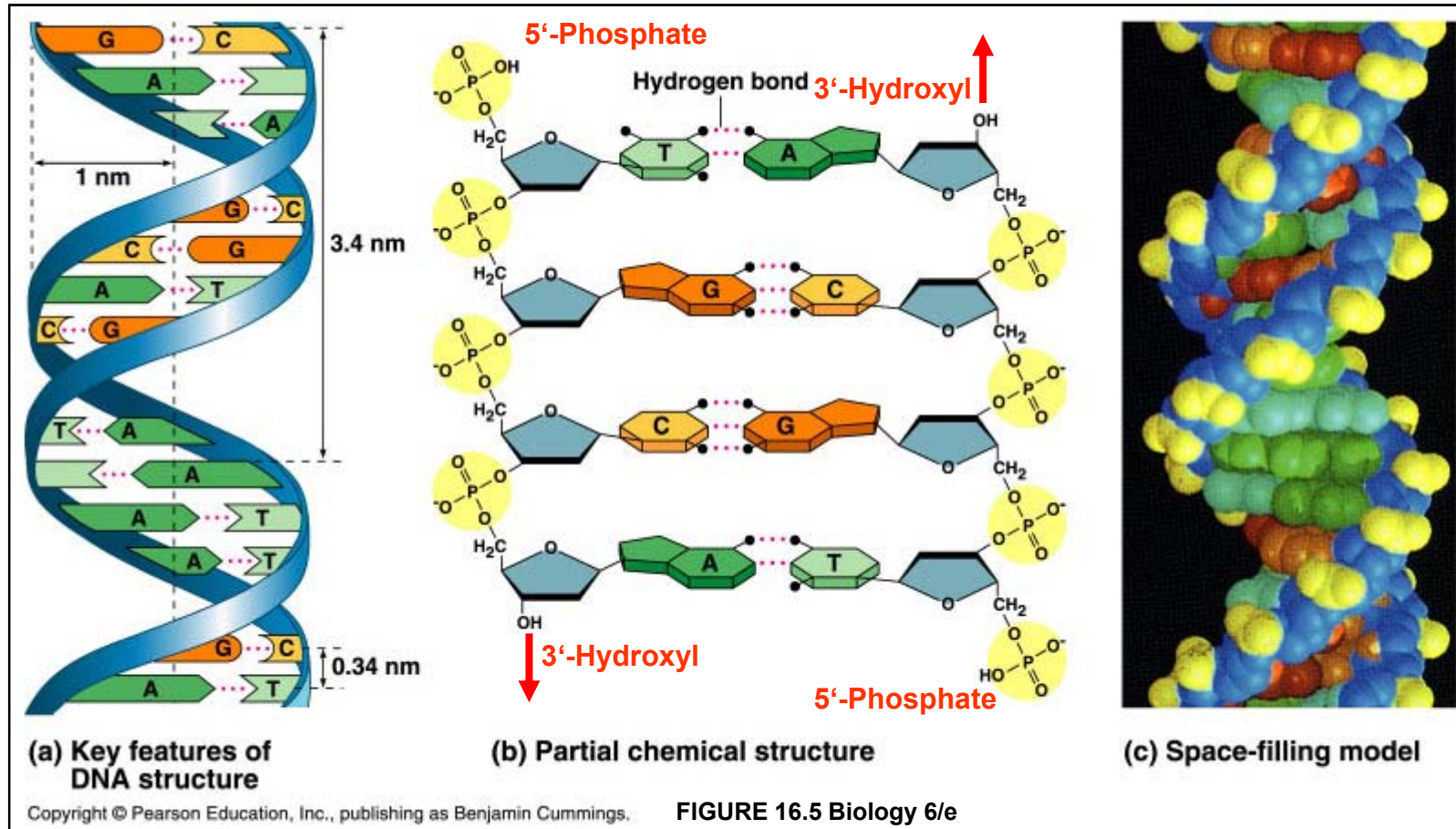


Überprüfung des Expressionsstammes

- Kolonie-PCR
- Wachstums-unabhängige Methode
- Schnelle Überprüfung von Einzelkolonien

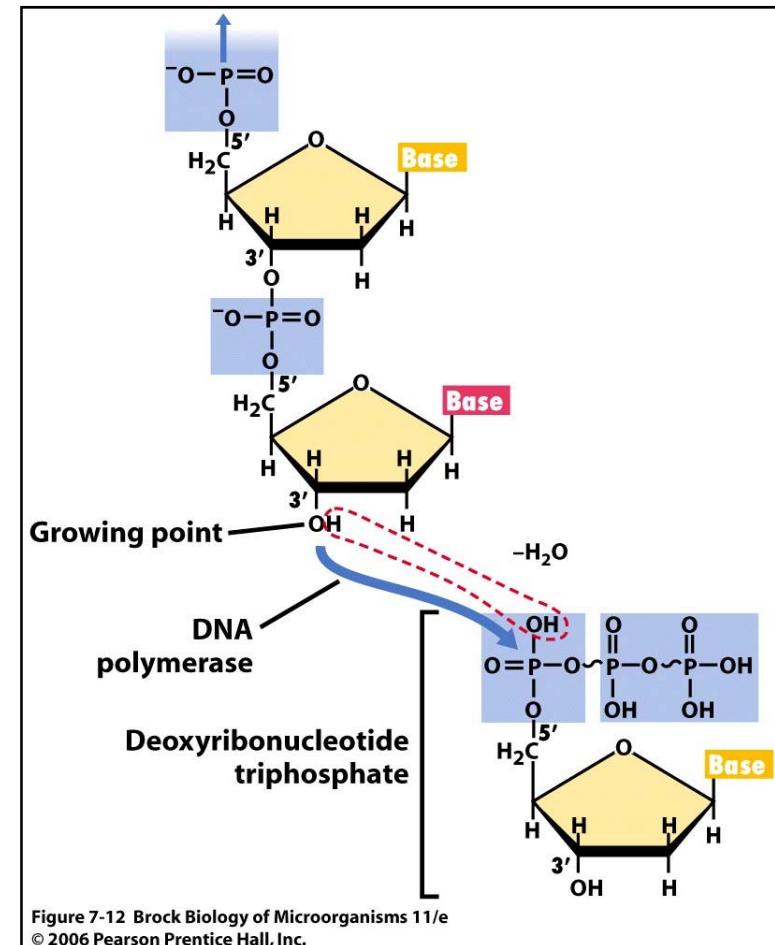
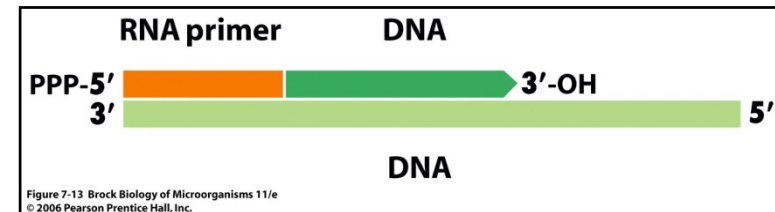


