

# Kurs 5 Grundpraktikum Genetik

## Klassische Experimente der Gentechnologie: DNA-Klonierung Pt. 2



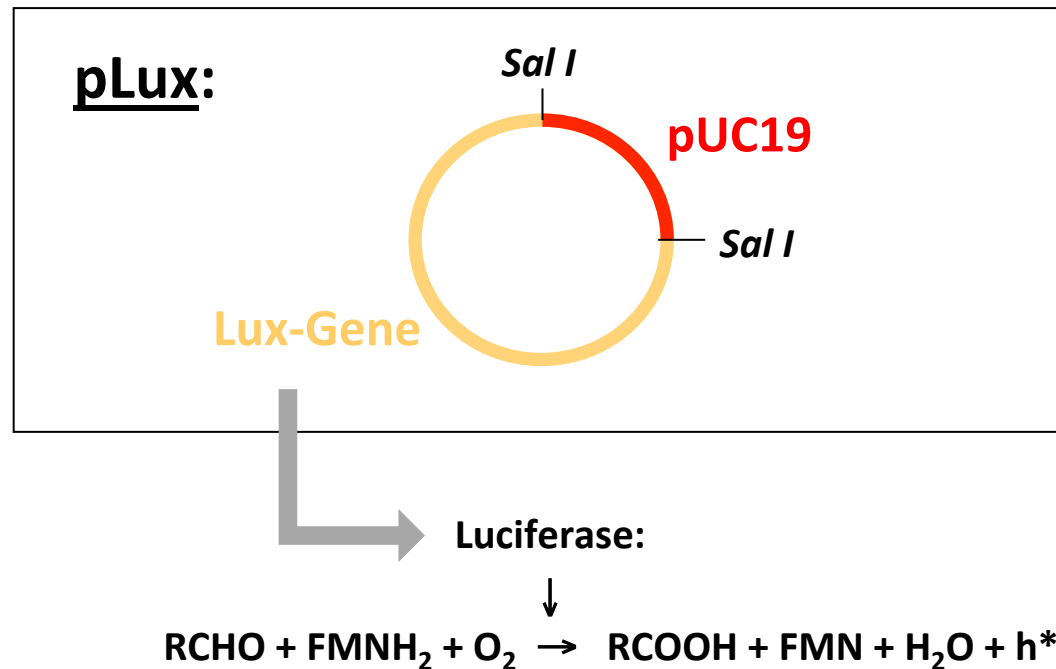
Thomas Hankeln & Christiane Kraemer  
AG Molekulargenetik & Genomanalyse (iOME)

# Biolumineszenz

Fähigkeit von Lebewesen, selbst oder mit Hilfe von Symbionten Licht zu erzeugen



# Die Übertragung der Lux-Gene verleiht E. coli eine vollkommen neue Eigenschaft



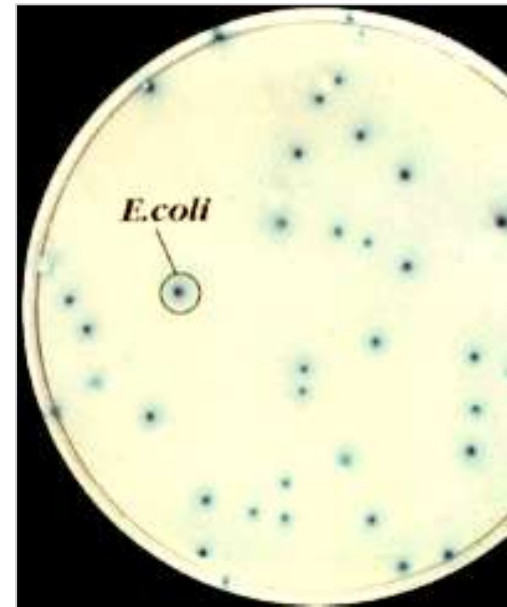
**pLux:**  
Lux-Gen-Operon  
aus *Allivibrio fischeri*  
(9 kb *Sal I*-Fragment,  
enthält sechs Strukturgene  
und zwei, die für die  
Regulation zuständig sind)  
kloniert in pUC19

Engbrecht, Nealson, Silverman (1983) Cell 32, 773 – 781

Bacterial Bioluminescence: Isolation and Genetic Analysis of Functions from *Vibrio fischeri*

# Kurstag 5

- **Auswertung des Transformationsexperiments**
- **Isolierung von Plasmid-DNA aus den rekombinanten Bakterienstämmen**
- **Restriktion der Plasmid-DNA**
- **Gelelektrophorese**
- **Dokumentation und Auswertung der Gele**



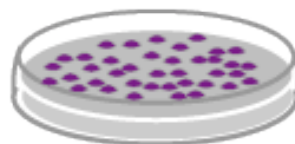
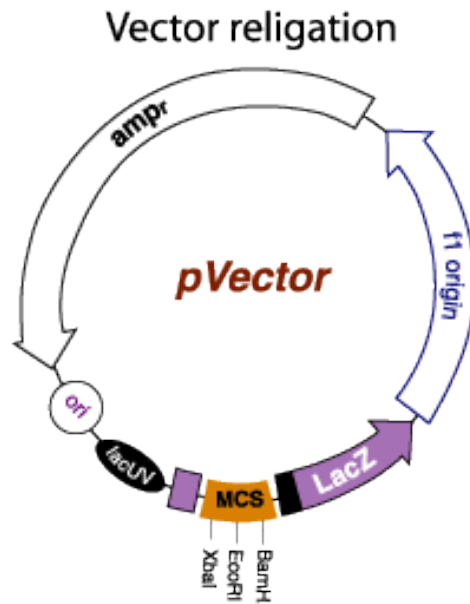
# Auswertung der Transformation

Transformation	weiße Kolonien	blaue Kolonien	Kolonien insgesamt
a) Ligationsansatz:			
b) unrestringierte pUC18-DNA:			
c) unrestringierte pLux-DNA:			
d) TE-Puffer oder A.bidest			

Wo leuchten die Bakterien?

