



Universität Hamburg
DER FORSCHUNG | DER LEHRE | DER BILDUNG

Fachbereich Chemie

Institut für Biochemie und
Molekularbiologie



Praktikum Biochemie/Molekularbiologie

BSc Studiengänge

Chemie
Biologie
Nanowissenschaften
Computing in Science
Molecular Life Sciences

Molekularbiologie II

Rekombinante PCR
Zielgerichtete Mutagenese
Heterologe Expression
His-Tag Reinigung

Inhalt

	Seite
Inhalt.....	2
Zeitplan.....	3
Theoretische Grundlagen	4
Einleitung	4
β -Lactam Antibiotika	4
β -Lactamasen	5
RTEM β -Lactamase.....	6
Expressionsvektor pET β Lac.....	8
Aufgabenstellung.....	9
Durchföhrung.....	13
Platzabgabe - Eichen der Mikropipetten.....	36
Auswertung.....	37
Anhang	39
cDNA Sequenz der RTEM β -Lactamase	39
Verwendete DNA und Protein Standards	41
Literatur	41
Verwendete KMR Substanzen	42

Zeitplan

Montag: 11.00 Uhr Praktikumslabor

- Ansetzen der PCR Reaktion

Dienstag: 11.00 Uhr Praktikumslabor

- Analyse der PCR Reaktion, Isolierung der PCR Produkte
- DNA Minipräparation
- Rekombinante PCR
- Isolierung des PCR Produktes
- Restriktionsverdau

Mittwoch: 11.15 Praktikumslabor

- Analyse des Restriktionsverdaus
- Isolierung von DNA aus Agarosegelen
- Ligation
- Transformation

Montag: 11.00 Praktikumslabor

- Screening rekombinanter Klone
- Gießen von SDS-Polyacrylamidgelen
- Restriktionsverdau
- Analyse des Restriktionsverdaus

Dienstag: 11.00 Praktikumslabor

- Rekombinante Expression
- Zellaufschluss
- Enzym-Isolierung

Mittwoch: 11.15 Praktikumslabor

- SDS-PAGE
- Enzym-Test
- Auswertung und Diskussion, Praktikumskritik

Theoretische Grundlagen

Einleitung

Um den Reaktionsmechanismus eines Enzyms aufzuklären, ist, neben der räumlichen Struktur des Proteins, eine Identifikation der Aminosäuren wichtig, die an der Katalyse beteiligt sind. Ein gezielter Austausch von wichtigen Aminosäuren im aktiven Zentrum kann die Aktivität eines Enzyms sowohl positiv als auch negativ beeinflussen und gibt somit Aufschluss über die an der Reaktion beteiligten Aminosäuren. Dabei kann ein Aminosäurerest eine kovalente Bindung mit dem Substrat eingehen, negative oder positive Ladungen aufnehmen, den pH-Wert lokal verändern oder Lösungsmittelmoleküle verdrängen. Die konzertierte Aktion der verschiedenen Aminosäurereste ist ein sehr komplexer Vorgang, der in der Regel zu einer Stabilisierung eines Übergangszustandes führt. Die Aufklärung solcher Reaktionsmechanismen ist für das Verständnis von Enzymreaktionen von großer Bedeutung, da z.B. Analoga von Übergangszuständen als Inhibitoren wirken und als Therapeutika eingesetzt werden können.

Mit Hilfe molekularbiologischer Methoden sollen in dieser Versuchswoche gezielt verschiedene Punktmutationen in dem aktiven Zentrum der β -Lactamase eingebaut werden. Nach Klonierung, Analyse, Expression und Isolierung der jeweiligen Mutanten wird die Enzymaktivität bestimmt, die einen Rückschluss auf den Einfluss der Aminosäurereste gibt. Mittels dieser Daten und mit Hilfe der räumlichen Struktur sollen schließlich Vorschläge für den Reaktionsmechanismus erarbeitet und diskutiert werden.

