

Kurs 4 Grundpraktikum Genetik

Klassische Experimente der Gentechnologie: DNA-Klonierung Pt. 1



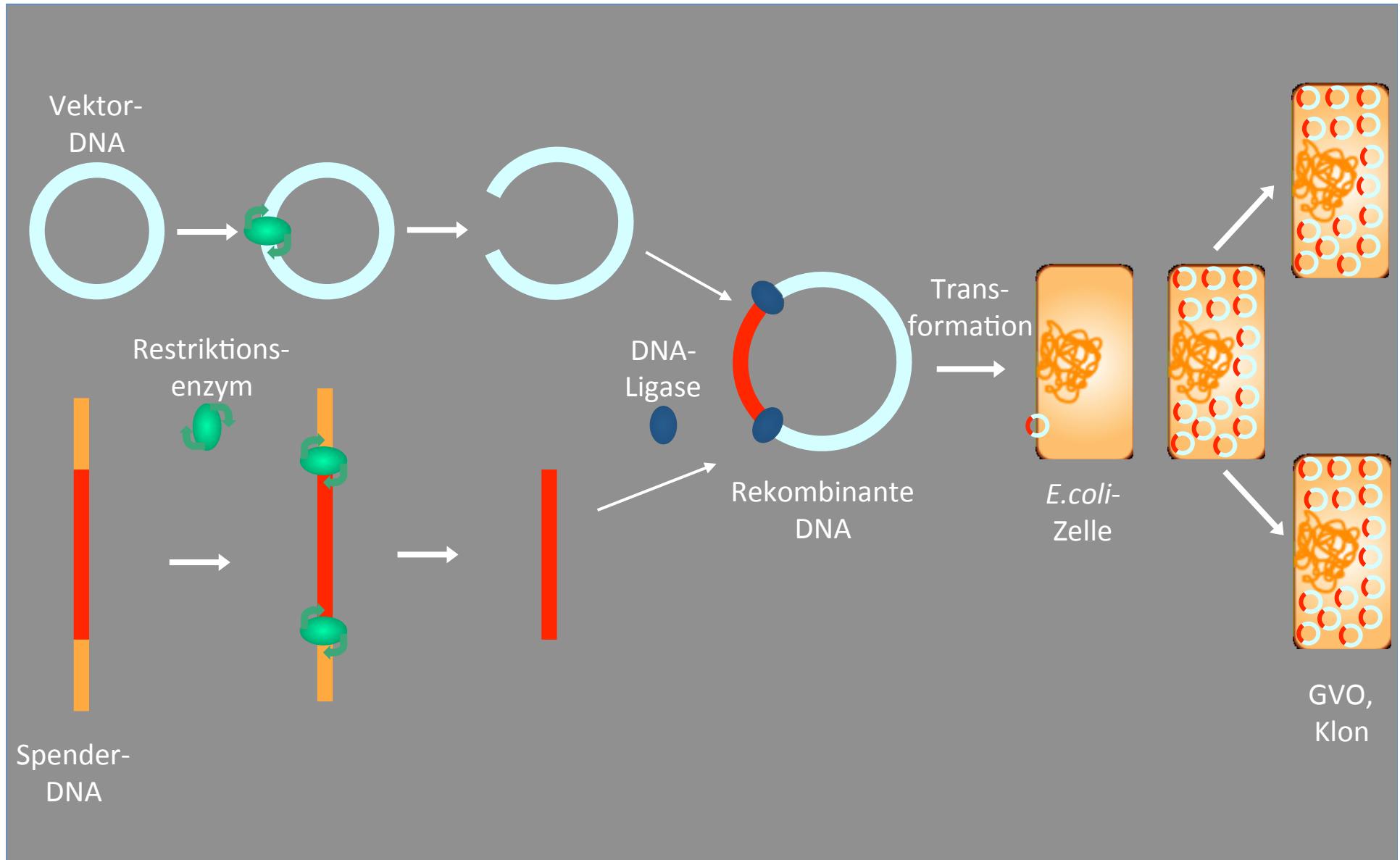
Thomas Hankeln & Christiane Kraemer
AG Molekulargenetik & Genomanalyse (iOME)

...es werde LICHT!

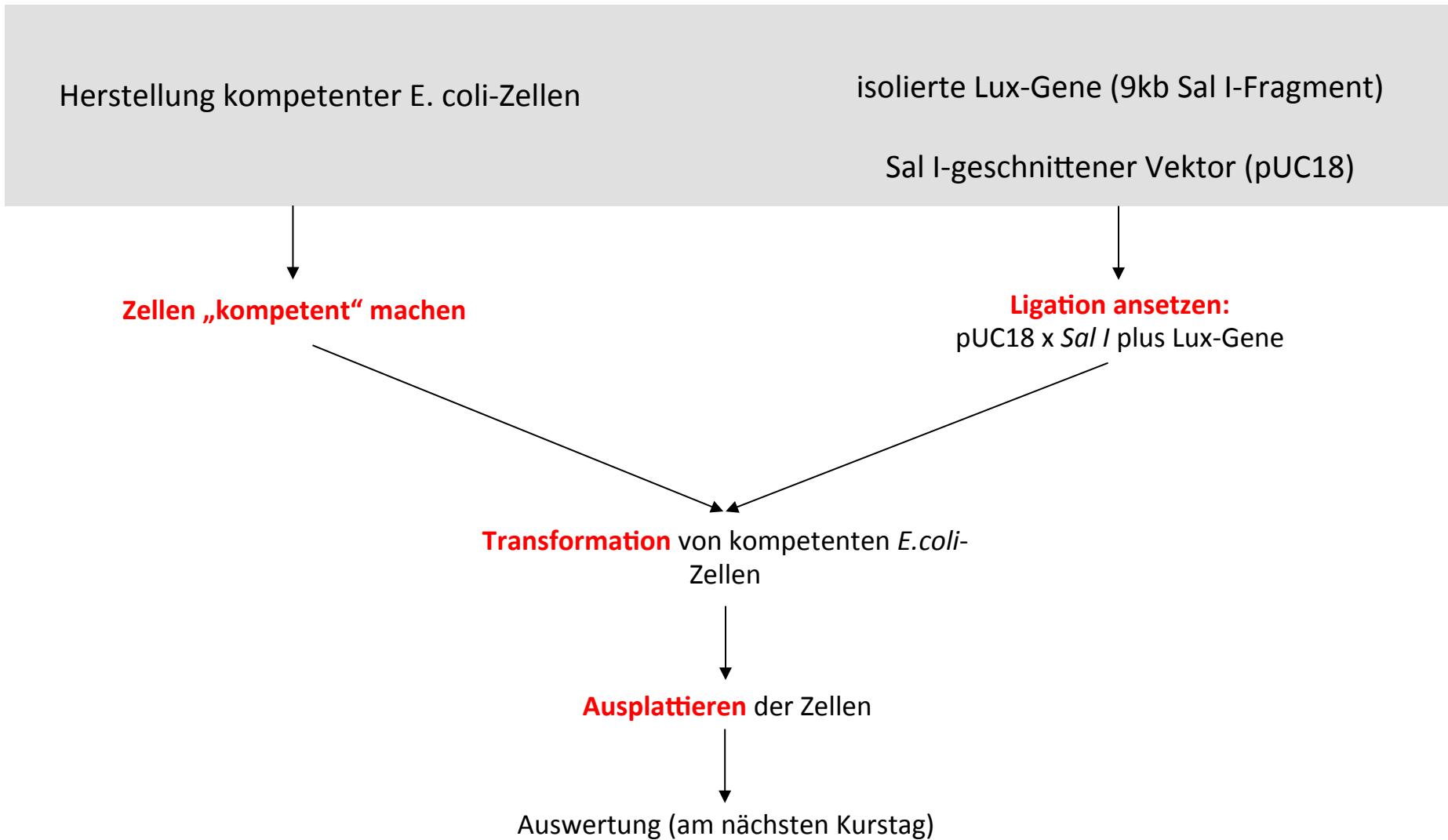


**Klonierung der LUX-Gene aus dem marinem Bakterium
Vibrio fischeri in E. coli-Zellen**

Das klassische Klonierungsexperiment



Kurstag 4 Übersicht



Sicherheit in der Gentechnik

Gentechnikgesetz - GenTG

20.06.1990

Sicherheitsstufe 1

Nach dem Stand der Wissenschaft ist nicht von einem Risiko für die menschliche Gesundheit und die Umwelt auszugehen.

Sicherheitsstufe 2

Nach dem Stand der Wissenschaft ist von einem geringen Risiko für die menschliche Gesundheit und die Umwelt auszugehen.

Sicherheitsstufe 3

Nach dem Stand der Wissenschaft ist von einem mäßigen Risiko für die menschliche Gesundheit und die Umwelt auszugehen.

Sicherheitsstufe 4

Nach dem Stand der Wissenschaft ist von einem hohen Risiko oder dem begründeten Verdacht eines solchen Risikos für die menschliche Gesundheit oder die Umwelt auszugehen.

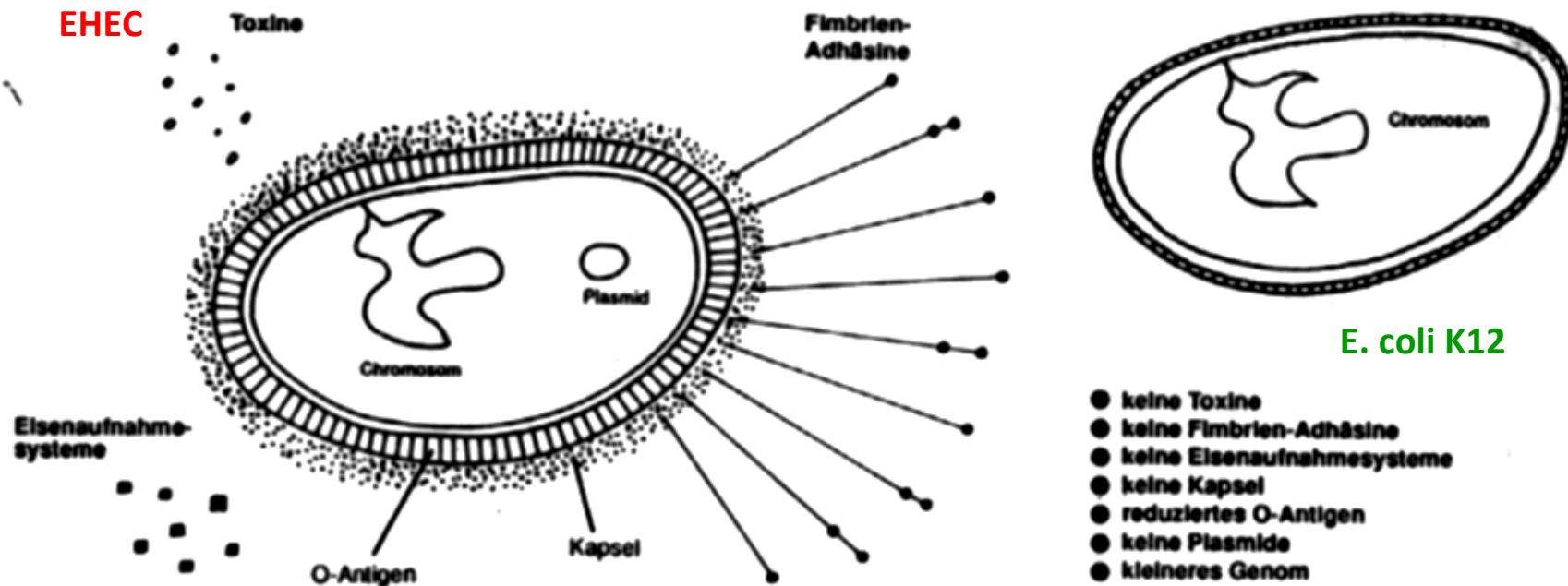
Zunehmendes Gefährdungspotential
von gentechnischen Anlagen





Warnschild: Biohazard - biologische Gefährdung.