Die Doppelhelix



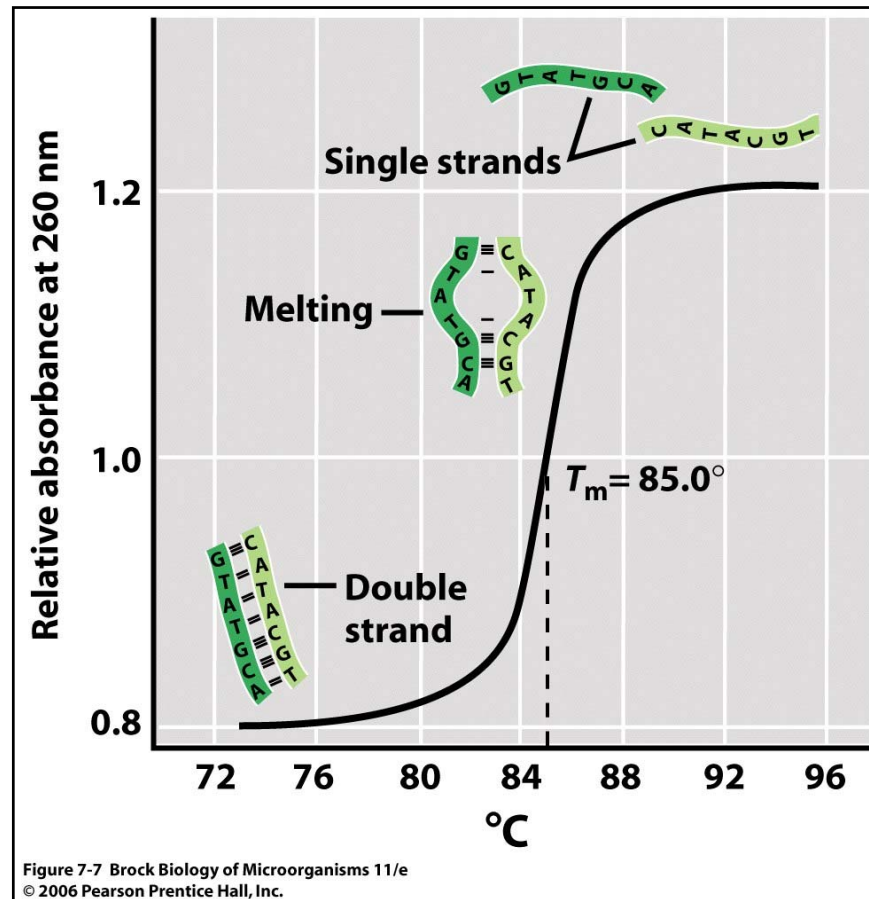
DNA Polymerase

- **DNA Replikation**
- Beide DNA Stränge **antiparallel**
- DNA Polymerasen **fügen Nukleotide nur am 3'-Hydroxyl Ende an** (nie am 5'-phosphate Ende)
- **Elongation des neuen DNA Stranges nur in 5'→3' Richtung**
- **Benötigt Primer** (Nukleinsäure Moleküle)
- **DNA Replication: Primer (<15 Nukleotide, RNA) synthetisiert durch die Primase** (RNA polymerizing enzyme)



