

Ablauf gentechnischer Kurs 2019 – Klonierung und Expression bakterieller und pflanzlicher Gene

- Termin:** 18.2.2019 – 1.3.2019
Täglich 9.00 Uhr bis ca. 16.00 Uhr
Einstündige Mittagspause je nach Arbeitsablauf
- Raum:** Praktikumsraum, 3. OG, Einsteinstr. 3a,
- Teilnehmer:** max. 18 Studenten (6 Gruppen zu je 2-3 Studenten)
- Mitzubringen sind:** Kittel, USB-Stick
Permanentmarker, fein
Schreibzeug
ausgedruckte Vorschriftensammlung
(Script auf Homepage)



Klonierung und Expression Bakterieller und pflanzlicher Gene

Pro Gruppe wird ein Gen/Protein bearbeitet

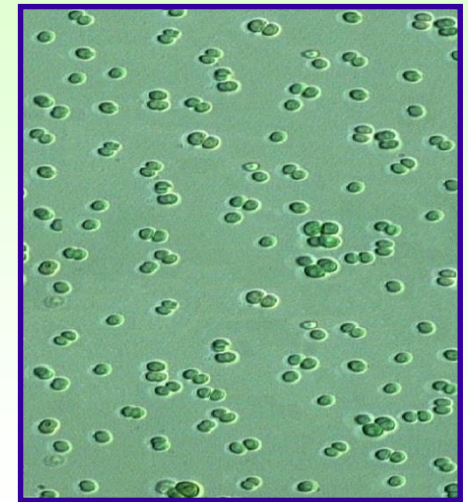
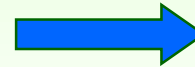
1. **SyPGAM1** – Phosphoglyceratmutase 1 aus *Synechocystis*, sll0395
2. **SyPGAM2** – Phosphoglyceratmutase 2 aus *Synechocystis*, Slr1945
3. **SyPGAM3** – Phosphoglyceratmutase 3 aus *Synechocystis*, Slr1748
4. **SyGAPDH1** – Phosphoglyceraldehyd-3-P Dehydrogenase 1 aus *Syn*, Slr0885
5. **SyGAPDH2** – Phosphoglyceraldehyd-3-P Dehydrogenase 2 aus *Syn*, Slr1342
6. **EcGvcL** – T-Protein Untereinheit der GDC aus *E. coli*



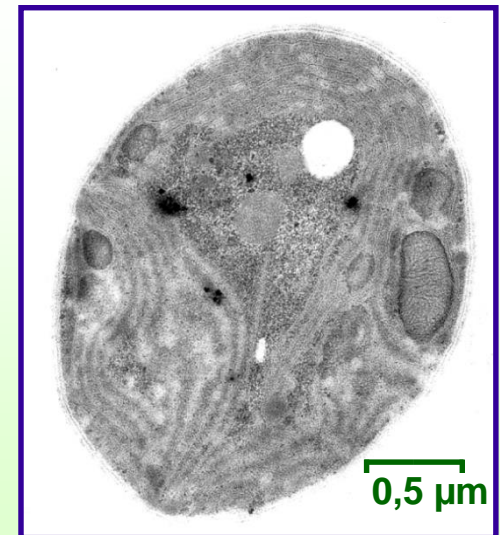
Dominierendes Untersuchungsobjekt

Cyanobacteria

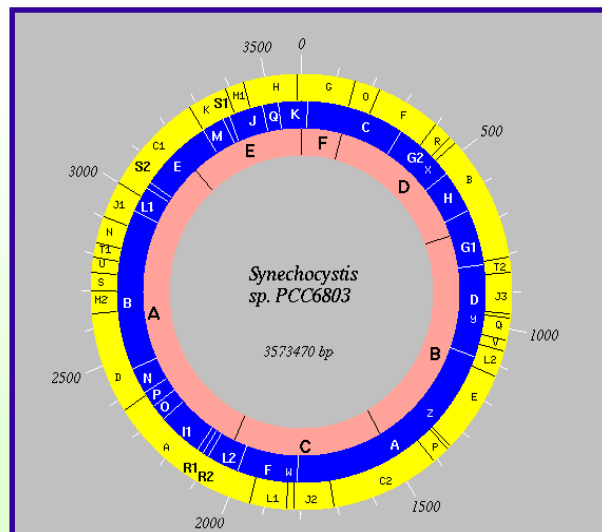
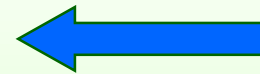
Synechocystis sp. PCC 6803
3,7 Mbp
Unicellular
Euryhaline
Natural transformable
Photo-heterotrophic growth



