

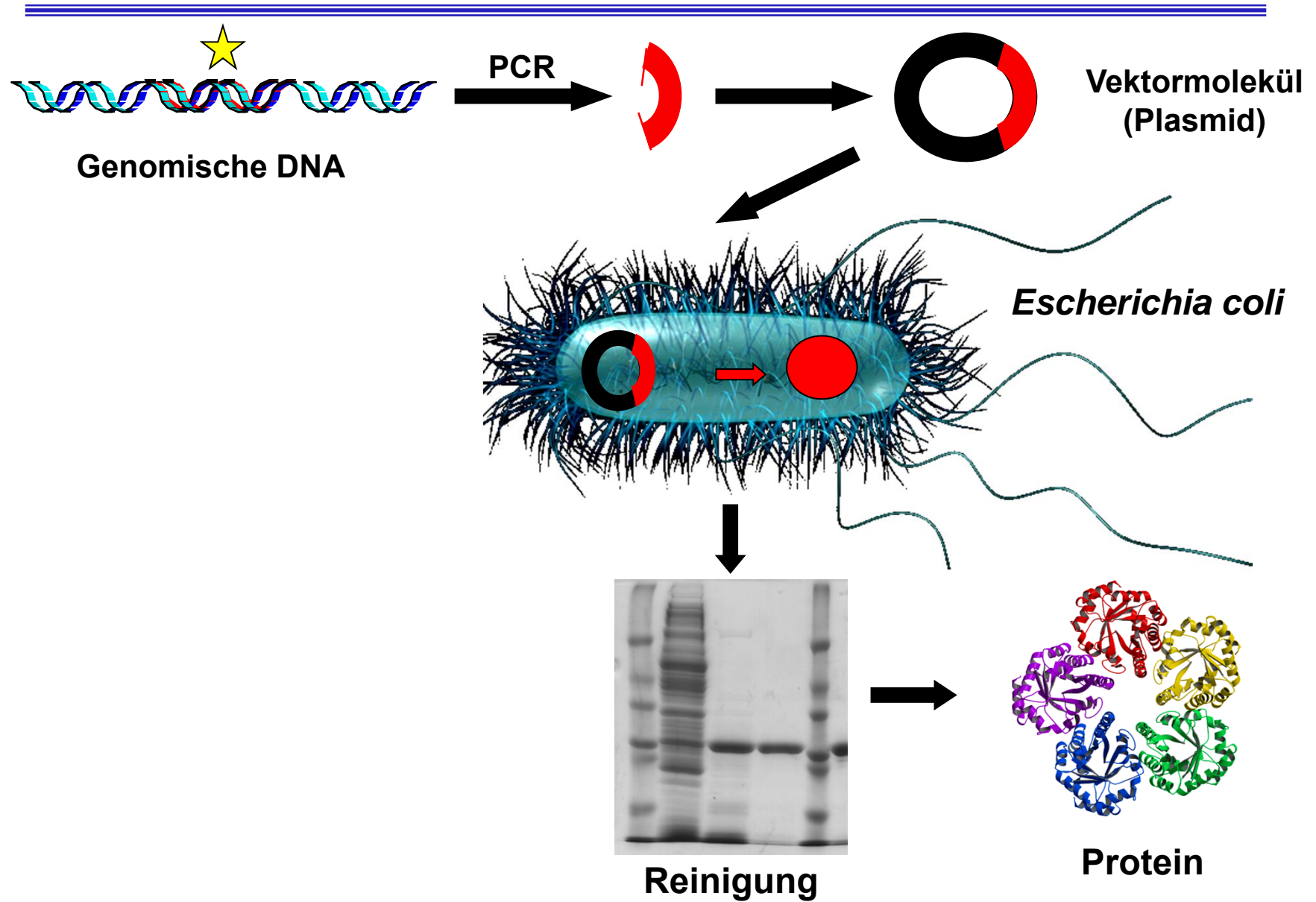
# Praktikum Biochemie

„Biotechnologie“

(Molekularbiologie & Biochemie)

Bettina Siebers

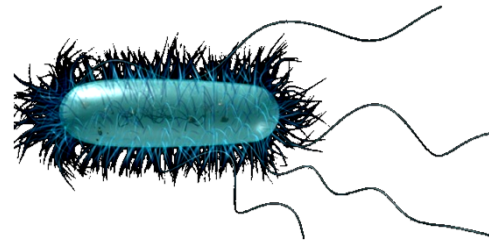
# Protein Expression



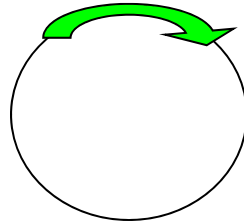
# Transformation des Expressionsstammes

---

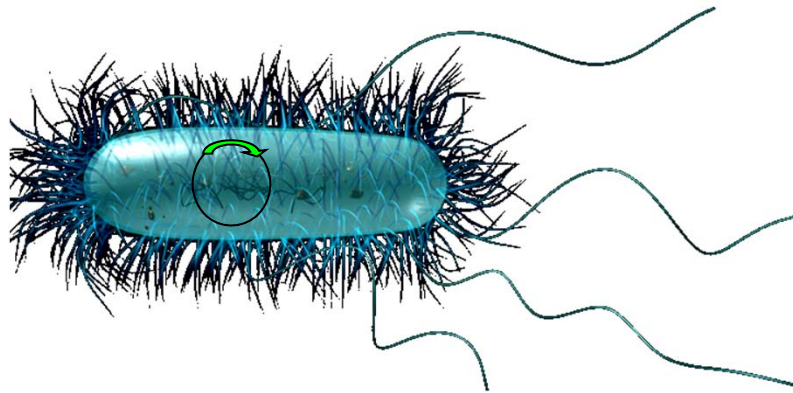
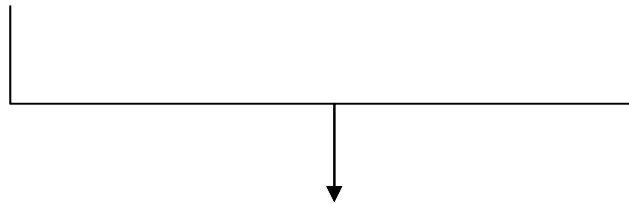
---



*E. coli* BL21 (DE3)