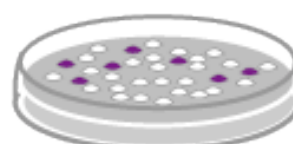
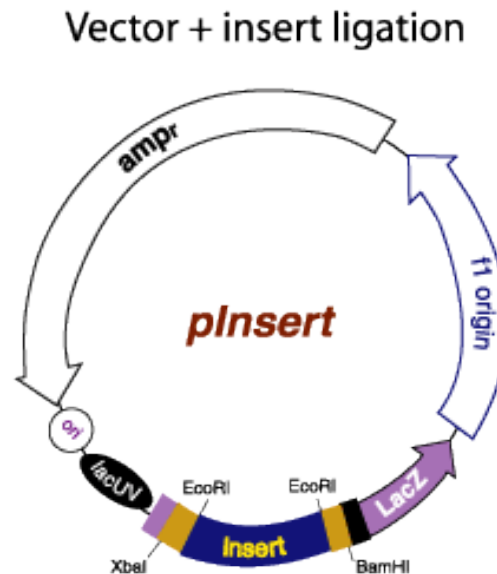
# Klonierung der LUX-Gene in pUC18:

## Was ist als Ergebnis zu erwarten?



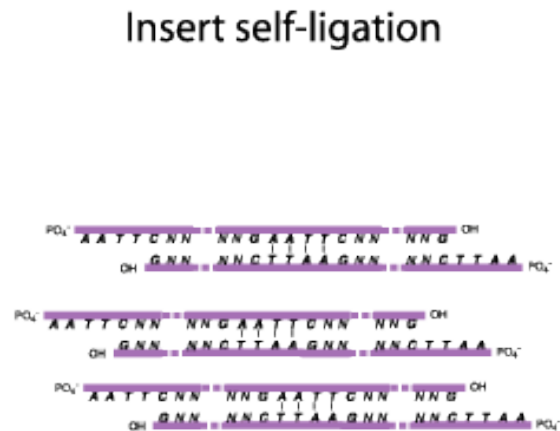
Amp+X-Gal plate

Religation des Vektors



Amp+X-Gal plate

„rekombinante“ DNA



Amp+X-Gal plate

Religation des Integrats

# Bestimmung der Transformationsrate

## Definition der Transformationsrate:

Die Transformationsrate ist die Zahl an Bakterienkolonien (cfu), die durch **1 µg Vektor-DNA** transformiert wird.

Bestimmen Sie die Transformationsrate unter der Annahme, dass die pUC18-Lösung, die wir Ihnen zur Verfügung gestellt haben, eine **Konzentration von 5 ng/µl** hatte!

# Bestimmung der Transformationsrate

5 ng pUC18/ $\mu$ l

für die TF eingesetzte pUC18-DNA: 5  $\mu$ l = 25 ng DNA

zzgl. Zellen: \_\_\_\_\_  $\mu$ l = \_\_\_\_\_ ng DNA

TF-Ansatz aufgefüllt: \_\_\_\_\_  $\mu$ l = \_\_\_\_\_ ng DNA

davon ausgestrichen: \_\_\_\_\_  $\mu$ l = \_\_\_\_\_ ng DNA

ergibt \_\_\_\_\_ Kolonien pro \_\_\_\_\_  $\mu$ g pUC18-DNA

oder (umgerechnet) \_\_\_\_\_ Kolonien pro 1  $\mu$ g Vektor-DNA



# Bestimmung der Transformationsrate

für die TF eingesetzte pUC18-DNA:      5  $\mu$ l =      25 ng DNA

zzgl. Zellen:                                      205  $\mu$ l =      25 ng DNA

TF-Ansatz aufgefüllt:                      \_\_\_\_\_  $\mu$ l = \_\_\_\_\_ ng DNA

davon ausgestrichen:                      \_\_\_\_\_  $\mu$ l = \_\_\_\_\_ ng DNA

ergibt \_\_\_\_\_ Kolonien pro \_\_\_\_\_  $\mu$ g pUC18-DNA

oder (umgerechnet) \_\_\_\_\_ Kolonien pro 1  $\mu$ g Vektor-DNA

# Bestimmung der Transformationsrate

für die TF eingesetzte pUC18-DNA:      5  $\mu$ l =      25 ng DNA  
zzgl. Zellen:                                      205  $\mu$ l =      25 ng DNA  
TF-Ansatz aufgefüllt:                      1205  $\mu$ l =      25 ng DNA  
davon ausgestrichen:                      \_\_\_\_\_  $\mu$ l = \_\_\_\_\_ ng DNA

ergibt \_\_\_\_\_ Kolonien pro \_\_\_\_\_  $\mu$ g pUC18-DNA  
oder (umgerechnet) \_\_\_\_\_ Kolonien pro 1  $\mu$ g Vektor-DNA

# Bestimmung der Transformationsrate

für die TF eingesetzte pUC18-DNA:	5 µl =	25 ng DNA
zzgl. Zellen:	205 µl =	25 ng DNA
TF-Ansatz aufgefüllt:	1205 µl =	25 ng DNA   : 1205
davon ausgestrichen:	_____ µl =	_____ ng DNA

ergibt \_\_\_\_\_ Kolonien pro \_\_\_\_\_ µg pUC18-DNA  
oder (umgerechnet) \_\_\_\_\_ Kolonien pro 1 µg Vektor-DNA

# Bestimmung der Transformationsrate

für die TF eingesetzte pUC18-DNA:	5 $\mu$ l =	25 ng DNA	
zzgl. Zellen:	205 $\mu$ l =	25 ng DNA	
TF-Ansatz aufgefüllt:	1205 $\mu$ l =	25 ng DNA	: 1205
	1 $\mu$ l =	0,02 ng DNA	

davon ausgestrichen: \_\_\_\_\_  $\mu$ l = \_\_\_\_\_ ng DNA

ergibt \_\_\_\_\_ Kolonien pro \_\_\_\_\_  $\mu$ g pUC18-DNA  
oder (umgerechnet) \_\_\_\_\_ Kolonien pro 1  $\mu$ g Vektor-DNA

# Bestimmung der Transformationsrate

für die TF eingesetzte pUC18-DNA:	5 µl =	25 ng DNA
zzgl. Zellen:	205 µl =	25 ng DNA
TF-Ansatz aufgefüllt:	1205 µl =	25 ng DNA   : 1205
	1 µl =	0,02 ng DNA
davon ausgestrichen:	100 µl =	2 ng DNA

ergibt \_\_\_\_\_ Kolonien pro \_\_\_\_\_ µg pUC18-DNA  
oder (umgerechnet) \_\_\_\_\_ Kolonien pro 1 µg Vektor-DNA

# Bestimmung der Transformationsrate

für die TF eingesetzte pUC18-DNA:	5 µl =	25 ng DNA
zzgl. Zellen:	205 µl =	25 ng DNA
TF-Ansatz aufgefüllt:	1205 µl =	25 ng DNA   : 1205
	1 µl =	0,02 ng DNA
davon ausgestrichen:	100 µl =	2 ng DNA
davon ausgestrichen:	100 µl =	0,002 µg DNA

ergibt **X** Kolonien pro **0,002 µg** pUC18-DNA  
oder (umgerechnet) \_\_\_\_\_ Kolonien pro 1 µg Vektor-DNA

