

Praktikum Biochemie

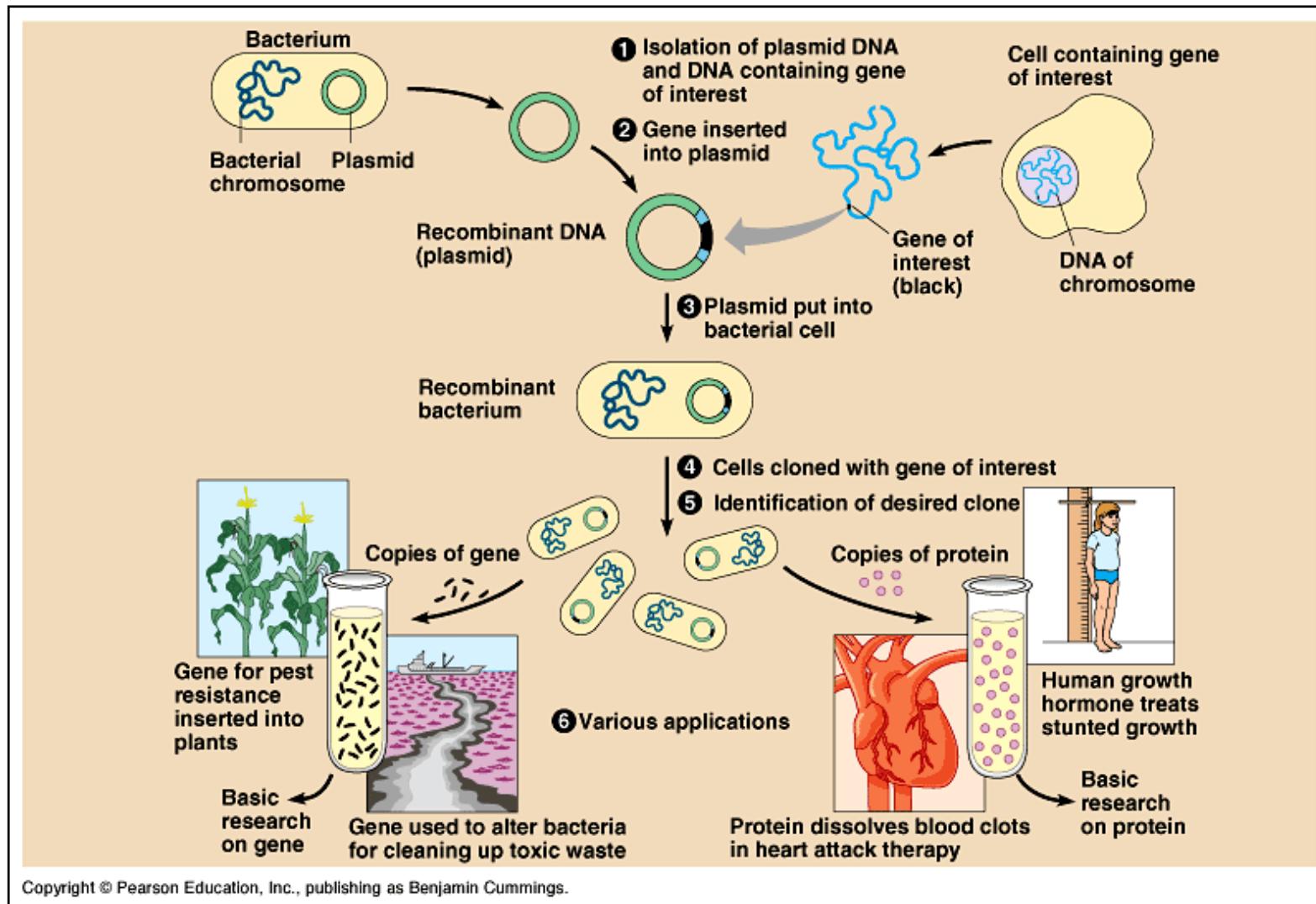
„Biotechnologie“

(Molekularbiologie & Biochemie)



Bettina Siebers

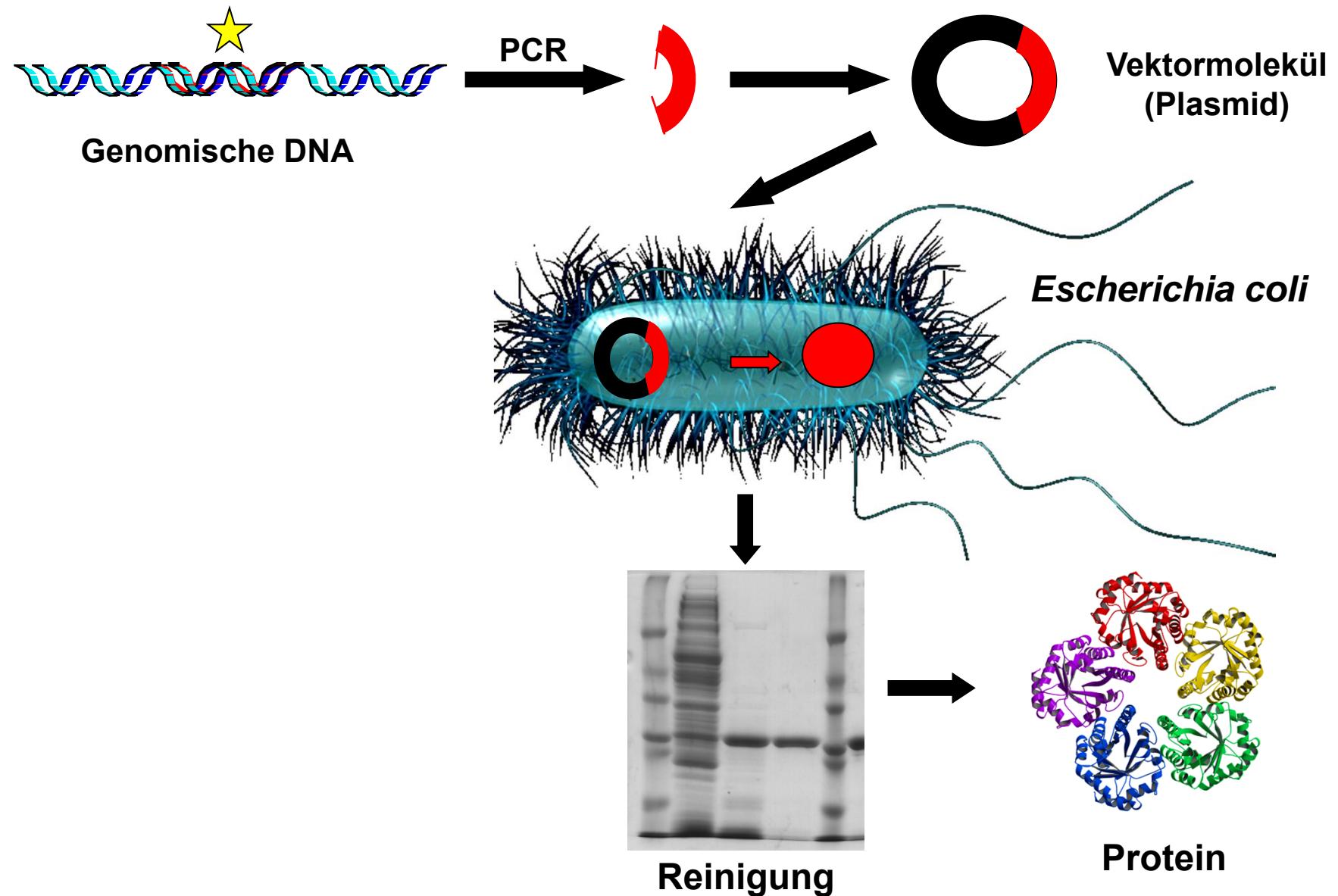
Biotechnologie



Copyright © Pearson Education, Inc., publishing as Benjamin Cummings.