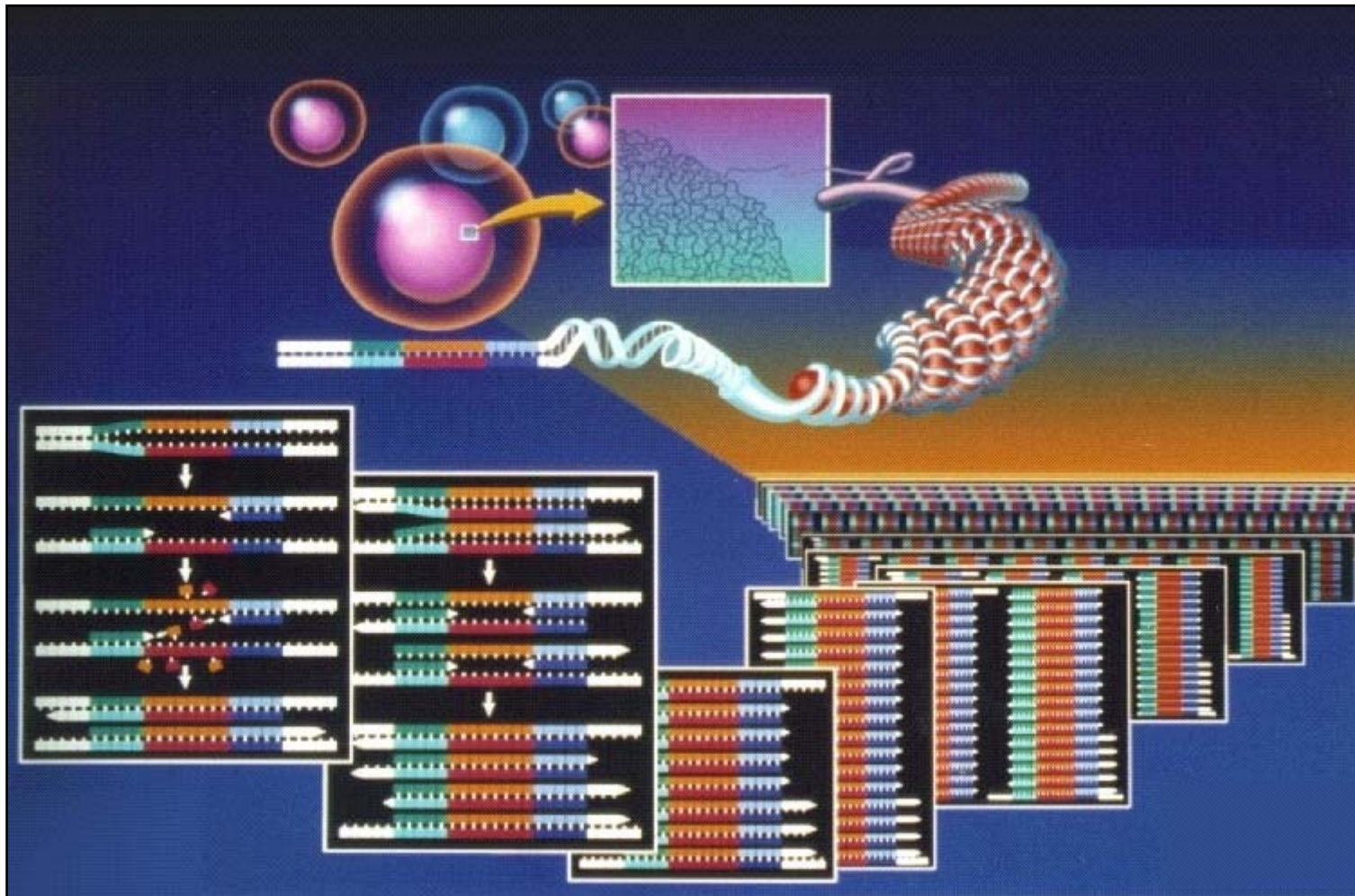
pET19b::*EstCE*



# Kolonie-PCR

## Polymerase Chain Reaction

---

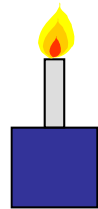




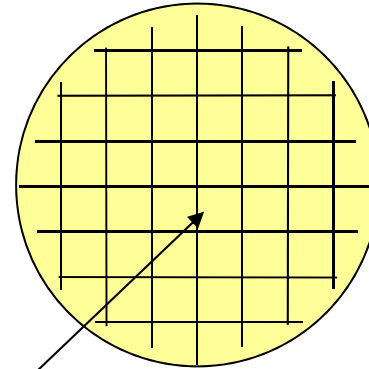
# Picken der Klone



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

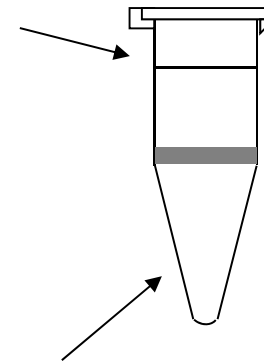


In der Nähe des **Bunsenbrenners** arbeiten



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

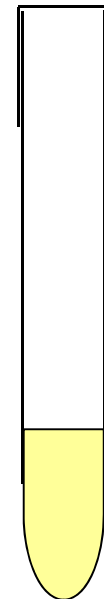
Kolonie-PCR



Plasmid Präparation



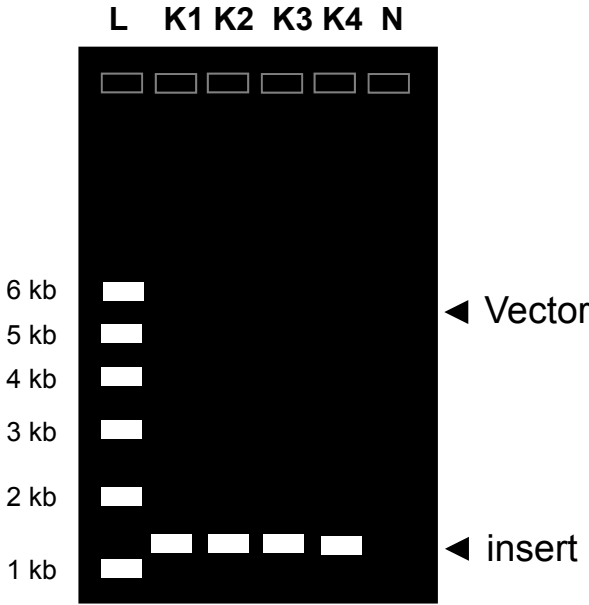
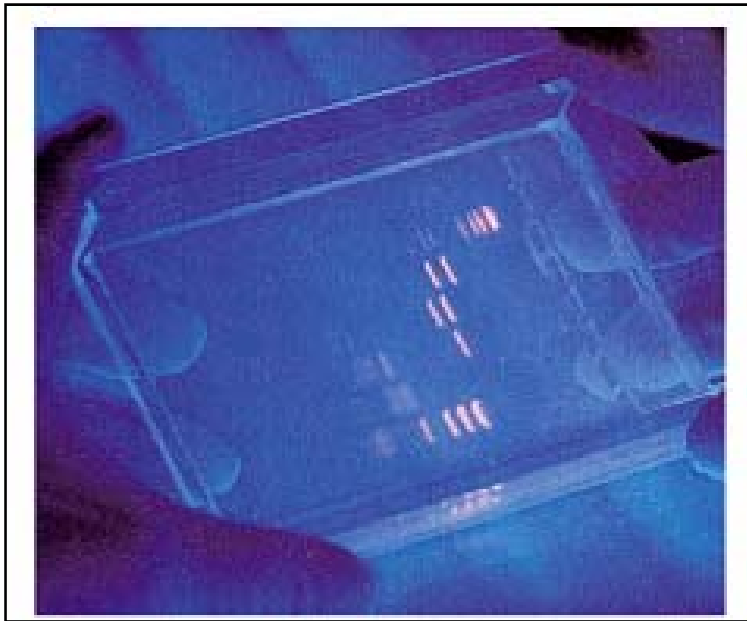
Vorkultur Expression