# Bestimmung der Transformationsrate

für die TF eingesetzte pUC18-DNA:	5 µl =	25 ng DNA
zzgl. Zellen:	205 µl =	25 ng DNA
TF-Ansatz aufgefüllt:	1205 µl =	25 ng DNA   : 1205
	1 µl =	0,02 ng DNA
davon ausgestrichen:	100 µl =	2 ng DNA
davon ausgestrichen:	100 µl =	0,002 µg DNA

oder (umgerechnet) **X : 0,002 µg** Kolonien **pro 1 µg** Vektor-DNA

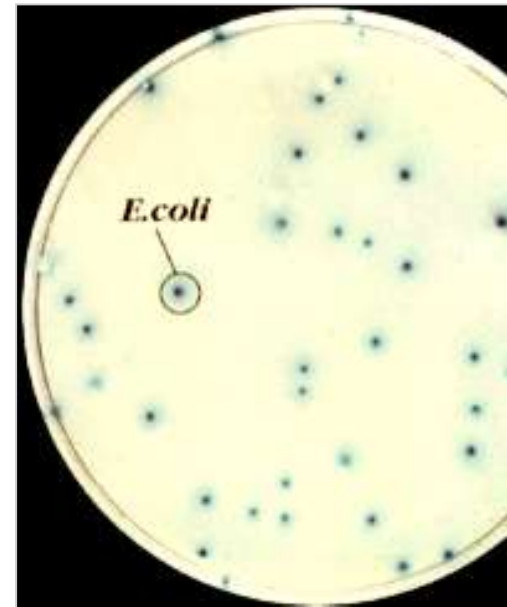
## Beispiel:

10 Kolonien ausgezählt: -> TF-Rate ist  $5 \cdot 10^4$

150 Kolonien ausgezählt: -> TF-Rate ist  $150 \cdot 500 = 7,5 \cdot 10^5$

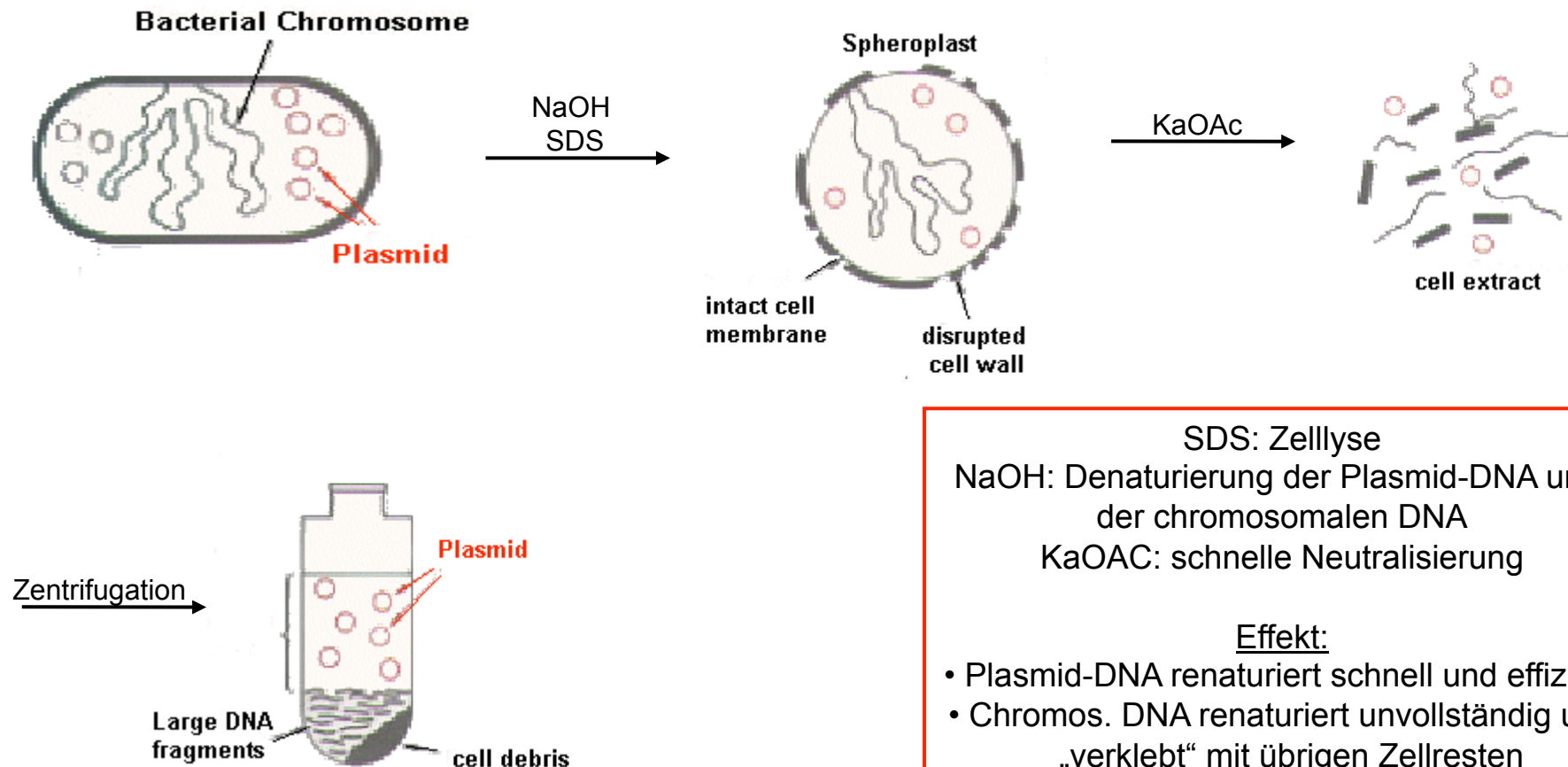
# Kurstag 8

- Auswertung des Transformationsexperiments ✓
- Animpfen von blauen und weißen Bakterienkolonien in L-Medium; Schütteln ü.N. 37°C ✓
- **Isolierung von Plasmid-DNA aus den rekombinanten Bakterienstämmen**
- Restriktion der Plasmid-DNA
- Gelelektrophorese
- Dokumentation und Auswertung der Gele





