

SCHNUPPERKURS GENTECHNIK

1

ExploHeidelberg

2

Klonierung des Phagen Lambda






3

GFP – green fluorescent protein

4

Gens in a bottle

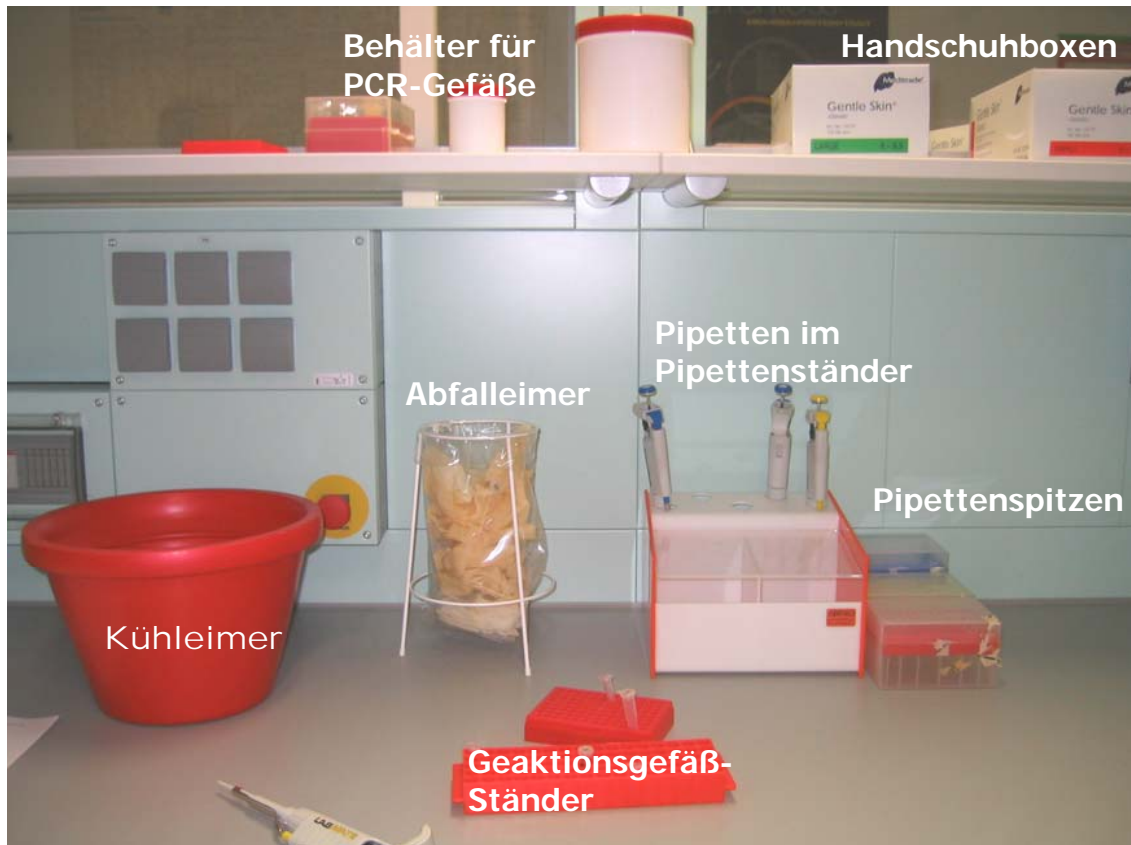


-  Stiftung Jugend und Wissenschaft GmbH
-  Technologiepark auf dem Neuenheimer Feld
-  Explo Lernlabor
 -  ganztägigen Praktika
 -  mehrtägige Schnupperkurse

Schutzmaßnahmen

- ■ Sicherheitsstufe 1:
„Es ist nach den neusten Erkenntnissen nicht von einer Gefährdung der Gesundheit auszugehen.“
- ■ Tragen von Handschuhen und Laborkitteln innerhalb des Laborbereiches Pflicht
- ■ Desinfizieren der Hände nach Verlassen

Das Labor



Laborgeräte



Vortexer (Mischen von Reagenzien)



