

Hinweise

Dies sind Protokolle zum Praktikum „Genetik und Molekularbiologie“ an dem ich im SS 2001 teilgenommen habe. Natürlich haben meine Protokolle keinen Anspruch auf Vollständigkeit und Fehlerlosigkeit. Sie basieren auf dem Skript zum Praktikum, auf das auch zahlreiche Verweise gemacht werden.

Versuch 1: Bestimmung des Lebendtiters von Saccharomyces cerevisiae (S. cerevisiae)

Einleitung:

Mit diesem Versuch soll die Zellanzahl der Hefe *S. cerevisiae* in einem Milliliter der Ausgangslösung festgestellt werden.

Material und Methoden:

s. auch Skript

- 16 YEP – Platten (VM)
- 10 Verdünnungsröhrchen a 4,5 ml steriler 0,9%iger NaCl – Lösung
- Drigalskispatel
- eine YEP – Platte mit *Saccharomyces cerevisiae*
- 1 ml sterile 0,9%ige NaCl – Lösung in 2 ml Eppendorfgefäß

Die Hefezellen werden zunächst in einer Kochsalzlösung suspendiert, die dann immer weiter verdünnt wird. Danach hat man Lösungen mit Konzentrationen von 10^{-1} bis 10^{-9} . Davon werden dann auf je zwei Agar - Platten (Vollmedium) 0,1 ml der Lösungen ausplattiert und bei 28°C inkubiert, dem Temperaturoptimum der Hefe.

Resultate:

Die Platten wurden, anders als im Skript angegeben, schon am Dienstag ausgezählt und nicht erst am Donnerstag, da sie bereits genügend gewachsen waren.

Konzentration	Gezählte Kolonien
10^{-1}	Zu dicht gewachsen
10^{-2}	Zu dicht gewachsen
10^{-3}	Zu dicht gewachsen
10^{-4}	527 450
10^{-5}	58 66
10^{-6}	29 16
10^{-7}	Nicht gezählt
10^{-8}	Nicht gezählt
10^{-9}	Nicht gezählt

Dabei muss man beachten, dass die angegebenen Konzentrationen noch um eine Zehnerpotenz erniedrigt werden müssen, da von dem 1 ml der Ausgangslösung nur 1 µl ausplattiert wurde, also eine weitere Verdünnungsstufe erreicht wurde. Die zwei unterschiedlichen Zahlen stammen von den beiden Platten auf die ausplattiert wurde.

Um nun den Lebendtiter auszurechnen, muss man erst den Mittelwert der beiden Platten bilden. Mit diesem rechnet man nun auf die Ausgangslösung zurück. Von den drei Werten, die man erhält, bildet man dann ebenfalls den Mittelwert und das Ergebnis ist dann die Anzahl an (lebenden) Hefezellen in der Ausgangslösung, der Lebendtiter.

Rechnung:

1. Mittelwert: $(527 + 450) / 2 = 488,5$
1.Lebendtiter: $488,5 * 10^5$

2. Mittelwert: $(58 + 66) / 2 = 62$
2.Lebendtiter: $62 * 10^6$

3. Mittelwert: $(29 + 16) / 2 = 22,5$
3.Lebendtiter: $22,5 * 10^7$

Lebendtiter (Mittelwert):

$$(488,5 * 10^5 + 62 * 10^6 + 22,5 * 10^7) / 3 = (3,3585 * 10^8) / 3 = 1,1195 * 10^8$$

In einem Milliliter der Ausgangslösung sind also ca. $1,195 * 10^8$ lebende Zellen der Hefe *S. cerevisiae*.

Versuch 2: Sexuelle Hybridisierung bei der Hefe *S. cerevisiae* auxotrophe, konditionale und Farbmутanten

Einleitung:

In diesem Versuch wurden verschiedene Hefezellenstämme gekreuzt. Die Kreuzungen wurden dann auf auxotrophe und auch konditionale Mutanten untersucht.