Sicherheit von E. coli als Wirt



E. coli K12 fehlen mehr als 1000 Gene gegenüber pathogenem *E. coli*-Stamm.

K12 kann menschlichen Darm nicht besiedeln ! > Containment

Verhalten in S1-Labore

- **Schutzkittel!**
- Straßenkleidung, Taschen → Spinde!
- **Essen, Trinken** im Kursraum **verboten**,
- Im Falle einer Kontamination: Betreuer informieren und geeignete Desinfektionsmaßnahmen durchführen!
- **Abfälle** sammeln für **Autoklavieren** !
- Hinweise zur Allgemeinen Laborsicherheit (Skript) beachten!
Sicherheitsbelehrung bestätigen!

[Aktuelles](#)[Projekte](#)**► Weiterbildungsangebote**[Master- und weiterbildende Studiengänge der JGU Mainz](#)[Kontaktstudien](#)[Lehrkräftefortbildungen](#)**► Seminare**[Bildungsprämie](#)**► Gentechnik**[Musik](#)[ProfilPASS](#)[Rutschungen](#)[Strahlenschutz](#)[Studieren 50 Plus](#)[Gasthörerstudium](#)

Sicherheit in der Gentechnik

Adressaten/ Adressatinnen

Personen, die als Projektleiter oder Beauftragte für die Biologische Sicherheit gentechnischer Anlagen bestellt werden sollen; Biologen, Mediziner sowie Sicherheitsfachkräfte mit molekularbiologischen oder biotechnologischen Kenntnissen.

Ziele

Die Teilnehmenden sollen Kenntnisse in Fragen der biologischen Sicherheit erlangen, insbesondere wird die Vermittlung der Lehrinhalte gemäß § 15 Abs. 2 Satz 1 Nr. 3 der Gentechnik-Sicherheits-Verordnung erfolgen.

Veranstalter

Dr. Michael Rammelsberg, Beauftragter für Biologische Sicherheit an der Johannes Gutenberg-Universität Mainz

Anmeldung

Wichtiger Hinweis für Angestellte der Johannes Gutenberg-Universität und der Universitätsmedizin Mainz:
Bitte nutzen Sie die internen Anmeldeformulare in der rechten Spalte, eine Online-Anmeldung ist für Sie nicht möglich

Kontakt

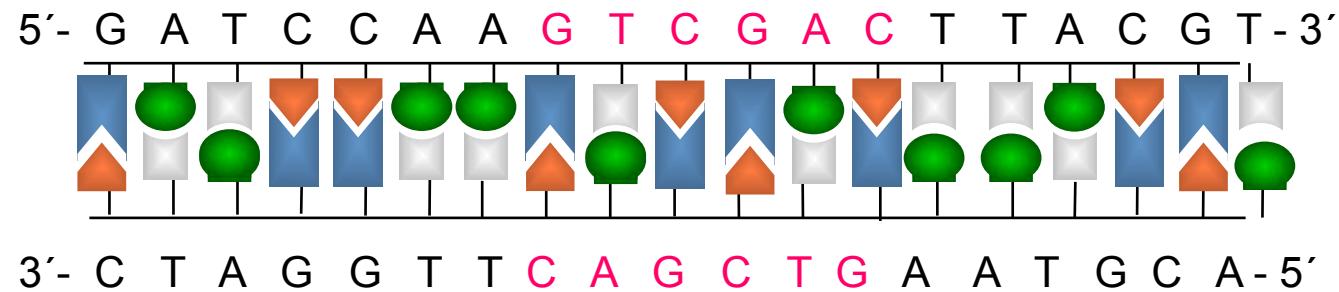
Dr. Michael Rammelsberg,
Beauftragter für die biologische Sicherheit
gentechnischer Anlagen
Tel 06131/ 39-24808
Fax 06131/ 39-23475
Email: rammelsb@uni-mainz.de

Download

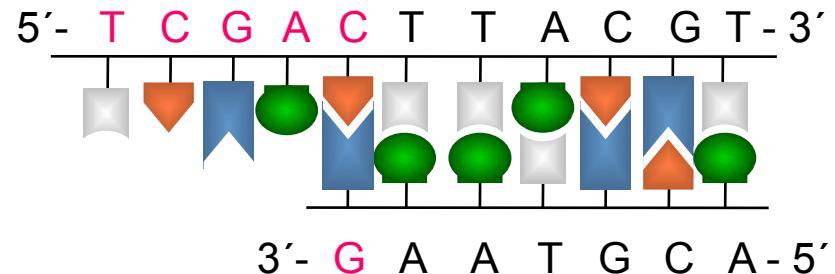
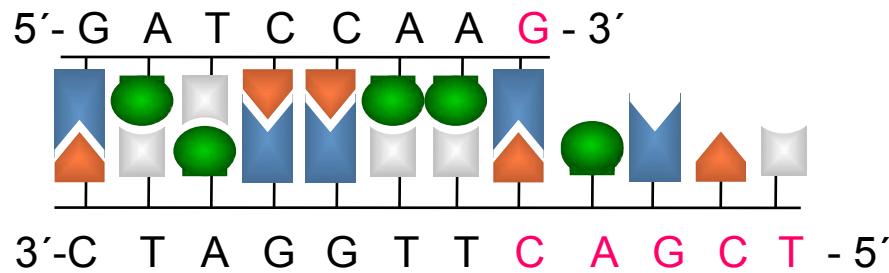
[Programm 2015 \(pdf\)](#)[Programm 2016 \(pdf\)](#)[Anmeldeformular für Angestellte der JGU für das Seminar am 24./25. November 2015 \(pdf\)](#)[Anmeldeformular für Angestellte der JGU für das Seminar am 08./09. März 2016 \(pdf\)](#)[Anmeldeformular für Angestellte der JGU für das Seminar am 22./23. September 2016 \(pdf\)](#)[Anmeldeformular für Angestellte der JGU für das Seminar am 22./23. November 2016 \(pdf\)](#)

Restriktion & Ligation

Restriktion mit Sal I

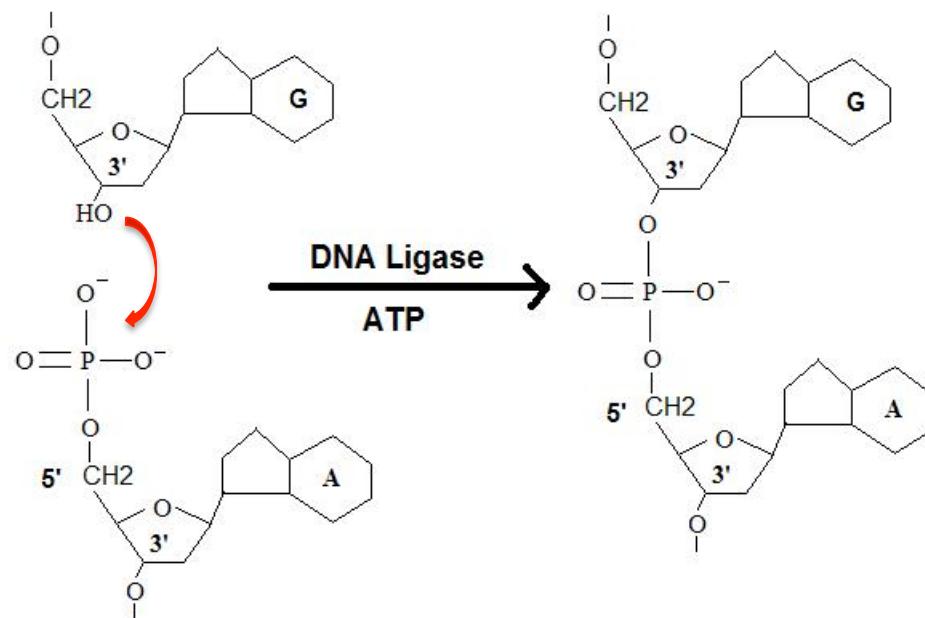


x Sal I



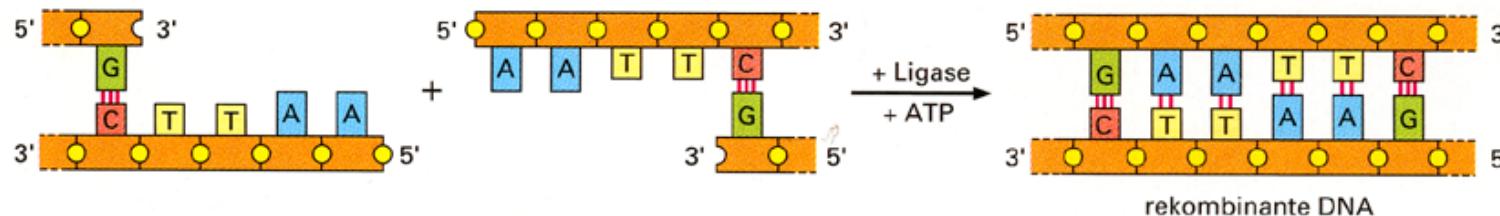
DNA-Ligasen

katalysieren die Bildung einer **Phosphodiesterbindung**
zwischen einem **5'-Phosphat** und einem freien **3'-OH-Ende**
d.h. sie können zwei DNA-Moleküle miteinander verbinden!