# Kolonie-PCR

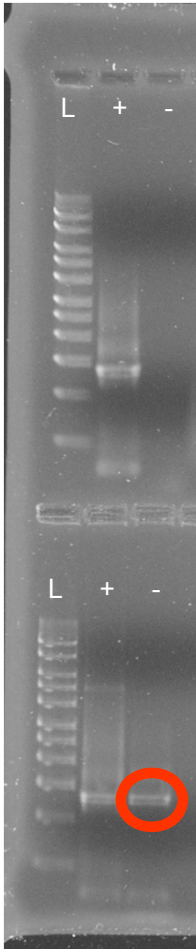
---

---



# PCR

---

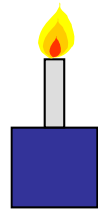


- Negativ Kontrolle mit allen Komponenten außer „template“ DNA.
- Bande in der negativ Kontrolle:
  - Ausversehen DNA in der negativ Kontrolle
  - Pipettierfehler beim Beladen des Gels
  - Kontamination einer der PCR Komponenten mit DNA

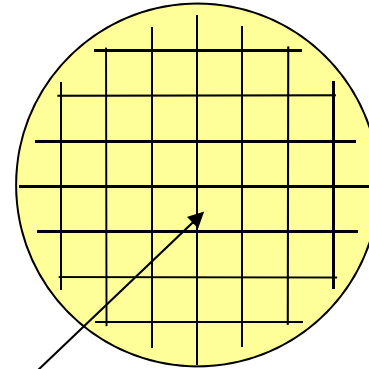
# Picken der Klone



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

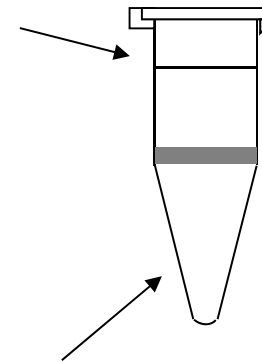


In der Nähe des **Bunsenbrenners** arbeiten



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

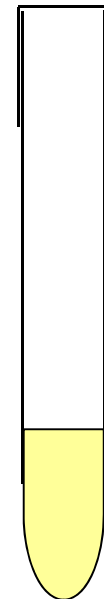
Kolonie-PCR



Plasmid Präparation



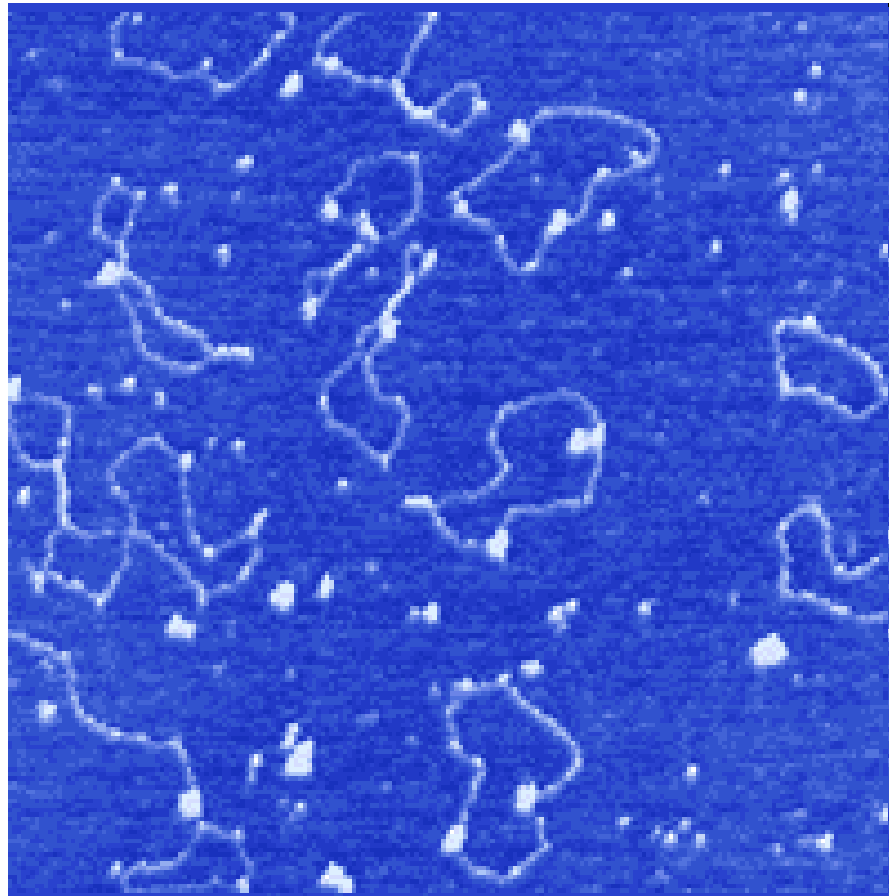
Vorkultur Expression





# Plasmidpräparation & Restriktion

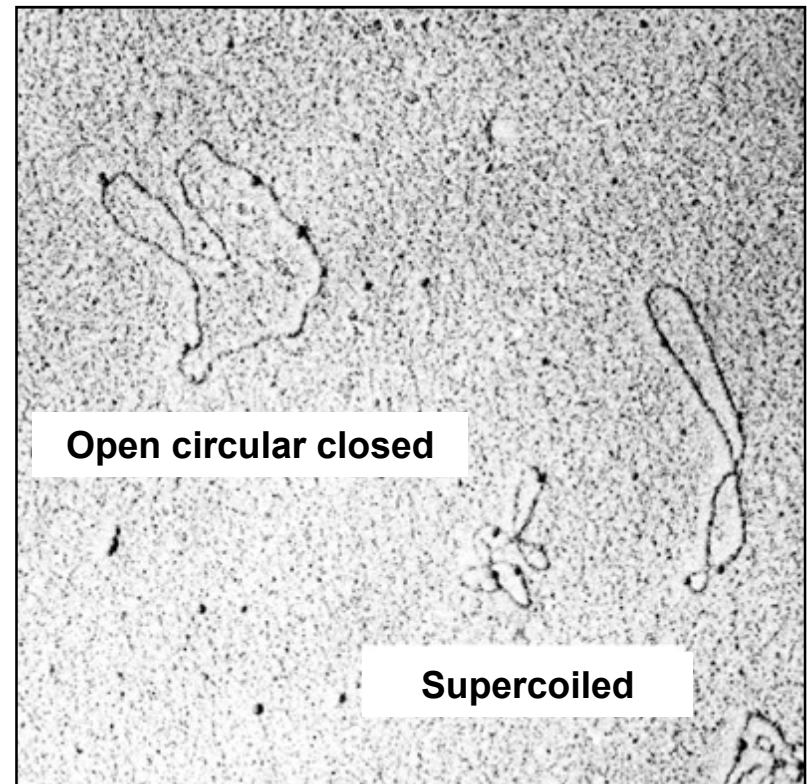
---



# Vektoren: Plasmide

---

- Extrachromosomale genetische Elemente
- meist zirkulär, doppelsträngig
- variable Größe
- variable Kopienzahl in der Zelle
- kann unabhängig in der Zelle replizieren
- für die Replikation origin of replication (*ori*) essentiell