Thermocycler

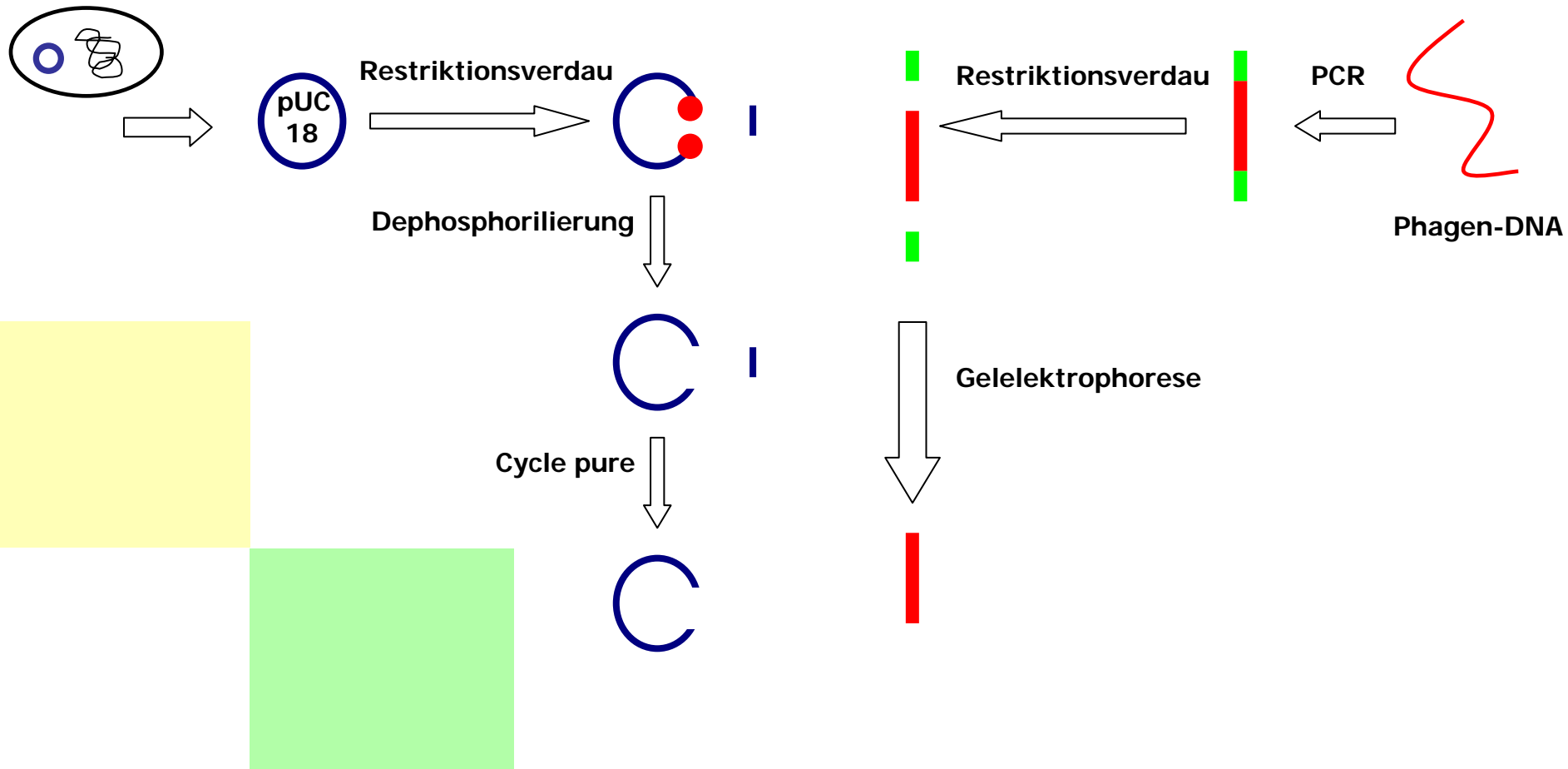


Zentrifuge

2

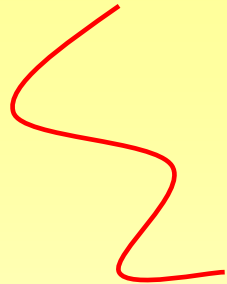
Klonierung eines Lambda-Gens in Vector pUC18

Versuchsübersicht – Teil 1



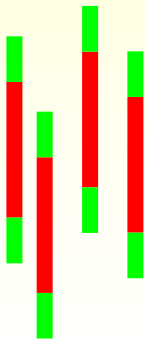
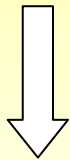
2

Klonierung eines Lambda-Gens in Vector pUC18



Phagen-DNA

PCR



PCR (Polymerase chain reaction)

Reagenzien: Wasser, DNA, Primer, PCR- Master-Mix

Schritt	Temperatur	Dauer	Was passiert?
„ Precycle “ (Denaturierung)	94°C	1 min	Die beiden Stränge der DNA werden getrennt. (zugänglich für Primer)
„ Annealing “ Anlagerung der Primer	61°C	30 sec	Primer lagern sich an die DNA Stränge an.
„ Elongation “ (DNA-Synthese)	72°C	1:20 min	Taq-Polymerase beginnt mit der Synthese der neuen Stränge.
„ Postcycle “	72°C	5 min	Eventuell unvollständige Kopien werden aufgefüllt.