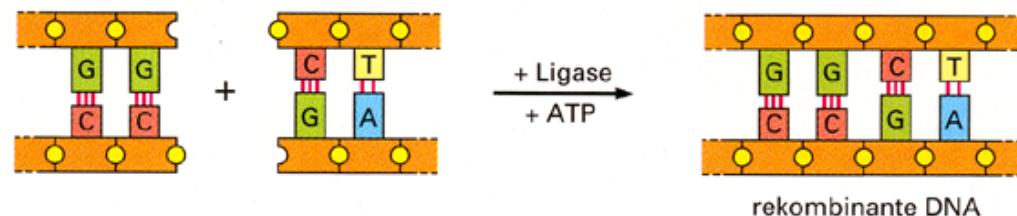


Möglichkeiten der Ligation

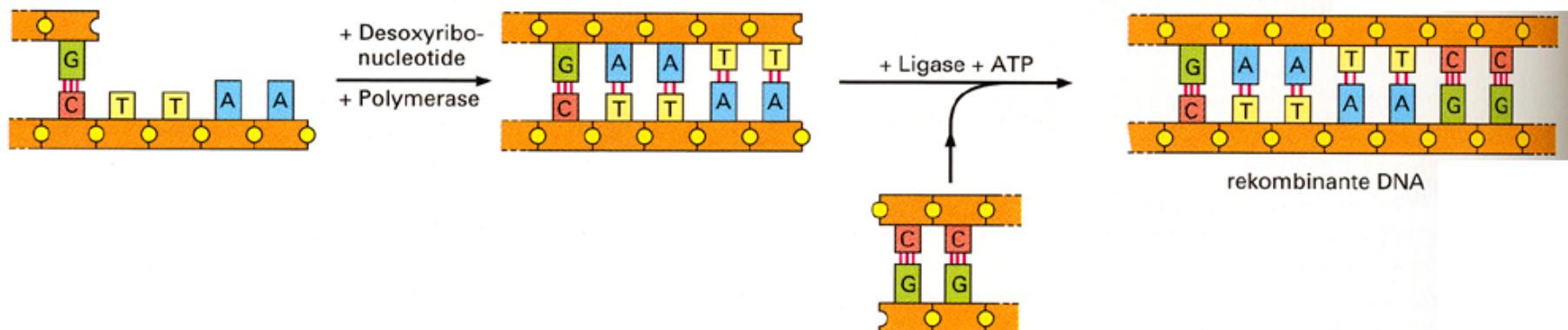
(A) VERBINDUNG VON ZWEI KOMPLEMENTÄREN ÜBERHÄNGENDEN ENDEN



(B) VERBINDUNG VON ZWEI STUMPFEN („BLUNT“) ENDEN



(C) VERBINDUNG EINES STUMPFEN MIT EINEM ÜBERHÄNGENDEN ENDE





Ligieren Sie ein **Bam HI**-Restriktionsende mit
einem **Sau 3AI**-Restriktionsende! Skizze!

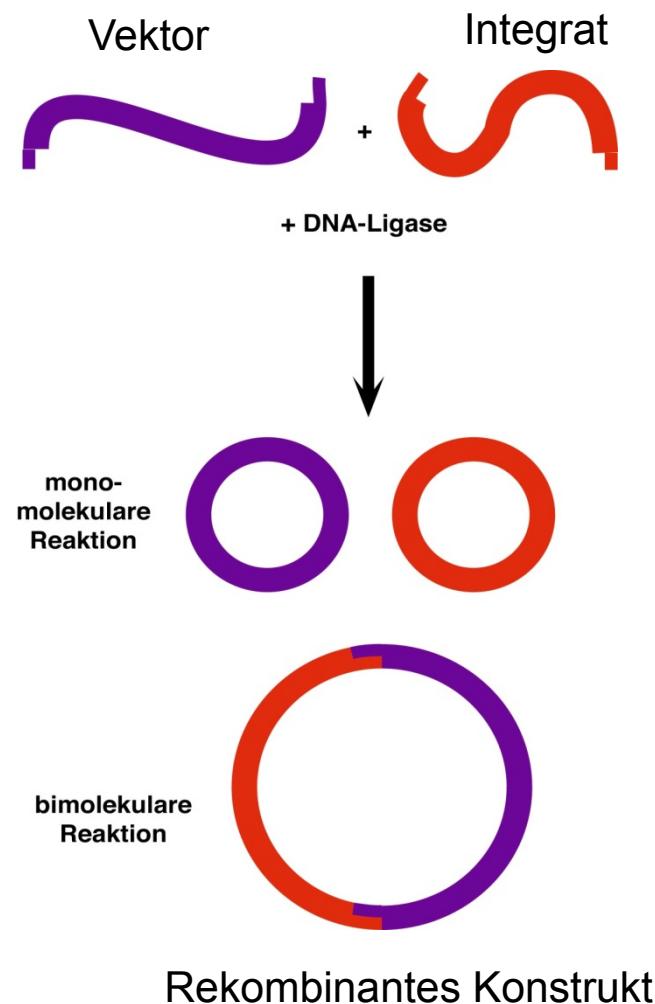
In wie viel Prozent aller Fälle wird dabei die
Bam HI-Schnittstelle regeneriert?

Hinweis:

Bam HI: 5'-G↓GATCC-3'

Sau 3AI: 5'-'↓GATC-3'

Was entsteht bei der Ligation?



Es entstehen (ohne Anwendung spezieller Tricks) alle möglichen Ligationsprodukte.

Q:
Wie findet man die Bakterien, die rekombinante Moleküle aufgenommen haben?

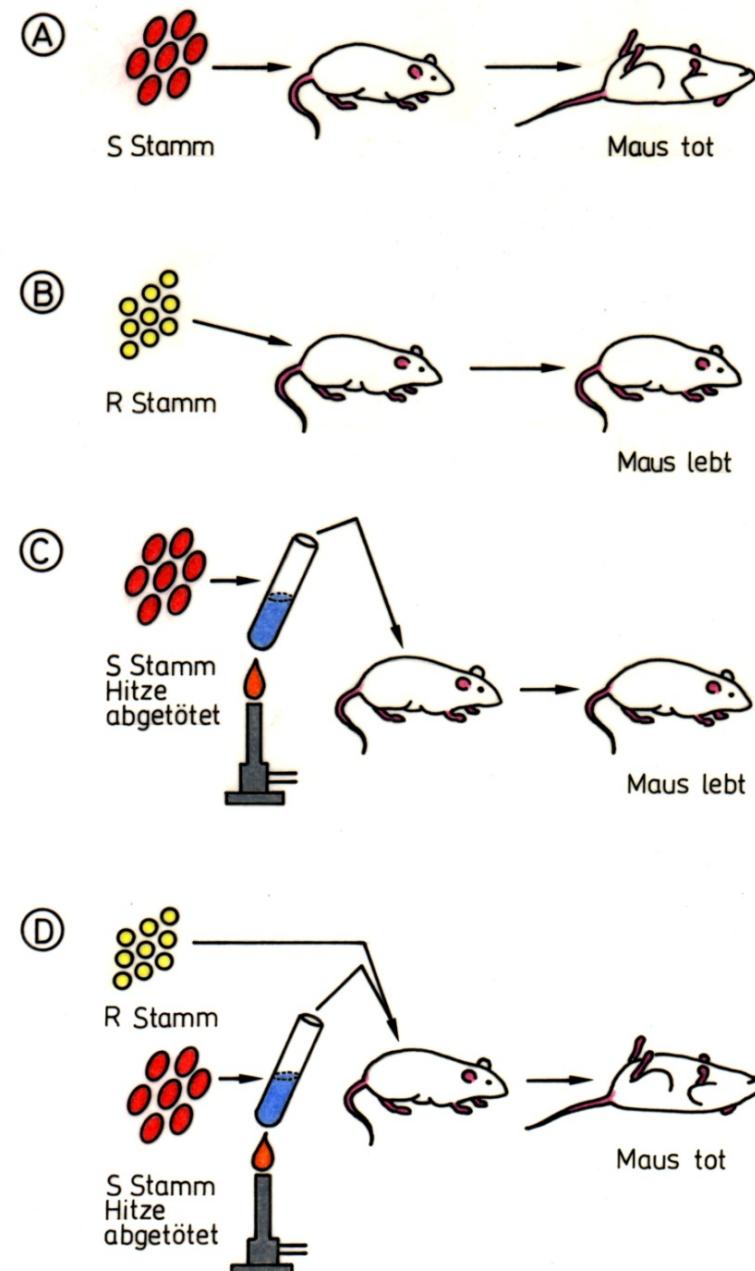
Transformation

...hier beginnt offiziell die Gentechnik!

Zur Erinnerung...