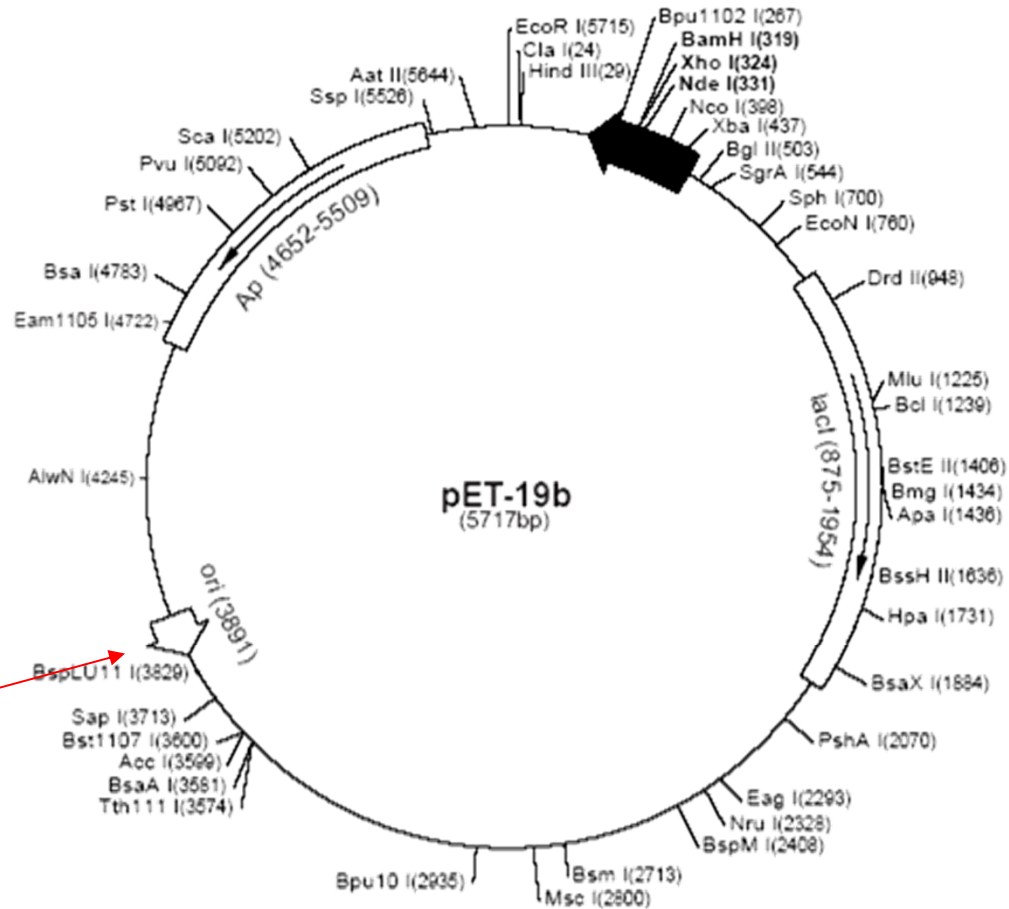


# Expressionsvektor: pET19b

## pET-19b sequence landmarks

T7 promoter	472-488
T7 transcription start	471
His•Tag coding sequence	366-395
Multiple cloning sites ( <i>Nde</i> I - <i>Bam</i> H I)	319-335
T7 terminator	213-259
<i>lacI</i> coding sequence	875-1954
pBR322 origin	3891
<i>bla</i> coding sequence	4652-5509

Origin of replication



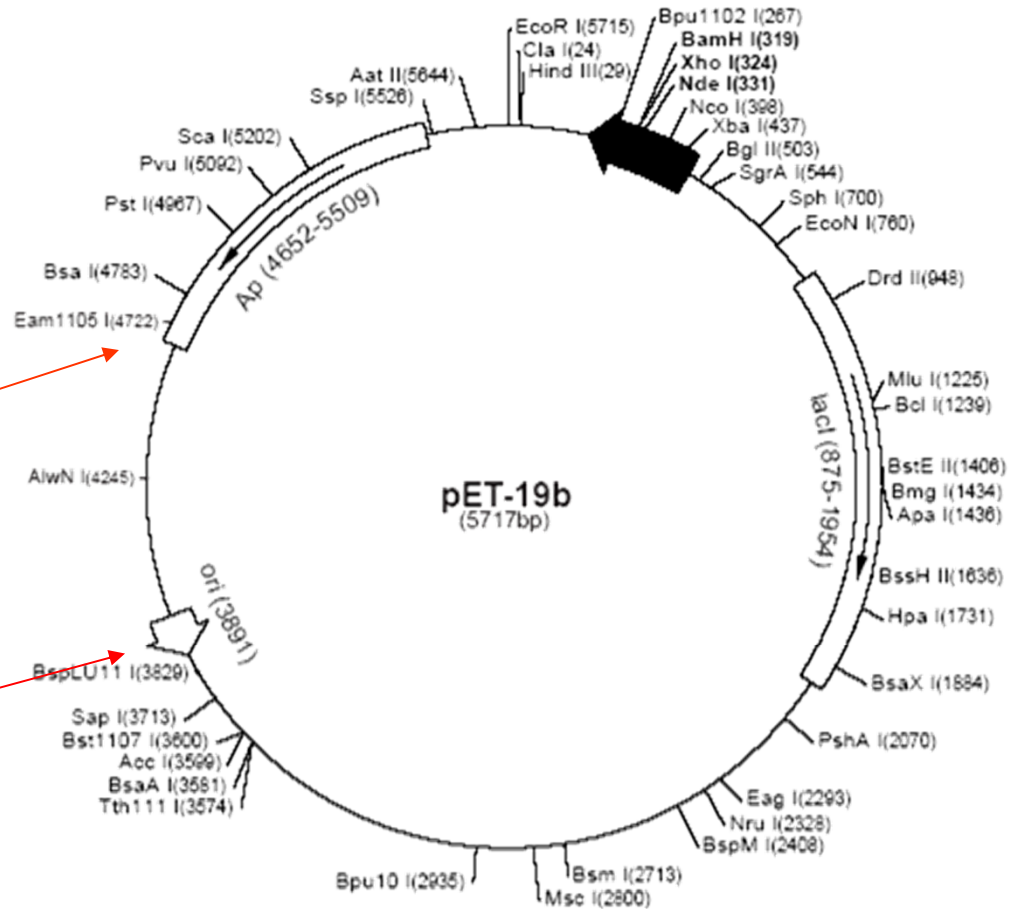
# Expressionsvektor: pET19b

## pET-19b sequence landmarks

T7 promoter	472-488
T7 transcription start	471
His•Tag coding sequence	366-395
Multiple cloning sites ( <i>Nde</i> I - <i>Bam</i> H I)	319-335
T7 terminator	213-259
<i>lacI</i> coding sequence	875-1954
pBR322 origin	3891
<i>bla</i> coding sequence	4652-5509