10 μ m



0,5 μ m

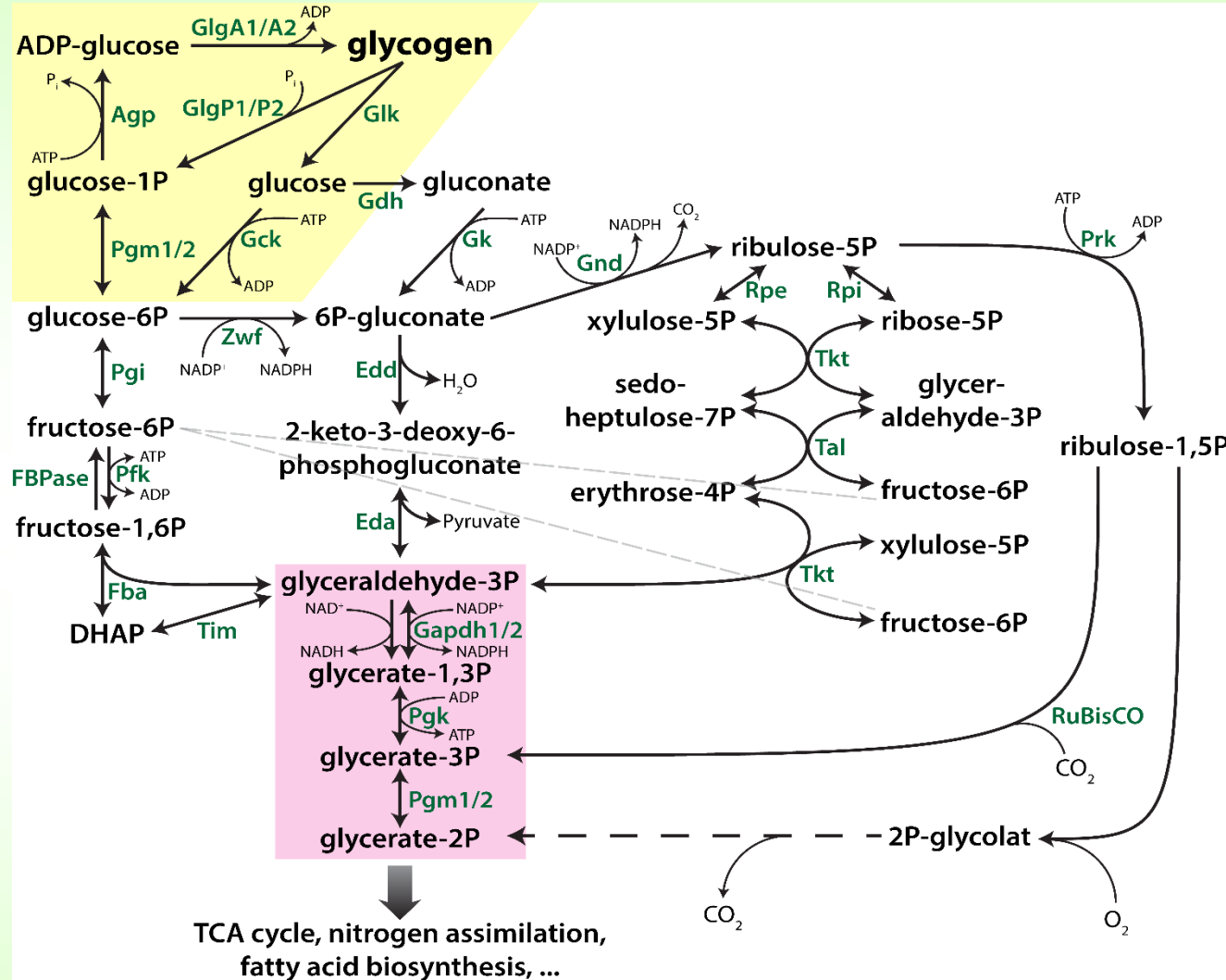
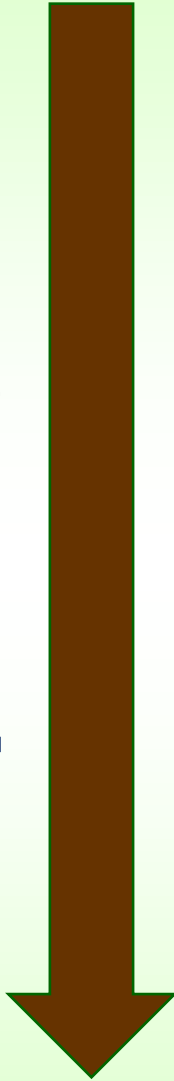


Kaneko et al. 1996, DNA Res. 3, 109-136.