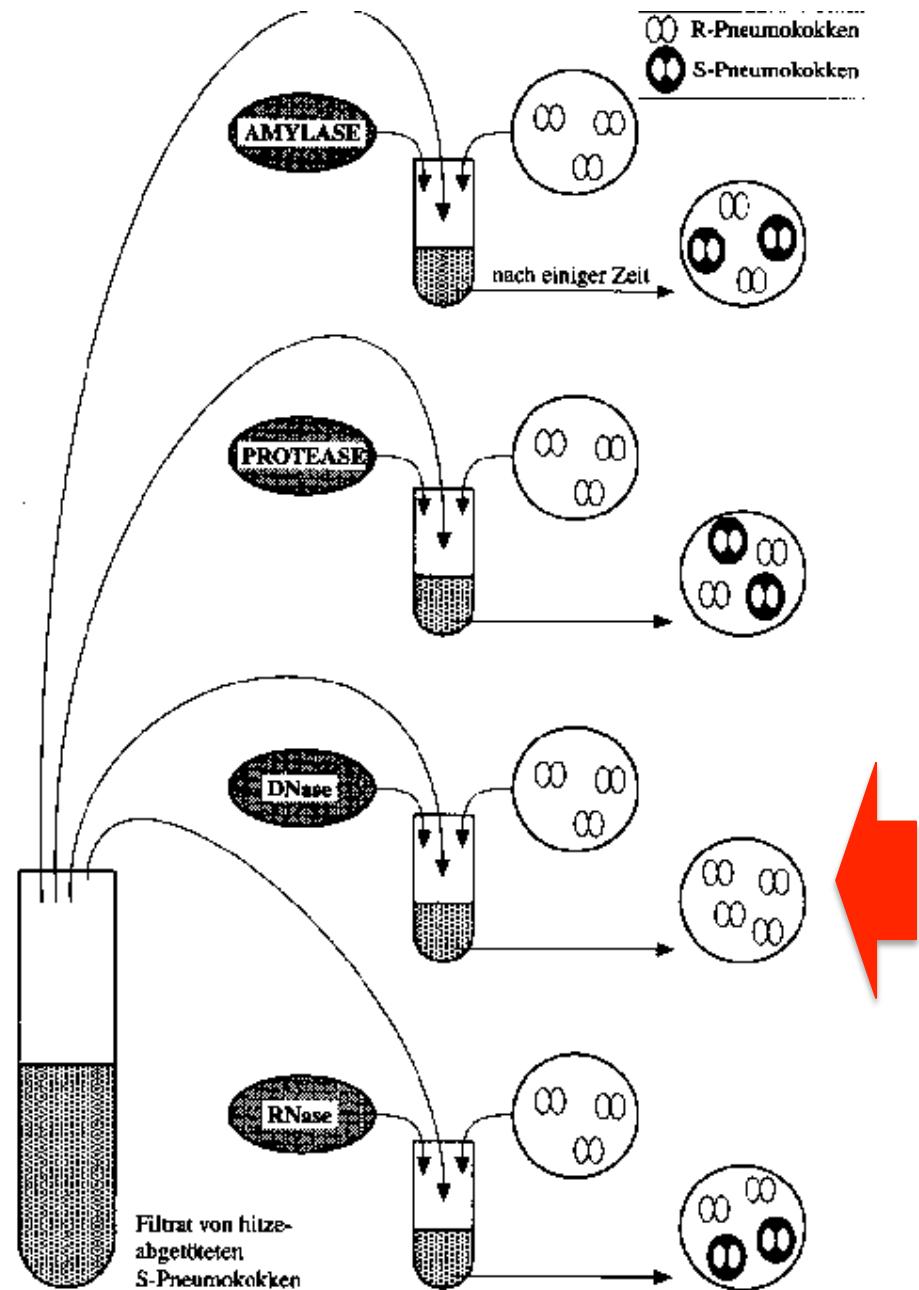
Frederick Griffith 1928:

Das Prinzip der „Transformation“



Avery, MacLeod & McCarty 1944

**DNA ist das
„transformierende
Prinzip“ !!**



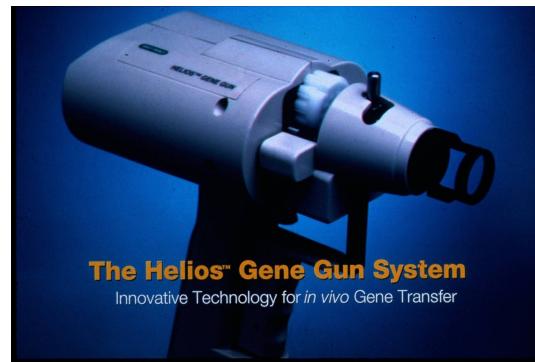
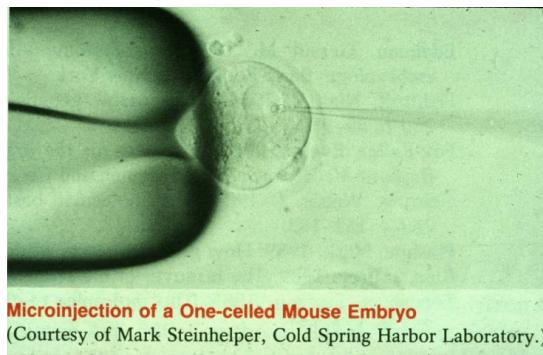
Transformationsmethoden

Bakterien

chemisch (CaCl_2 > Quelleffekt)
physikalisch (Elektroporation)

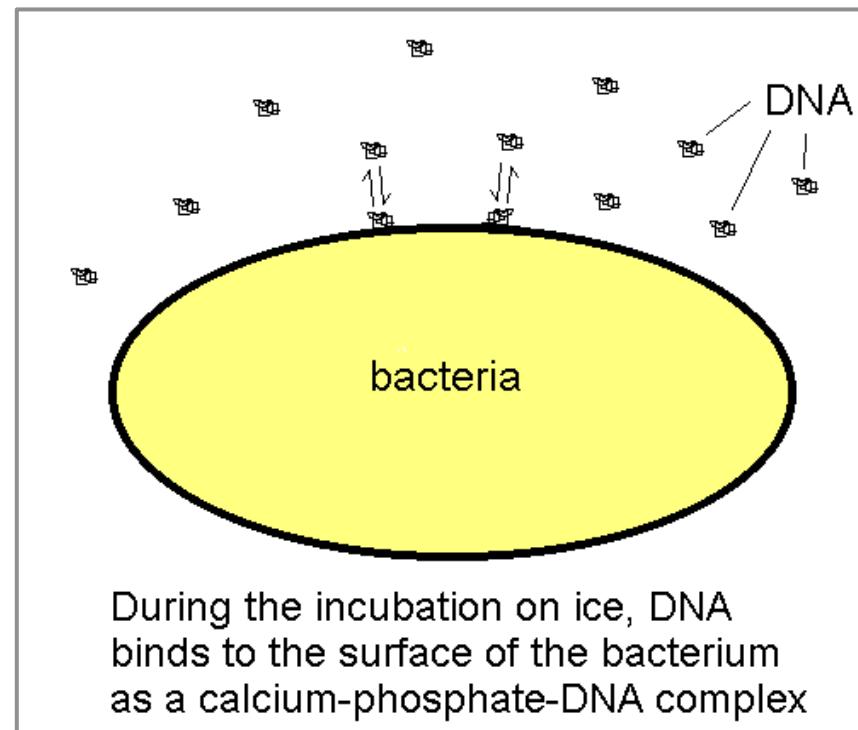
eukar. Zellen

Co-Präzipitation der DNA als Salz
Elektroporation
Mikroinjektion
Agrobakterien (Pflanzen)
Gene Gun!



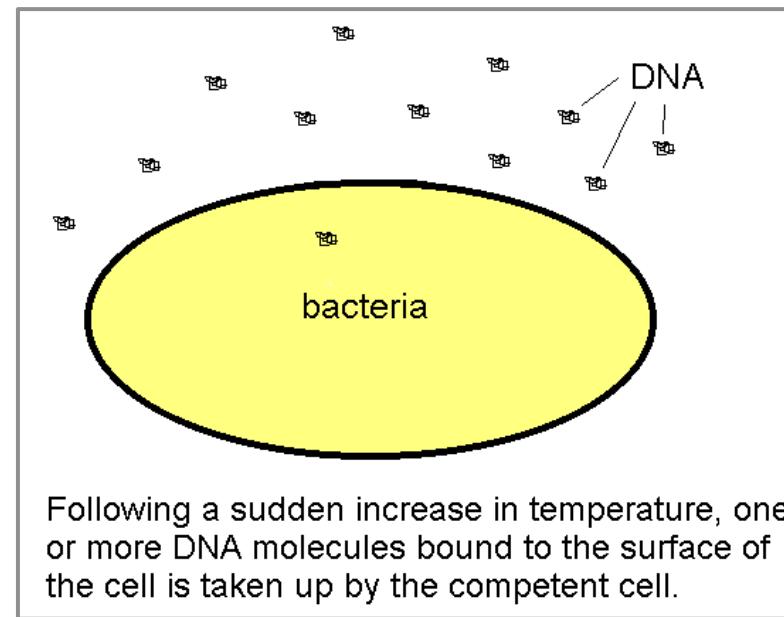
Transformation von *E. coli*: CaCl₂-Behandlung von Zellen

Ein Überschuss an Calcium-Ionen verändert die **Durchlässigkeit der Membran** und steigert die Aufnahmefähigkeit der Zellen für Fremd-DNA.



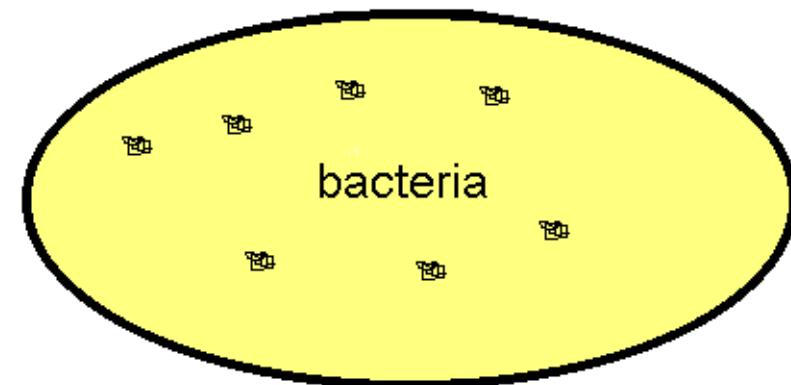
Transformation von *E. coli*: Hitzeschock

The uptake of DNA at this stage is *one of molecular biology's "magical mysteries". No one really knows* how the DNA gets inside the cell, we just know that it works. Some cells may take in more than one plasmid, some may take in none, and some will take in only a single plasmid, even though several may be bound to the surface at the time of the heat shock. Supercoiled plasmids are most easily taken up, yielding transformation efficiencies in the range 10^6 - 10^{10} transformants/ μg of DNA. Relaxed circular DNA (nicked or covalently closed) gives efficiencies about 10- to 100-fold less than supercoiled, and linear DNA is down by another factor of 10- to 100-fold from relaxed circular DNA.



Nach dem Hitzeschock: Inkubation bei 37°C

Cells that have not taken up a plasmid will not grow on the selective media when plated. Cells that have taken up a relaxed plasmid will immediately repair any nicks in the plasmid by using *E. coli* DNA ligase, and then introduce negative supercoils by using DNA gyrase. The plasmid is now ready to participate in cellular processes such as replication and transcription.



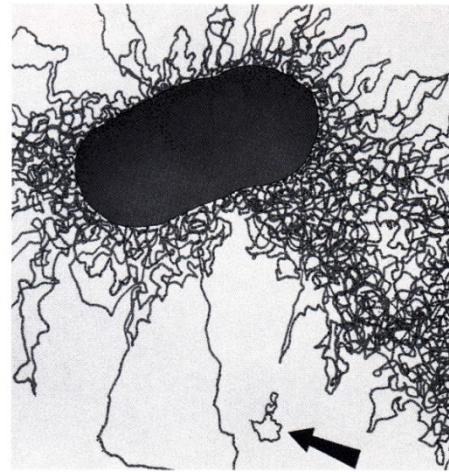
Once inside the cell, the DNA is replicated, and begins to express any genetic markers such as ampicillin resistance or the *cysB* gene product.