Temperatur und DNA Struktur

Effekt von Temperatur: Hitze-Denaturierung



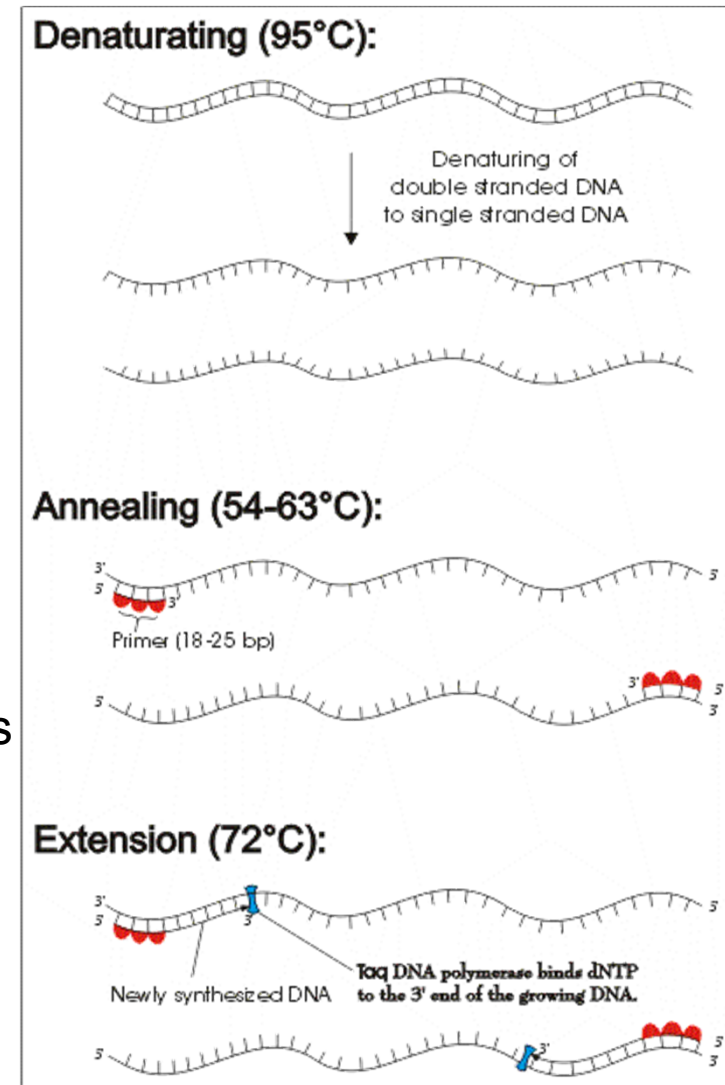
PCR

➤ Komponenten der PCR Reaktion

- **Template DNA (Matritze)**
- **dNTPs**, Mischung aus Desoxynukleotiden (dATP, dCTP, dGTP, dTTP) zur Synthese der neuen DNA
- **Primer**, kurze Oligonukleotide, die mit dem Anfang (forward primer) und Ende (reverse primer) des Zielgens hybridisieren und die freie 3'OH Gruppe für die DNA Polymerase liefern
- **DNA Polymerase** (*Taq* bzw. Phusion polymerase, (aus *Thermus aquaticus* bzw. *Pyrococcus ssp.*)
– Genauigkeit hängt von der **MgCl₂** Konzentration ab.
- **Puffer**, optimale Reaktionsbedingungen für die *Taq* polymerase
- **MgCl₂**
- **H₂O**, auffüllen des Reaktionsvolumens auf 50 µl (alternativ auch 25 µl or 100 µl)

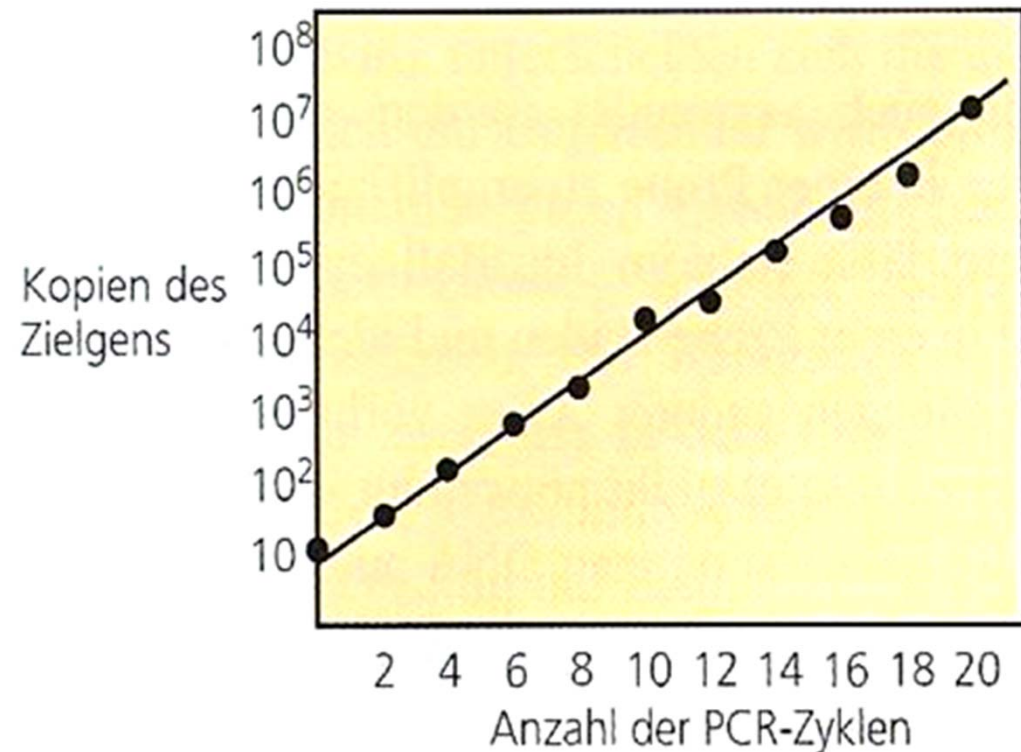
PCR

1. **Denaturierung** der DNA Matrize (einzelnsträngige DNA)
2. **Annealing/Anlagerung:** Der Primer lagert sich an die Zielsequenz der DNA an.
3. **Elongation/extension/Verlängerung:** Die *Taq* DNA Polymerase fügt die dNTPs an das 3' Ende der Primer an, wobei die Nukleotidsequenz der DNA als Matrize dient.