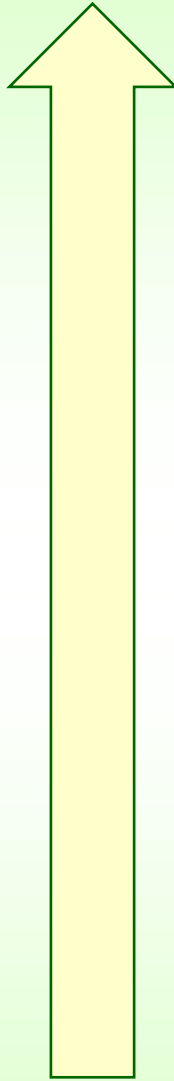
Cyanobakterieller Grundstoffwechsel

Dark – CO₂ release and sugar catabolism

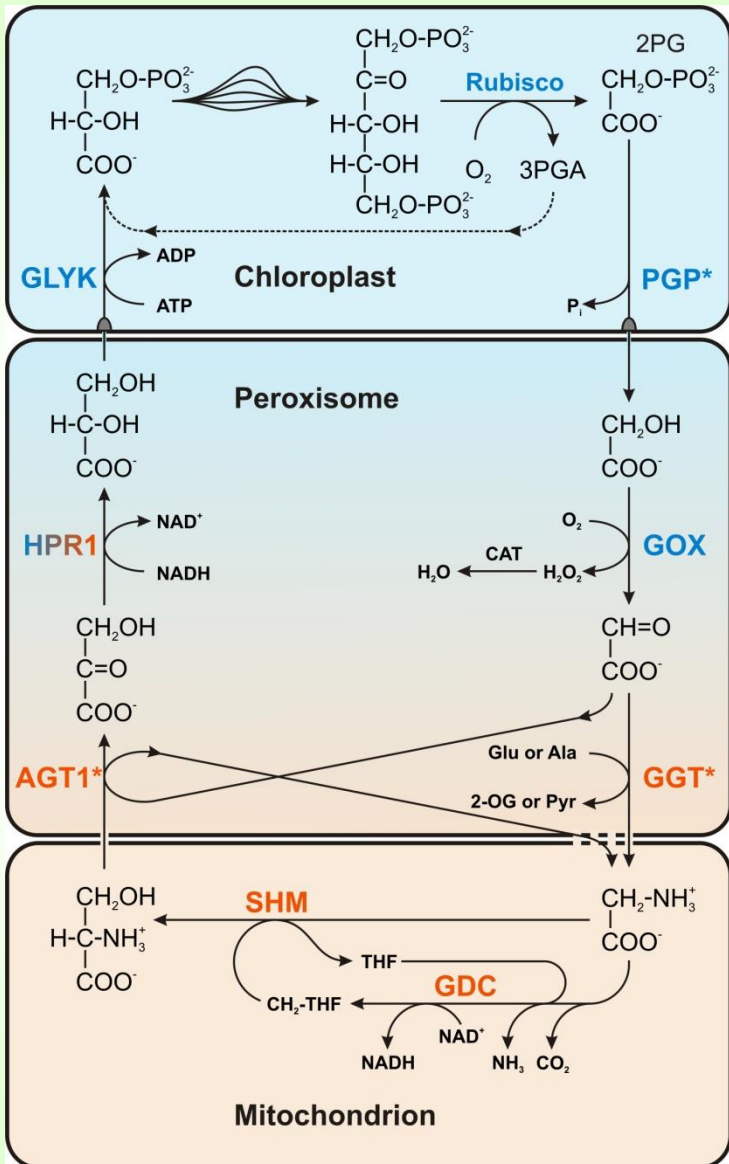


TCA cycle, nitrogen assimilation, fatty acid biosynthesis, ...

Light – CO₂ assimilation and sugar anabolism



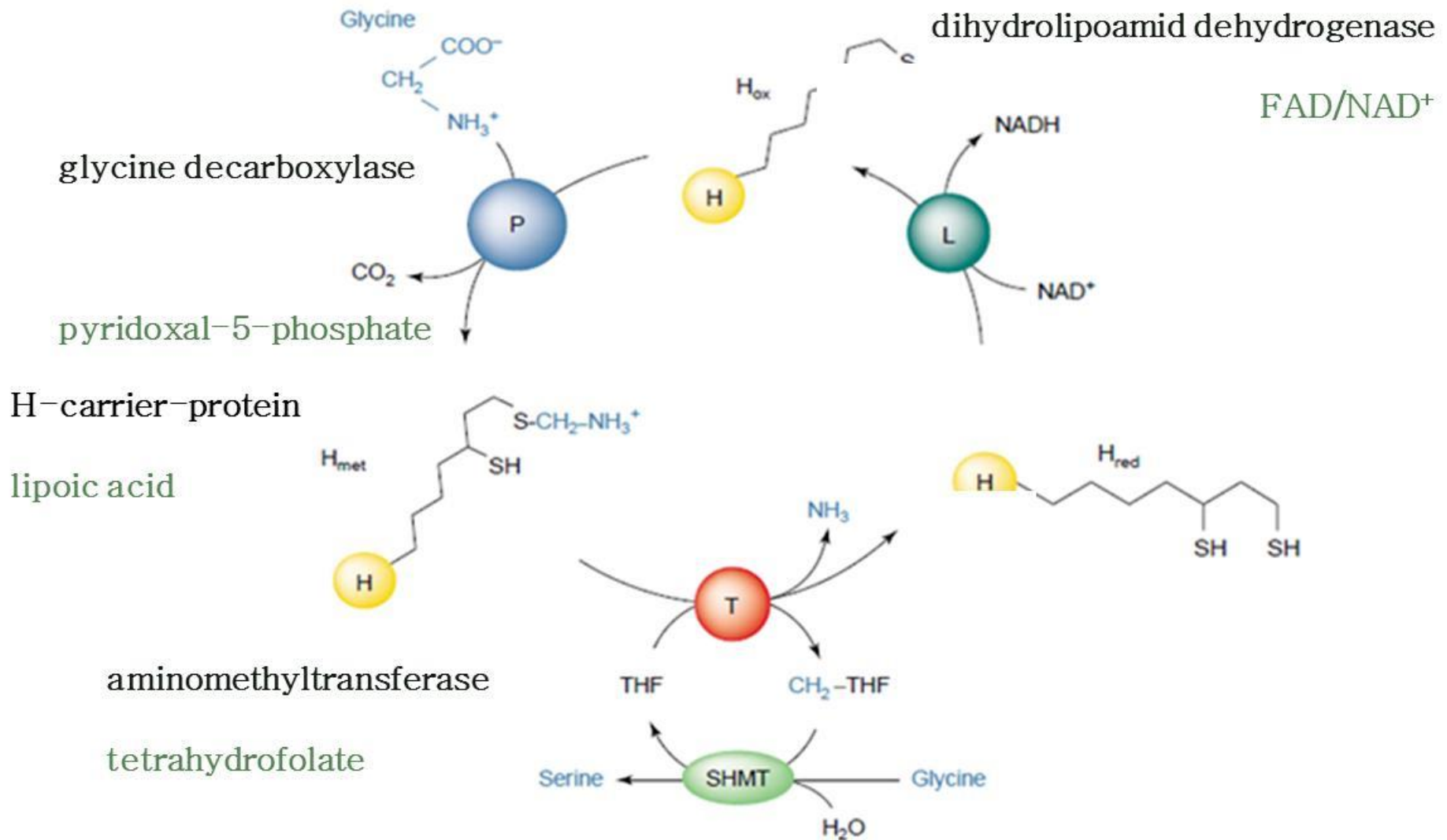
Photorespiration in Pflanzen und Cyanobakterien