Vektoren



- Könnte man die Lux-Gene nicht einfach **ohne** Vektor in kompetente *E.coli*-Zellen transformieren?

Plasmide



- **zirkuläre, doppelsträngige, extrachromosomal DNA-Moleküle**

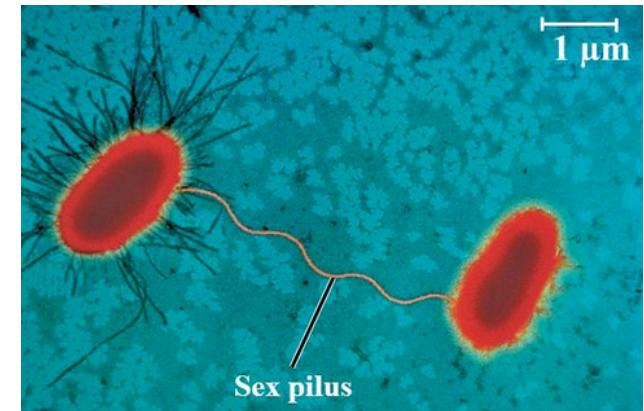
(Ausnahme: lineare Plasmide z.B. bei *Streptomyces rochei*, *Borrelia* und *Thiobacillus versutus*)

- **Replikons**
- **nicht-essentielle**, aber manchmal vorteilhafte Gene
(z. B. Antibiotika-Resistenzgene)

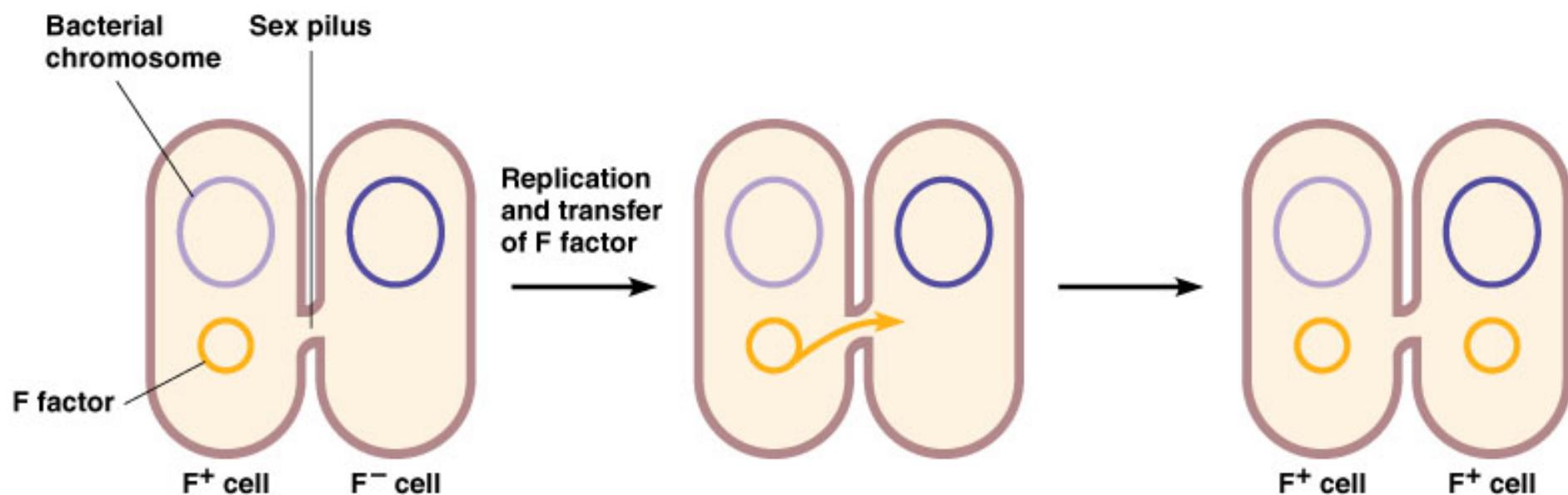
Klassifikation von Plasmiden

- F-Plasmide (Fertilitätsfaktor)
- ResistenzTransferF (Antibiotikaresistenzen)
- Col-Plasmide (Colicine)
- Degradative Plasmide (Schwermetallresistenz, Toluolabbau)
- symbiotische Plasmide mit Nif-Genen (Nitrogenase, N₂-Fixierung)
- Virulenzplasmide (Ti-Plasmid)

Viele Plasmide sind **konjugativ!**



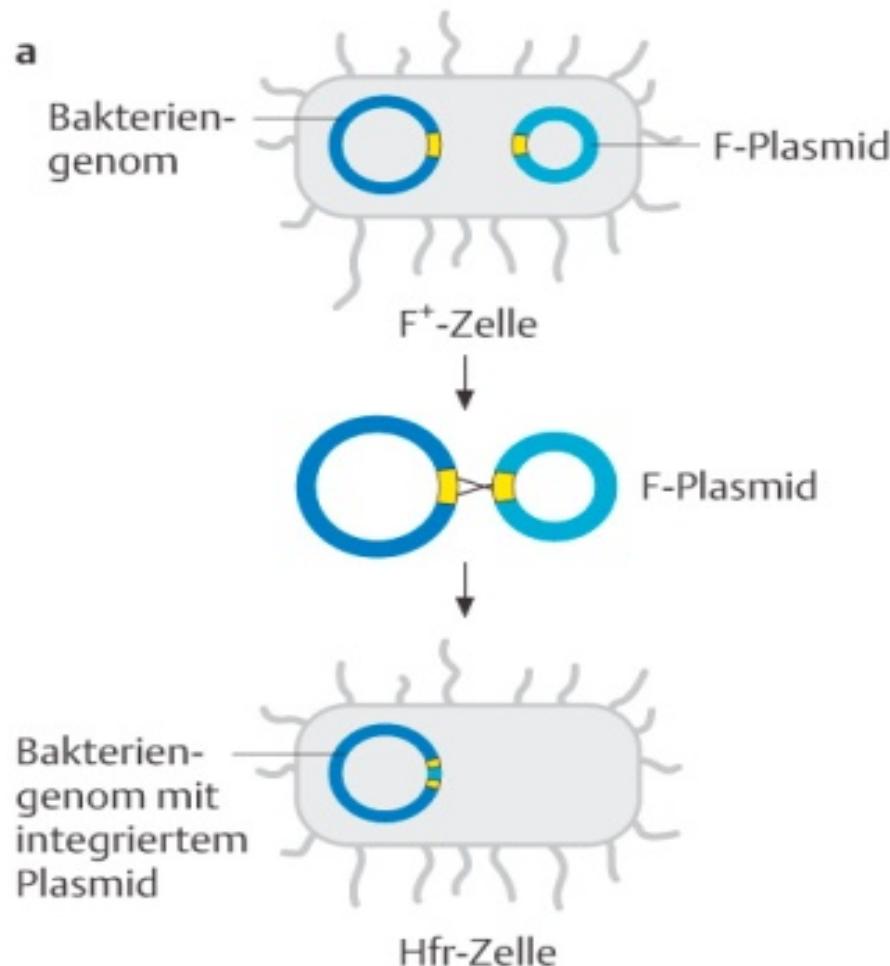
Bakterielle Konjugation



(a) When an F factor (a plasmid) is transferred from a donor (F^+) to a recipient (F^-), the F^- cell is converted into an F^+ cell.

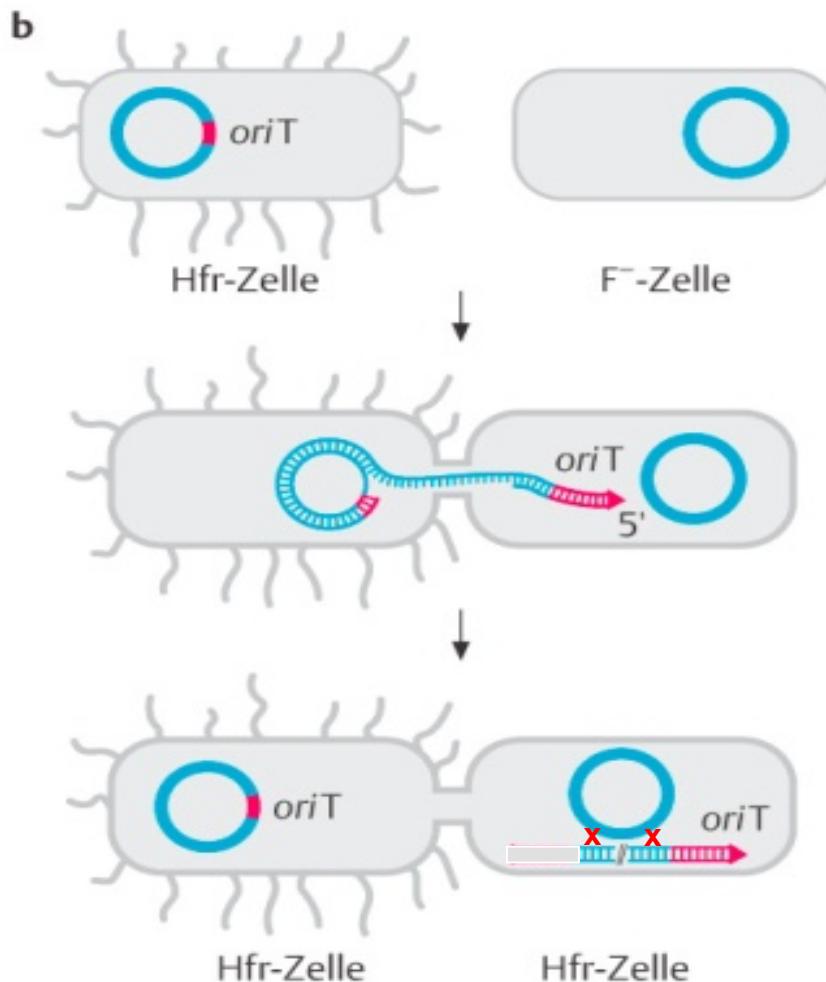
Copyright © 2004 Pearson Education, Inc., publishing as Benjamin Cummings.

Bakterielle Konjugation: Hfr-Zellen



Aber warum „Hfr“??