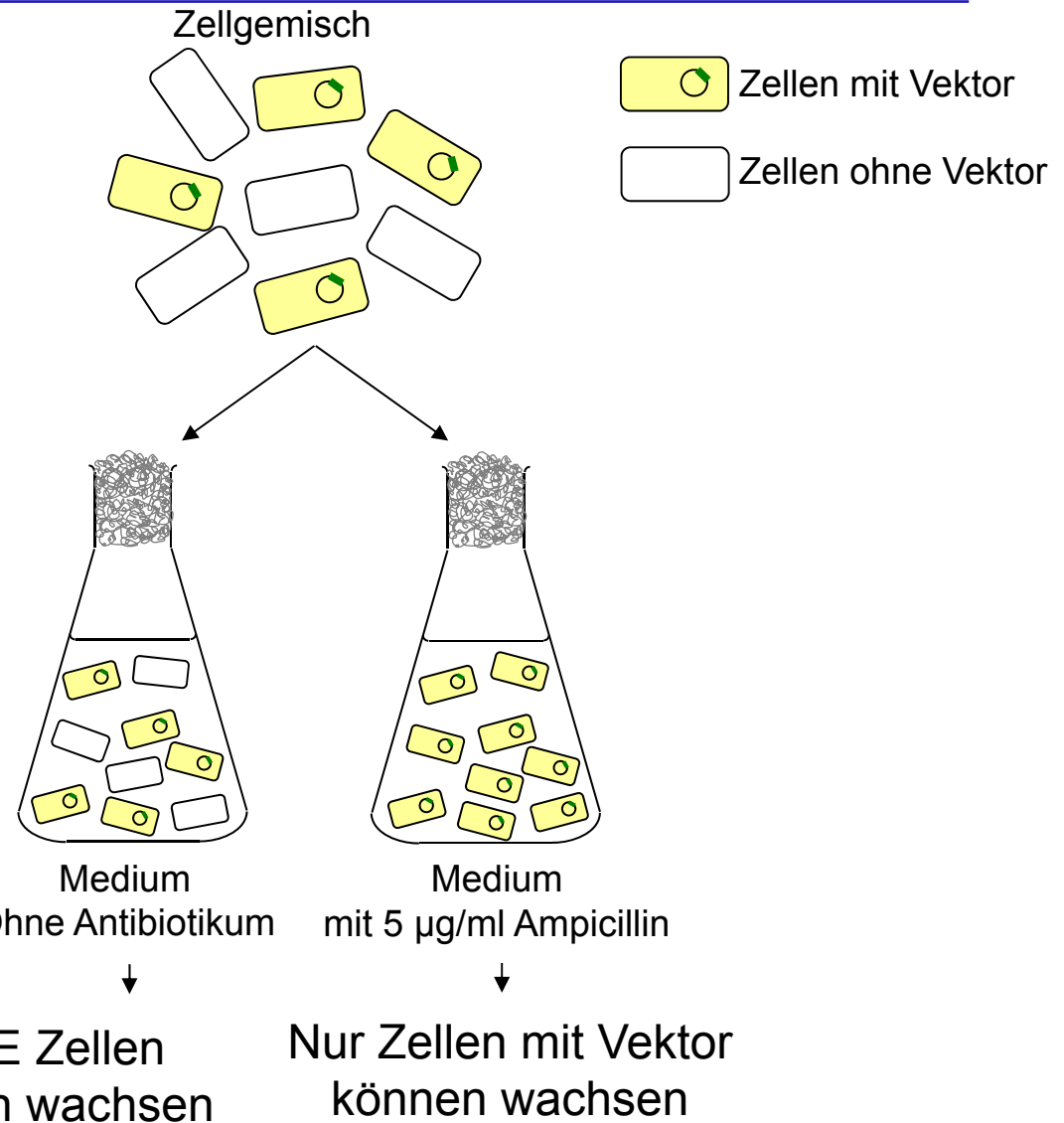
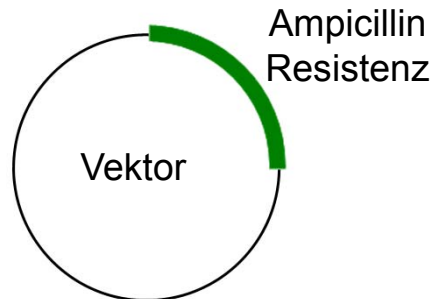
Ampicillin Resistenz