- Photorespiratory proteins are present in **ALL** cyanobacteria as in plants.
 - The phylogenetic origin of photorespiratory enzymes is a mixture of proteo- and cyanobacterial enzymes. (* uncertain)
 - GOX enzymes diverted from LOX in ancient cyanobacteria and served as ancestor for plant GOX.
4. **ALL** cyanobacteria use glycolate dehydrogenase for photorespiratory glycolate oxidation.

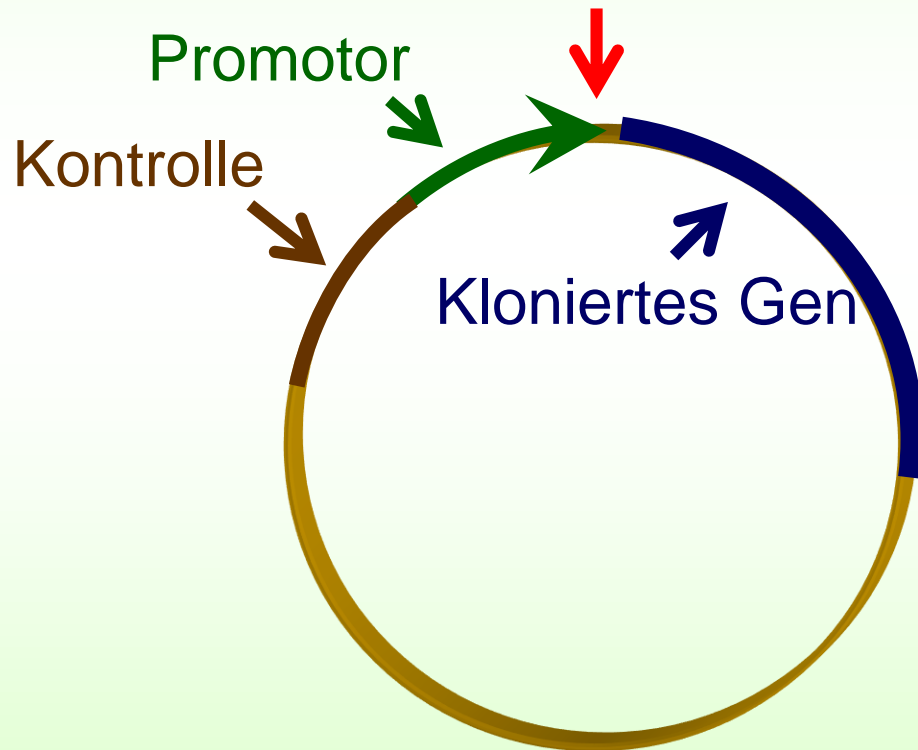


Bildet der GCD einen Komplex? In vitro Rekonstitution!

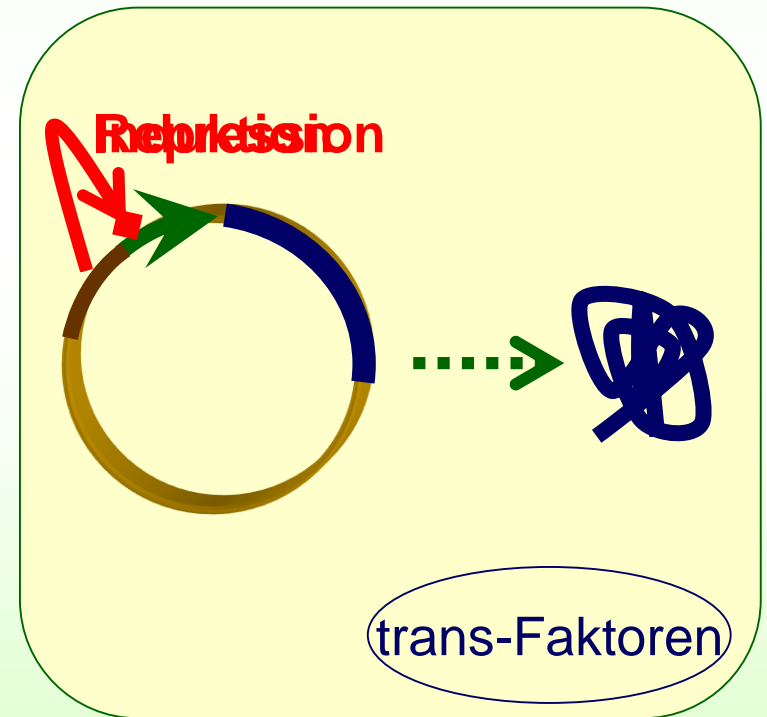


Untersuchung von rekombinanten Carboligasen bzw. verwandten Enzymen: *in vivo* Analysen