Bakterielle Konjugation: Hfr-Zellen



oriT = origin-of-transfer
des integrierten Plasmids

Vom **oriT** aus werden benachbarte Teile des Genoms der Hfr-Zelle in die F- Zelle übertragen

Homologe Rekombination (häufig)
bewirkt Einbau der Hfr-Gene in das
Genom der F- Zelle

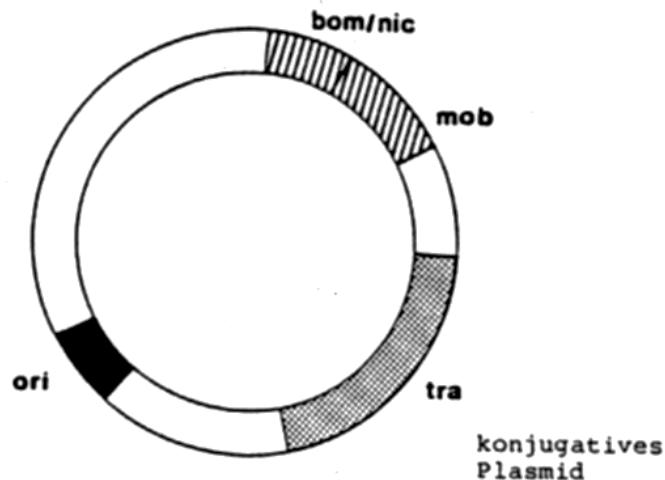


Warnschild: Biohazard -biologische Gefährdung.

Bio-Sicherheit moderner Plasmidvektoren

F-Faktor

- breitet sich über Konjugation aus!



bom/nic: origin-of-transfer

mob: mobility genes

tra: transfer genes (Pili)

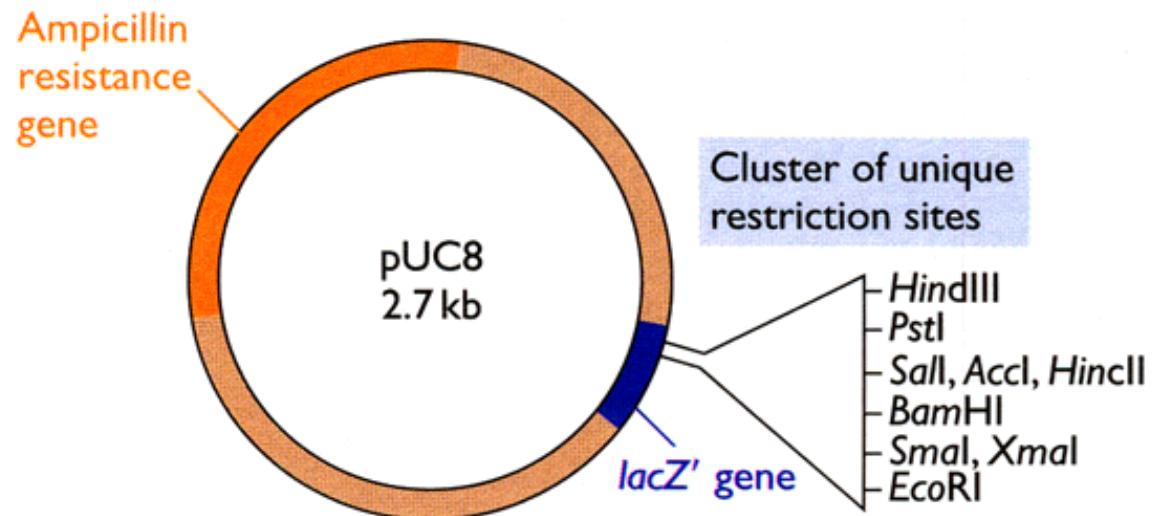
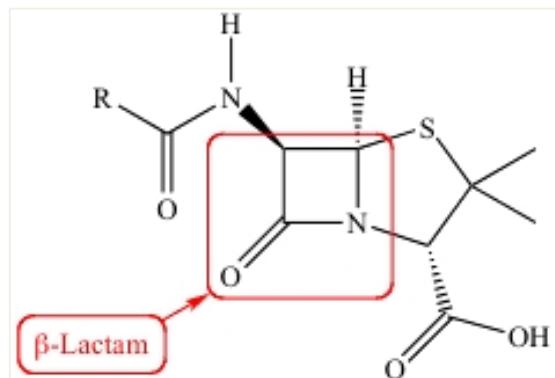
pUC18 und Nachfolger haben **KEINE** dieser genetischen Eigenschaften mehr!

Keine Konjugation = kein unerwünschter Gentransfer = **containment**

Ein Plasmid-Vektor in der Gen-technologie braucht...

- einen „**high copy number**“-Replikations-Origin
- nur einmal pro Vektor vorhandene **Restriktions-schnittstellen** (MCS) zum Einfügen der Fremd-DNA
- **Markergene** zum Erkennen,
 - (1) ob der Vektor in die Bakterienzelle aufgenommen ist
 - (2) ob der Vektor eine Fremd-DNA trägt