FIGURE 20.1 Biology 6/e

Protein Expression



The flow of genetic information

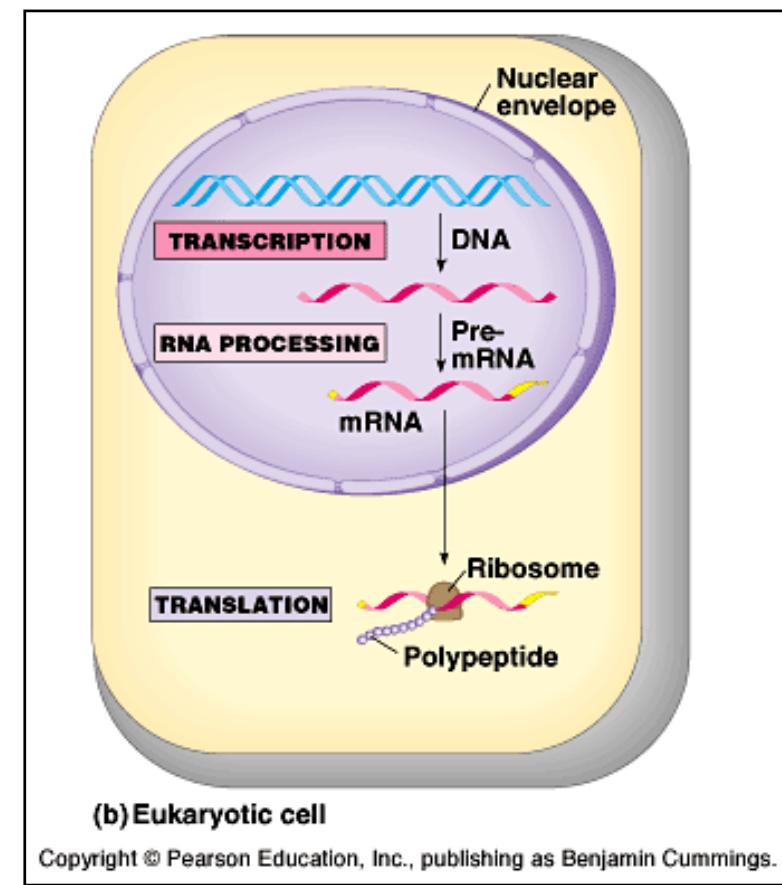
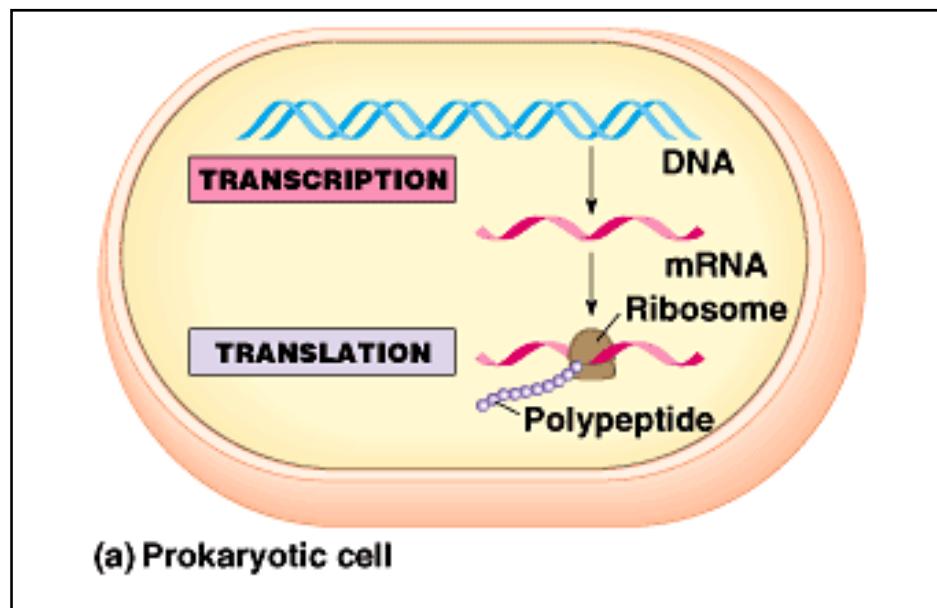
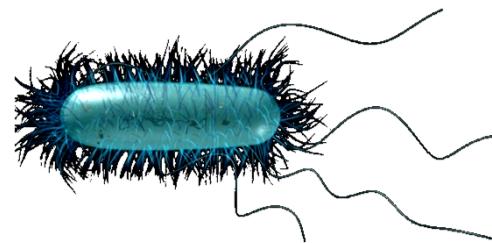


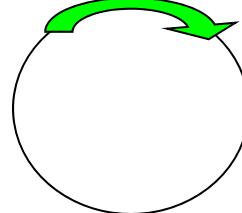
FIGURE 17.2 Biology 6/e

Copyright © Pearson Education, Inc., publishing as Benjamin Cummings.

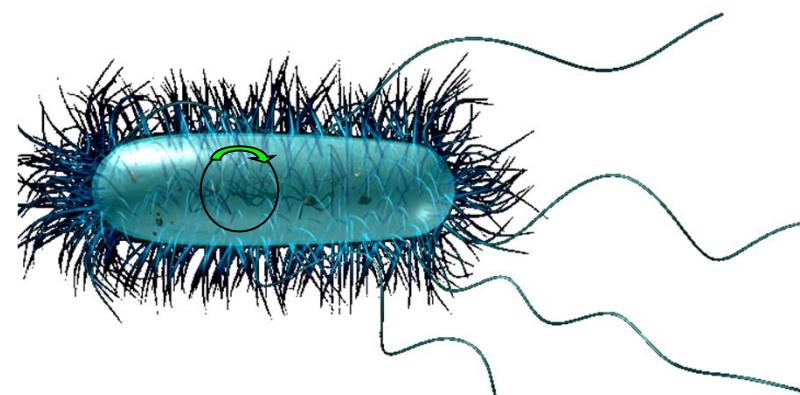
Transformation des Expressionsstammes



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**

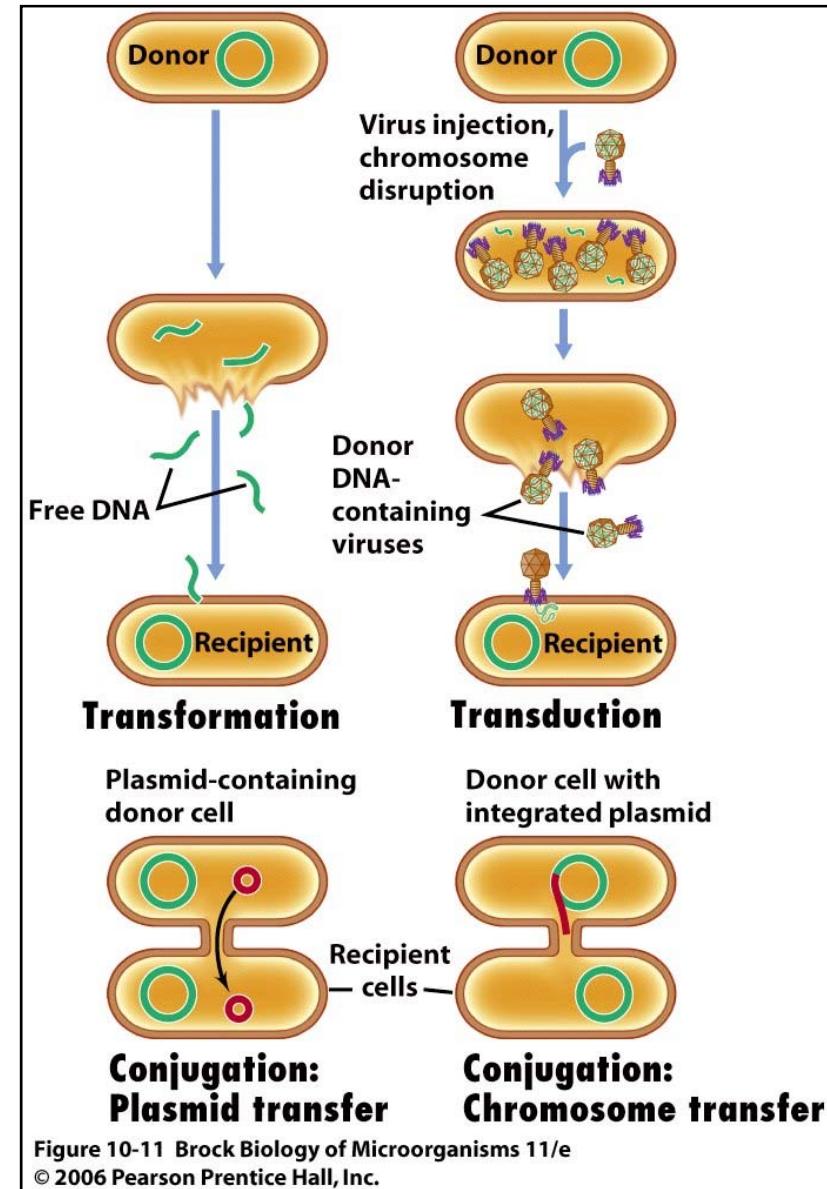
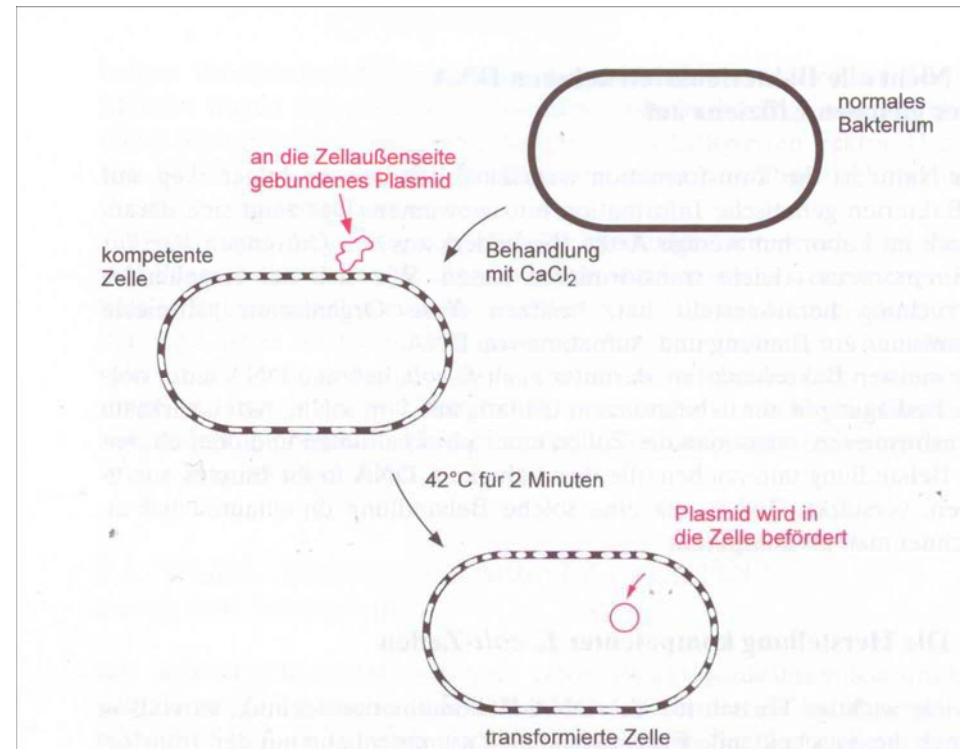


Figure 10-11 Brock Biology of Microorganisms 11/e
© 2006 Pearson Prentice Hall, Inc.