REKOMBINANTER EXPRESSIONSVEKTOR



TRANSGENE WIRTSZELLE



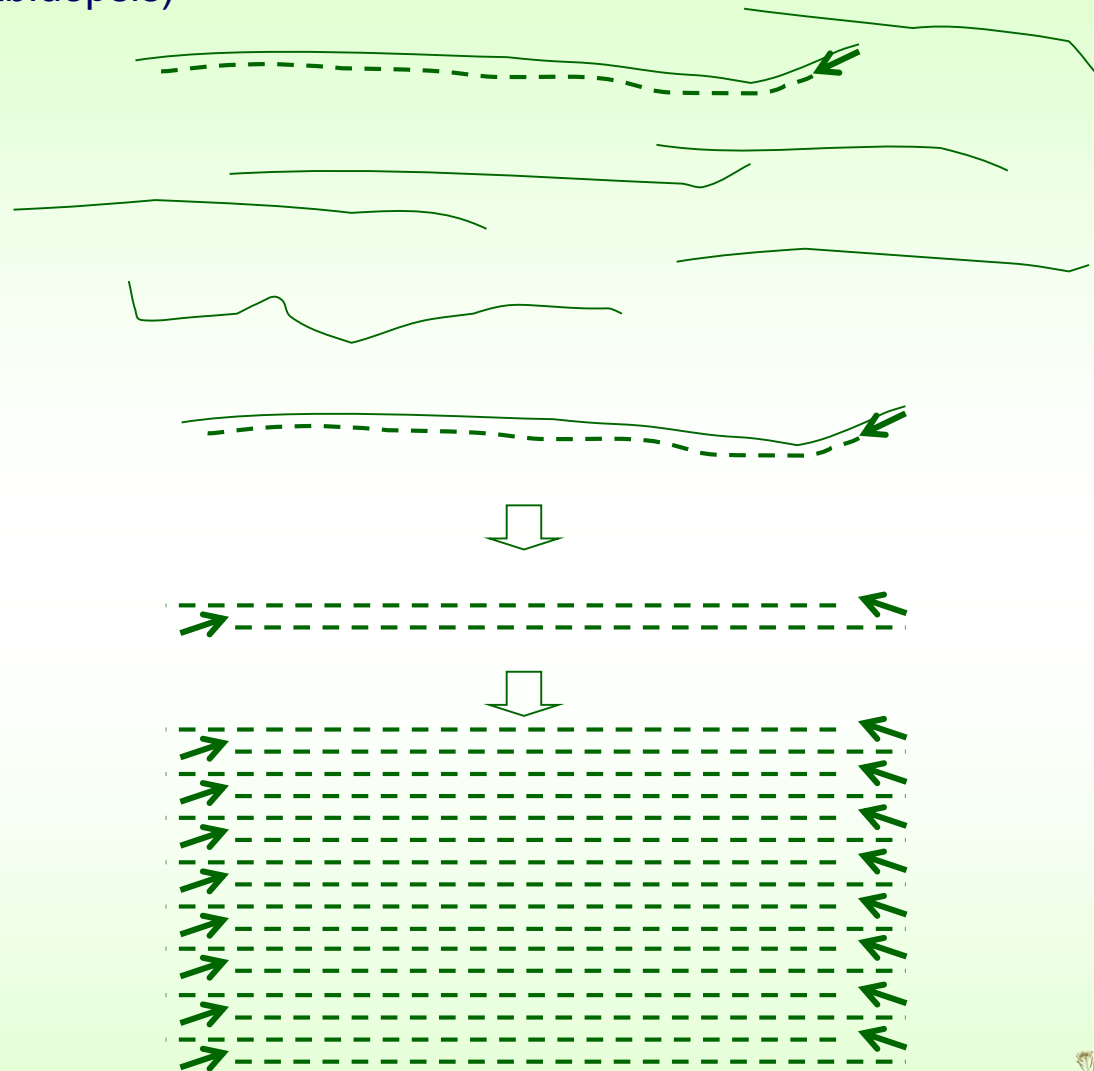
(1. Isolation von Gesamt-RNA aus Arabidopsis)

(2. cDNA-Synthese)