Origin of replication



# Vektoren: Plasmide

- Genetische Marker in Vektorsequenzen:
  - Antibiotikaresistenzen

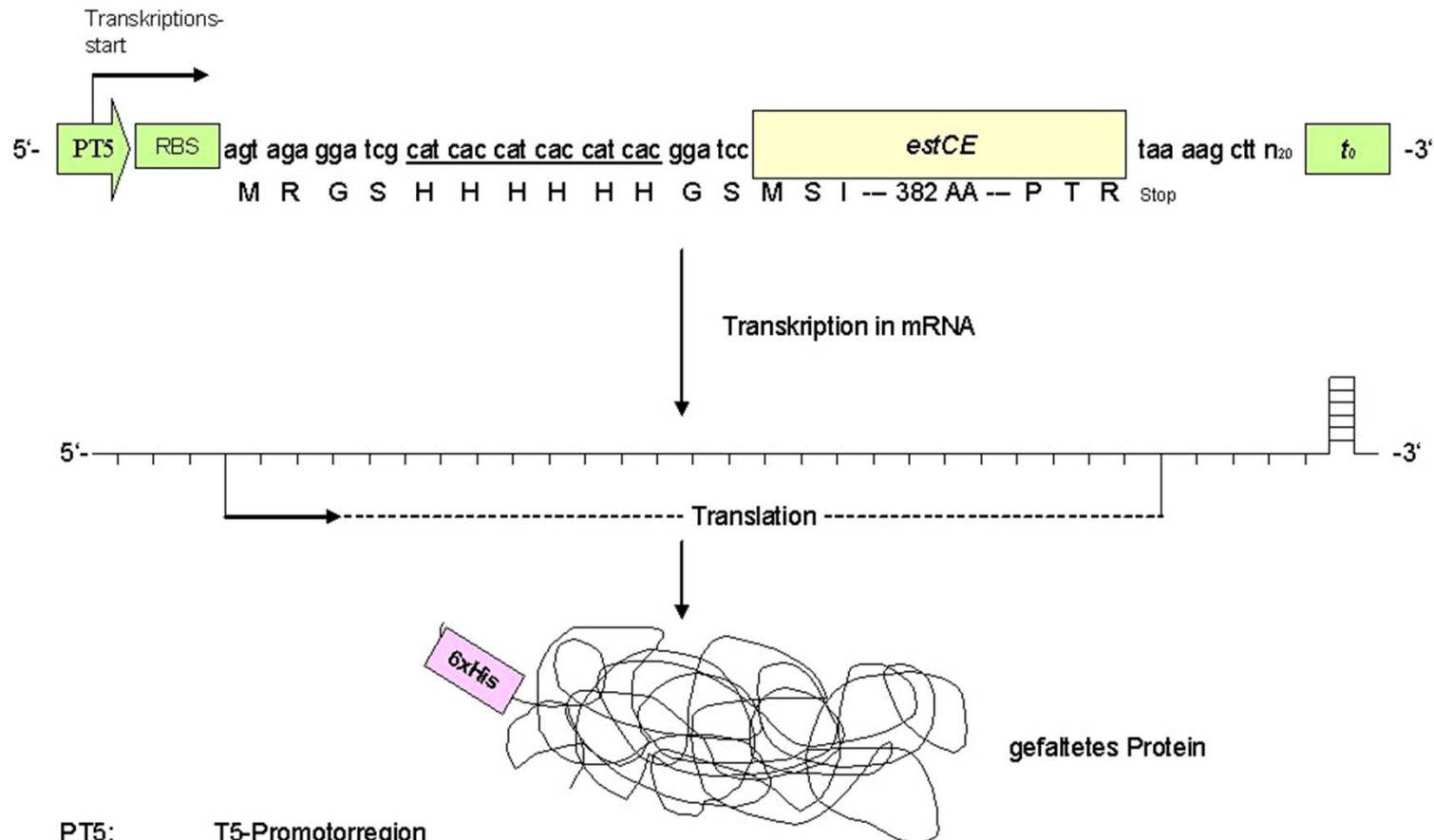








# N-terminaler His-Tag



PT5: T5-Promotorregion  
RBS: Ribosomenbindestelle  
t<sub>0</sub>: Terminatorregion

- Der His-tag hat keinen Einfluss auf die Aktivität des Proteins



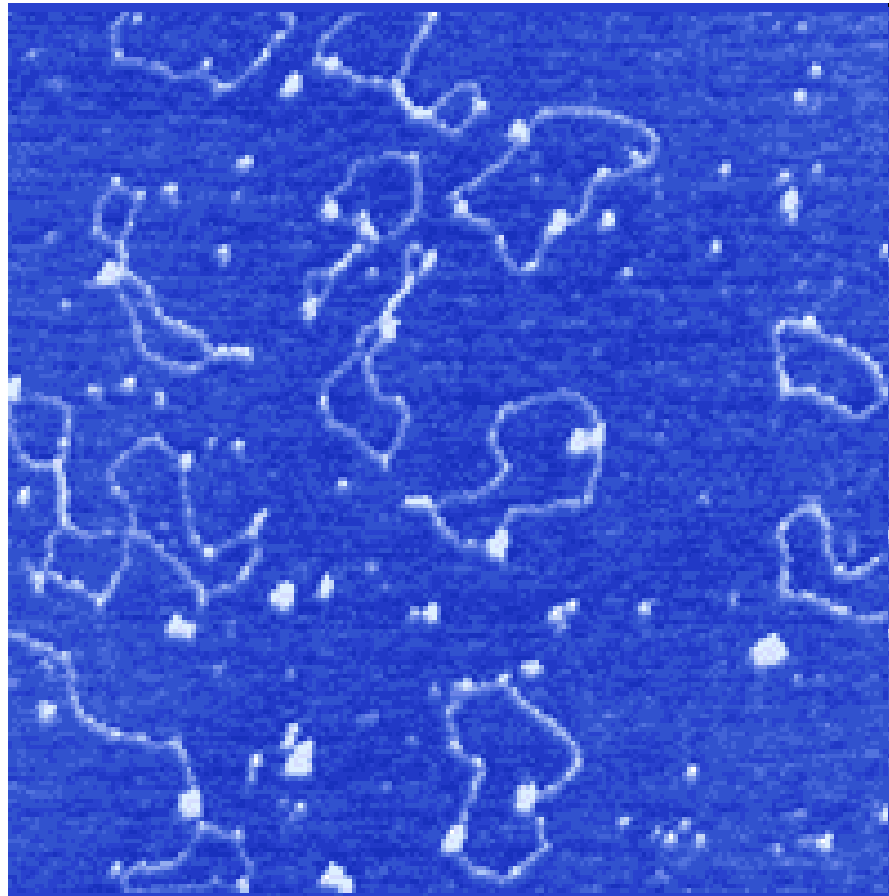
# Expression Vector

---

- Antibiotic resistance
- Origin of replication (ori)
- Multiple cloning site (MCP)
- Inducible Promoter (T7 Polymerase)
- Ribosome binding site (rbs, Translation)
- Terminator
- Tag for purification (e.g. histidine tag)

# Plasmidpräparation & Restriktion

---



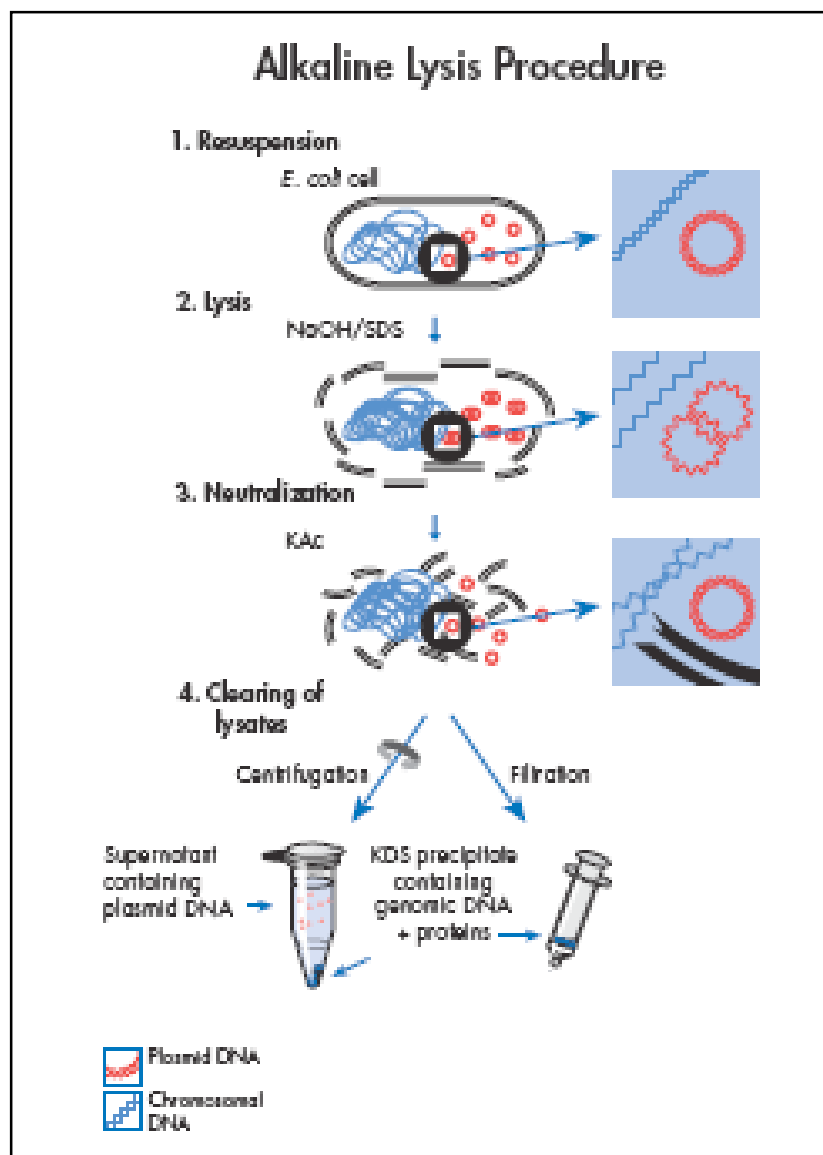
# Plasmid Isolierung

---

- das Plasmid wurde in wachsenden *Escherichia coli* Zellen vermehrt
- Plasmidisolierung nach dem Prinzip der **alkalischen Lyse**:
  - Grundlage: Plasmid DNA mit geschlossener, zirkulärer Struktur
  - Genau wie chromosomale DNA denaturiert die Plasmid-DNA unter alkalischen Bedingungen.
  - Im Ggs. Zu chromosomaler DNA kann Plasmid-DNA bei Neutralisation renaturieren