Kompetente Zellen: CaCl_2 Methode

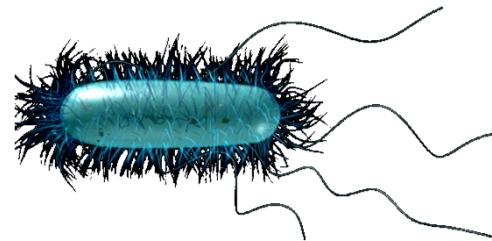
- **Chemische Methode**
- Eisgekühlte Salzlösung (50 mM CaCl_2), Funktionsweise nicht genau bekannt
- $\text{CaCl}_2 \rightarrow$ Anheftung der DNA an der äußeren Zellhülle
- Hitzeschock (42°C) → Aufnahme der DNA
- Physikalische Methode → Elektroporation



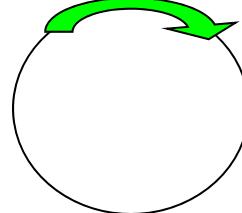
Transformation

- 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.

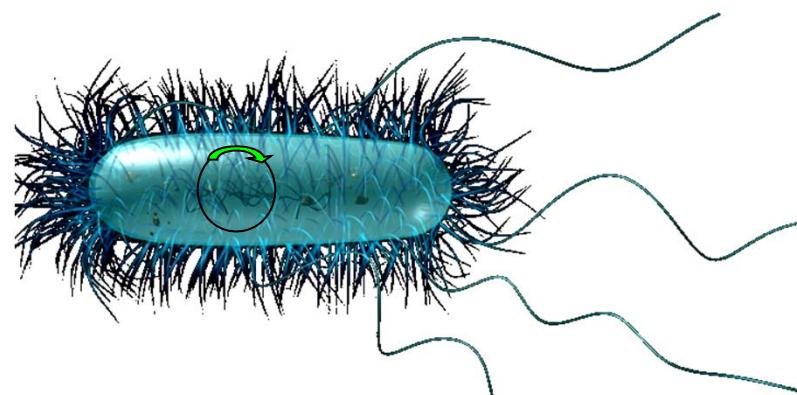
Transformation des Expressionsstamme



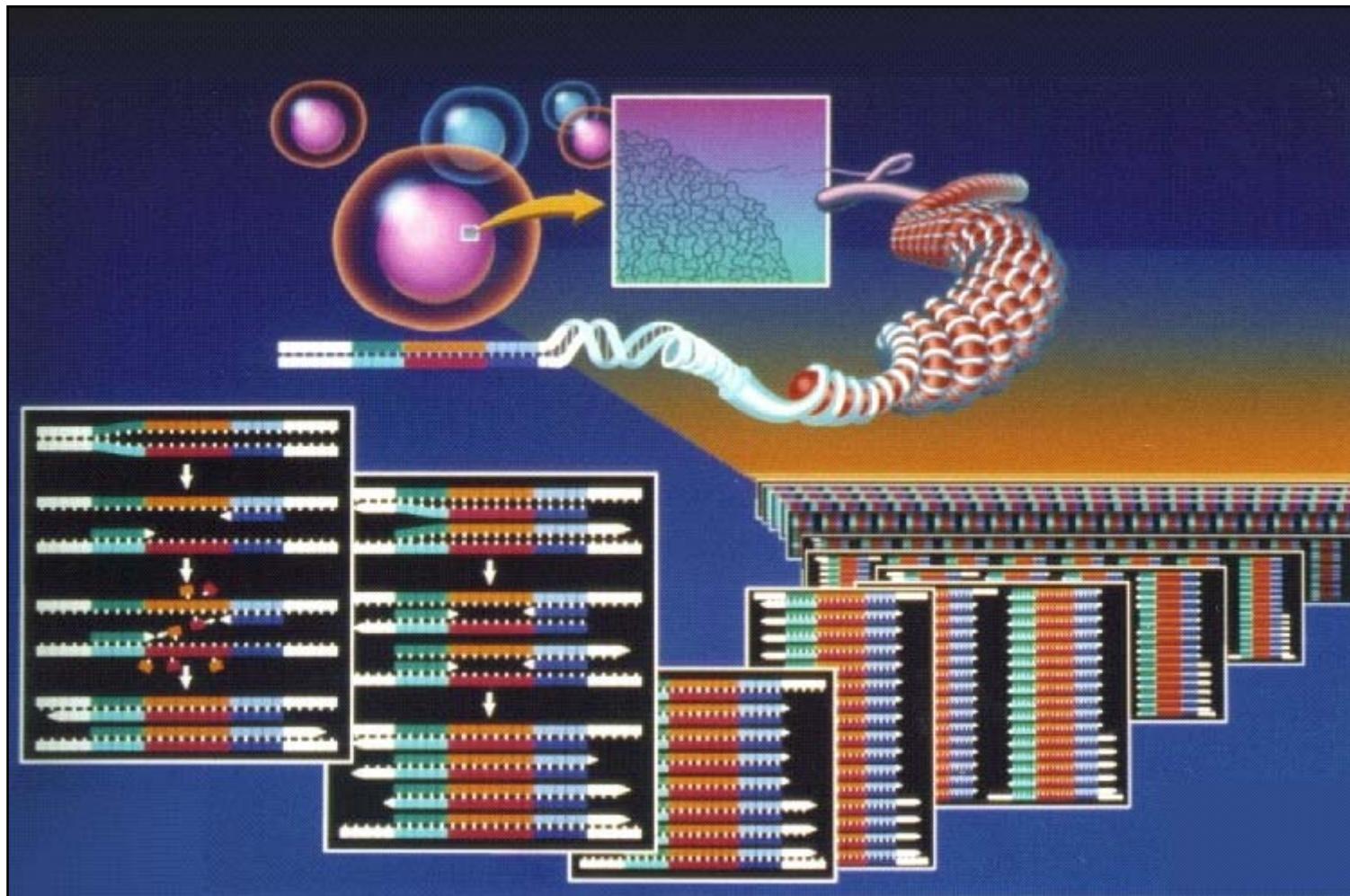
E. coli BL21 (DE3)