Material und Methoden:

s. auch Skript

YEP - Platte mit den jeweiligen Kreuzungspartnern
eine YEP - Platte mit Impfstrichen der beiden α - Stämme 41 und A334
4 YEP - Platten
1 YNB - Platte (MM), 1 YNB - Platte + Leucin
sterile Samtläppchen und Stempel
Hefestämme als Kreuzungspartner:

Bezeichnung	Paarungstyp	Mutationen
DBY 747	a	his3 leu2 ura3 trp1
SHY - 4	a	ura3 trp1 leu2 his3
41	α	ade2 trp5 ile1
A334	α	leu2 phe2 arg8 prt1

Da Konjugation nur zwischen Stämmen stattfinden kann von denen einer den Paarungstyp α und der andere a hat, werden die Stämme so auf die Platten überstempelt, dass insgesamt vier verschiedene "Überlappungsgebiete" von verschiedenen Stämmen auftreten, so dass jeder Stamm mit a - Paarungstyp mit jedem mit α - Paarungstyp gekreuzt wird. Bis Dienstag wachsen sie zunächst auf VM und werden dann auf die anderen Platten gestempelt.

Die α - Stämme werden zur Auffindung konditionaler Mutanten auf zwei VM Platten gestempelt, wovon die eine bei 28°C und die andere bei 37°C bebrütet wird.

Resultate:

Man erwartet, dass auf dem VM alle Stämme wachsen, da alle benötigten Stoffe vorhanden sind bzw. alle Stoffe die nötig sind, um die benötigten Stoffe zu synthetisieren. Dies war auch der Fall.

Auf der MM - Platte, auf der Leucin nicht supplementiert (zugegeben) ist, die Zellen ihn also selbst synthetisieren müssen, können nur die Stämme wachsen, die nicht beide eine Mutation im gleichen Gen aufweisen, da dort keine Komplementation stattfinden kann. Denn diese Zellen besitzen somit kein Gen für ein Enzym das an der Synthese eines Stoffes, hier Leucin, beteiligt ist. Folglich müssen die Kreuzungen von DBY 747 mit 41 und SHY - 4 mit 41 wachsen. Die beiden anderen nicht. Alle anderen Mutationen werden von den Kreuzungspartnern komplementiert. Tatsächlich wuchsen die Kreuzung von DBY 747 und 41, die von SHY - 4 mit 41 jedoch nicht.

Auf der MM - Platte mit Leucin müssten alle Kreuzungen wachsen, da das Leucin vorhanden ist, also die Zellen es nicht notwendigerweise synthetisieren müssen. Hier wuchsen nur die Kreuzung von DBY 747 mit 41 und die von DBY 747 mit A334 leicht.

Die Ergebnisse waren anders als erwartet, da der Stamm SHY - 4 wahrscheinlich bereits eine spontane Mutation erfahren hatte.

Im zweiten Teilversuch konnten wir beobachten, dass der Stamm A334 eine temperatursensitive Mutante ist. Auf der bei 37°C inkubierten Platte fand nämlich kein Wachstum statt. Im Gegensatz zu dem Stamm 41, der bei beiden Temperaturen gewachsen ist.

Versuch 3: Amplifikation des HIS3 – Gens von Pichia stipitis mittels der Polymerase – Kettenreaktion (PCR)

Einleitung:

In diesem Versuch sollte ein Gen aus der Hefe *Pichia stipitis* amplifiziert (= vermehrt) werden. Dies geschah mit der Polymerase – Kettenreaktion. Anschließend wurde noch eine Gel - Elektrophorese durchgeführt.

Material und Methoden:

s. auch Skript

Plasmid – DNA (template)
10 x Taq – Polymerase – Puffer
MgCl₂ – Lösung 25 mM
dNTP – Mix 10 mM
Primer
Taq - Polymerase
steriles Aqua bidest.

In das Reaktionsgemisch wurden die Template – DNA (ein Plasmid), Primer, ein dNTP – Mix („freie“ Nucleotide) und Taq – Polymerase gegeben. Es wurden drei Ansätze hergestellt: in einen wurde Wasser zugegeben (Kontrolle), in den zweiten pUC HIS3 Plasmid (Template) und in den letzten pUC HIS3 / 1 Plasmid (Template). Das Enzym Taq - Polymerase synthetisiert dann an den durch Hitze aufgebrochenen DNA – Doppelsträngen pro Strang je zwei neue, zu der Template – DNA komplementäre Stränge, so dass aus einem Doppelstrang zwei werden, mit denen das Verfahren dann ebenfalls durchgeführt wird. Dies findet in einem Cycler statt, der dann die für jede Phase notwendige Temperatur generiert. Anschließend wurde dann die amplifizierte DNA in die Slots eines Agarose - Gels gegeben und Strom angelegt. Das führt dazu, dass die negativ geladene DNA vom Pluspol weg durch das Gel "wandert". Dabei wandern die kürzeren, leichteren Fragmente weiter als die längeren, schwereren. Die zusätzlich hinzugegebenen DNA - Fragmente des Lambda - Phagen (Marker) ermöglichen einen genaueren Vergleich und Aussagen über die DNA - Fragmentlängen.