# Das Prinzip der „alkalischen Lyse“ nach Birnboim u. Doly (1979)



SDS: Zellyse

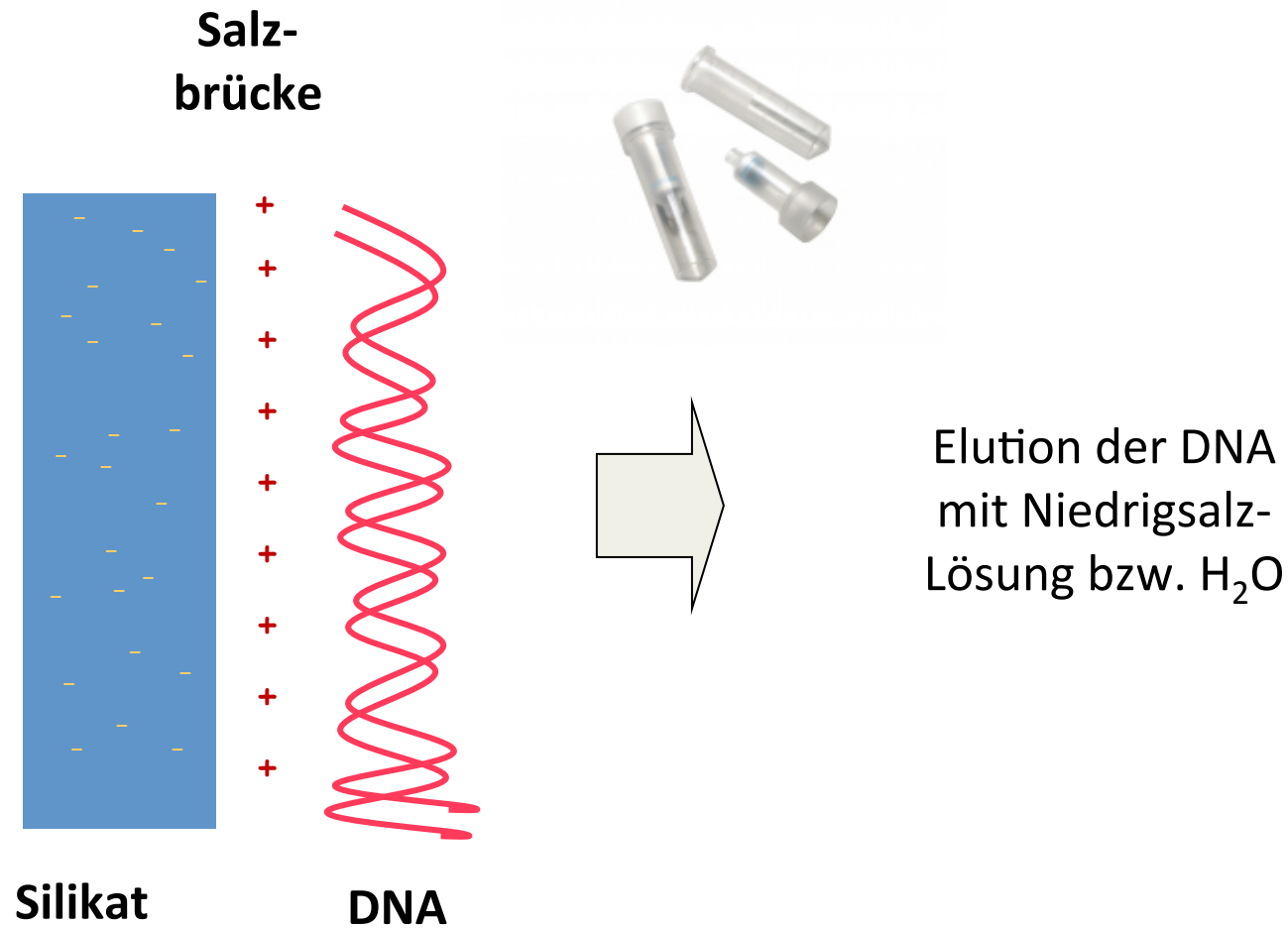
NaOH: Denaturierung der Plasmid-DNA und  
der chromosomalen DNA

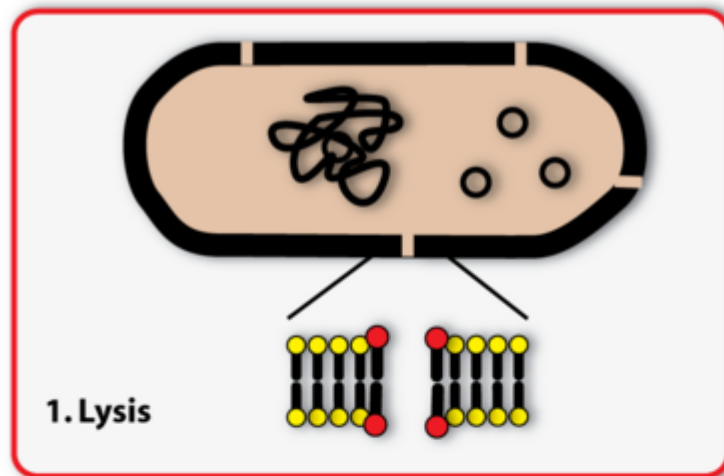
KaOAc: schnelle Neutralisierung

Effekt:

- Plasmid-DNA renaturiert schnell und effizient
- Chromos. DNA renaturiert unvollständig und „verklebt“ mit übrigen Zellresten
- > Entfernung der chromosomalen DNA durch Zentrifugation

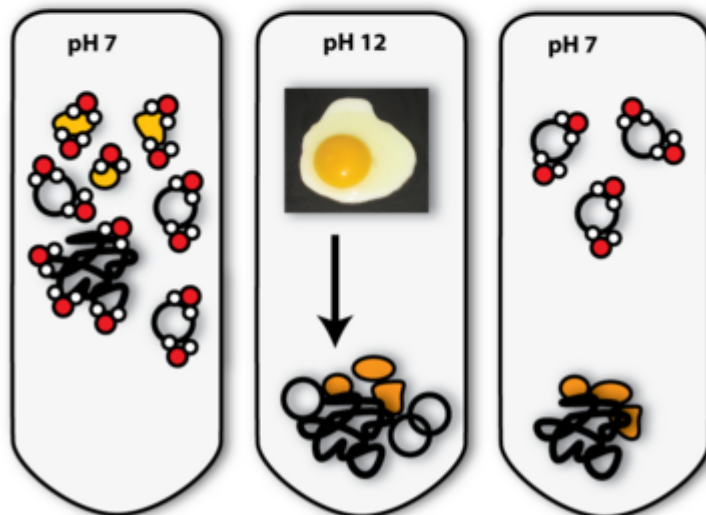
# Reinigung der Plasmid-DNA durch Filtration über Silicamembranen



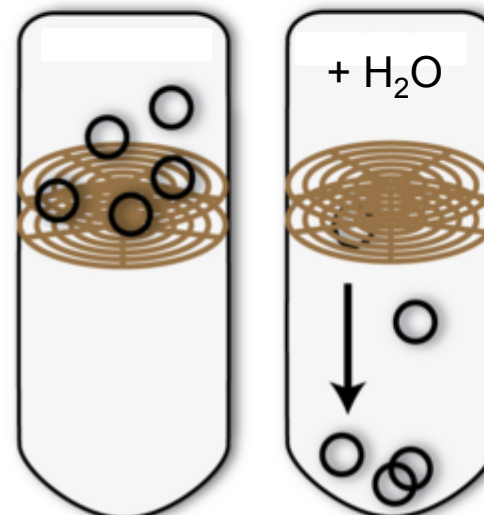


## Miniprep via alkaline lysis

### 2. Separation of Plasmids



### 3. Column Purification



Quelle: [http://2008.igem.org/wiki/images/thumb/7/7a/Miniprep\\_en.png/800px-Miniprep\\_en.png](http://2008.igem.org/wiki/images/thumb/7/7a/Miniprep_en.png/800px-Miniprep_en.png)

## Ist die genetische Transformation ein eher häufiges oder ein eher seltenes Ereignis?

- Berechnen Sie!