2

Klonierung eines Lambda-Gens in Vector pUC18

Plasmid Minipräp – Plasmid-DNA aus einer Bakterienkultur isolieren und reinigen

■ Durch Abzentrifugieren entsteht ein Bakterienpellet

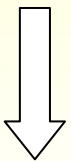
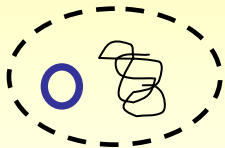
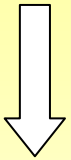
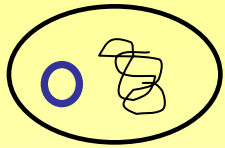
■ Eine weitere Reagenz lässt die Zellen kompetent werden

■ Erneutes Abzentrifugieren lässt die leeren Bakterienhüllen auf den Boden sinken

■ Auftragen auf Minipräp-Zentrifugensäule

■ DNA haftet an dem Filter der Säule

■ DNA mit sterilem Wasser von Säule lösen



2

Klonierung eines Lambda-Gens in Vector pUC18

Agarose Gelelektrophorese

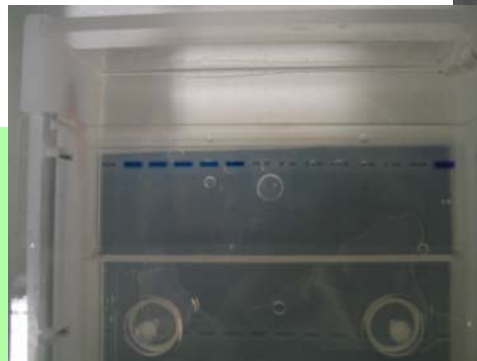
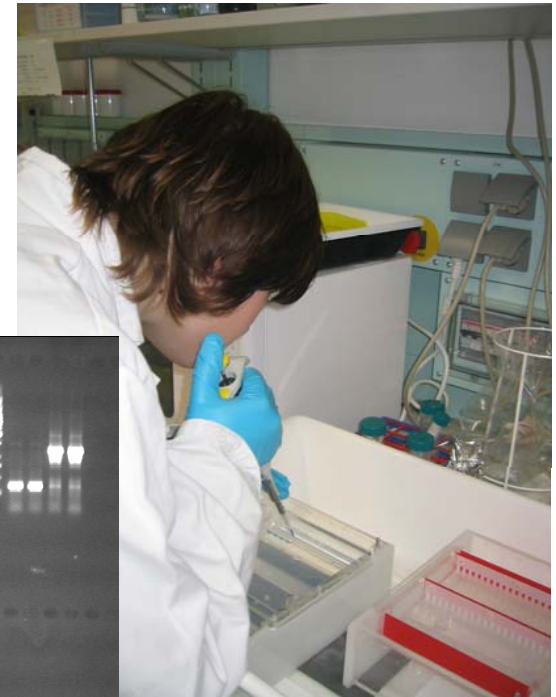
- ■ Agarose + Puffer + Ethidium-Bromit
- ■ Gel wird in vorbereitete Gelkammern gegossen.
- ■ Kämme werden in das noch flüssige Gel gesteckt
- ■ Wenn das Gel ausgehärtet ist:
 - ■ Herausziehen der Kämme
 - ■ Gel mit Pufferlösung überschichten



2

Klonierung eines Lambda-Gens in Vector pUC18

- Proben + Farbmarker werden in die Geltaschen gefüllt
- Das Gel wird bei 100V für 60 Min. „gefahren“.
- Auswertung des Gels am Floureszenzschirm.

