

Ablauf Gentechnikpraktikum im WS 2019/2020

Termin: 17.02.2020 – 28.02.2020, täglich 9.00 Uhr bis max. 17.00 Uhr

Raum: Praktikumsraum, 3. OG, Einsteinstr. 3

Teilnehmer: max. 18 Studenten (6 Gruppen zu je 2-3 Studenten)

Thema: Klonierung & Expression von Genen aus Bakterien

Einführung: Das Hauptziel des Praktikums besteht im Erlernen gentechnischer Standardmethoden. Dieses Lernziel wird mit aktuellen Anforderungen der Forschung in der Abteilung Pflanzenphysiologie kombiniert. In diesem Jahr sollen Gene kloniert und exprimiert werden, die für Proteine des Zuckerstoffwechsels in dem Modellcyanobakterium *Synechocystis* sp. PCC 6803 bzw. des Serinstoffwechsels der Pflanze *Arabidopsis* kodieren. Alle Gene bzw. Proteine spielen eine wichtige Rolle im primären C-Stoffwechsel in Cyanobakterien bzw. Pflanzen (Glycolyse/Photorespiration/Glycogenstoffwechsel). Im Praktikum sollen diese Gene jeweils in Expressionsvektoren zur Proteingewinnung gebracht werden. Die experimentelle Bestätigung der biochemischen Funktion durch Nachweis der entsprechenden Enzymaktivität der rekombinanten Proteine wird in den erfolgreichen Ansätzen angestrebt.

Im Praktikum werden Techniken der DNA-Isolation, Gelelektrophorese, DNA-Restriktion, -Ligation, sowie Proteinisolation, -Trennung und -Aufreinigung durchgeführt. Bei längeren Inkubationszeiten werden im Computerpool einschlägige Programme zur DNA-Klonierung sowie zum Sequenzvergleich vorgestellt und geübt.

Ablauf (Zeiten dienen der Orientierung, sind unverbindlich!):

1. Woche

Montag:

- 9-10 - Ansatz von PCR-Reaktionen zur Amplifikation von Genen bzw. cDNAs
- 10-12 - Einführung
- 13-14 - Agarose-Gel zur Überprüfung der PCR-Reaktionen
- 13-14 - Einführung in den Clone Manager im Computerpool
- 15-16 - Ansatz von Ligationen erfolgreich amplifizierter PCR-Fragmente in pGEMT (evtl. Neuansatz von PCR-Reaktionen)
- 15-16 - Einimpfen von *E. coli* zur Isolation der Plasmide pET28a, pET28b, IBA6+

Dienstag:

- 9-10 - Plasmidisolation (pET28/IBA6 u.a.) über Säulchen
- 10-11 - Kontrollrestriktionen der isolierten Plasmide
- 14-16 - Transformation der pGEMT-Ligationen in *E. coli*, Gießen von AXI-Platten

Mittwoch:

- 9-10 - Überprüfung wahrscheinlich rekombinanter pGEMT-Klone mit PCR
- 9-10 - Ansatz der Restriktionen des Expressionsplasmids, pET28a/IBA6
- 10-12 - Fertigstellung der *in silico* Klonierungen mit Clone Manager
- 14-15 - Agarosegel vom geschnittenen pET28/IBA6, Gelelektion
- 14-16 - Trennung der Kontroll-PCR-Reaktionen im Agarosegel
- 15-16 - Einimpfen vermutlich richtiger Klone mit pGEMT-Konstrukten zur ÜNK
-

Donnerstag :

- 9-10 - DNA-Gewinnung durch Minipräparation aus den Übernachtskulturen
- 10-11 - Überprüfung der DNA durch Kontrollrestriktion
- 11-13 - Gelelektrophorese zur Auftrennung der Kontrollrestriktion, pro Gruppe ein richtiges DNA-Präparat zur Sequenzierung
- 13-14 - Elution der Fragmente aus dem Agarosegel
- 15-16 - Ansatz von Ligationen der eluierten Gene mit geschnittenem pET28/IBA6
- 16-17 - Transformation der Ligationen

Freitag:

- 9-10 - Überprüfung rekombinanter Klone mit pET28/IBA6 durch PCR
- 13-14 - Agaroseelektrophorese der Kontroll-PCR mit pET28/IBA6 (auch Gelelution)
- 14-15 - Einimpfen vermutlich rekombinanter Klone zur Übernachtskultur

2. Woche

Montag:

- 9-10 - Plasmidminipräparation aus vermutlich rekombinanten pET28/IBA6-Klonen
- 10-11 - Kontrollrestriktionen
- 13-14 - Gelelektrophorese der Kontrollrestriktionen
- 14-16 - bestätigte Konstrukte von pET28/IBA6 mit den verschiedenen DNAs/Genen werden nach *E. coli* Stamm BL21 transformiert

Dienstag:

- 9-10 - je 3 Klone von *E. coli* BL21 mit pET28/IBA6-Konstrukten in LB-Medium mit und ohne Induktor einimpfen
- 10-12 - Herstellung der Polyacrylamidgele
- 13-14 - nach 3 h Ernte, Lysat direkt auf SDS-Gel und Trennung
- 16-17 - Klon mit der besten Expression zur Übernachtskultur einimpfen
- 13-15 - Auswertung der Sequenzierungen bei AG Bastrop

Mittwoch:

- 9-15 - Anzucht von *E. coli* BL21 mit rekombinanten pET28/IBA6-Vektoren in Kolbenkultur, Zugabe von Induktor in exponentieller Wachstumsphase
- 12-15 - Computerraum, Sequenzvergleiche, BLAST, Phylogenieprogramme

Donnerstag:

- 9-15 - Proteinisolation und –Reinigung über Affinitätschromatographie (Ni-NTA/Streptavidin)

Freitag:

- 9-12 - Herstellung SDS-Gel
- 10-12 - Messung von Enzymaktivitäten
- 13-15 - Trennung der Überexpressionsproben im SDS-Gel
- 13-16 - Auswertung und Aufräumen