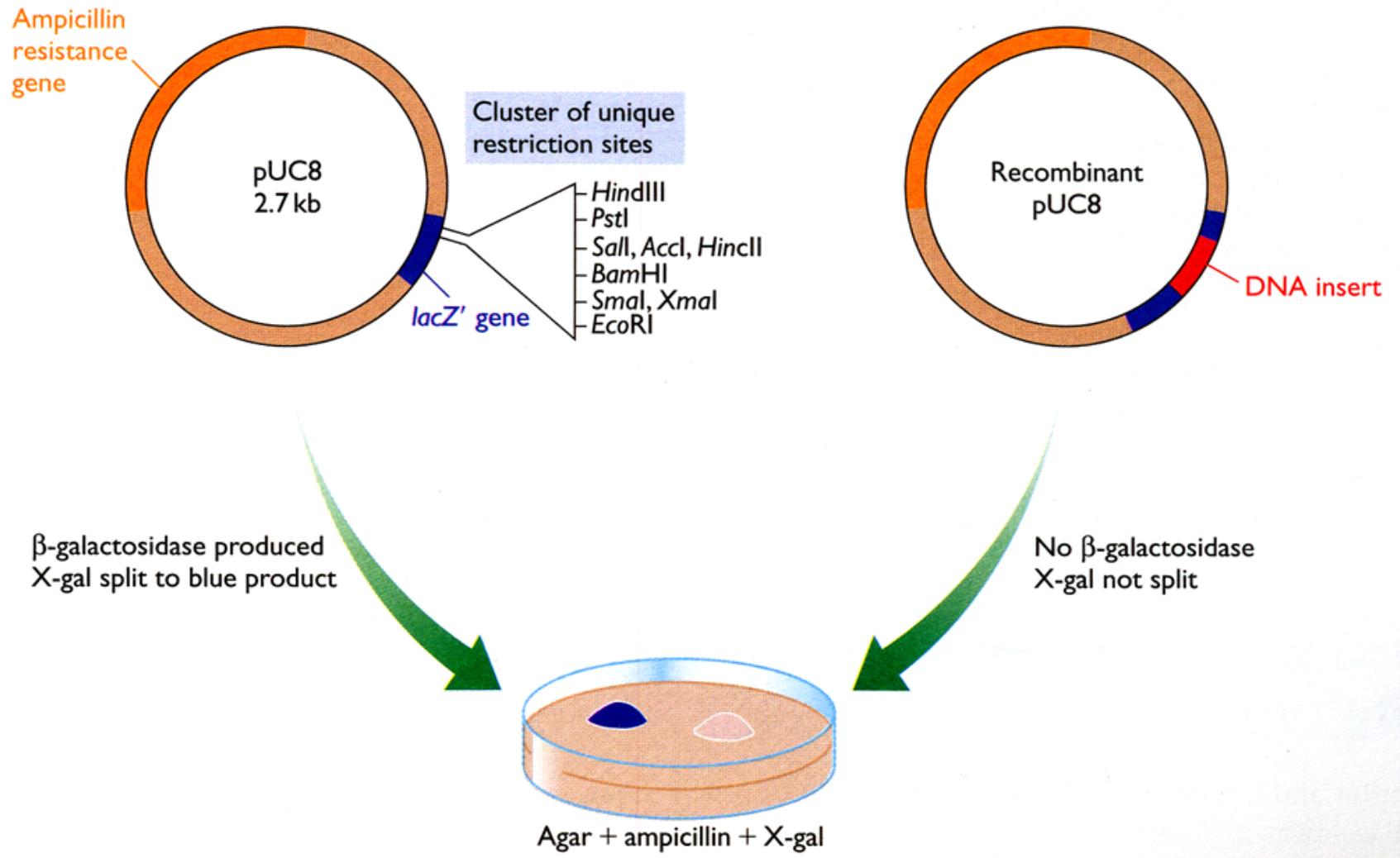
Moderne pUC-Vektoren



Amp^R (β-Lactamase)
als erstes Markergen
zeigt Anwesenheit
von Plasmid in Zelle

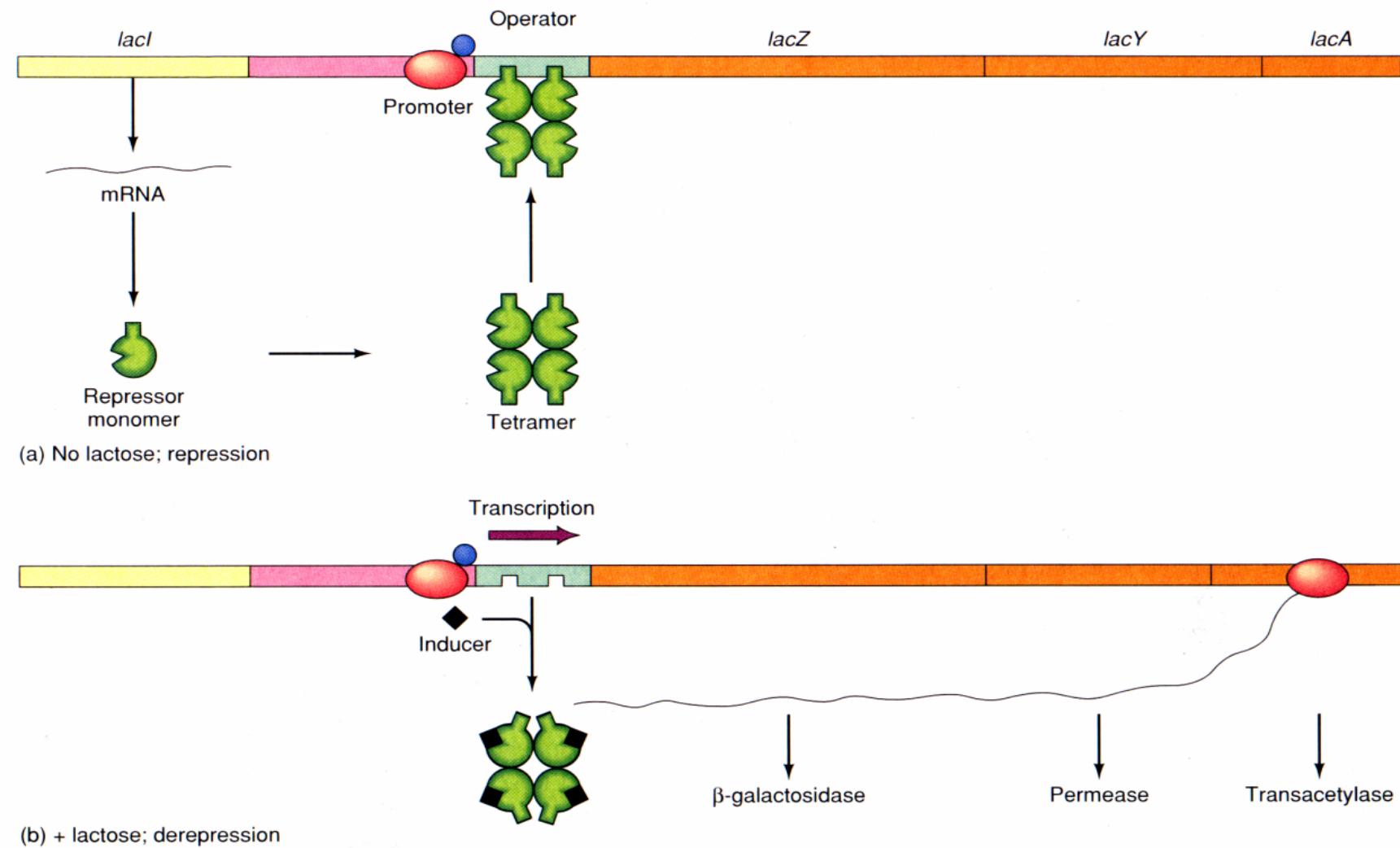


pUC: lacZ' als zweites Markergen



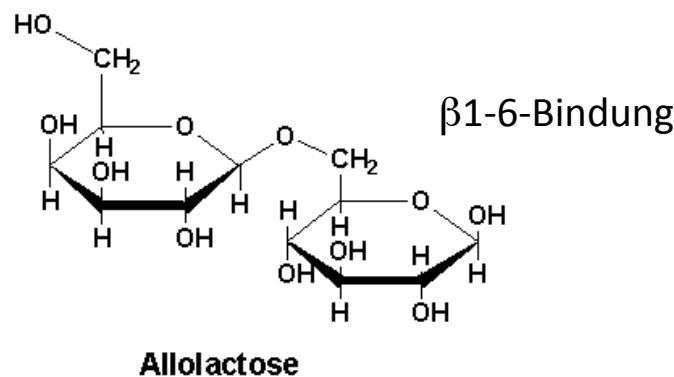
BLAU-WEISS-Selektion: nur weiße Kolonien enthalten das Fremdgen!!!

Wir erinnern uns: das *Lac-Operon*...

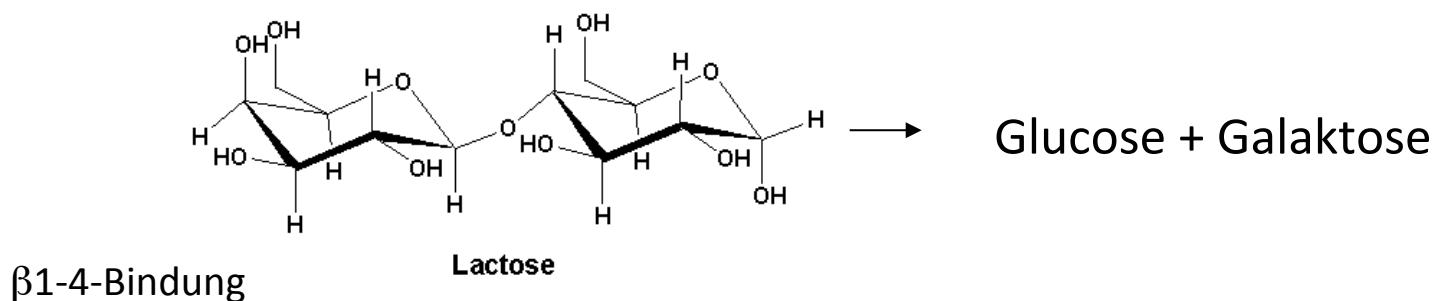


Induktor und Substrat des lac-Operons

- der natürliche **Induktor** des lac-Operons ist die Allolaktose:

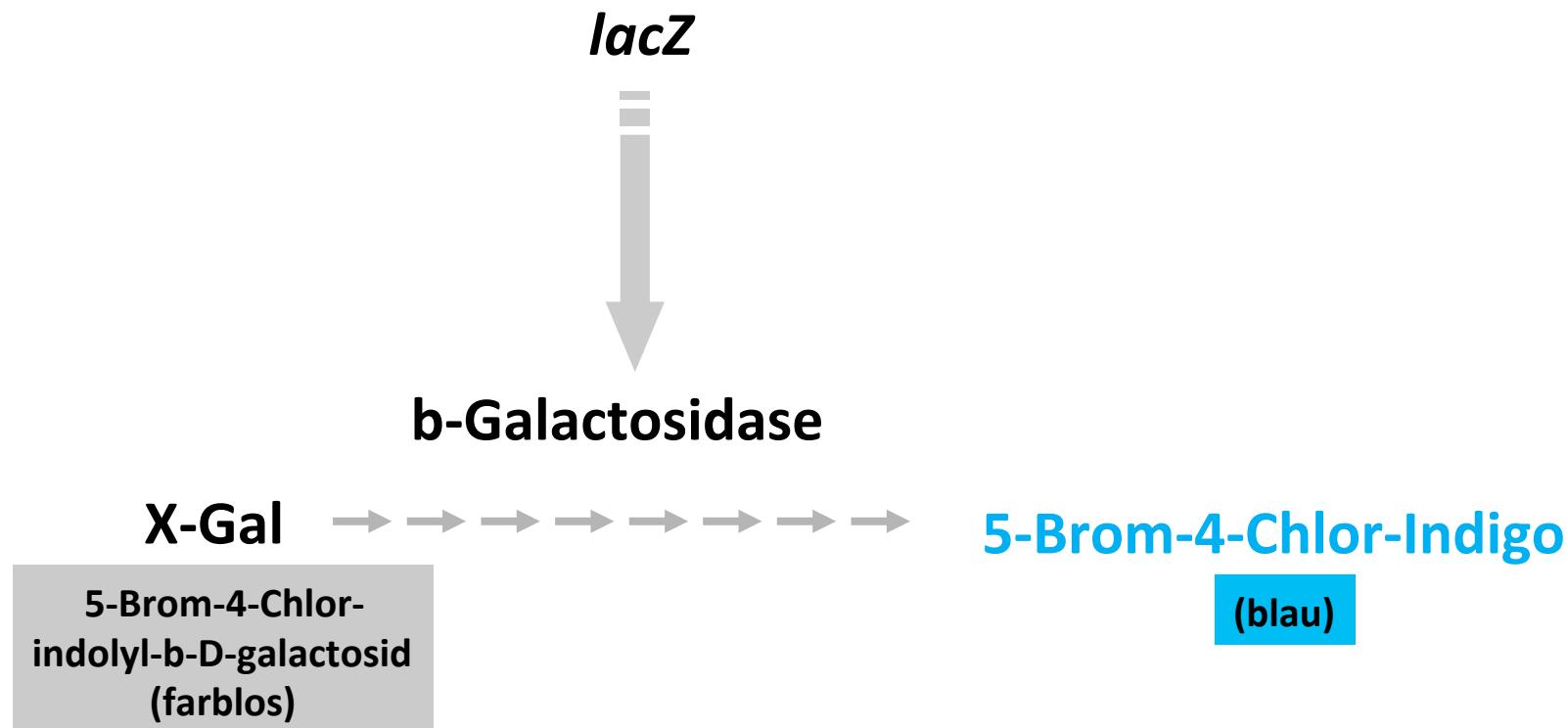


- das natürliche **Substrat** der β -Galaktosidase ist die Laktose:



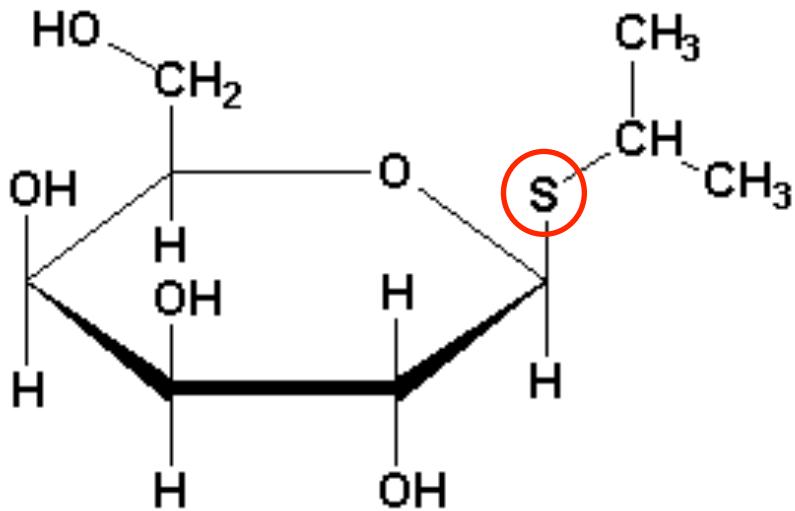
Aber Zucker machen keine blaue Farbe...

Klonierung mit dem Vektor pUC18: X-Gal als künstliches Substrat für die β -Galactosidase



X-Gal ist also das Substrat!
Wir brauchen noch Induktor...!