β -Lactam Antibiotika

Im Jahre 1928 entdeckte Alexander Fleming, dass verschiedene Schimmelpilzkulturen das Wachstum von Bakterien hemmen konnten. Wie sich später herausstellte enthielten diese Pilze Antibiotika wie Penicillin, welches aus einem Thiazolidinring besteht, der mit einem β -Lactam Ring kondensiert ist. Die bisher bekannten Penicilline unterscheiden sich nur durch den Substituenten R (Abb.1A). Therapeutisch angewandt werden außerdem Cephalosporine, die ebenfalls einen β -Lactam Ring enthalten (Abb.1B).

Die antibakterielle Wirkung dieser Antibiotika beruht auf Inhibierung der Zellwandsynthese der Bakterien. Eine Transpeptidase ist bei der Zellwandsynthese für die Quervernetzung von Peptidoglykanketten verantwortlich. Penicillin wird von dieser

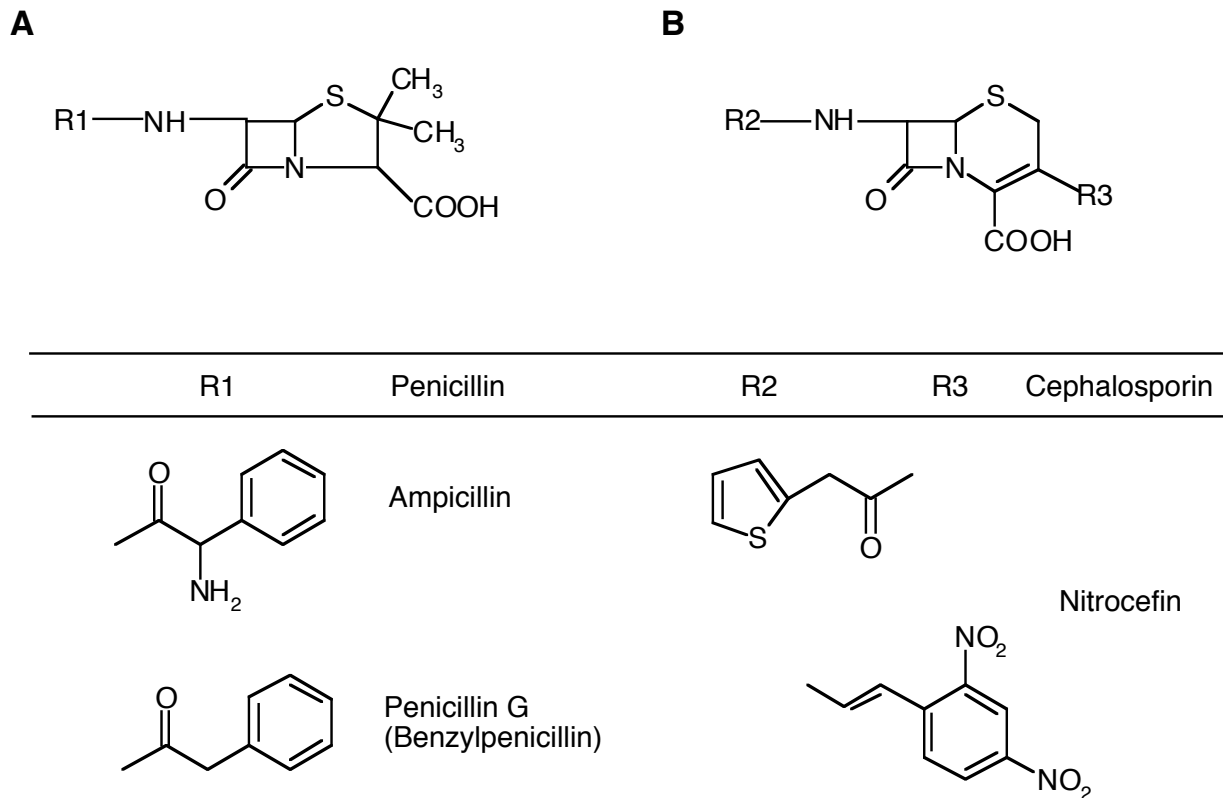


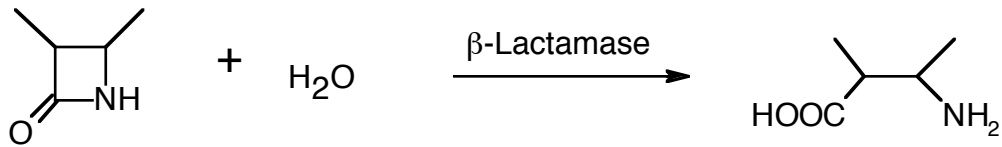
Abb.1: Strukturformeln von Penicillinen (A) und Cephalosporinen (B).

Transpeptidase im aktiven Zentrum gebunden, und der sehr reaktive β -Lactam Ring reagiert mit einem Serin-Rest des Enzyms. Diese Reaktion ist irreversibel und die Zellwandsynthese der Bakterien wird somit inhibiert.

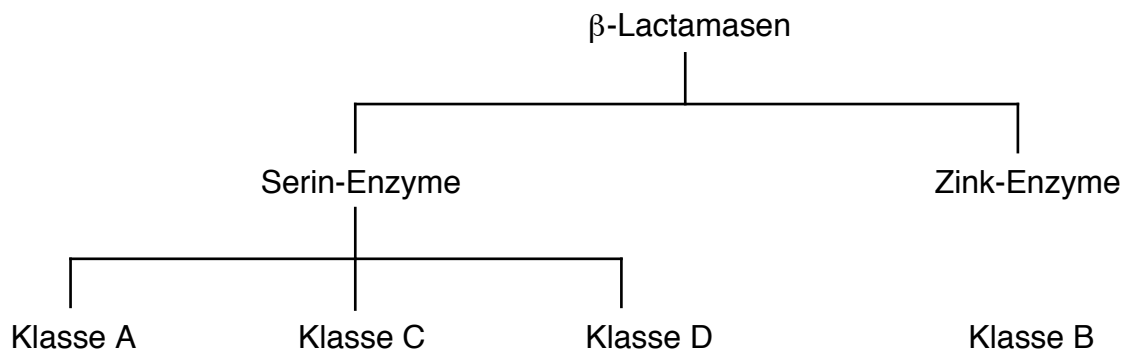
β -Lactamasen