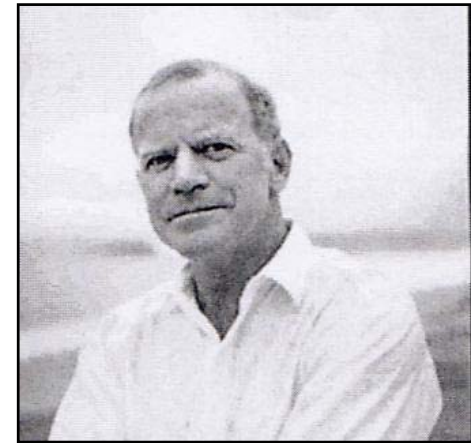
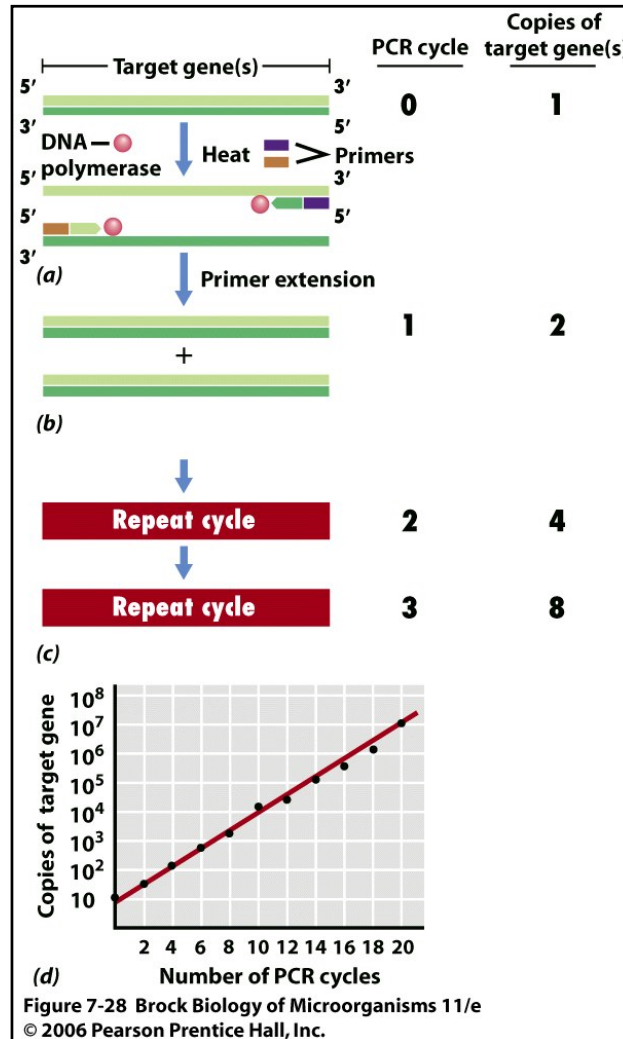
PCR Amplifikation

- Die Anzahlen der Kopien verdoppelt sich in jedem Zyklus.
- Nach 20 – 30 Zyklen hat man zwischen 10^6 – 10^9 Kopien des Zielgens.



PCR

Amplifying DNA: The Polymerase Chain Reaction (PCR)



Kary Mullis, 1983

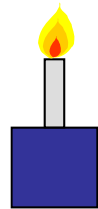
Loading



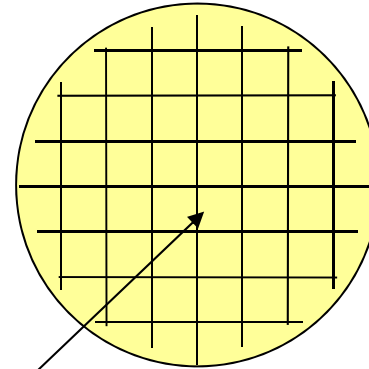
Picken der Klone



Eine Kolonie wird mit einer sterilen Spitze abgenommen und zunächst auf eine Agarplatte überführt.

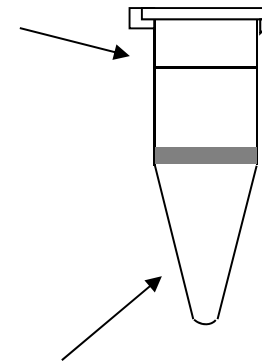


In der Nähe des **Bunsenbrenners** arbeiten



Denken sie an die korrekte **Beschriftung** von Platte, Tube und Reagenzglas!

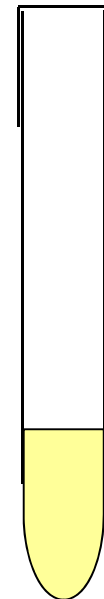
Kolonie-PCR



Plasmid Präparation



Vorkultur Expression



Überprüfung des Expressionsstammes

- **Jede Gruppe** wählt **4 Kolonien** aus, die sie für die **Kolonie-PCR** (heute 1. Tag) und **Plasmid Präparation** (2. Tag) einsetzt.
- Benutzen sie jeweils eine **sterile Spitze** um die Kolonie zu „**picken**“ (abzunehmen) und auf folgende Medien zu transferieren:
 - **LB-Ampicillin Platte** (Klone 1-4 markieren, Inkubation 37°C, anschl. Lagerung; Replikat))
 - **1,5 ml Reaktionsgefäß** für die Kolonie-PCR mit 50 µl Tris-Puffer
 - **5 ml LB Medium + Ampicillin** (Spitze abwerfen). Diese Kultur dient der für die Plasmid Präparation (2. Tag)

!! Alle Arbeiten steril in der Nähe des Bunsenbrenners ausführen !!

- Bitte beachten sie die **entsprechende Nummerierung** der Reaktionsgefäße und Platten!
- Die Agar Platten (Replikat) bzw. 5 ml Kultur (Plasmid-Präparation) werden über Nacht bei **37°C inkubiert** (Schrank bzw. Schüttler)

Kolonie-PCR

- **4 Kolonien** werden gepickt und in die markierten 1,5 ml Reaktionsgefäße mit Tris-Puffer (50 µl, 10 mM Tris/HCl, pH 7,0) überführt
- Die Reaktionsgefäße werden für **5 min bei 94°C** zur **Zell-Lyse** inkubiert
- **Zentrifugation** des Zell-Lysats für 1 min bei 13.000 rpm (Raumtemperatur)
- **Ca. 35 µl des Überstandes** vorsichtig abnehmen
- **5 µl des Überstandes** direkt in der **PCR als Template-DNA (Matritze)** einsetzen
- Die PCR wird mit der **Phusion-Polymerase** durchgeführt.
- Positive Klone werden über **Agarose Gelelektrophorese** identifiziert.