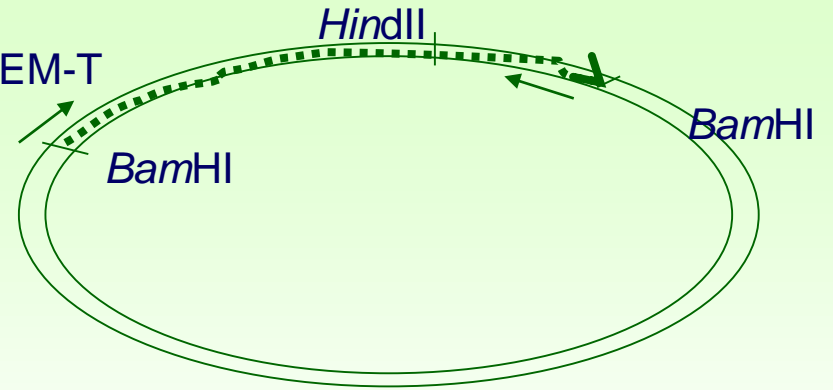
- genspezifischer 3'-Primer
- reverse Transcriptase

3. PCR-Amplifikation

- Zusatz eines genspezifischen 3'-Primers
- Taq-Polymerase
- Amplifizierung und Isolierung der cDNA



4. Klonierung der PCR-Fragmente (cDNAs) in pGEM-T

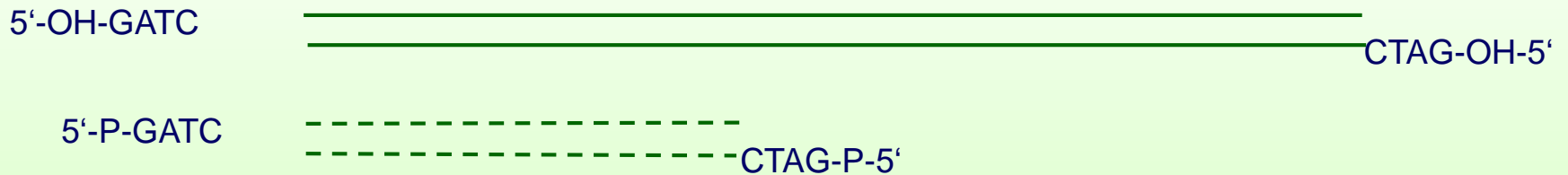


5. Isolierung und Restriktion von Plasmidvektoren

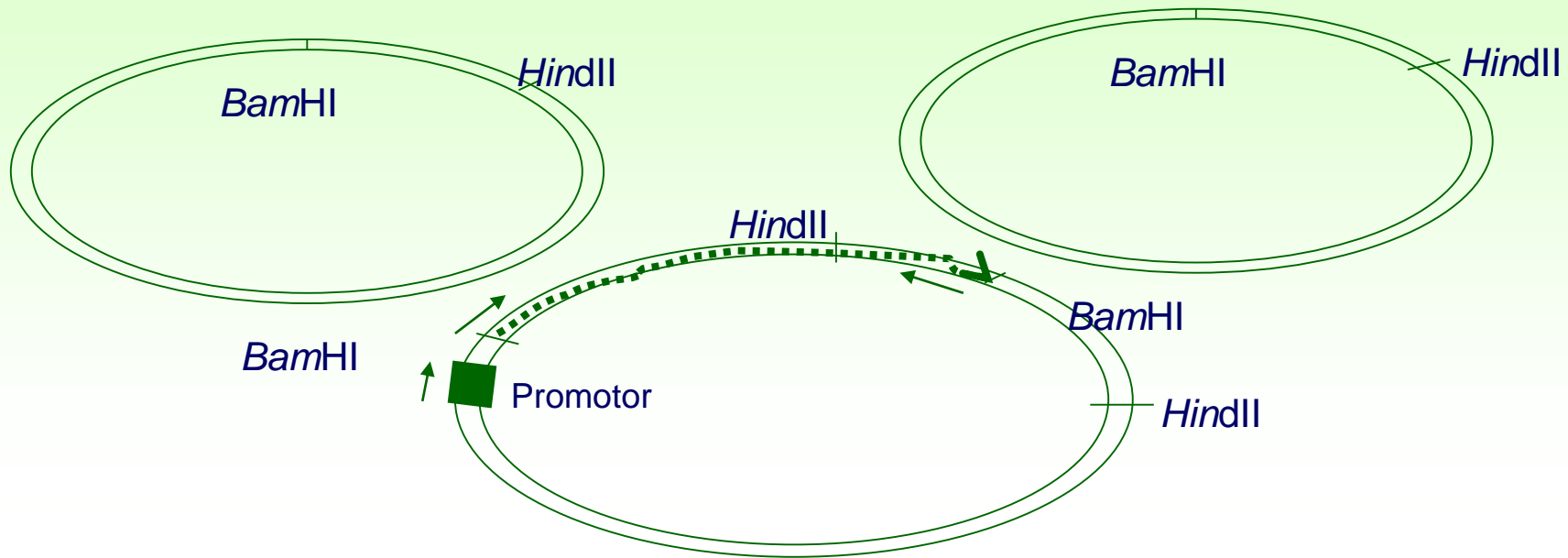
- pBAD-HisA-Expressionsvektor
- pGEMT mit cDNA-Insert