# Principle of alkaline lysis



## P1 Resuspension

10 mM Tris-HCl

1 mM EDTA (Inhibition of nucleases, destabilization of outer membrane)

20  $\mu\text{g/ml}$  RNase (digestion of RNA)

## P2 Lysis

0.2 M NaOH (denaturation of DNA, hydrolysis of cell wall)

1% SDS (w/v) (protein denaturation, membrane solubilization)

## P3 Neutralization

(2.55 M  $\text{KAc}^-$ )

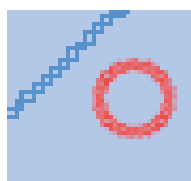
(neutralization, KDS precipitates)

# Plasmidpräparation

## Alkaline Lysis Procedure

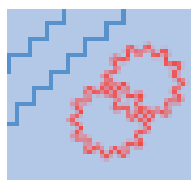
### 1. Resuspension

*E. coli* cell



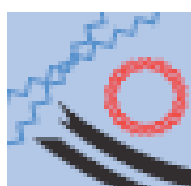
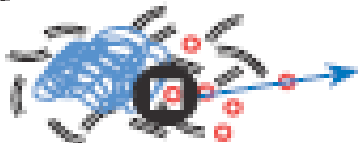
### 2. Lysis

NaOH/SDS



### 3. Neutralization

KAc



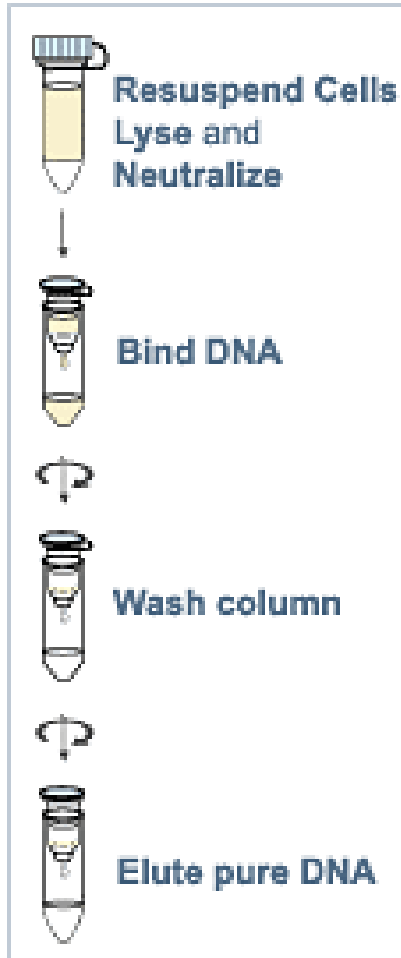
### 4. Clearing of lysates



- 1,5 ml der Übernachtskultur in 2 ml Eppendorf Cup
- 2 min zentrifugieren (13.000 rpm, RT), Überstand verwerfen (2 x wdh.)
- Resuspendieren des Zellpellets in 250 µl Resuspensions-Puffer (TE Puffer + RNase A)
- Zugabe von 250 µl Lysis-Puffer (NaOH, SDS) mischen; **Zell-Lyse** (invertieren, nicht vortexen)
- Zugabe von 350 µl Neutralisationspuffer (KAc<sup>-</sup>) mischen (nicht vortexen!); **Neutralisation** (invertieren, nicht vortexen)
- 5 min bei 13000 rpm zentrifugieren
- Überführung des Überstandes in ein neues 1.5 ml Eppendorf Cup

# Reinigung der Plasmid DNA

---



- **Binden der DNA** an die Silikamatrix der Säule: Überführen des Überstandes auf die Säule; 1 min zentrifugieren, 13.000 rpm, RT (Durchlauf verwerfen)
- **Waschen:** 500 µl Waschpuffer auf die Säule geben; 1 min zentrifugieren, 13.000 rpm, RT (Durchlauf verwerfen); Waschschrift wiederholen
- 2 min „trocken“ zentrifugieren, 13.000 rpm, RT
- **Elution:** Säule in neues Cap überführen, 30 µl H<sub>2</sub>O zur Elution auf die Säule geben, 1 min inkubieren, RT; 1 min zentrifugieren, 13.000 rpm, RT; Säule verwerfen

# Restriktionsenzyme

- Restriktionsendonukleasen
- In Prokaryonten weit verbreitet
- Wichtige Werkzeuge der Molekularbiologie
- Type II Enzyme erkennen Sequenzen mit doppelter Symmetrie „**Palindrome**“ (beide DNA Stränge haben die gleiche Sequenz von links bzw. von rechts gelesen)

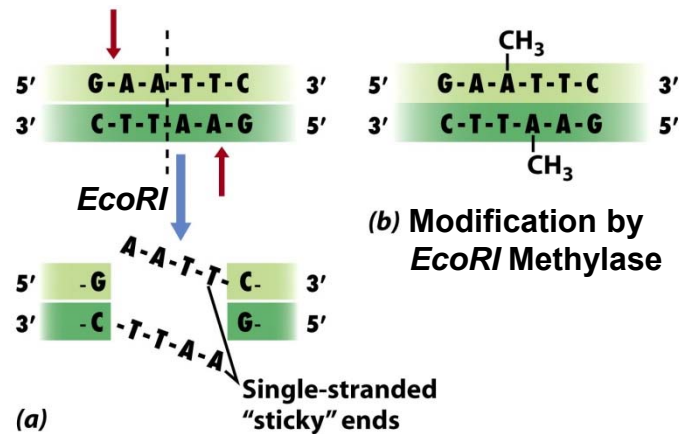


Figure 7-21 Brock Biology of Microorganisms 11/e  
© 2006 Pearson Prentice Hall, Inc.