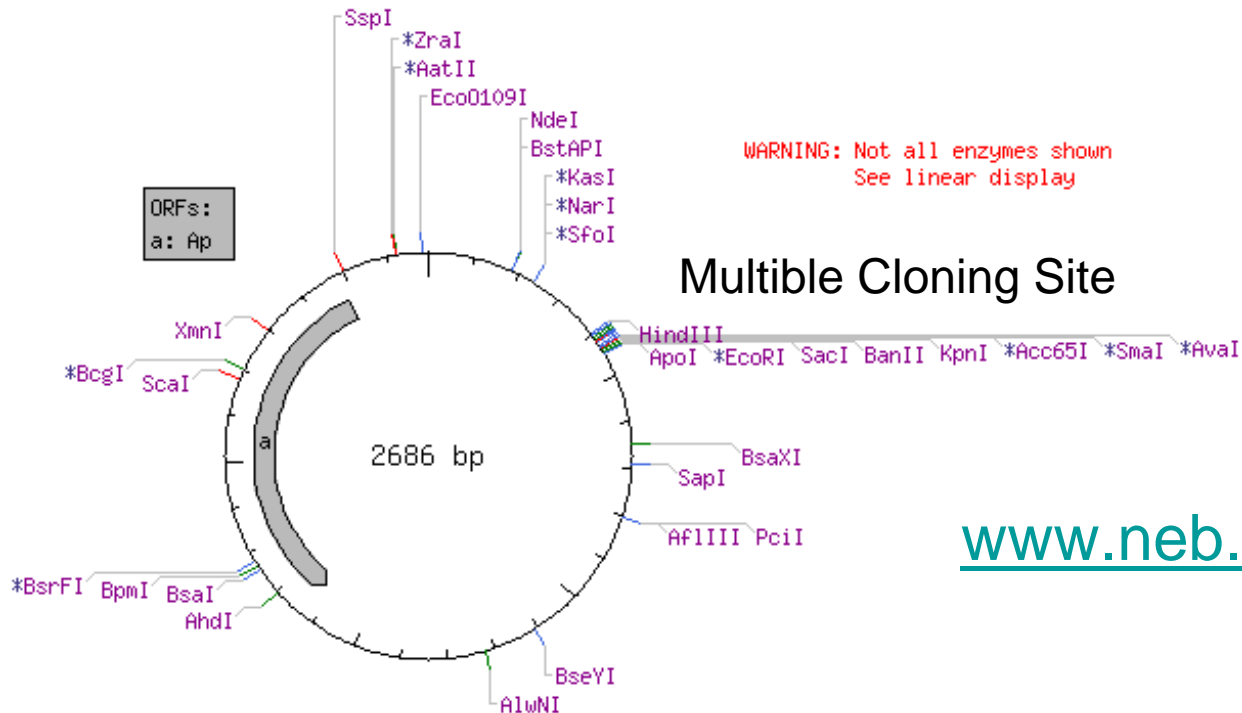


2

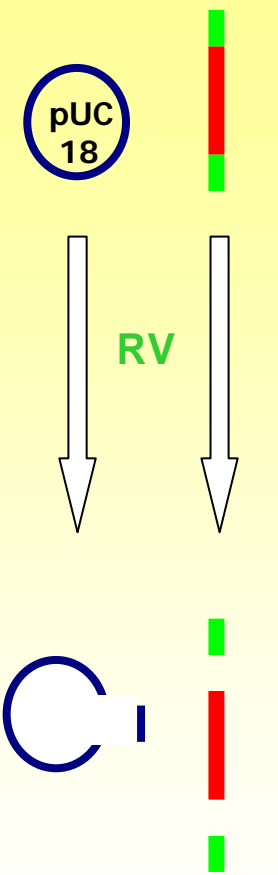
Klonierung eines Lambda-Gens in Vector pUC18