pET19b::*EstCE*

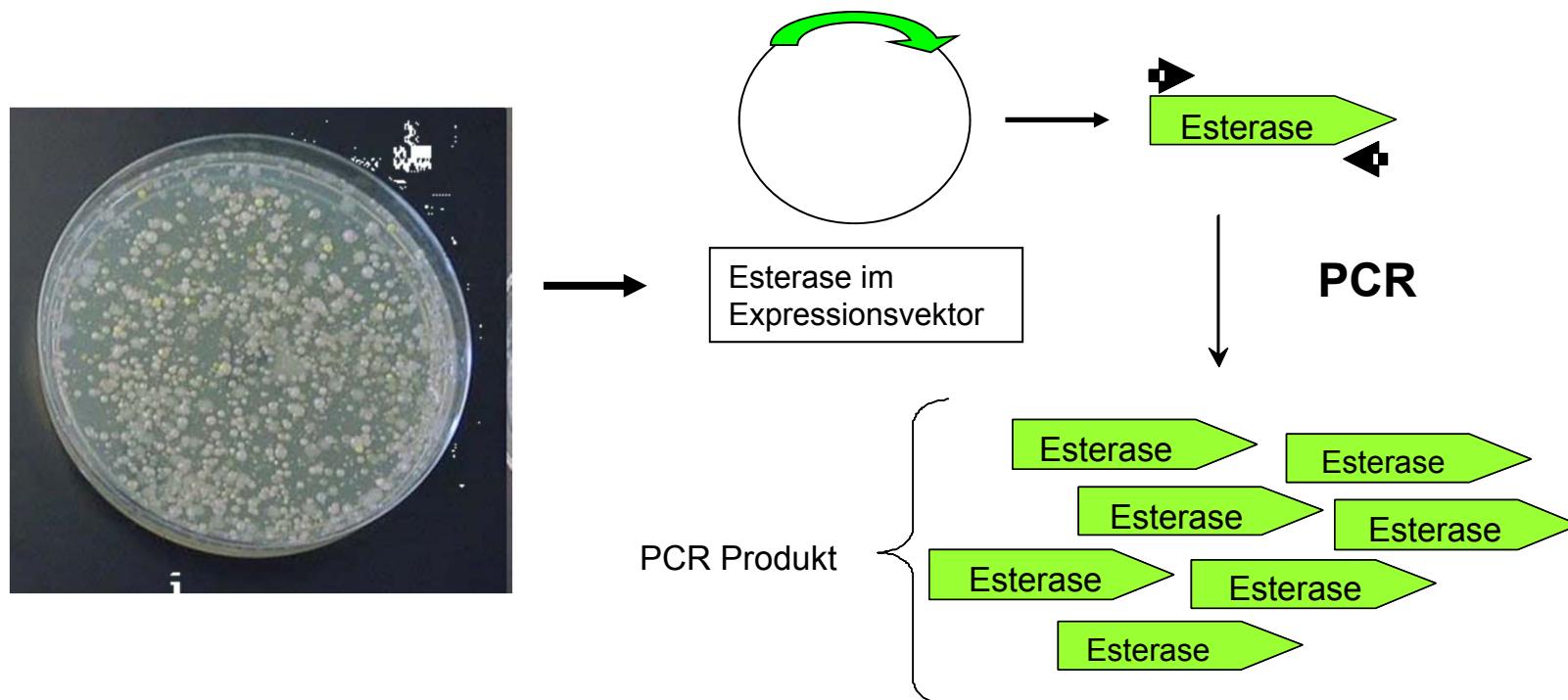


(1) Kolonie-PCR Polymerase Chain Reaction

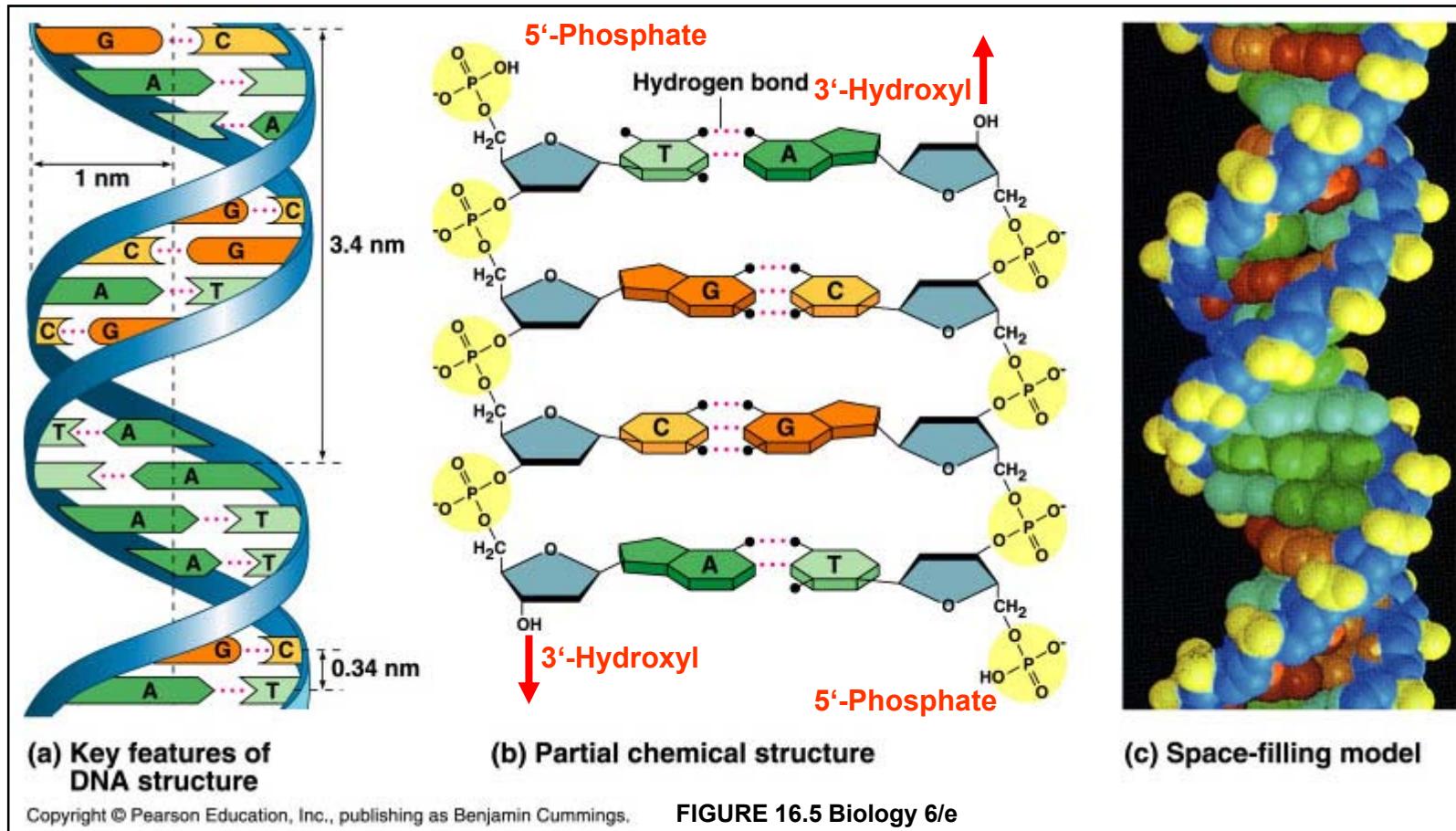


Überprüfung des Expressionsstammes

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



Die Doppelhelix



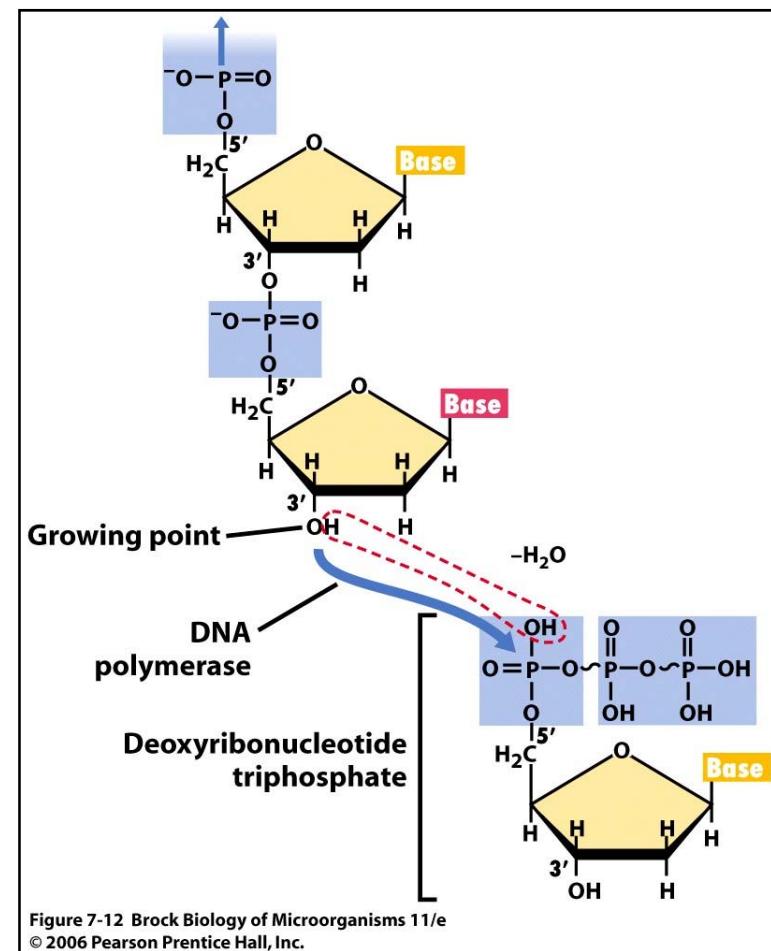
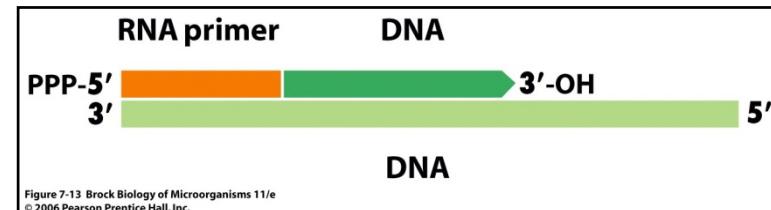
Copyright © Pearson Education, Inc., publishing as Benjamin Cummings.