Resultate:

In dem Ansatz mit Wasser darf natürlich keine Amplifikation passieren, also auch im Gel keine DNA - Bande zu erkennen sein. Dies würde auf eine Verunreinigung des Prä - Mixes hindeuten.

In den beiden anderen Ansätzen findet eine Amplifikation statt. Da die Template - DNA unterschiedlich ist, entstehen auch DNA - Fragmente unterschiedlicher Länge, die im Gel unterschiedlich weit wandern. Die geringe Anzahl an im Gel weit gewanderten DNA - Fragmenten sind solche, die noch nicht oder nicht vollständig amplifiziert wurden. Im einen pUC HIS3 Ansatz lässt sich eine DNA - Bande von ca. 800 bp (Basenpaaren) erkennen und im anderen eine von ca. 2,7 kb.

Versuch 4: Transformation von E.coli mit dem Plasmid pUC HIS 3 und pUC

Einleitung:

In diesem Versuch sollten transformierte E.coli - Zellen über die Blau -Weiß - Selektion erkannt werden.

Material und Methoden:

s. auch Skript

kompetente E.coli DH5 α
Plasmid - DNA - Lösung

800 μ l LB - Medium (evtl. LB + Salze zugeben)
LBA/IX - Platten: 250 ml LB - Agar
2,5 ml Ampicillin
0,5 ml IPTG
1,25 ml X - Gal

Bei der Transformation nehmen Zellen „nackte“ DNA aus ihrer Umgebung auf. Da E.coli natürlicherweise nicht kompetent ist, wird dieses z.B. mit Schockgefrieren, Hitzeschock und ähnliches induziert. Wir vermischen in einen Ansatz kompetente Zellen mit dem Plasmid pUC (als Kontrolle), im anderen kompetente Zellen mit dem pUC HIS3 Plasmid. Da diese Plasmide ein Ampicillin – Resistenzgen enthalten, kann man die Zellen bei denen die Transformation erfolgte auf Ampicillin – haltigen Platten selektieren. Zudem können die Zellen, die das Plasmid mit dem pUC HIS3 Plasmid aufgenommen haben, den ebenfalls im Medium enthaltenen, farblosen Stoff X - Gal in blaue β – Galactosidase umwandeln. Man kann dann die sogenannte Blau – Weiß – Selektion durchführen, da man die Kolonien anhand ihrer Farbe unterscheiden kann. Auf drei Platten wurden je 50 μ l, auf je einer Platte 100 μ l und auf der letzten der herunterzentrifugierte Rest ausplattiert.

Resultate:

Auf den Platten, auf denen die Zellen ausplattiert wurden, zu denen das pUC HIS3 Plasmid gegeben wurde, erwartet man ausschließlich blaue Kolonien, da die transformierten Zellen einerseits β - Galactosidase synthetisieren und andererseits ampicillin - resistent sind. Auf den anderen Platten, auf die der Ansatz mit dem pUC Plasmid plattiert wurde, erwartet man ausschließlich weiße Kolonien, da hier die transformierten Zellen nur ein Ampicillin - Resistenzgen mit dem Plasmid aufgenommen haben. In beiden Ansätzen sterben die nicht transformierten Zellen ab.

Die Beobachtungen entsprachen den Erwartungen. Dabei wuchsen auf den Platten, auf die der Rest plattiert wurde, die Zellen so dicht, dass ein Zellrasen entstanden war. Auf der Platte mit 100 μ l des Ansatzes wuchsen mehr Kolonien als auf den Platten mit 50 μ l des Ansatzes.

Versuch 5: Photometrische Bestimmung der Konzentration und Reinheit von Nukleinsäuren

Einleitung:

Indem UV - Licht durch eine DNA – Probe in einer Quarzküvette mit bekannter Schichtdicke geleitet wird und dann gemessen wird, wie viel des Lichtes nicht absorbiert wird, kann man Rückschlüsse auf die Verunreinigung mit Proteinen schließen.