Primer

Esterase-sequenzspezifische Primer (5' – 3')

- EstCE-FW

GG **CAT** ATG TCG ATA GCG GAT CAG

- EstCE-REV

GGA TCC TTA GCG AGT AGG TTC GTT TG

NdeI-Schnittstelle, Startcodon

BamHI-Schnittstelle, Stoppcodon

PCR Pipettierschema

- Pipettieren beginnend mit größtem Volumen (H₂O)
- **Mastermix** für 6 Ansätze
- Mischen mit Pipette

	Konzentration der Vorratslösung.	Probe Vol. [μl]	Neg. Kontrolle Vol. [μl]
Phusion-Puffer	5X	10	10
§ dNTPs	2 mM	5	5
§ EstCE-FW	10 μM	2,5	2,5
§ EstCE-REV	10 μM	2,5	2,5
# Phusion Polymerase	2.5U/μl	1	1
DNA template	5	5	0
H ₂ O (PCR clean*)		19	24
Total volume		50	50

§ auf Eis auftauen und lagern

bis zur Verwendung die *Taq* Polymerase bei -20°C im Gefrierschrank lassen, anschließend sofort wieder in den Gefrierschrank bringen

* Das einzusetzende DNA-Volumen ist abhängig von der DNA-Isolierung und wird jeder Gruppe bekannt gegeben. Daran ist das H₂O-Volumen anzupassen.

PCR Bedingungen

Zyklus	1.	2 - 31	32
Denaturation	98°C, 30s	98°C, 10s	
Annealing		52°C, 30s	
Elongation		72°C, 40s	72°C, 10 min

Peltier-Element
(schnelles abkühlen
& heizen)

Besondere
Dünnwandige
Reaktionsgefäße



Beheizbarer Deckel,
verhindert
Kondensieren der
PCR Lösung am
Deckel des
Reaktionsgefäßes