FIGURE 16.5 Biology 6/e



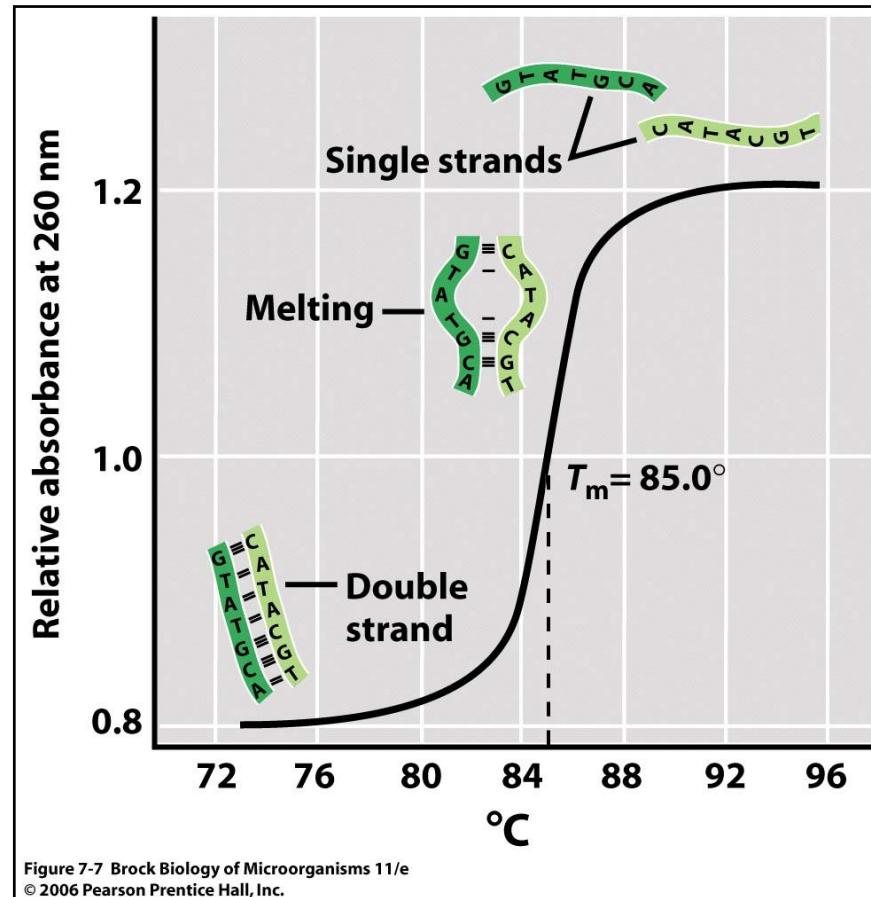
DNA Polymerase

- **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



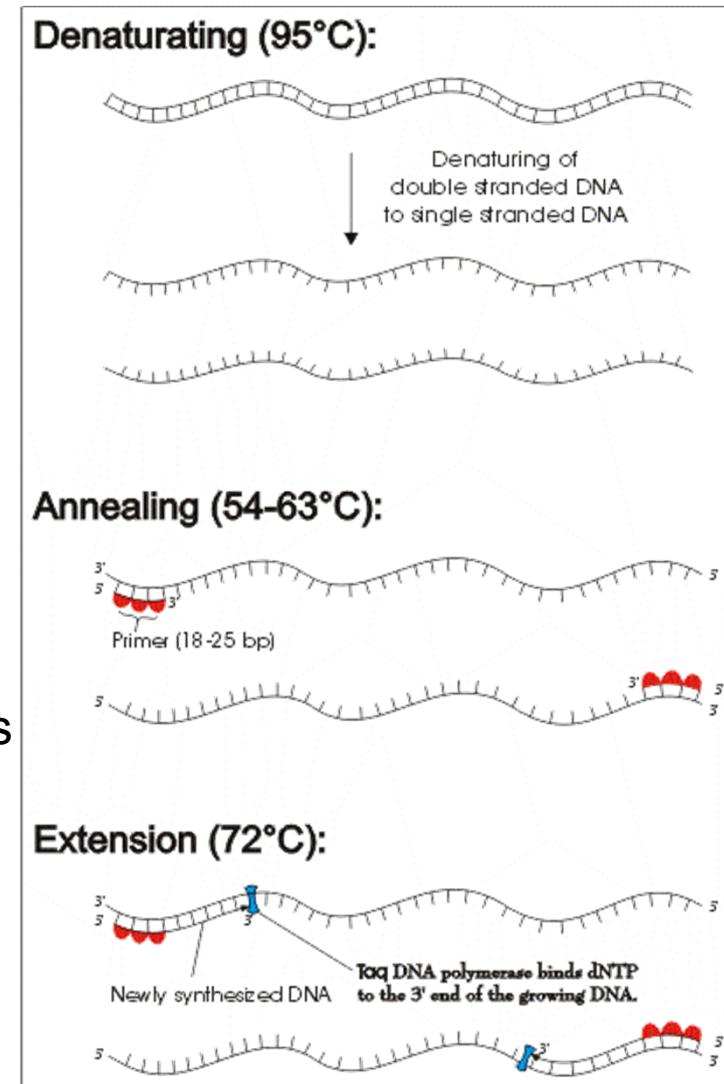
PCR

➤ 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 Raktionsvolumens auf 50 µl (alternativ auch 25 µl or 100 µl)

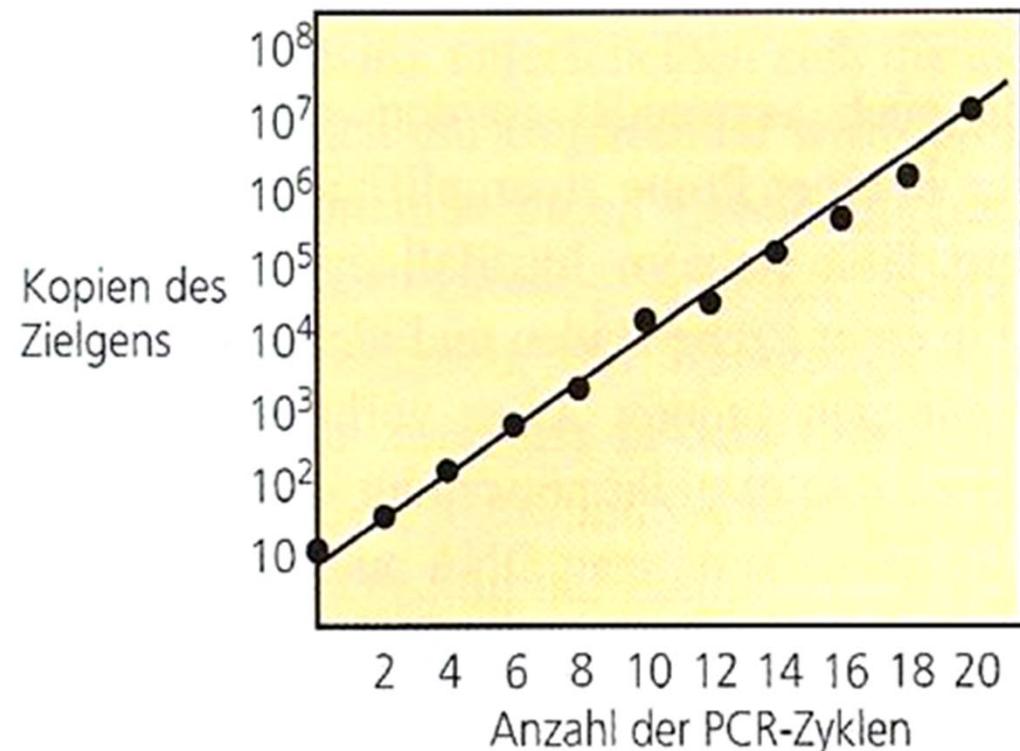
PCR

1. **Denaturierung** der DNA Matrize
(einzelsträngige 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.



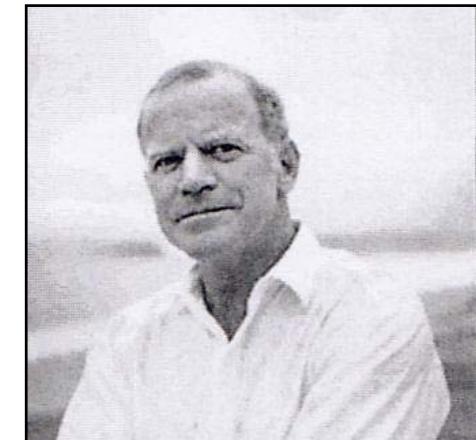
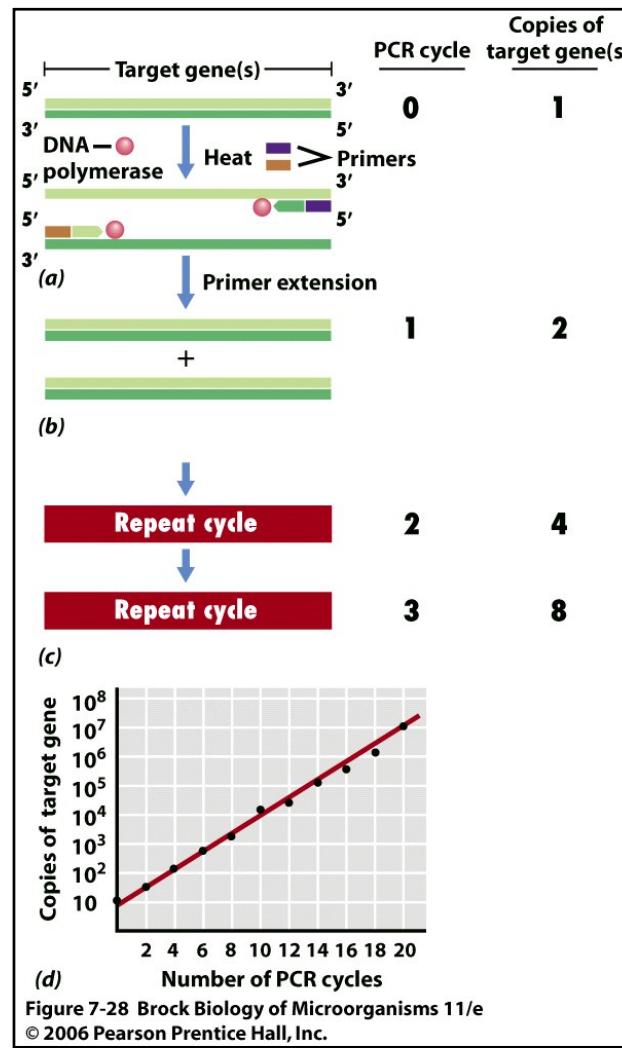
PCR Amplifikation