Wie hoch war die Zahl der pUC18-Moleküle, die für die Transformation eingesetzt wurde und wie viele pUC-Moleküle wurden von den *E. coli*-Zellen tatsächlich aufgenommen?

Zur Vereinfachung dieser Aufgabe gehen Sie bitte von einem durchschnittlichen Molekulargewicht von 660 Da für ein Basenpaar aus!

(für die TF eingesetzte Menge an Vektor-DNA: 25ng)

# Wie hoch ist der Anteil an pUC-Molekülen, die in *E.coli*-Zellen transformiert wurden?

(für die TF eingesetzte Menge an Vektor-DNA: 25ng)

## Tipp:

Zunächst überlegen Sie, wie viele Moleküle pUC18 für die Transformation eingesetzt wurden:

(durchschnittliches Molekulargewicht eines Nukleotids: 660 Da)

Wie groß ist der Vektor pUC18?

Welche DNA Menge haben Sie eingesetzt?

Wie vielen Molekülen entspricht dies?

## Wie hoch ist der Anteil an pUC18-Molekülen, die in *E.coli*-Zellen transformiert wurden?

1 Mol pUC18 ?

1 Mol pUC18 =  $6 \cdot 10^{23}$  Moleküle

Wie groß ist der Vektor pUC18?

2686 bp \* 660 Da = 1.772.760 g/mol

# Wie hoch ist der Anteil an pUC18-Molekülen, die in *E.coli*-Zellen transformiert wurden?

1 Mol pUC18 =  $6 \cdot 10^{23}$  Moleküle

2686 Bp \* 660 Da = 1.772.760g/mol

$6 \cdot 10^{23}$  Moleküle pUC18 = 1.772.760 g

# Wie hoch ist der Anteil an pUC19-Molekülen, die in *E.coli*-Zellen transformiert wurden?

1 Mol pUC18 =  $6 \cdot 10^{23}$  Moleküle

2686 Bp \* 660 Da = 1.772.760g/mol

$6 \cdot 10^{23}$ Moleküle pUC18 = 1.772.760 g	:1.772.760
$3,38 \cdot 10^{17}$ Moleküle pUC18 = 1g	: $10^9$
$3,38 \cdot 10^8$ Moleküle pUC18 = 1ng	



# Wie hoch ist der Anteil an pUC19-Molekülen, die in *E.coli*-Zellen transformiert wurden?

$$1 \text{ Mol pUC18} = 6 \cdot 10^{23} \text{ Moleküle}$$

$$2686 \text{ Bp} \cdot 660 \text{ Da} = 1.772.760 \text{ g/mol}$$

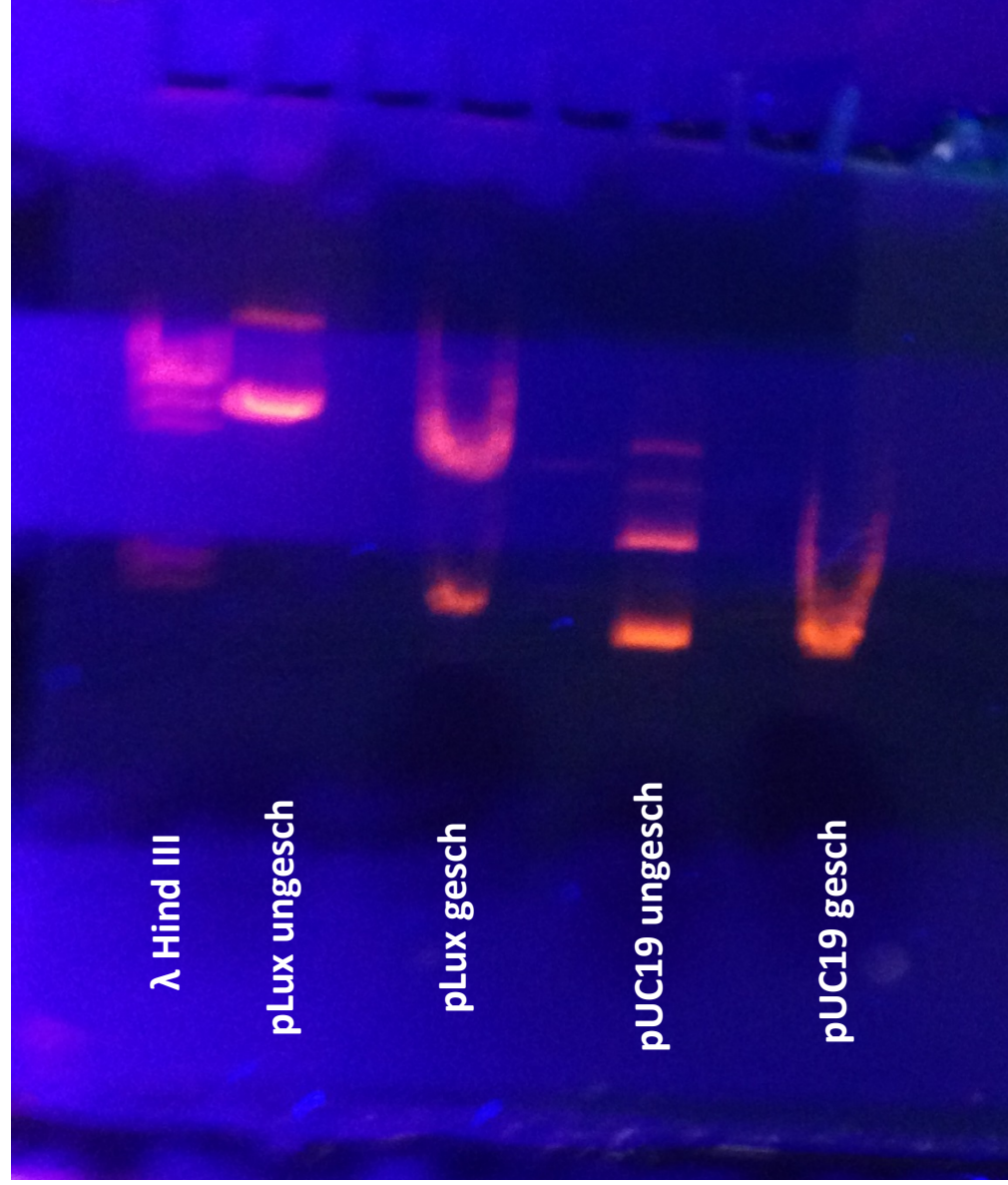
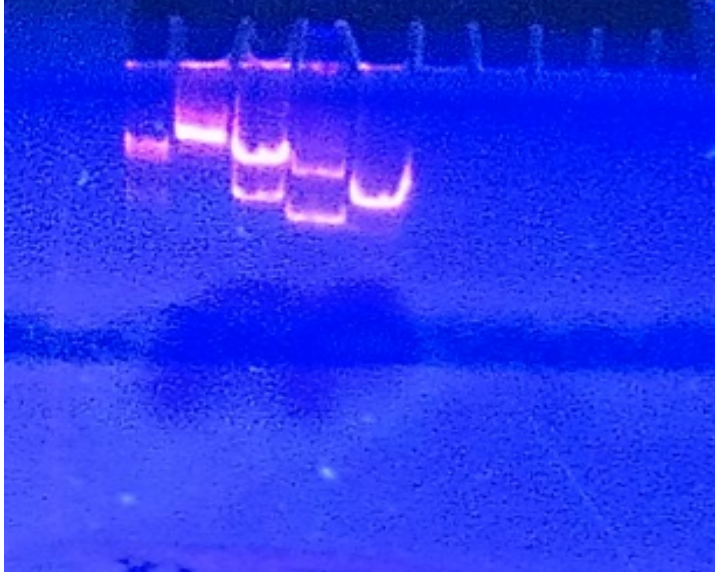
$$\begin{array}{lcl} 6 \cdot 10^{23} \text{ Moleküle pUC18} & = & 1.772.760 \text{ g} \quad | :1.772.760 \\ 3,38 \cdot 10^{17} \text{ Moleküle pUC18} & = & 1 \text{ g} \quad | :10^9 \\ 3,38 \cdot 10^8 \text{ Moleküle pUC18} & = & 1 \text{ ng} \quad | \cdot 25 \\ & & \text{(für die TF eingesetzte Menge an Vektor-DNA)} \end{array}$$