(2) Agarose Gelelektrophorese

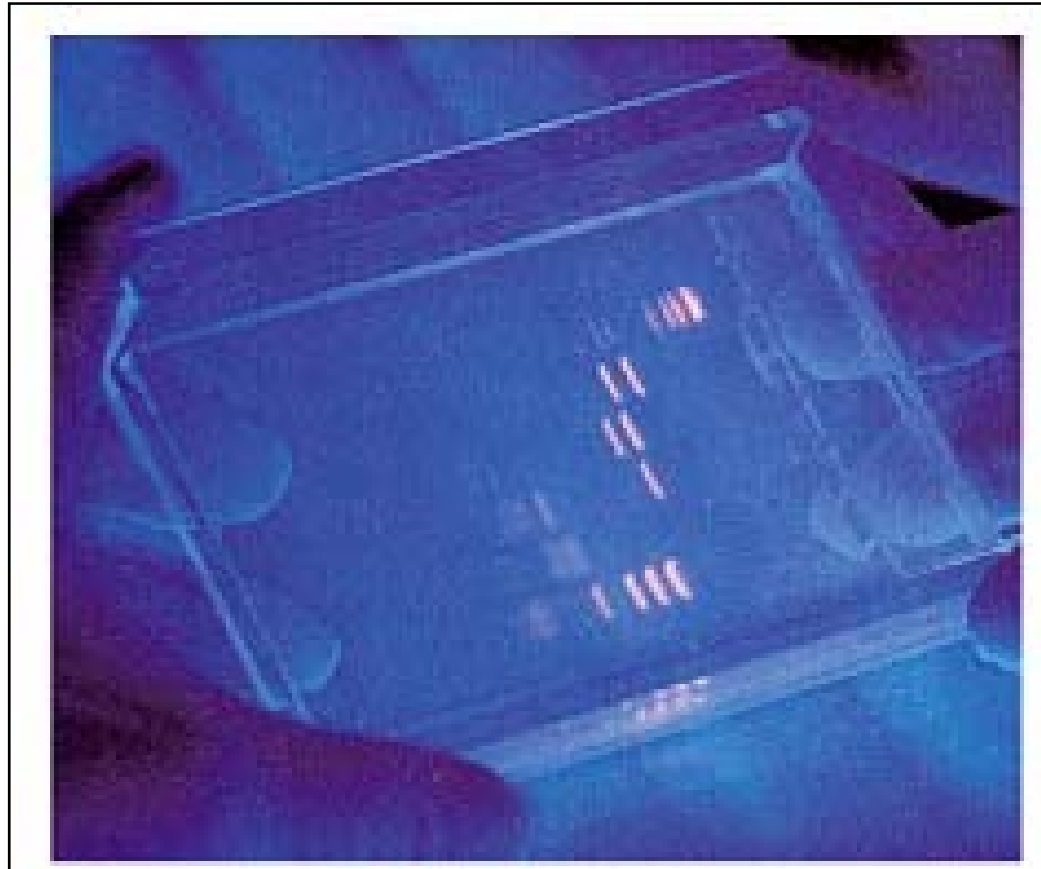


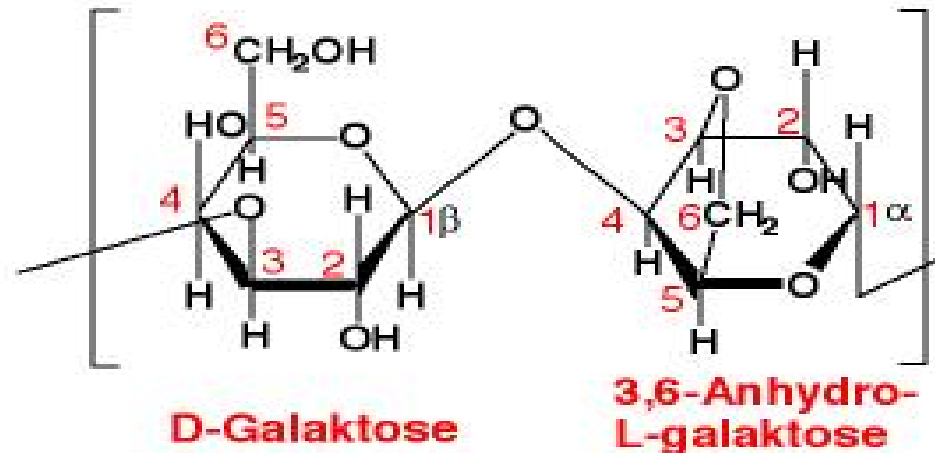
FIGURE 20.9c Biology 6/e

Agarose



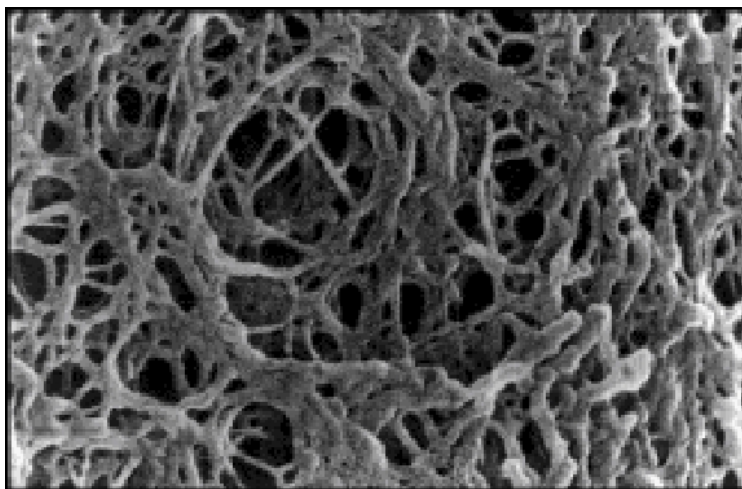
Rotalge *Gelidium*
Agar agar

- Gewonnen aus **Rotalgen** der Gattungen *Gelidium* und *Gracillaria* (**Agar-Agar = Agarose + Agaropektin**)
- **Lineares Kohlenhydratpolymer** aus dem Disaccharid **D-Galactose und 3,6-Anhydrogalactose** (alternierende β -1,4- und α -1,3-glykosidische Verknüpfung)



Agarose

- **Agarose bildet ein poröses Netz** (Stränge durch Wasserstoffbrückenbindungen miteinander verbunden)
- **DNA-Wanderung** abhängig von **Konformation und Größe der DNA**
- **Porengröße** (150 – 500 nm) durch **Agaroseanteil** (i.d. R 0,6 - 2% (w/v)) bestimmt



Scanning EM image of agarose polymer

[openwetware.org/.../Agarose gel electrophoresis](http://openwetware.org/.../Agarose_gel_electrophoresis)

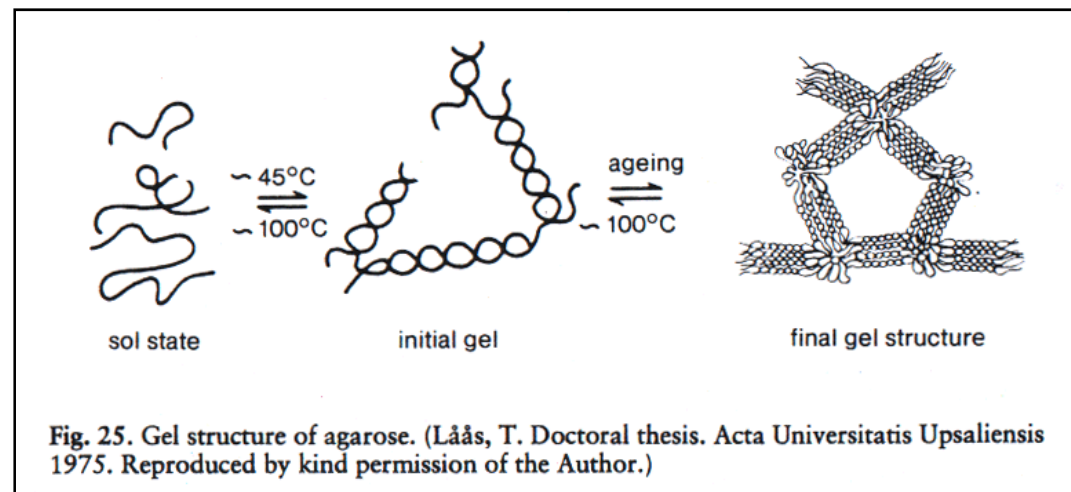


Fig. 25. Gel structure of agarose. (Låås, T. Doctoral thesis. Acta Universitatis Upsaliensis 1975. Reproduced by kind permission of the Author.)

Vorbereitung des Agarosegels



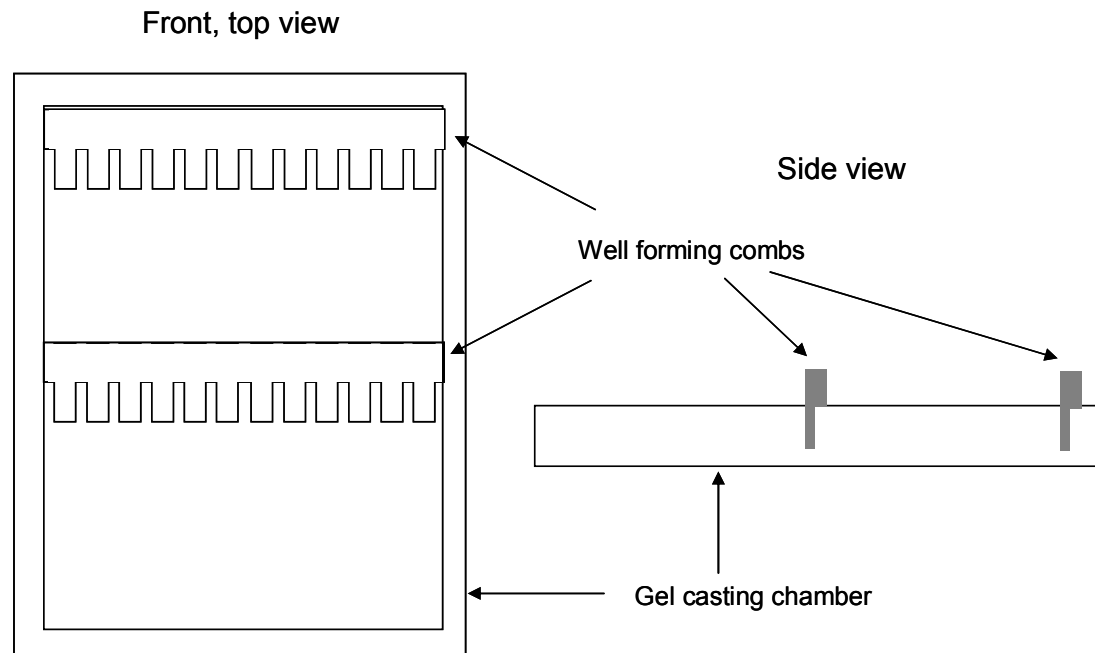
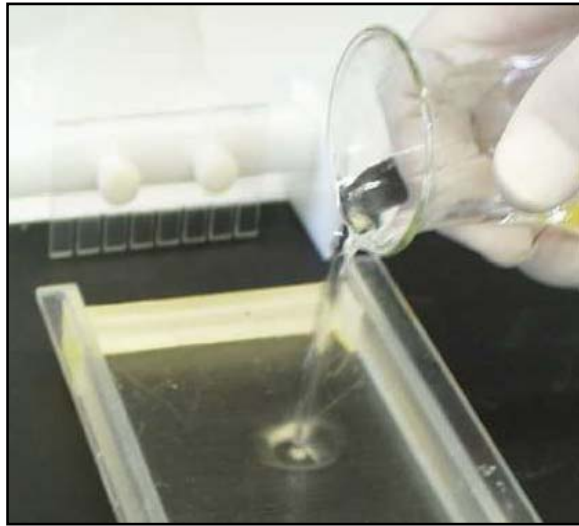
Elizabeth Parker