- 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



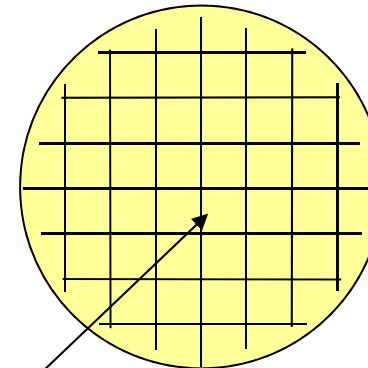
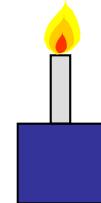
Picken der Klone



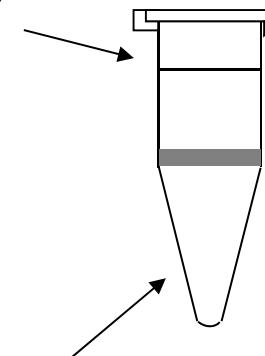
Eine Kolonie wird mit einer sterilen Spitze abgenommen und zunächst auf eine Agarplatte überführt.



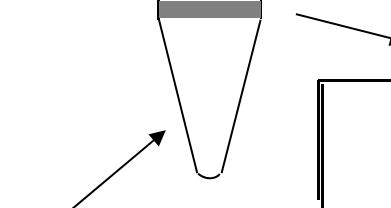
In der
Nähe des Bunsenbrenners
arbeiten



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

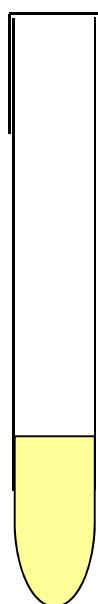


Kolonie-PCR



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 (H_2O)
- **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_2O (PCR clean*)		19	24
Total volume		50	50

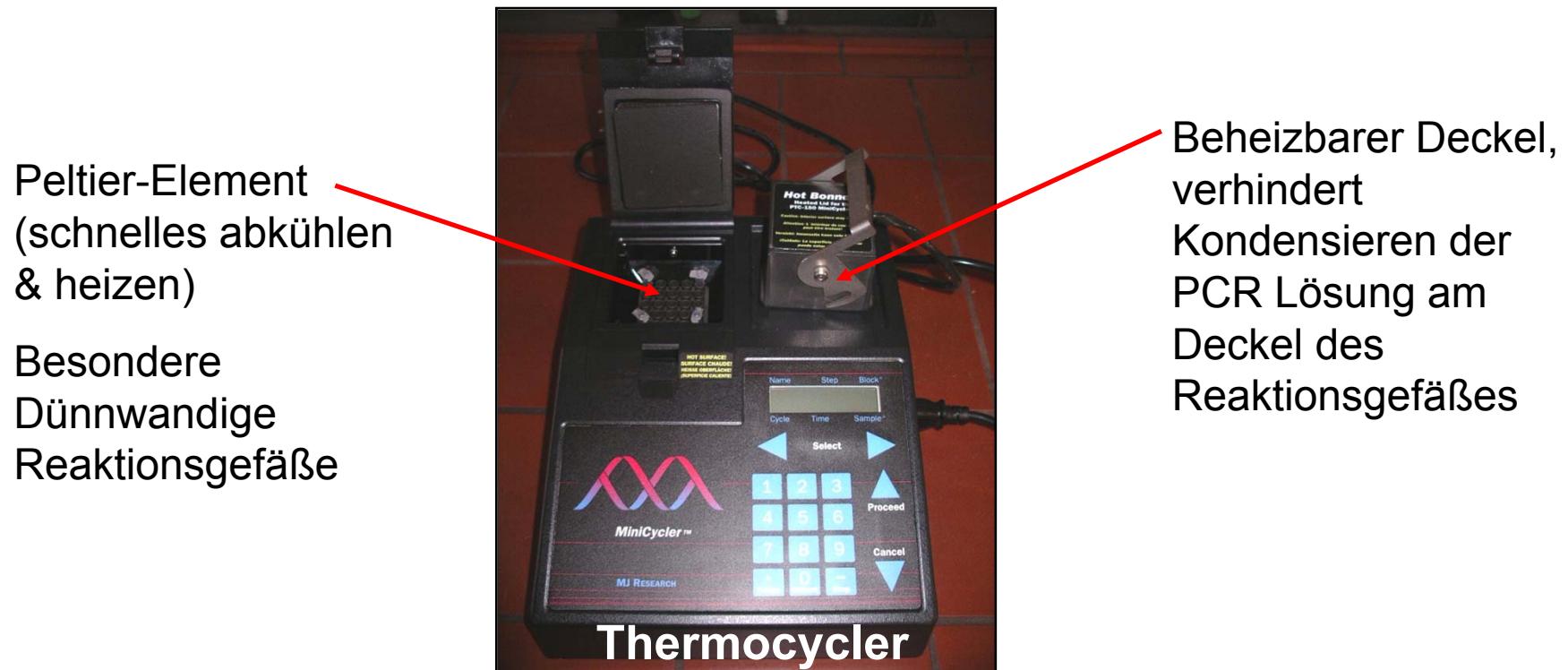
§ auf Eis auftauen und lagern

bis zur Verwendung die *Taq* Polymerase bei $-20^{\circ}C$ 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 H_2O -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



(2) Agarose Gelelektrophorese

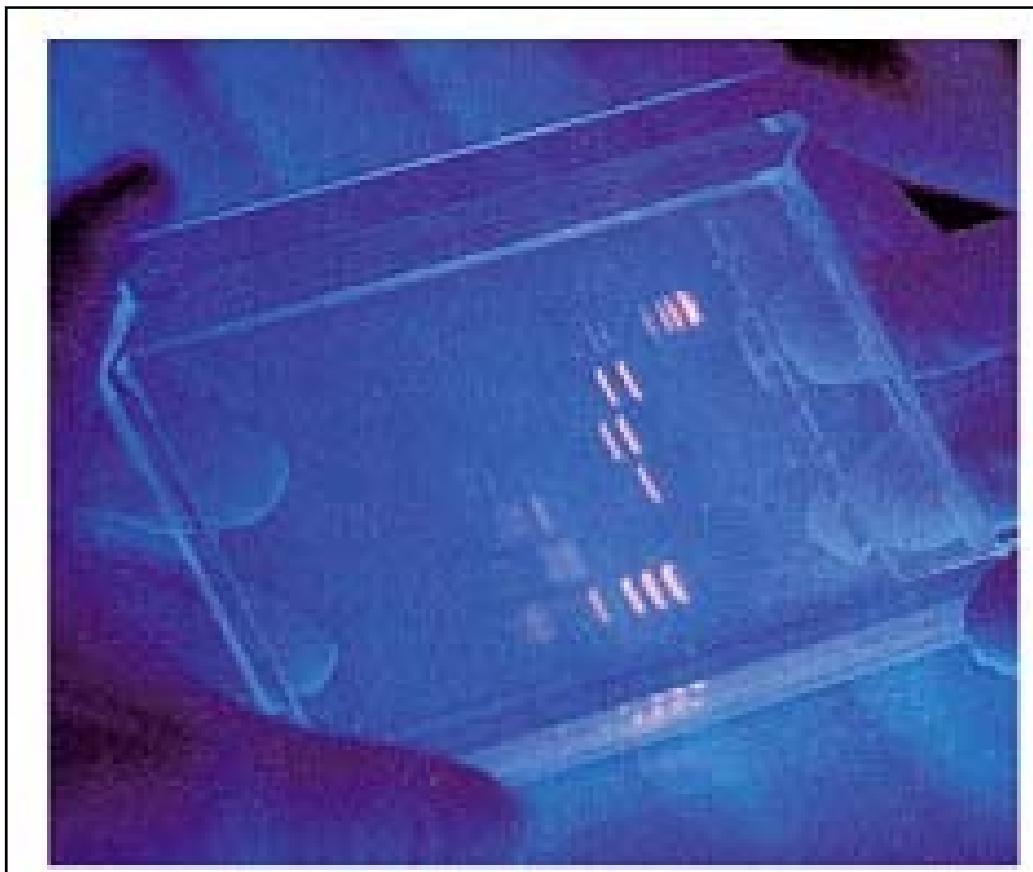
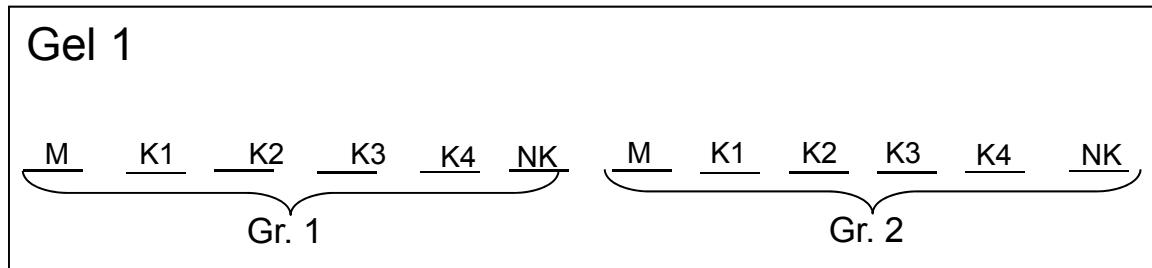
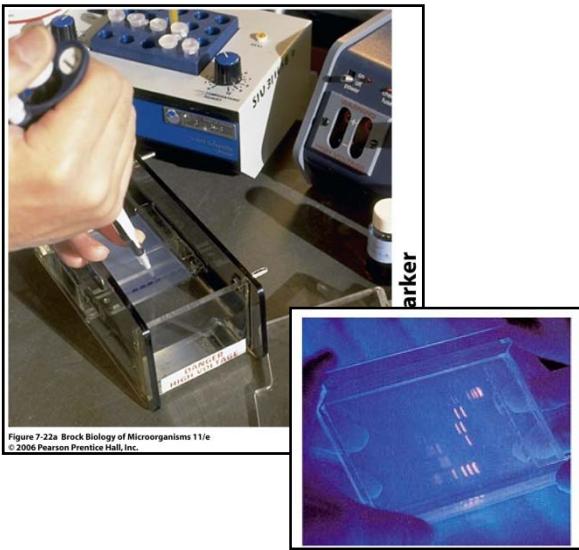