Restriktionsverdau

Restriktionsenzyme EcoR1 und Sal1



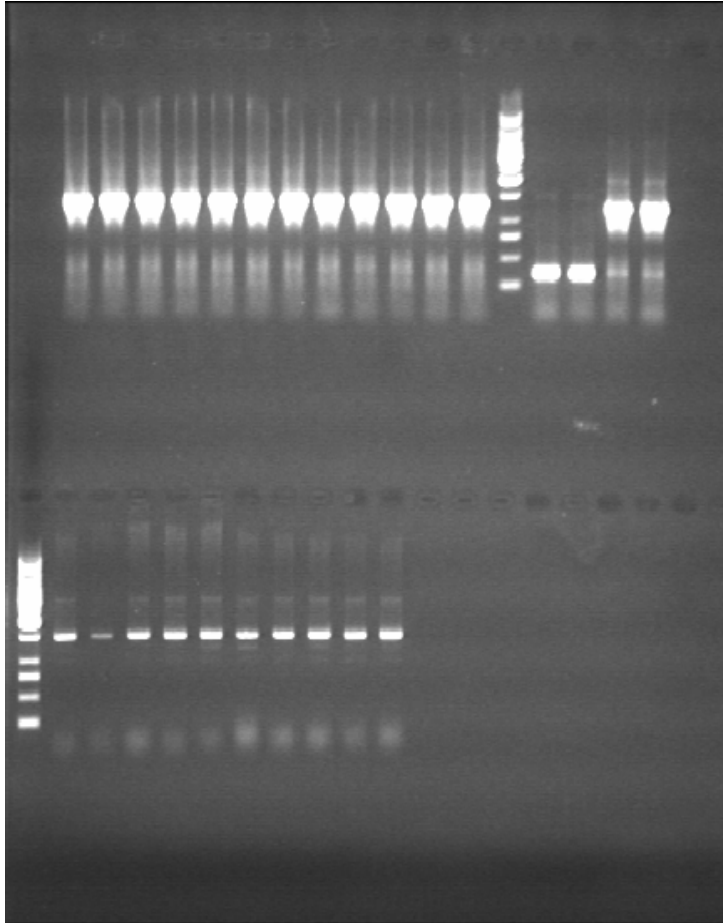
www.neb.com



2

Klonierung eines Lambda-Gens in Vector pUC18

PCR der
Lambda
DNA

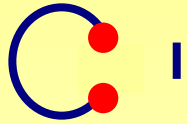


Restriktionsverdau der
einzelnen Proben war
erfolgreich

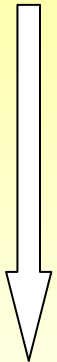
Ergebnisse Agarose
Gelelektrophorese

2

Klonierung eines Lambda-Gens in Vector pUC18



Cycle
Pure



Cycle Pure – Dephosphorylierung und Aufreinigung des geschnittenen Vektors



Entfernen von:

- Phosphat-Teilchen an den Enden der Vektor - DNA
- In der Lösung vorhandenen Enzymen
- Das durch Sal1 und EcoR1 herausgeschnittene Stück des Vektors

2

Klonierung eines Lambda-Gens in Vector pUC18

Gelextraktion des geschnittenen Lambda-Fragments

■ ■ Bande bei ca. 1000 BP wird aus dem Agarosegel ausgeschnitten → Isolierung des RecT Gens