β -Lactamasen sind Enzyme, die von Bakterien produziert werden. Sie katalysieren die Hydrolyse einer Amidbindung in dem β -Lactam Ring von Antibiotika der Penicillin/Cephalosporin Familie (Abb.2) und vermitteln dadurch entsprechende Antibiotika-Resistenzen.

Die β -Lactamasen werden in vier Klassen eingeteilt. Klasse B β -Lactamasen enthalten Zink und werden von einigen Gram-negativen Bakterien produziert. Sie hydrolysieren den β -Lactam Ring über nichtkovalente Intermediate. Die Klassen A, C und D sind Serin-Hydrolasen (Abb.3). Sie sind evolutionär miteinander verwandt und gehören zu einer Protein Superfamilie, zu der auch DD-Peptidasen und einige Penicillin bindende

Abb.2: Spaltung des β -Lactam Ringes.

Proteine (PBP's) gehören. Alle diese Proteine besitzen ein Ser-X-X-Lys Motiv im aktiven Zentrum, und die Hydrolyse scheint über einen kovalenten Acyl-Enzym Mechanismus zu laufen. Beispiele einiger β -Lactamasen sind in Tab. 1 aufgeführt (1).

Abb.3: Klassifizierung der β -Lactamasen.

RTEM β -Lactamase

Die β -Lactamase, welche bei der Ampicillin Selektion von Plasmiden verwendet wird, ist die RTEM β -Lactamase aus *E. coli*. Ihre Sequenz wurde 1978 aufgeklärt (2) und 1992 gab es die ersten Strukturdaten durch Röntgenbeugung (3) (Abb.4).