Figure 7-22a Brock Biology of Microorganisms 11/e
© 2006 Pearson Prentice Hall, Inc.

Agarose Gelelektrophorese

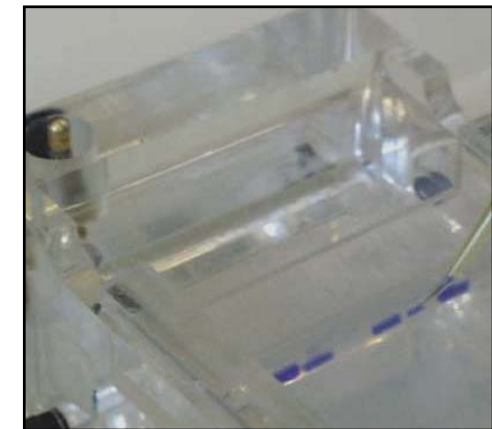
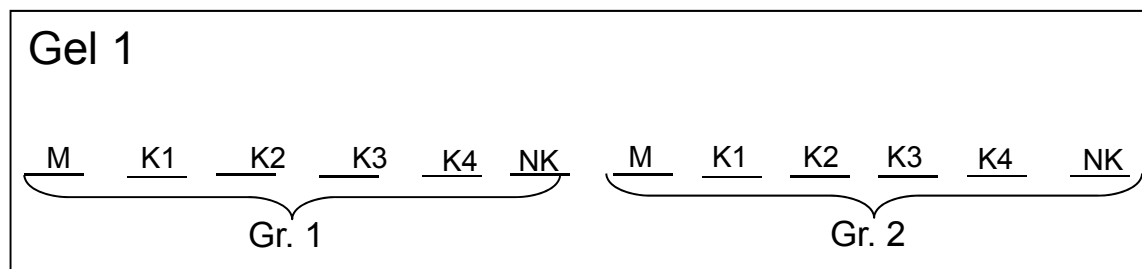
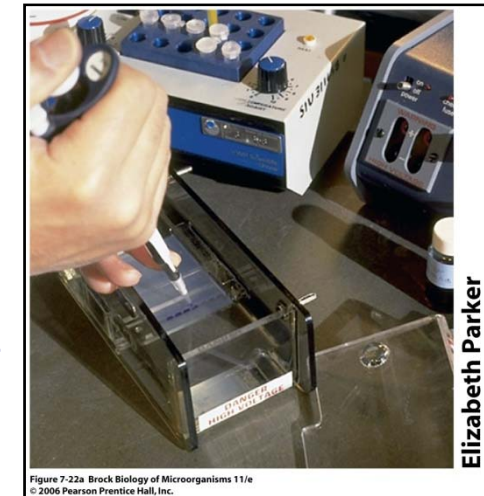
- Jeweils **4 Gruppen** teilen sich ein Gel
- 1 g Agarose wird zu 100 ml 1x TAE-Puffer (**1%**) gegeben und aufgekocht bis zur vollständigen Lösung der Agarose (Mikrowelle, **Schutzbrille** tragen!)
- Die Agarose wird im Wasserbad/Brutschrank auf **55°C runtergekühlt** und steht zum Gießen bereit.
- Die **Gelkammern** werden zusammen gebaut, die **runtergekühlte Agarose in die Kammern gegossen** und der Kamm eingesetzt. Dabei Bläschenbildung vermeiden.