■ ■ Agarose-Gel + Bindepuffer
bei 60°C lösen

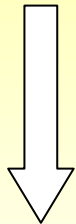
■ ■ DNA auf eine Zentrifugensäule laden

■ DNA waschen

■ DNA mit Wasser von Säule lösen



Gel-
extrak-
tion



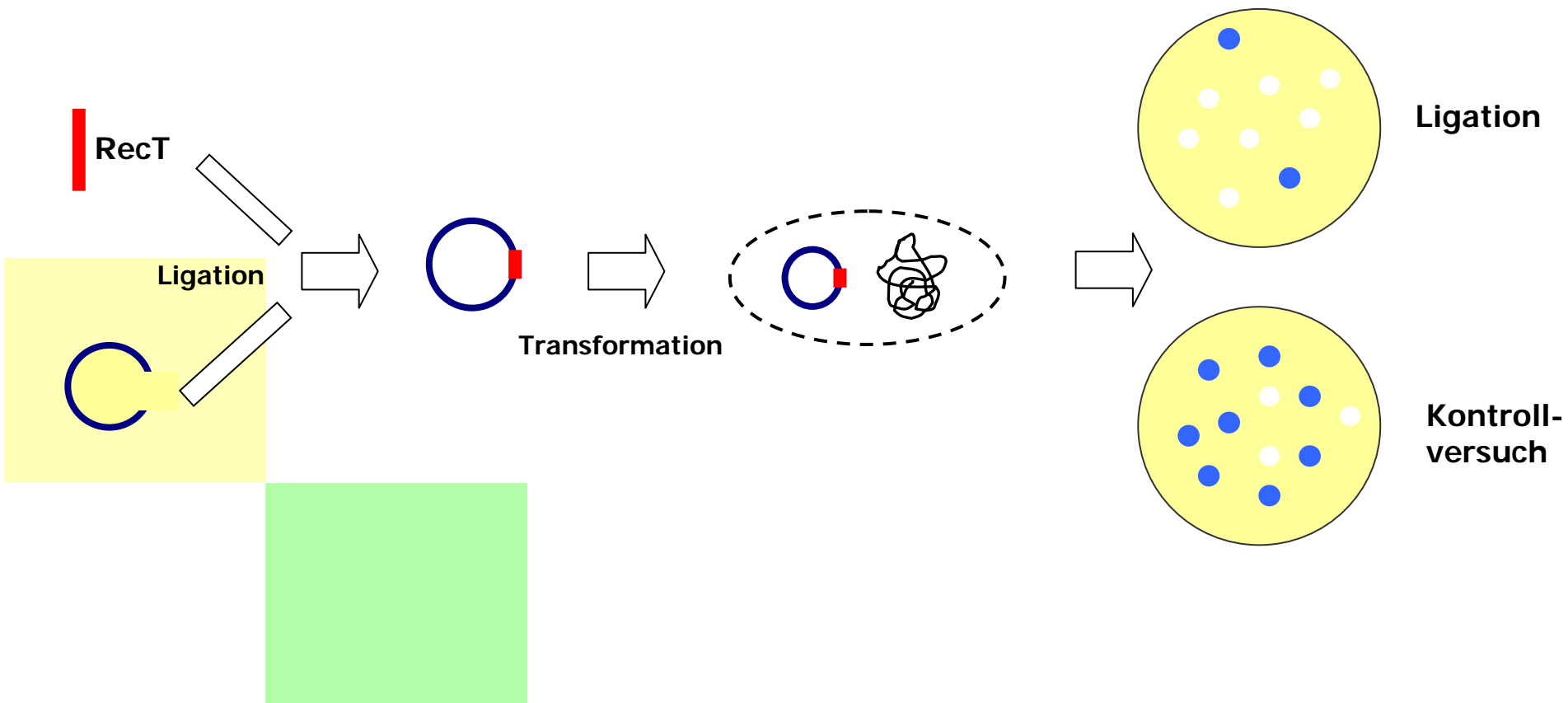
RecT



2

Klonierung eines Lambda-Gens in Vector pUC18

Versuchsübersicht – Teil 2

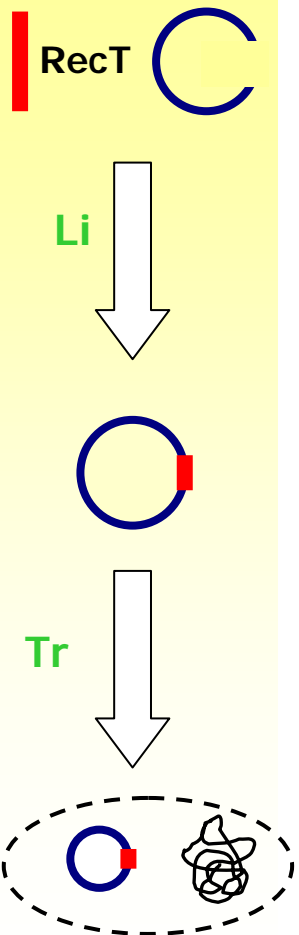


2

Klonierung eines Lambda-Gens in Vector pUC18

Ligation und Transformation

- Enzym Ligase → RecT wird mit dem geöffneten bakteriellen Expressionsvektor pUC18 verbunden
- Transformation kompetenter E-coli Zellen mit dem neukombinierten Vektor
 - Erhitzen der Zellen
 - Schnelles Abkühlen
- Um das Ergebnis zu überprüfen → Transformation ohne das neue Gen RecT

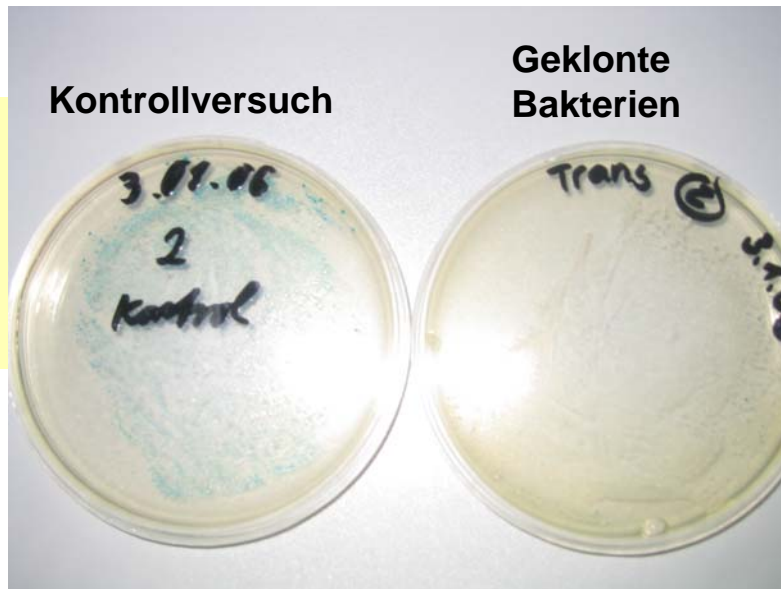


2

Klonierung eines Lambda-Gens in Vector pUC18

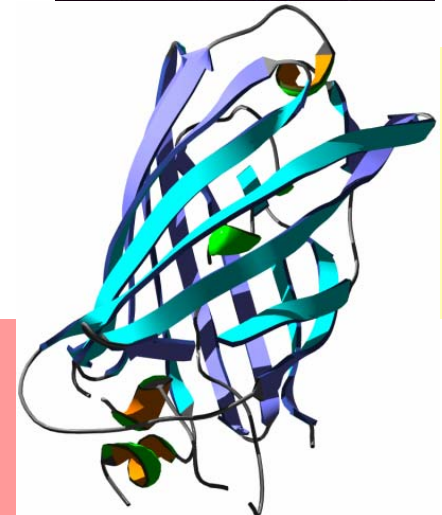
Aufbringen der Ansätze auf Nährböden

■ Nahe an einer Flamme arbeiten, um eine Keimbildung zu vermeiden.