FIGURE 20.9c Biology 6/e

Agarose Gelelektrophorese

- 1%-iges Agarose-Gel
 - Proben: je **5 µl der vier Proben und der Negativ-Kontrolle + 1 µl Loading Dye Buffer (6x)**



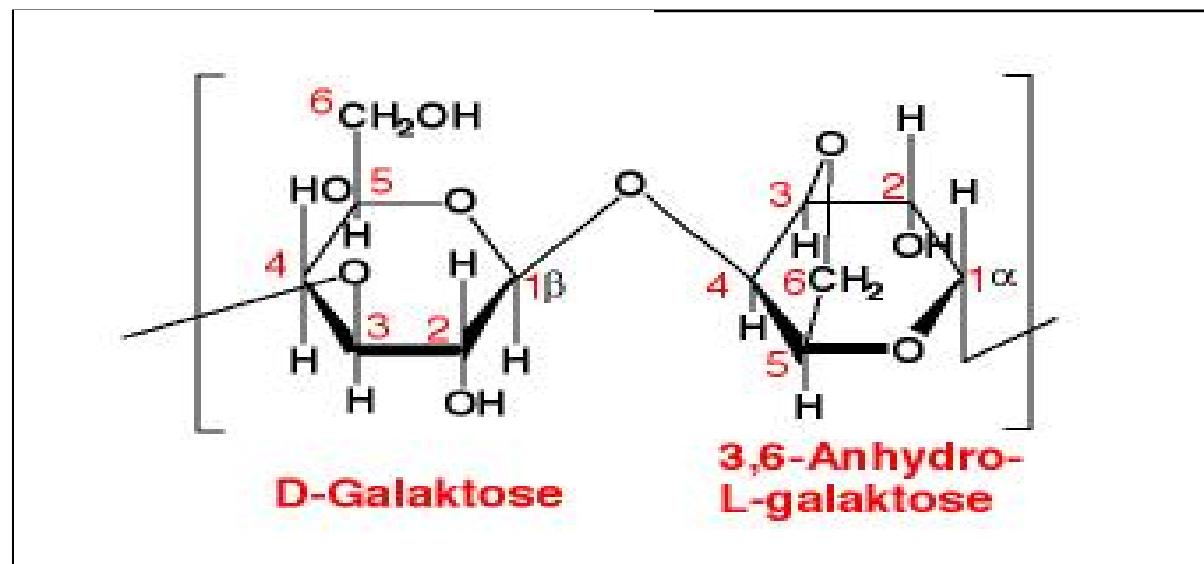
- Ist ein einzelnes/spezifisches PCR Produkt entstanden?
 - Entspricht die Größe des PCR-Produktes den Erwartungen?
 - Ist in der Negativ-Kontrolle (Wasser) ein PCR-Produkt zu sehen?

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

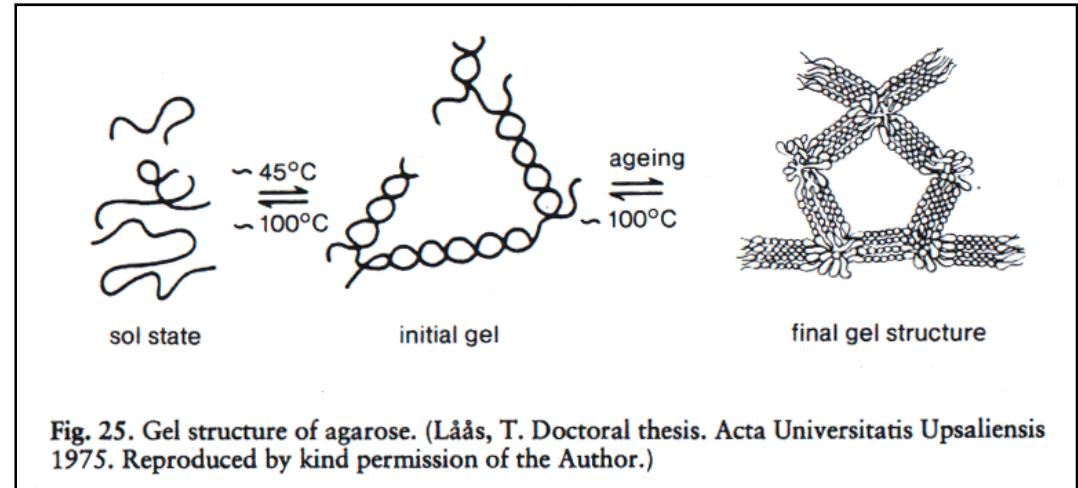
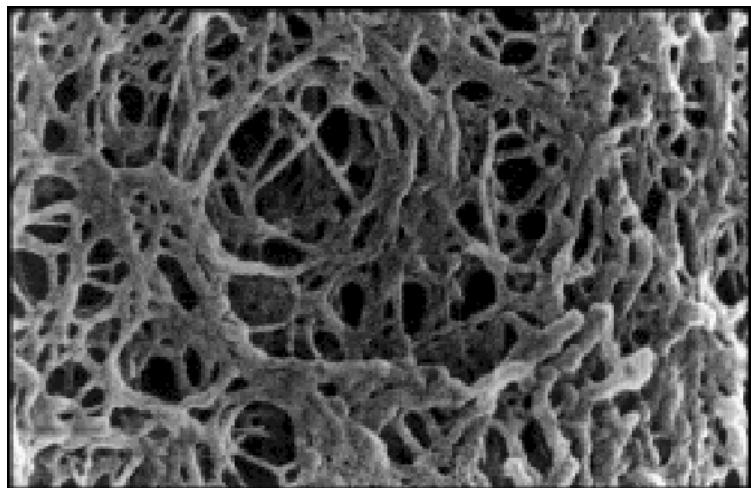


Fig. 25. Gel structure of agarose. (Låås, T. Doctoral thesis. Acta Universitatis Upsaliensis 1975. Reproduced by kind permission of the Author.)