$$8,45 \cdot 10^9 \text{ Moleküle pUC18} = 25 \text{ ng pUC18}$$

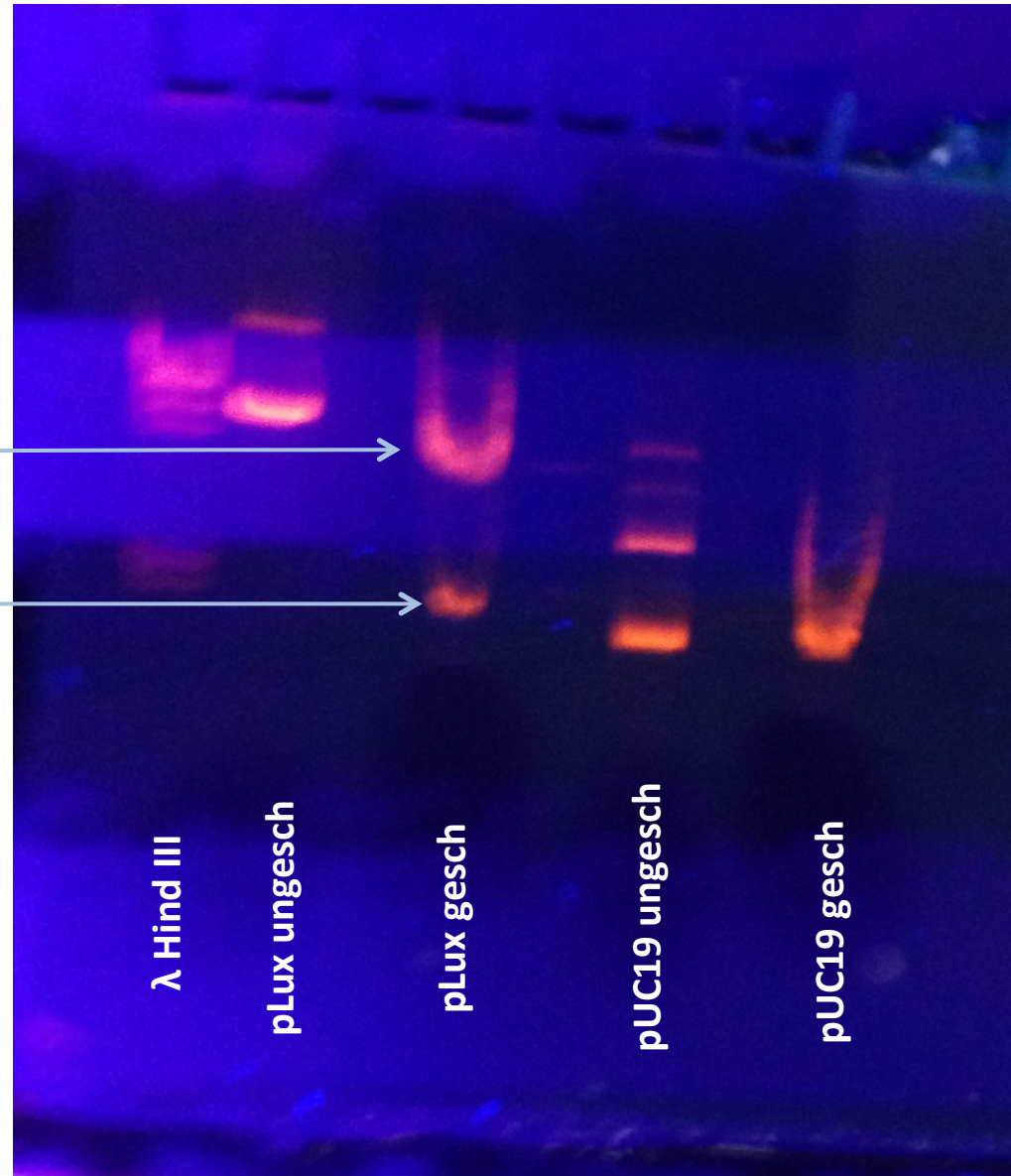
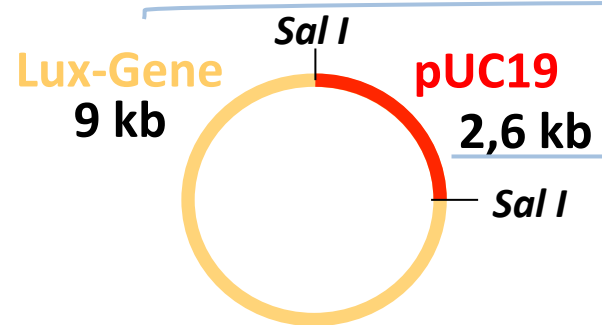
**-->  $8,5 \cdot 10^9$  Moleküle pUC18 wurden verwendet,  
um  $\sim 10^6$  Kolonien zu erzeugen**