- Funktion:
  - Schutz vor Aufnahme von Fremd-DNA
  - die Zelle schützt ihre eigene DNA vor Abbau durch Modifikations-Systeme (typischer Weise durch Methylierung, z.B. *EcoRI* Methylase)

**Table 7.4** Recognition sequences of a few restriction endonucleases

Organism	Enzyme designation <sup>a</sup>	Recognition sequence <sup>b</sup>
<i>Bacillus globigii</i>	<i>Bgl</i> III	A↓GATCT
<i>Bacillus subtilis</i>	<i>Bsu</i> RI	GG↓CC
<i>Brevibacterium albidum</i>	<i>Bal</i> I	TGG↓CCA
<i>Escherichia coli</i>	<i>Eco</i> RI	G↓AATTC <sup>c</sup>
<i>Haemophilus haemolyticus</i>	<i>Hha</i> I	GCG↓C
<i>Haemophilus influenzae</i>	<i>Hind</i> II	GTPy↓PuAC
<i>Haemophilus influenzae</i>	<i>Hind</i> III	A↓AGCTT
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	<i>Kpn</i> I	GGTAC↓C
<i>Nocardia otitidiscaviarum</i>	<i>Not</i> I	GC↓GGCCGC
<i>Proteus vulgaris</i>	<i>Pvu</i> I	CGAT↓CG
<i>Serratia marcescens</i>	<i>Sma</i> I	CCC↓GGG
<i>Thermus aquaticus</i>	<i>Taq</i> I	T↓CGA

<sup>a</sup> Nomenclature: The first letter of the three letter abbreviation of a restriction endonuclease designates the genus from which the enzyme originates, the second two letters, the species. The roman numeral designates the order of discovery of enzymes in that particular organism, and any additional letters are strain designations.

<sup>b</sup> Arrows indicate the sites of enzymatic attack. Asterisks indicate the site of methylation (modification). G, guanine; C, cytosine; A, adenine; T, thymine; Pu, any purine; Py, any pyrimidine. Only the 5' → 3' sequence is shown.

<sup>c</sup> See Figure 7.21a

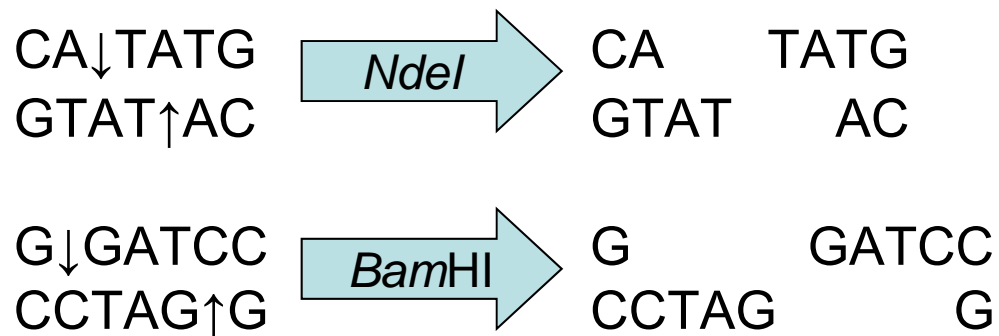
**Table 7-4** Brock Biology of Microorganisms 11/e  
© 2006 Pearson Prentice Hall, Inc.

# Plasmid Restriktion

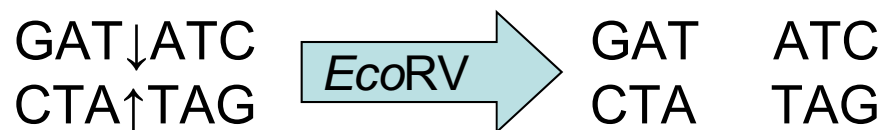
---

---

- **Restriktionsenzyme** erkennen und schneiden DNA spezifisch an kurzen Erkennungssequenzen
- ***NdeI*** und ***BamHI*** sind „sticky end cutter“, bilden Einzelstrangüberhänge



- ***EcoRV*** ist ein „blunt end cutter“ bildet glatte Enden ohne Einzelstrangüberhänge.



# Restriktionsanalyse

---

- 4.0  $\mu$ l Plasmid-DNA
  - 2.0  $\mu$ l 10xRestriktions Puffer (FastDigest)
  - 0.5  $\mu$ l BamHI Restriktions-Enzym (FastDigest)
  - 0.5  $\mu$ l NdeI Restriktions-Enzym (FastDigest)
  - 13.0  $\mu$ l Aqua bidest
- Vorsichtig mischen und kurz an zentrifugieren
  - Inkubation für 10 Min bei 37°C
  - Abstoppen der Enzymreaktion durch 10-minütige Inkubation bei 70°C
  - Die Proben können direkt mittels **Agarose-Gelelektrophorese** analysiert werden (10  $\mu$ l auftragen, der Puffer enthält bereits den loading Dye)



# Agarose Gelelektrophorese

---

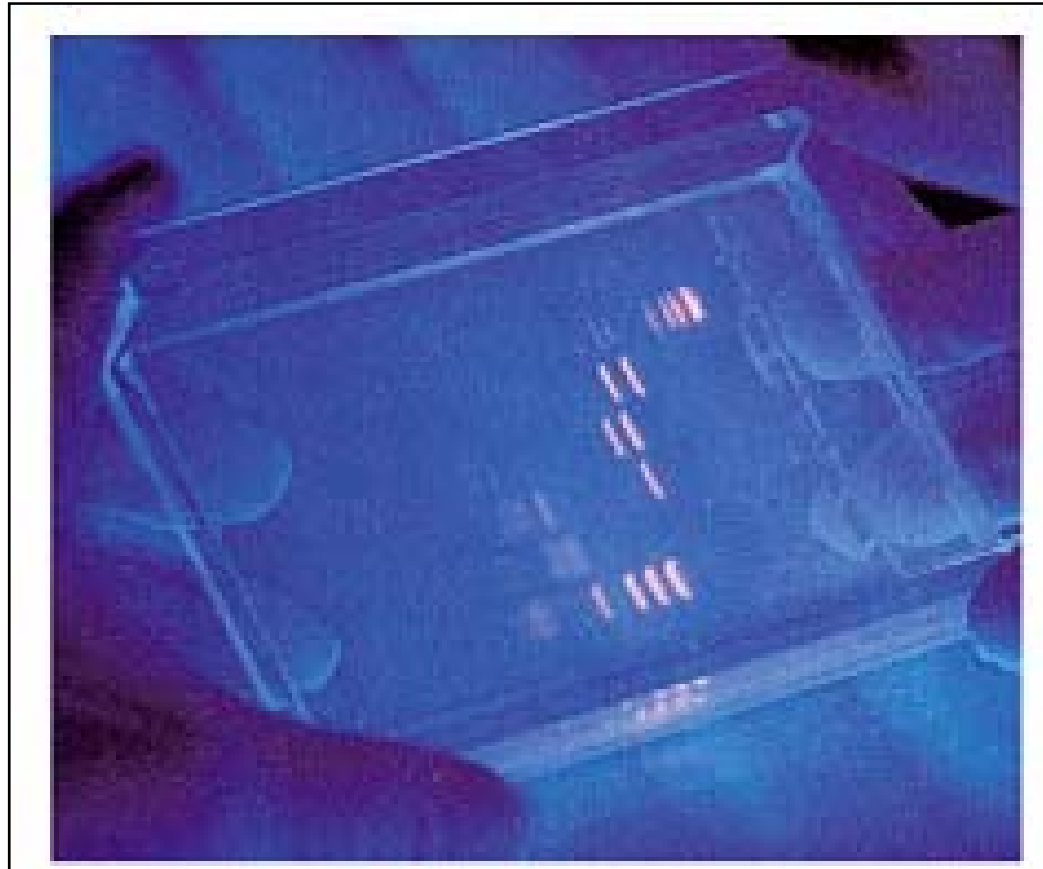


FIGURE 20.9c Biology 6/e

# *NdeI/BamHI* Restriktionsanalyse