GFP – Green fluorescent protein

- GFP ist ein grün fluoreszierendes Protein aus der Qualle *Aequorea Victoria*
- Keine Chromophoren (Licht absorbierende Atome) als Cofaktoren
- Reporter-Gen → Wo und zu welchem Zeitpunkt ist ein gewisses Gen aktiv
- Die Gen-Aktivität kann an lebenden Zellen untersucht werden



Affinitätschromatographie

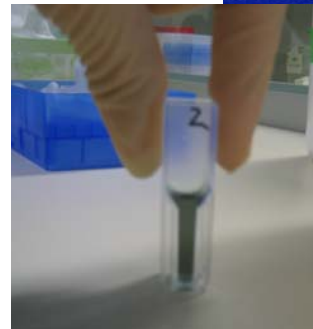
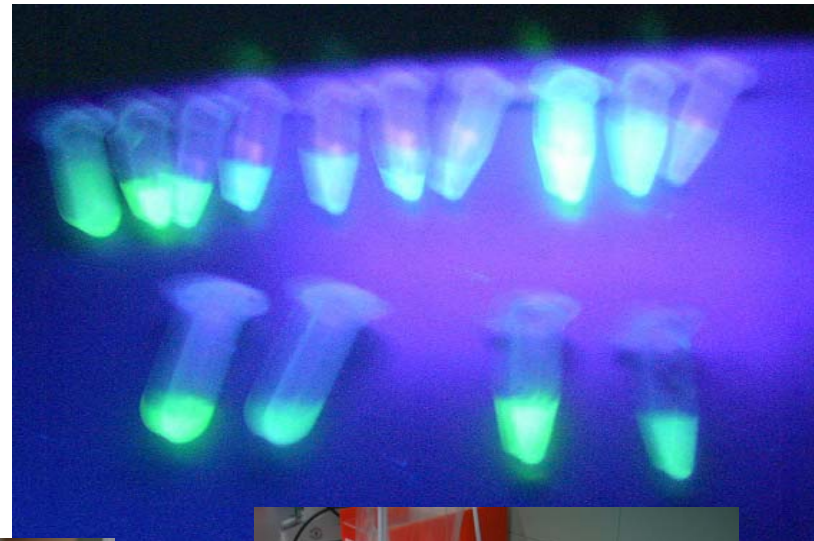
- Auftrennen eines Protein-Gemisches in seine einzelnen Komponenten
- Säulenchromatographie → Ni-NTA (nitriloacetic acid)
- Das GFP bindet an Nickelionen am Trägermembran
 - hohe Proteindichte am Trägermembran
 - Protein wird durch einen Elutionspuffer entfernt

3

GFP – green fluorescent protein

Bestimmung der Proteinkonzentration

- Abschätzen des GFP-Gehalts unseres Eluates unter UV Licht
- Eluat + Wasser + Biorad Protein Reagent in eine Küvette pipettieren
- Errechnen des GFP-Gehalts

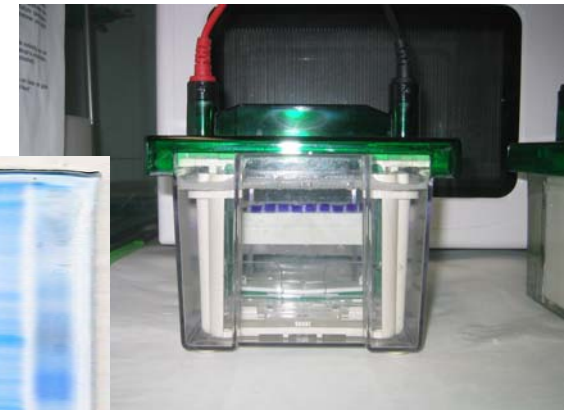
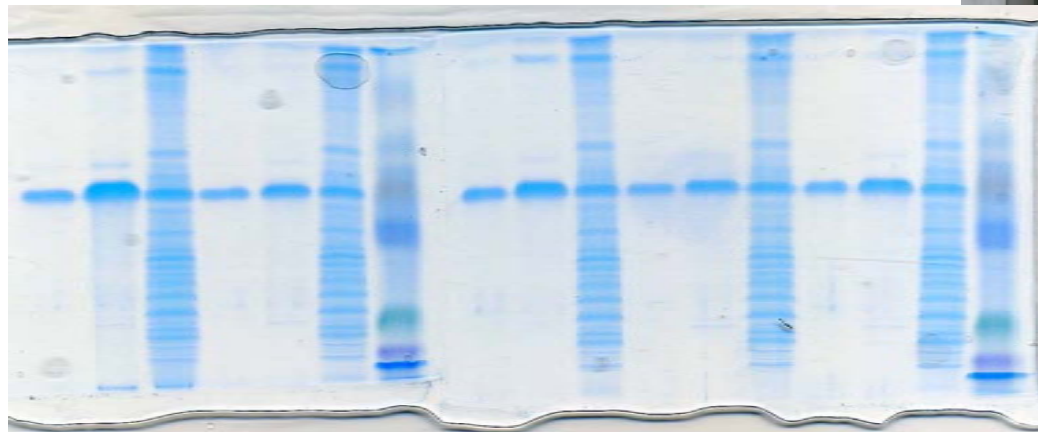