# Fragen...

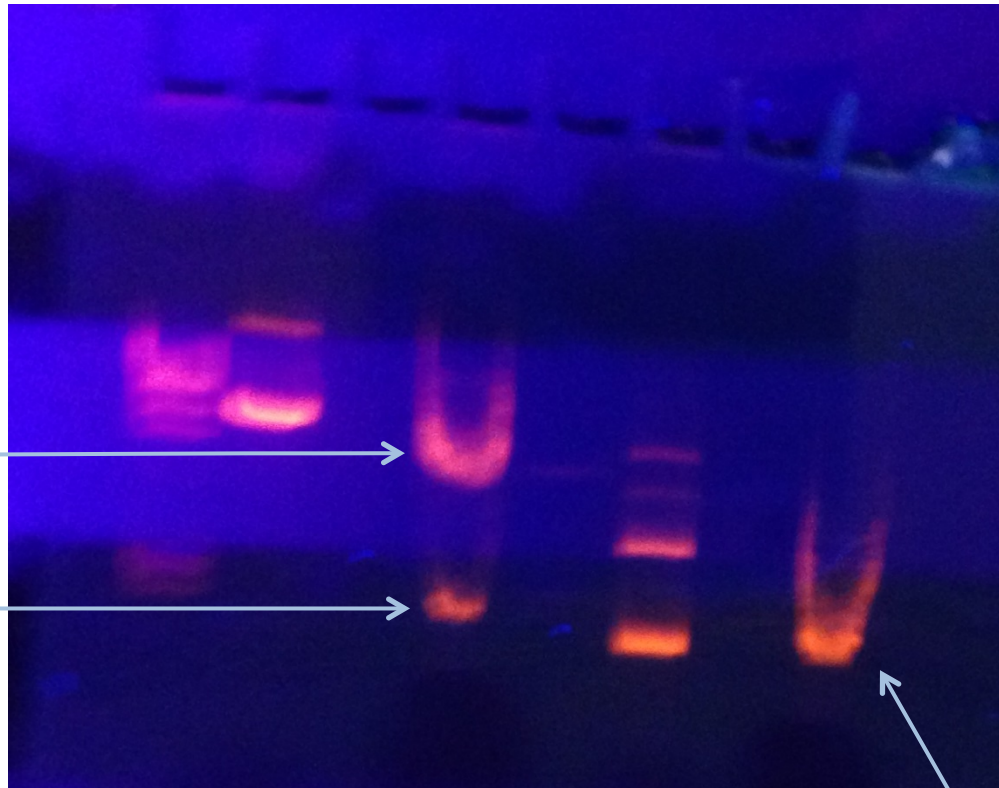
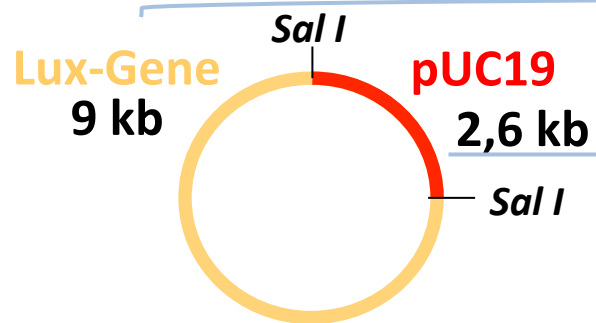
- Wie verhält sich die Ausbeute an Plasmid-DNA für pUC18 im Vergleich zu pLux? Können Sie dieses Ergebnis erklären?
- Welches **Muster** erwarten Sie als **Ergebnis der Gelelektrophorese** vor und nach der Restriktion von pUC18- bzw. pLux-DNA mit *Sal*I?



## pLux:



pLux:



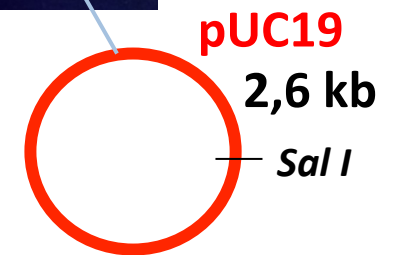
λ Hind III

pLux ungesch

pLux gesch

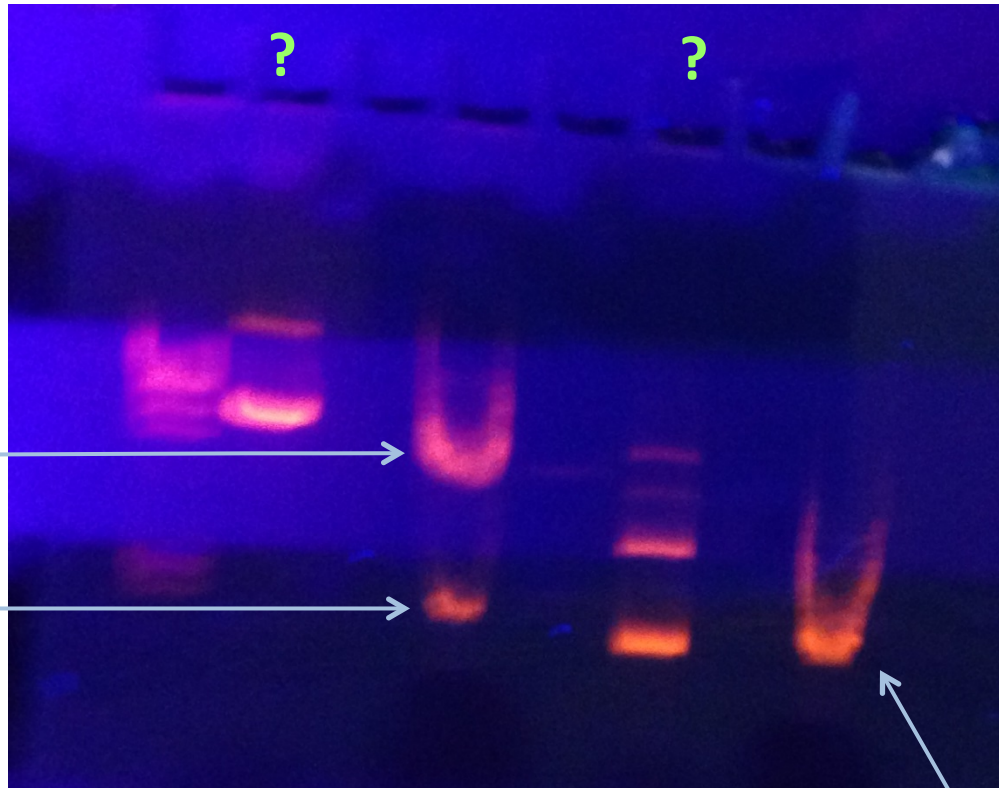
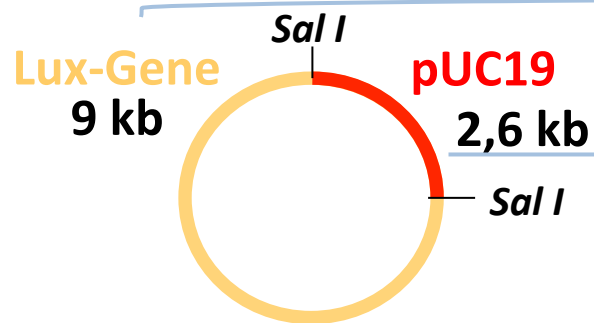
pUC19 ungesch