Agarose Gelelektrophorese



Agarose Gelelektrophorese

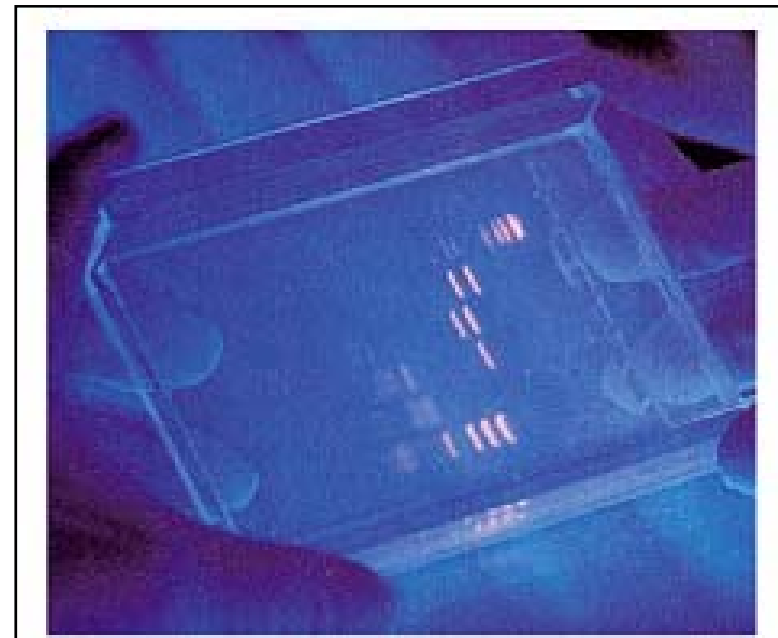
- Nach ca. **30 min** ist Agarose erstarrt
- **Laufpuffer** (1x TAE-Puffer) in Kammer füllen (Gel vollständig bedecken)
- **Kämme entfernen, Proben auftragen:**
 - **5 µl** der vier Proben und der **Negativ-Kontrolle**
 - **1 µl Loading Dye Buffer (6x)**
- Gesamte Volumen auftragen (Geltasche)
- Zusätzlich werden 5 µl eines **1 kb-Markers** aufgetragen.



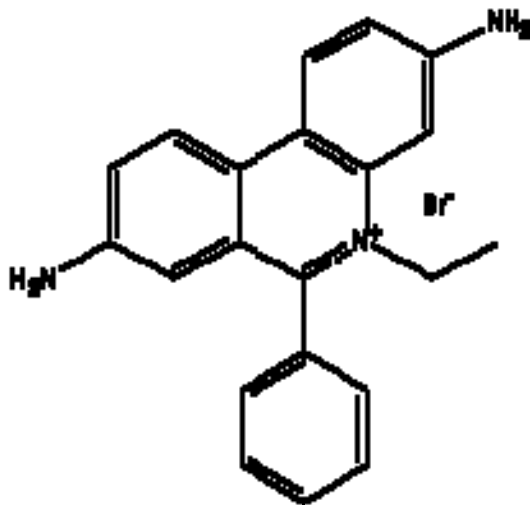
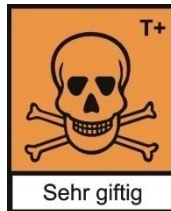
Agarose Gelelektrophorese

- Gele laufen mit **100 V/400 mA** Spannung (ca. 50 min)
 - Die negativ geladene DNA wandert zur positiven Elektrode
(**Kontakte richtig anschließen!**)

 - **Färben des Gels:** 15 min im Ethidiumbromid-Bad (!!!) anfärben,
!!Dies ist nur unter Aufsicht eines Betreuers durchzuführen!!
 - **Entfärben des Gels:** Gel kurz wässern
 - Gel unter **UV-Licht** auf Banden überprüfen (**GelDoc**, BioRad)
- !!Dies ist nur unter Aufsicht eines Betreuers durchzuführen!!**
- **Bilddokumentation**



Umgang mit Ethidiumbromid



Ethidiumbromid

- Da Ethidiumbromid als hochgiftig (**carcinogen**) eingestuft ist und bei direktem Hautkontakt resorbiert werden kann, gelten folgende Schutzmaßnahmen beim Umgang mit EtBr-haltigen Lösungen:
- Schutzhandschuhe aus **NITRIL** benutzen
- Keine Latexhandschuhe tragen
- Einmalhandschuhe unmittelbar nach Gebrauch bzw. Kontakt mit EtBr entsorgen!

➤ **Färben und Dokumentieren der Gele**
nur **in Gegenwart eines Betreuers !!!**

Marker = Größenstandard

- Die Laufstrecke **linearer DNA-Fragmente** im Agarosegel ist umgekehrt proportional zum Logarithmus ihrer **Größe**
- Mit Hilfe bekannter **Längenstandards (Marker)** kann so eine genaue Größenbestimmung erfolgen.
- Als Größenmarker wird der Gene Ruler 1 kb DNA-Ladder der Firma Fermentas verwendet

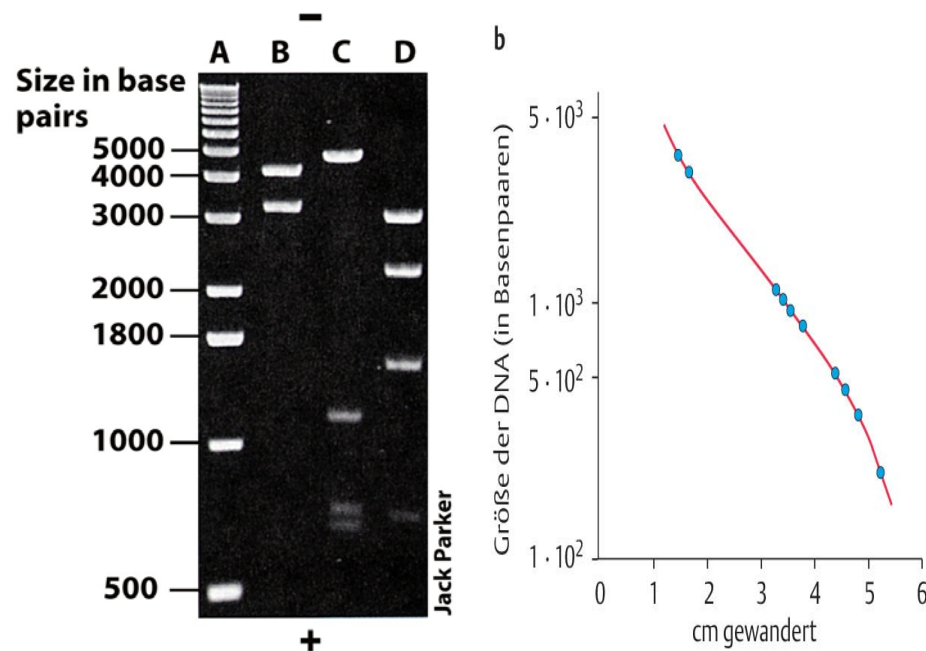


Figure 7-22b Brock Biology of Microorganisms 11/e