Material und Methoden:

s. auch Skript

- DNA aus der Plasmidpräparation
- Quarz - Küvette
- UV - Spektrometer

Die DNA wird mit Wasser (795 µl Wasser und 5 µl DNA) in die Quarzküvette (Schichtdicke: 0,5 cm) gefüllt und UV - Licht hindurchgestrahlt. Ein Photomultiplier misst die Intensität des nicht absorbierten Lichts. Es wurde einmal mit Licht der Wellenlänge 260 nm (ungefähr das Absorptionsmaximum von DNA) gemessen und einmal mit Licht der Wellenlänge 280 nm (Absorptionsmaximum von Proteinen) .

Resultate:

Wellenlänge	Absorption
260 nm	0,078
280 nm	0,015

Verdünnung der DNA = 160
Extinktionskoeffizient = 50

Berechnung des Gehaltes an DNA (µg / ml):

$A_{260} * \text{Verdünnung der DNA} * \text{Schichtdicke der Quarzküvette} * 50$

$$\Rightarrow 0,078 * 160 * 0,5 * 50 = 312 \mu\text{g} / \text{ml}$$

Berechnung des Gehaltes an Proteinen (µg / ml):

$A_{280} * \text{Verdünnung der DNA} * \text{Schichtdicke der Quarzküvette} * 50$

$$\Rightarrow 0,015 * 160 * 0,5 * 50 = 60 \mu\text{g} / \text{ml}$$

Quotient: $60 / 312 = 0,19 \ll 1,8$

d.h. also, dass die DNA - Lösung sehr stark durch Proteine verunreinigt ist.

Versuch 6: Restriktionsenzymverdau von Plasmid – DNA und elektrophoretische Auftrennung der Fragmente

Einleitung:

In diesem Versuch wird DNA mit Restriktionsenzymen verdaut und anschließend werden die DNA - Fragmente verschiedener Länge in der Gelelektrophorese aufgetrennt.

Material und Methoden:

37°C Brutraum			
sterile 1,5 Eppendorf tubes			
sterile Pipettenspitzen			
Eppendorf Pipetten			
steriles Wasser			
2 x Agarosegel - Probepuffer:	Bromphenolblau	0,1 % (w/v)	50 mg
	Xylencyanol	0,1 % (w/v)	50 mg
	Glycerol	50 % (w/v)	25 g
	TBE, pH 8,3	2 x	10 ml
	steriles H ₂ O	-	ad 50 ml
Lambda Größen - und Konzentrationsmarker			
Ethidiumbromid	1 % (w/v)		
TBE (10 x)	Tris - Base		900 mM
	Borsäure		900 mM
	EDTA x 2 H ₂ O		25 mM
	pH 8,3		

In das Reaktionsgemisch kommen DNA, das Restriktionsenzym (RE) EcoRI und steriles Wasser. Dieser Ansatz wird 2h bei 37°C inkubiert. Diese Zeit hielten wir nicht ganz ein, aber die DNA wurde dennoch fast vollständig verdaut. Das überprüften wir nämlich mit einer anschließenden Gel – Elektrophorese.

Auswertung:

Die DNA wurde in zwei Stücke geschnitten, da sie zwei Schnittstellen für das RE EcoRI aufweist. Restriktionsenzyme werden auch Restriktionsendonukleasen genannt, da sie einen DNA – Strang nicht am Ende schneiden, sondern mittendrin. Das Restriktionsenzym „schneidet“ dann an einer spezifischen Stelle, der Erkennungssequenz. Erkennungssequenzen sind meist kurze Sequenzen von ca. 6 – 8 Basenpaaren mit Basen in einer spezifischen Reihenfolge. Da versetzt im Zucker – Phosphat – Rückgrat geschnitten wird, entstehen kurze DNA – Einzelstrangenden, die sogenannten „sticky – ends“ (= klebrige Enden), da sie dazu neigen, sofort Wasserstoffbrückenbindungen zu komplementären Sequenzen einzugehen. Das kann dann entweder fremde DNA sein (was in diesem Versuch nicht gemacht wurde) oder das zuvor abgetrennte Stück. Durch Ligase können diese Bindungen dann wieder gefestigt werden. Im Versuch hatte das eine Stück eine Länge von ca. 2,7, das andere von 2,8 kb, so dass sie im Gel nahezu gleichweit liefen und zu einer Bande verschmierten. Die geringe Menge unverdaute DNA lief nicht so weit, da sie natürlich länger ist, als die schon geschnittenen Stücke.

Literatur:

Skript zum Praktikum
Biologie, Neil A. Campbell, 2000, Spektrum - Verlag