Obwohl eine Vielzahl von Mutanten der RTEM β -Lactamase hergestellt und strukturanalytisch untersucht worden sind (4), ist der genaue Reaktionsmechanismus, der bei der Spaltung des β -Lactam Ringes durch das Enzym abläuft, noch nicht bekannt.

Tab. 1: Beispiele einiger β -Lactamasen.

Name	Herkunft	Typ	Klasse
RTEM β -Lactamase	Plasmid kodierendes periplasmatisches Enzym von <i>Escherichia coli</i>	Serin	A
PC1 β -Lactamase	Extrazelluläres Enzym von <i>Staphylococcus aureus</i> PC1	Serin	A
β -Lactamase I	Extrazelluläres Enzym von <i>Bacillus cereus</i> 569/H	Serin	A
β -Lactamase II	Extrazelluläres Enzym von <i>Bacillus cereus</i> 569/H	Zink	B
P99 β -Lactamase	Periplasmatisches Enzym von <i>Enterobacter cloacae</i>	Serin	C
<i>Citrobacter</i> β -Lactamase	Periplasmatisches Enzym von <i>Citrobacter freundii</i>	Serin	C
<i>Licheniformis</i> β -Lactamase	Extrazelluläres Enzym von <i>Bacillus licheniformis</i> 749/C	Serin	A
<i>Albus G</i> β -Lactamase	Extrazelluläres Enzym von <i>Streptomyces albus G</i>	Serin	A

Abb.4: Räumliche Struktur der RTEM β -Lactamase

Expressionsvektor pET β Lac

In dieser Praktikumswoche sollen unterschiedliche Mutationen in die cDNA der β -Lactamase eingebaut werden. Als Ausgangsmaterial dient der prokaryotische Expressionsvektor pET26b(+) (Abb.5). Dieses Plasmid verfügt über einen T7 Promotor, der unter der Kontrolle des lac Operators steht. Mit IPTG kann somit die rekombinante Produktion induziert werden und durch Verwendung des T7 Promotors wird ein hoher Level an Expression erreicht. Im Bereich der Klonierungsstelle verfügt der Vektor über eine pelB Signalsequenz, die dazu führt, dass das rekombinante Protein in den periplasmatischen Raum der *E. coli* Zelle transportiert wird. Zusätzlich besitzt der Vektor die kodierende Sequenz für ein Histidin-Hexamer (His-Tag) (Abb.6). Wird ein rekombinantes Protein mit einem solchen His-Tag ausgestattet, kann die Isolierung des Proteins über eine Metallaffinitätssäule erfolgen, da das His-Tag eine hohe Affinität zu zweiwertigen Metallionen wie Nickel oder Cobalt aufweist.

Die cDNA der β -Lactamase wurde über die Restriktionsschnittstellen BamHI und XhoI in die Klonierungsstelle des pET26b(+) Vektors eingebaut (Abb.7). Damit ist