pUC19 gesch





# pLux:



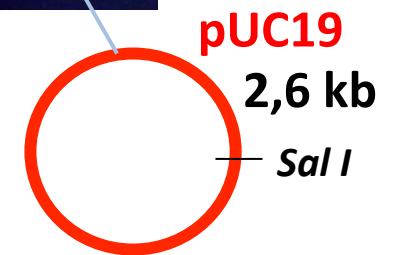
λ Hind III

pLux ungesch

pLux gesch

pUC19 ungesch

pUC19 gesch



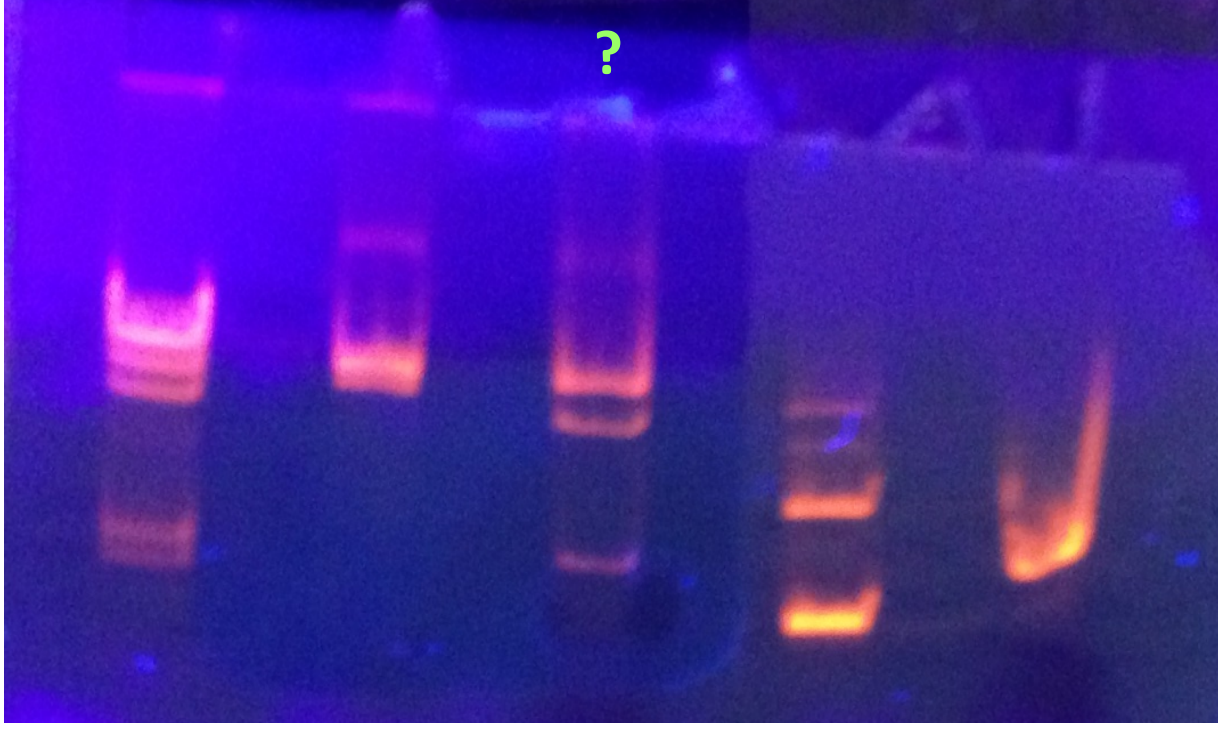
**λ Hind III**

**pLux ungesch**

**pLux gesch**

**pUC19 ungesch**

**pUC19 gesch**



# Zirkuläre DNA kann in verschiedenen Konformationen vorliegen

Nicht-superspiralisiert  $\longrightarrow$  superspiralisiert

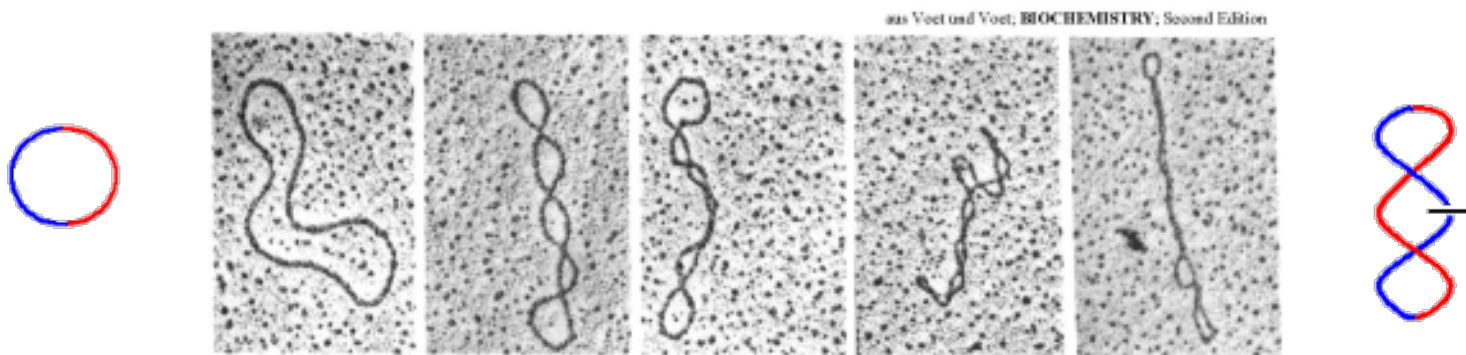


FIGURE 28-33. Electron micrographs of circular duplex DNAs that vary in their conformations from no supercoiling (left) to tightly supercoiled (right). [Electron micrographs by

Laurien Polder. From Kornberg, A. and Baker, T.A., *DNA Replication* (2nd ed.), p. 36, W.H. Freeman (1992). Used by permission.]

**Gyrationsradius:** Linear > Ringe > Supercoiled Ringe

$\rightarrow$  Unterschiedliche elektrophoretische Geschwindigkeit, Dichtegradienten