6. Phosphatasebehandlung der geschnittenen Expressionsvektoren



6. Ligation der geschnittenen Plasmidvektoren mit den geschnittenen cDNAs



7. Selektion rekombinanter Klone

- PCR-Analyse
- Kontrollrestriktion

8. Transformation überprüfter Konstrukte in einen Expressionsstamm wie z.B. LMG194

9. Herstellung rekombinanter Protein

- Trennung der Proteine aus LMG194 im SDS-Gel
- Enzymtests

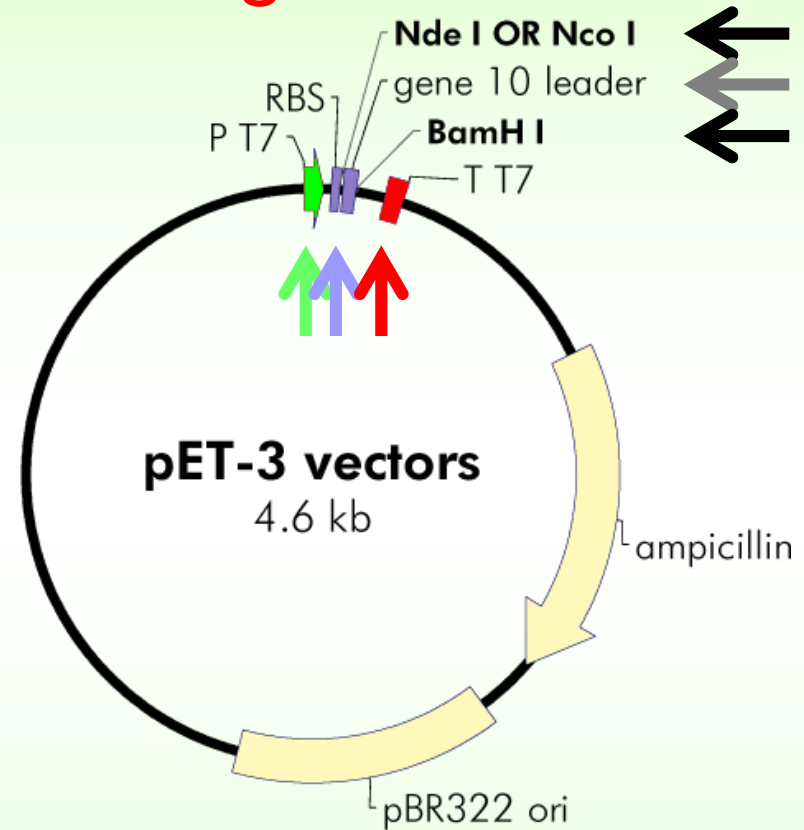


1. *Escherichia coli*

1.1 Expressionsvektoren - Allgemeines

Beispiel **pET3** (von pBR322)

- pBR322 Replikations-Origin
- Ampicillin-Resistenz (bla)
- **T7-Promotor**
- **Ribosomen-Bindungs-Ort**
- **Nde I/Nco I-Klonierungsort**
- **T7-Gen-10-Leader**
- **BamH I-Klonierungsort**
- **T7-Gen-10-Terminator**