Scanning EM image of agarose polymer

openwetware.org/.../Agarose_gel_electrophoresis

Vorbereitung des Agarosegels



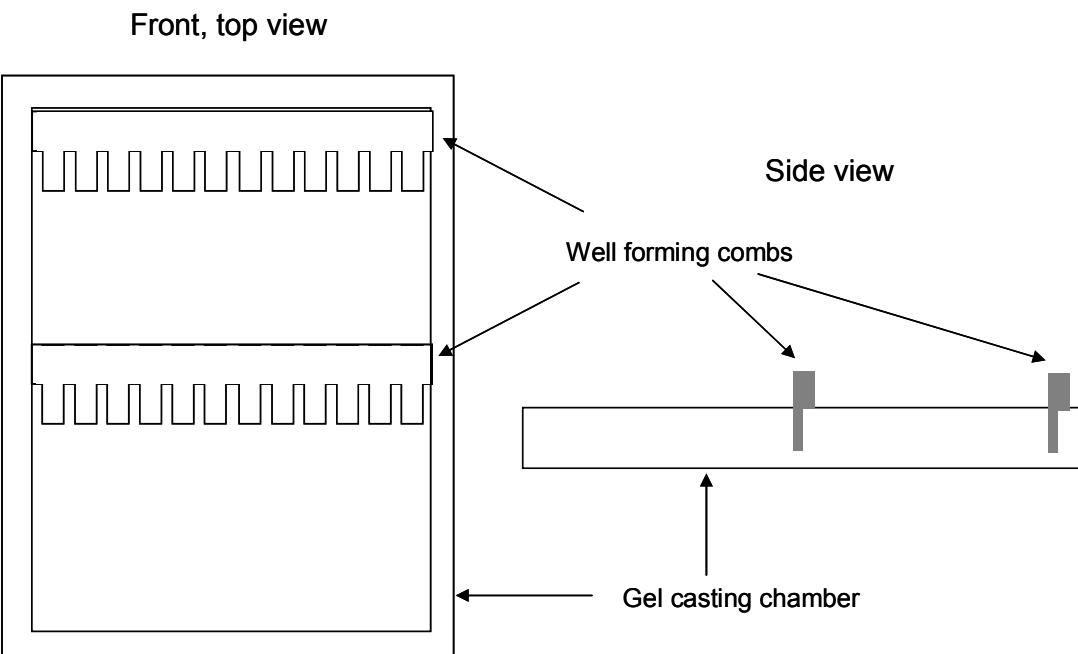
Figure 7-22a Brock Biology of Microorganisms 11/e
© 2006 Pearson Prentice Hall, Inc.

Elizabeth Parker

Agarose Gelelektrophorese

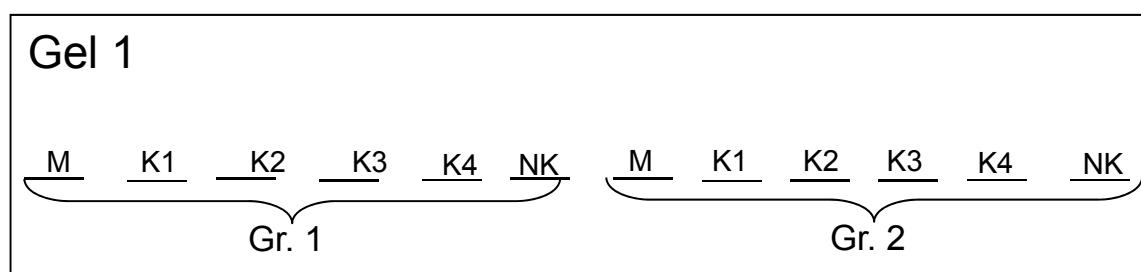
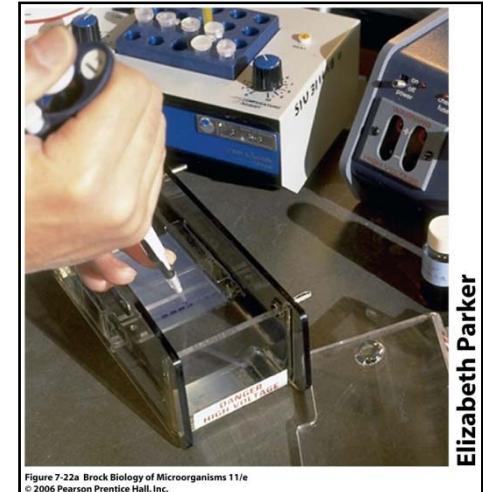
- Jeweils **4 Gruppen** teilen sich ein Gel
- 1 g Agarose wird zu 100 ml 1x TAE-Puffer (**1%**) gegeben und aufgekocht bis zur vollständigen Lösung der Agarose (Mikrowelle, **Schutzbrille** tragen!)
- Die Agarose wird im Wasserbad/Brutschrank auf **55°C runtergekühlt** und steht zum Gießen bereit.
-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

Agarose Gelelektrophorese



Agarose Gelelektrophorese

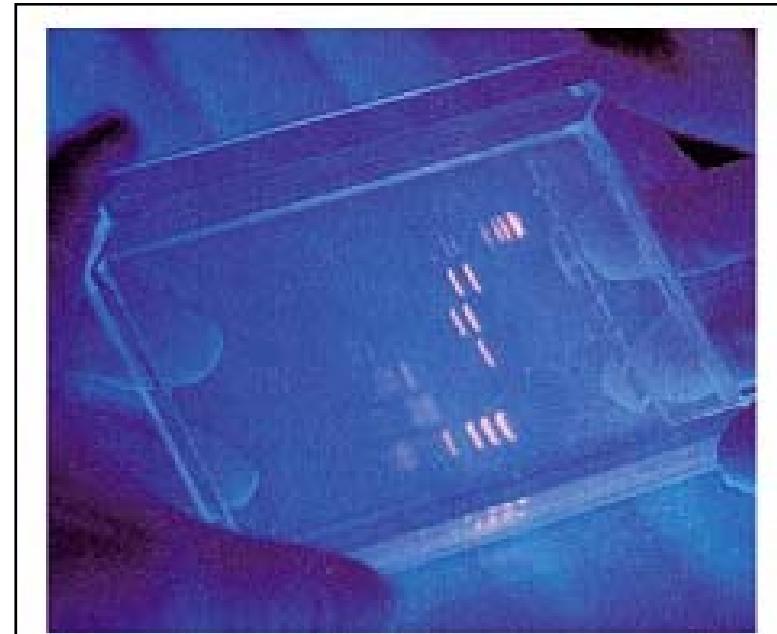
- Nach ca. **30 min** ist Agarose erstarrt
- **Laufpuffer** (1x TAE-Puffer) in Kammer füllen
(Gel vollständig bedecken)
- **Kämme entfernen, Proben auftragen:**
 - **5 µl der vier Proben und der Negativ-Kontrolle**
 - **1 µl Loading Dye Buffer (6x)**
- Gesamte Volumen auftragen (Geltasche)
- Zusätzlich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



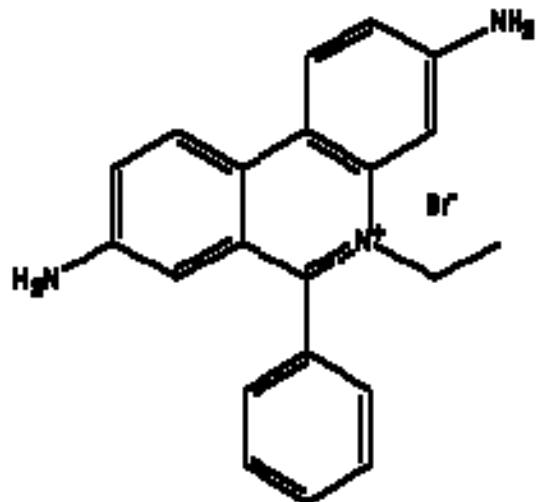
Agarose Gelelektrophorese

- 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

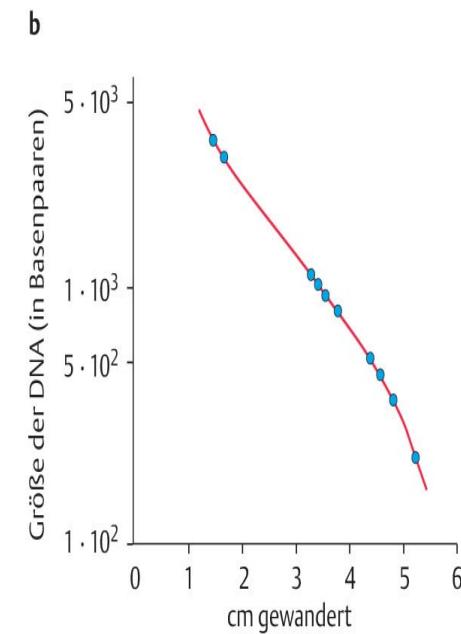
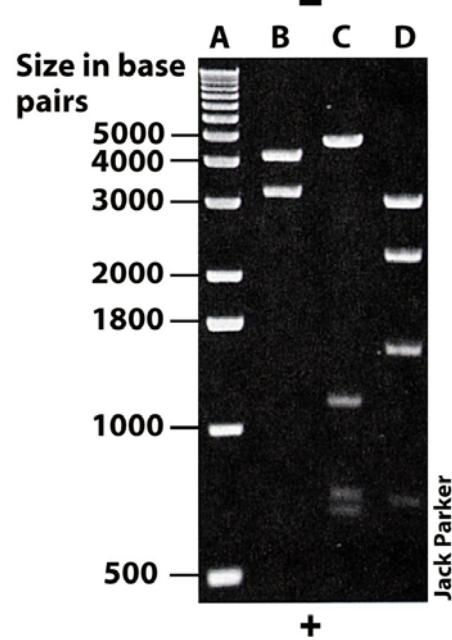


Figure 7-22b Brock Biology of Microorganisms 11/e