3

GFP – green fluorescent protein

Polyacrylamidgelelektrophorese

- ■ Standart-Experiment um Proteine nach ihrer Größe aufzutrennen
- ■ Sammelgel → Das Proteingemisch fokussieren (ausrichten)
- ■ Trenngel → Der Größe nach auftrennen



4

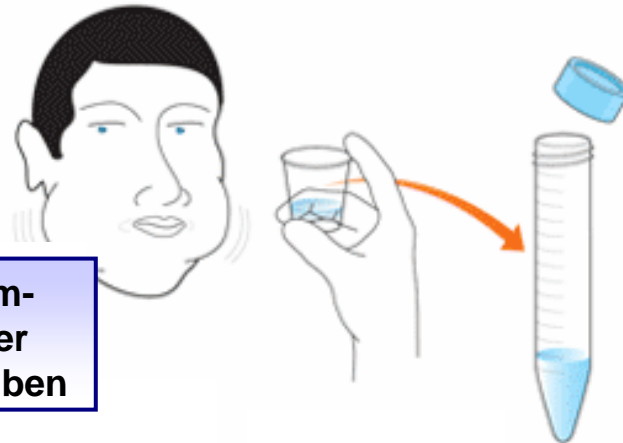
Genes in a bottle

Genes in a bottle

■ Biorad - Genes in a bottle kid



■

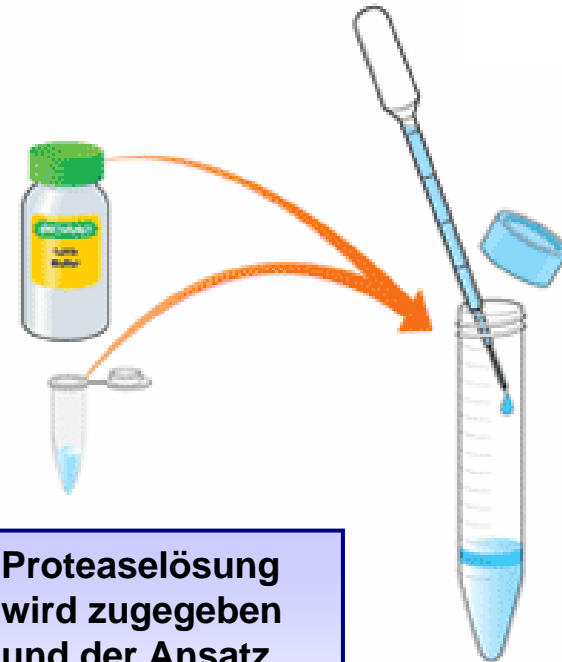


Mundschleimhaut mit einer Bürste abreiben

Schleimhautzellen mit einem Lyse-Puffer von der Bürste lösen

4

Genes in a bottle



**Proteaselösung
wird zugegeben
und der Ansatz
wird für 10 Min.
auf dem Rüttler
inkubiert.**

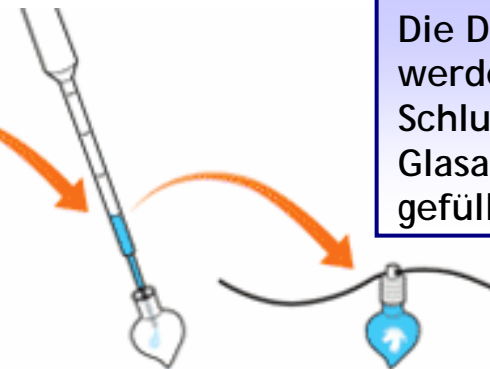
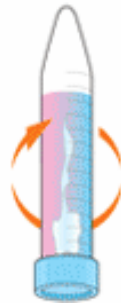
4

Genes in a bottle



Das Reagenzglas wird nun mit kaltem, 95%o Ethanol aufgefüllt.

Durch das Invertieren des Gefäßes aggregiert die DNA und sedimentiert auf den Boden.



Die DNA-Fäden werden zum Schluss in einen Glasanhänger gefüllt.



DNA Necklace
Extension Activity