pET-3a

GAAGGAGATATA

NdeI

CAT ATG

GCT AGC ATG ACT GGT GGA CAG CAA ATG GGT CGC

A S M T G G Q Q M G R

STRT

BamH I

GGA TCC

G S

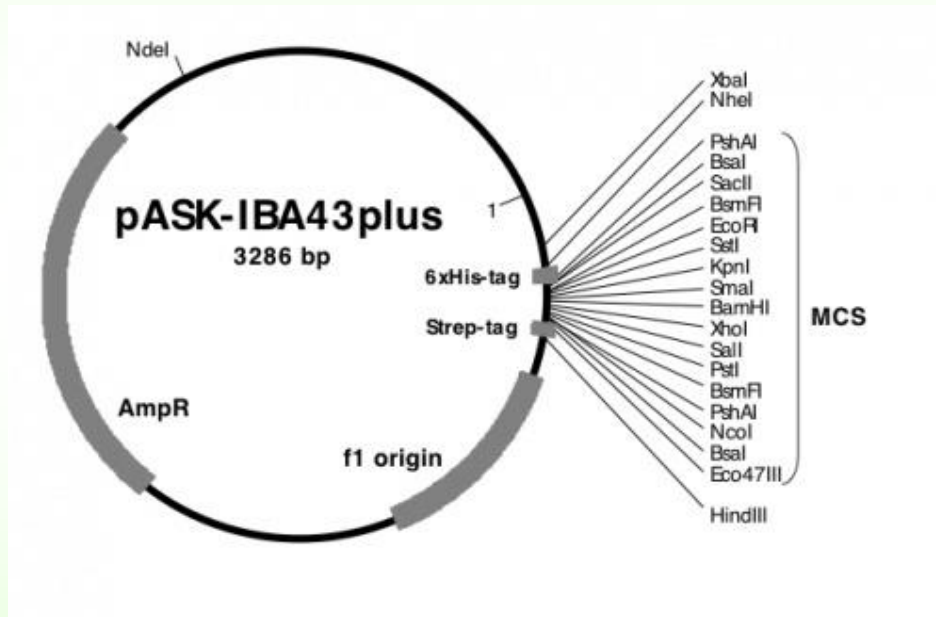
←RBS→

←-----T7-Gen-10 Leader-Peptid-----→

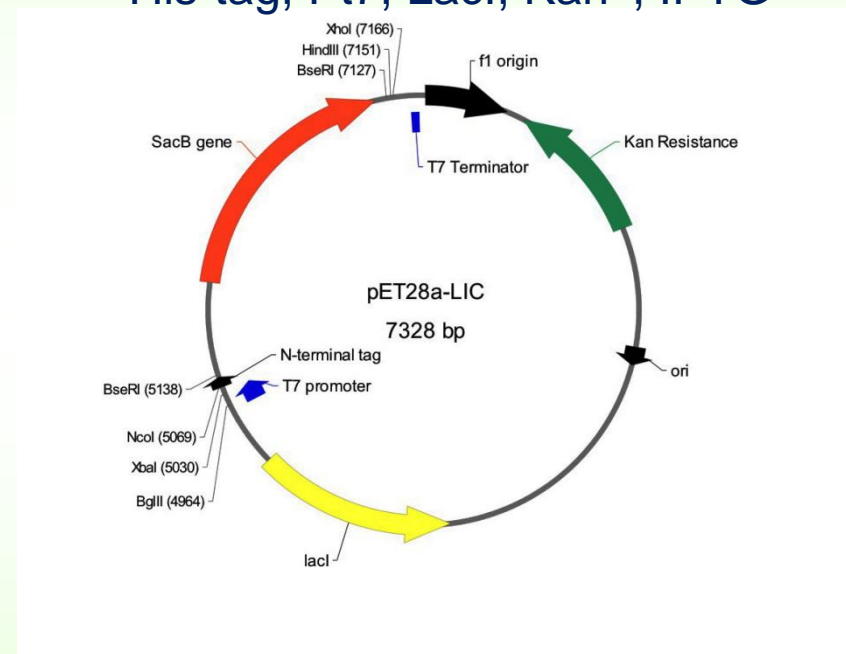
für optimale Translation

Expressionsvektoren

Strep&His-tag, Amp^R, AnhydroTetracyclin

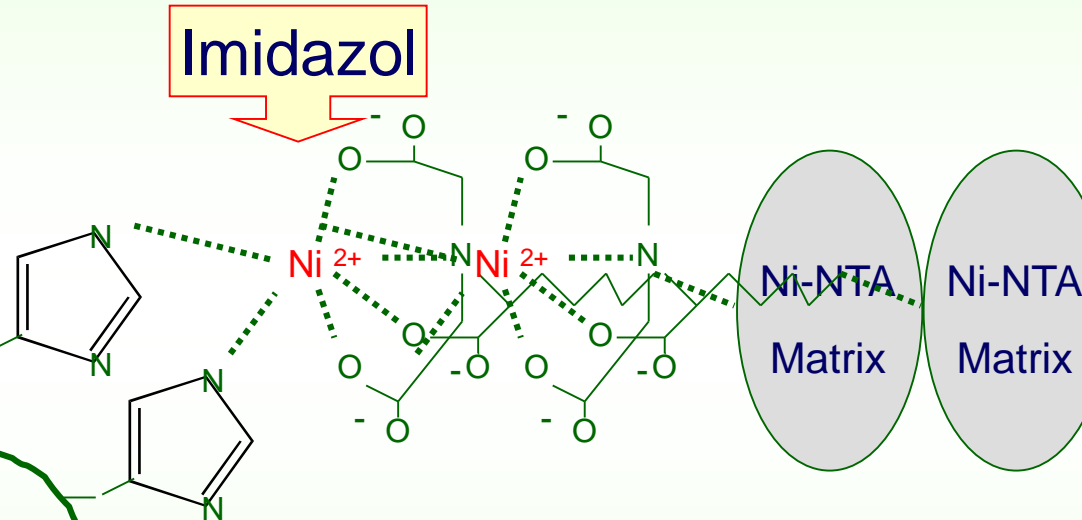
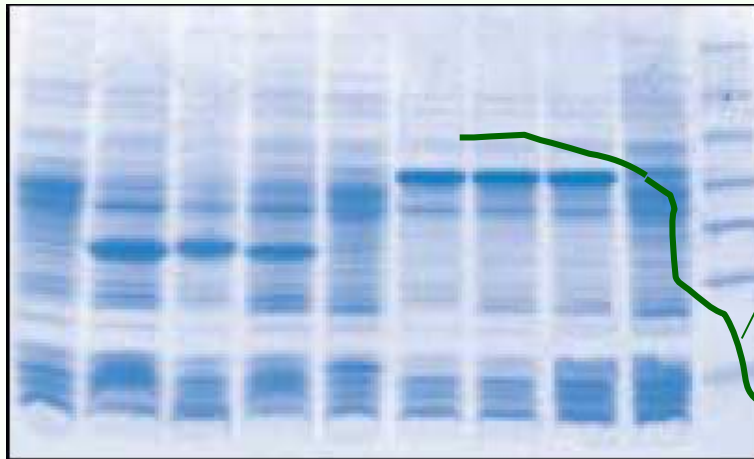


His-tag, Pt7, LacI, Kan^R, IPTG



Protein-Affinitäts-Reinigung His-Tags

1. Wachstum bei 37°C bis OD600 von etwa 0,8
2. Induktion mit 1 mM IPTG/ 2 h



5' -CAT CAT CAT CAT CAT CAT- 3'
3' -GTA GTA GTA GTA GTA GTA- 5'

-His-His-His-His-His-His-