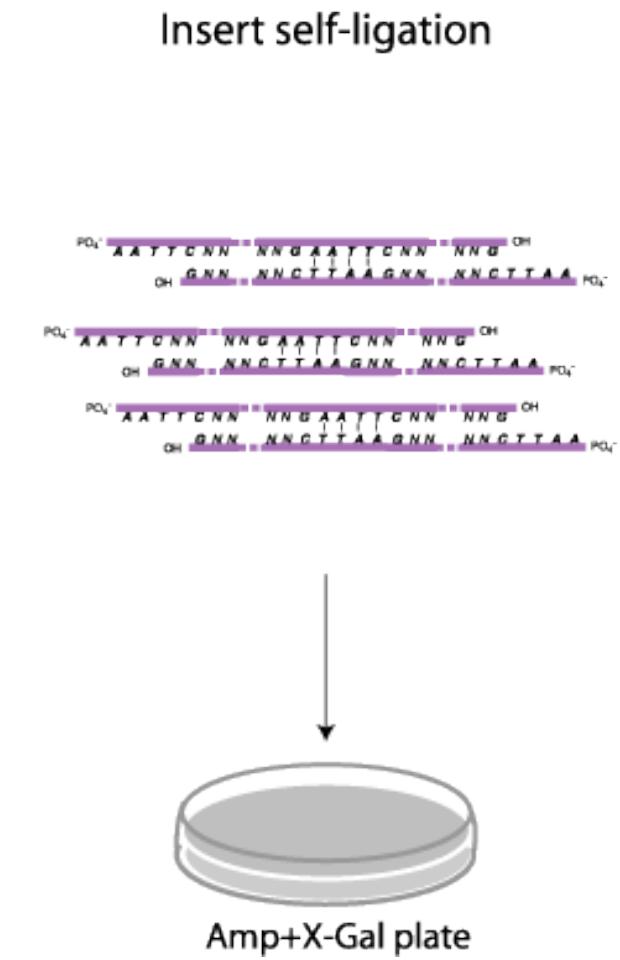
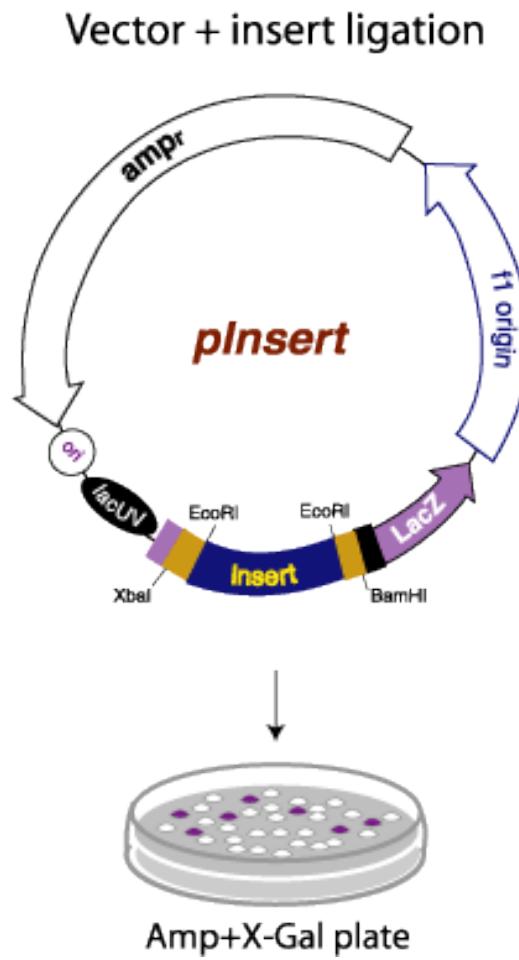
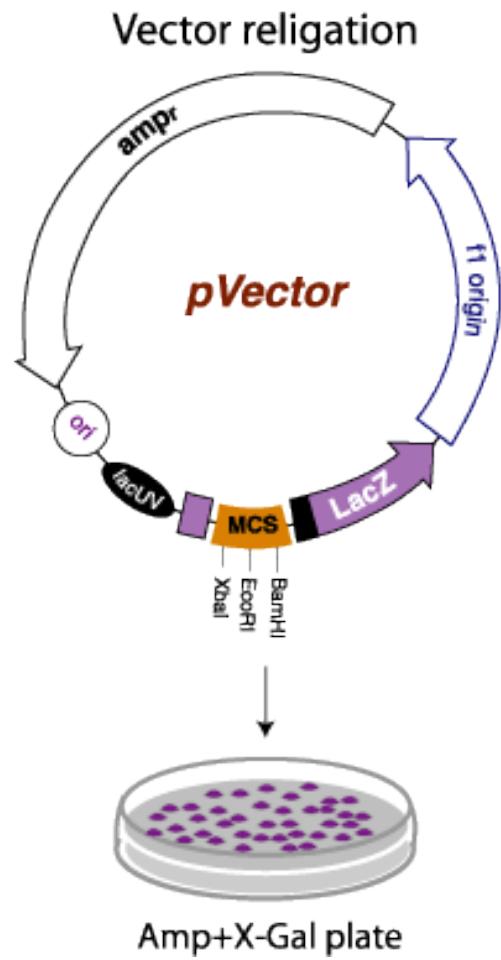
Klonierung mit dem Vektor pUC18: IPTG als künstlicher Induktor



IPTG ist selbst
kein Substrat!!

Isopropyl Thiogalactoside (IPTG)

Unterscheidung der Ligationsprodukte

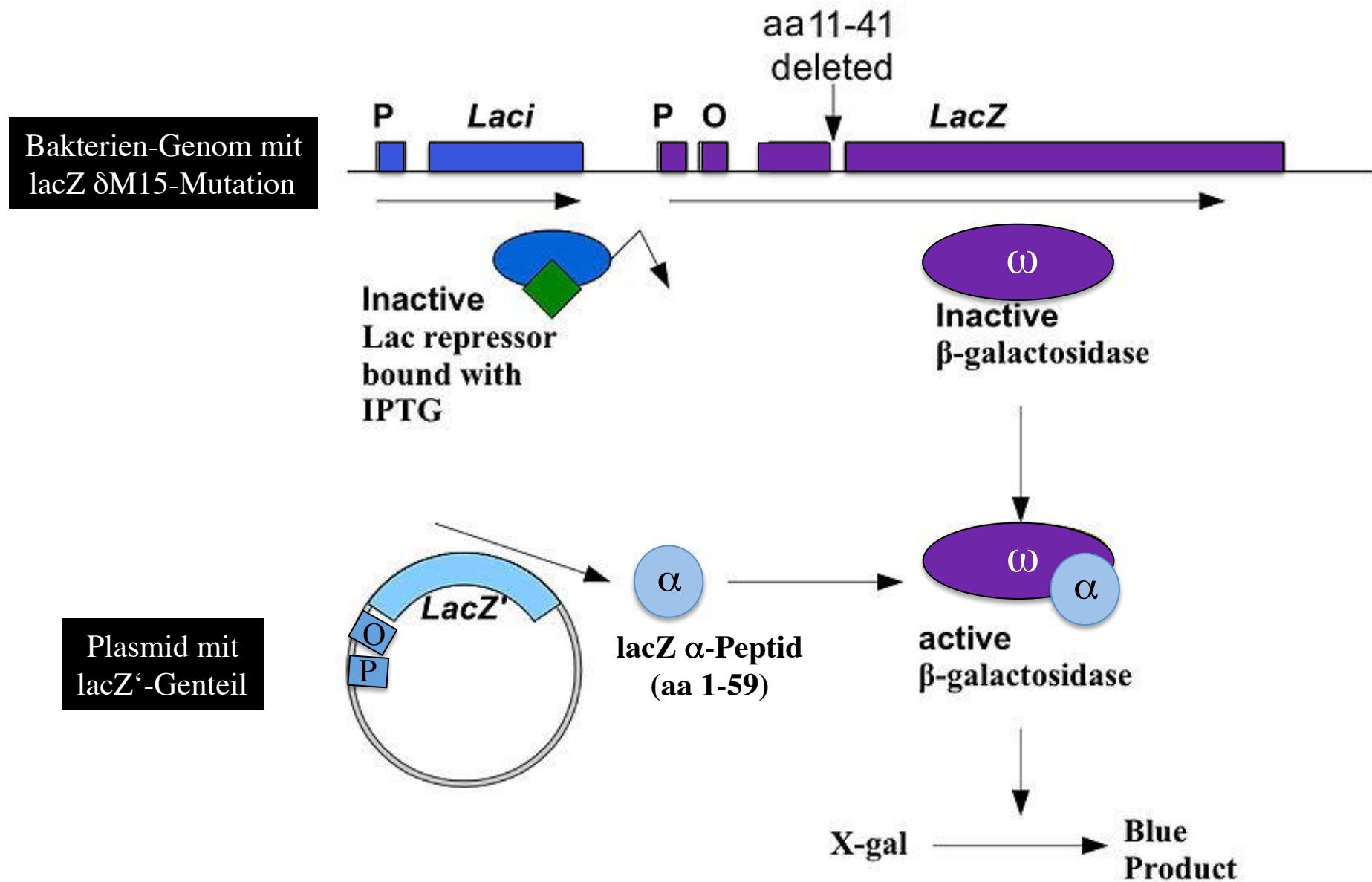


Religation des Vektors

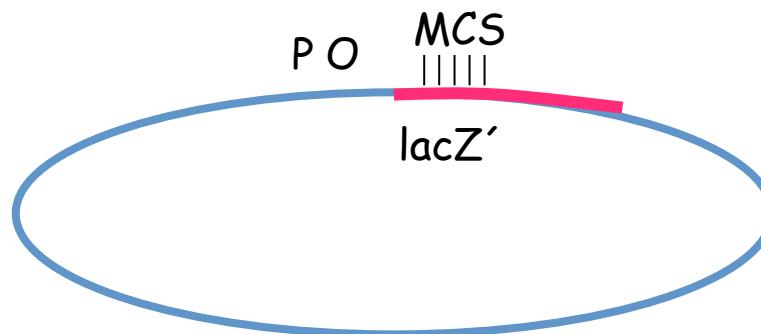
„rekombinante“ DNA

Religation des Integrats

Das lacZ/lacZ'-System



Was genau passiert bei der Integration von Fremd-DNA in das lacZ'-Gen?



Möglichkeiten:

Integrat hat Terminationssignale für TRANSKRIPTION

Integrat hat STOP-Kodons (TRANSLATION gestoppt)

Integrat verändert Offenen Leserahmen des lacZ'-Gens
> frameshift bei TRANSLATION > falsches Protein

Zeitplan Kurstag 4

Uhrzeit		
14:00 - 14:15	Testate	
14:15 - 14:50	Theorie und praktische Hinweise	
14:50 - 15:00	Ligation ansetzen	
15:00 - 15:30	Mit kompetenten Zellen anfangen (zentr., in CaCl_2 resusp.)	
15:30 - 16:20	Zellen in CaCl_2 auf Eis	10 min Pause / Theorie
16:20 - 17:00	Zellen zentr. und erneut in CaCl_2 resusp.; Transformationen ansetzen	
17:00 - 17:45	Inkubation auf Eis	Theorie
17:45 - 18:15	Hitzeschock / L-Medium zugeben	
18:15 - 18:45	Inkubation 37°C	Theorie/ Ergebnisprotokolle
18:45	Ausplattieren / evtl. Abschlussbesprechung	