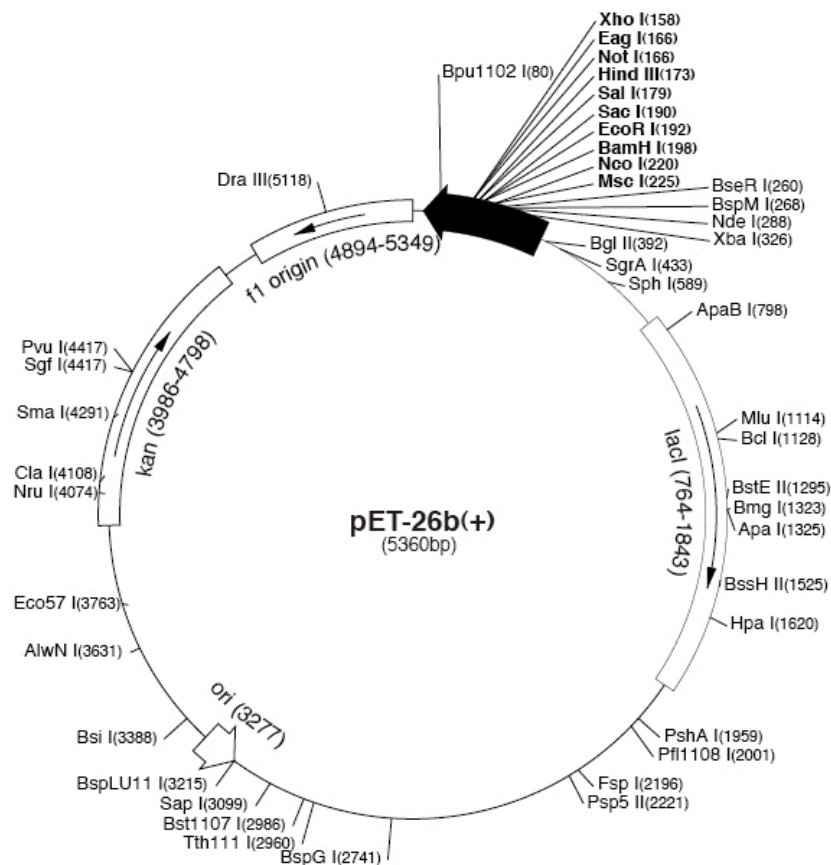


Abb. 5: Vektorkarte pET26b(+).

Tab.2: Zu untersuchende Mutationen der β -Lactamase

Mutation	Austausch	Sequenz	Restriktionsschnittstelle
S70A	Serin (70) gegen Alanin	Ser ATG AGC ACT GCC Ala	TGGCCA MscI
E104K	Glutamat (104) gegen Lysin	Glu Tyr GAG TAC TCA AAA TAT T Lys Tyr	AATATT SspI
S130G	Serin (130) gegen Glycin	Ser ACC ATG AGT GGT Gly	CCATGG NcoI
N132S	Asparagin (132) gegen Serin	Asn GAT AAC TCC Ser	GAWTC (W=A oder T) TfII
K234H	Lysin (234) gegen Histidin	Lys GCT GAT AAA CAT His	TGATCA BclI

Zuerst wird mit zwei PCR Reaktionen die Mutation in die cDNA der β -Lactamase eingebaut. Für die erste PCR wird ein pET-Fw Primer verwendet, der stromaufwärts der BamHI Schnittstelle in dem pET Vektor gebunden wird sowie ein Mut-Rev Primer, der an der gewünschten Position die Mutation einführt. Hierbei wird der von der Mutation 5' flankierende Bereich amplifiziert. Bei der zweiten PCR wird mit einem Mut-Fw Primer, der wiederum die Mutation einbaut, und einem pET-Rev Primer, der stromabwärts der XhoI Schnittstelle in dem pET Vektor gebunden wird, der 3' flankierende Bereich amplifiziert. In einer rekombinanten PCR werden anschließend die beiden DNA Stränge miteinander verknüpft. Da sich an den Enden des PCR Produktes die Schnittstellen für BamHI und XhoI befinden, wird über diese Schnittstellen die DNA in den Vektor pET26b(+) ligiert (Abb.8).

Die entstandenen pET β Lac Mutanten werden durch Restriktionsverdau an der mutierten Stelle überprüft und die Mutanten anschließend exprimiert (Abb.9). Das Protein wird aus den *E. coli* Zellen isoliert und mit Hilfe des His-Tags gereinigt. Mittels zweier Tests wird nun untersucht, inwiefern die Mutation eine Auswirkung auf die Funktion der β -Lactamase hat. Zum einen wird der Expressionsansatz auf Ampicillin-Platten ausgestrichen, wobei ein Wachstum der Zellen nur bei Abbau des Ampicillins erfolgen kann. Zum anderen wird die Spaltung von Nitrocefin, einem Cephalosporin Derivat, mit dem gereinigten Protein photometrisch untersucht.

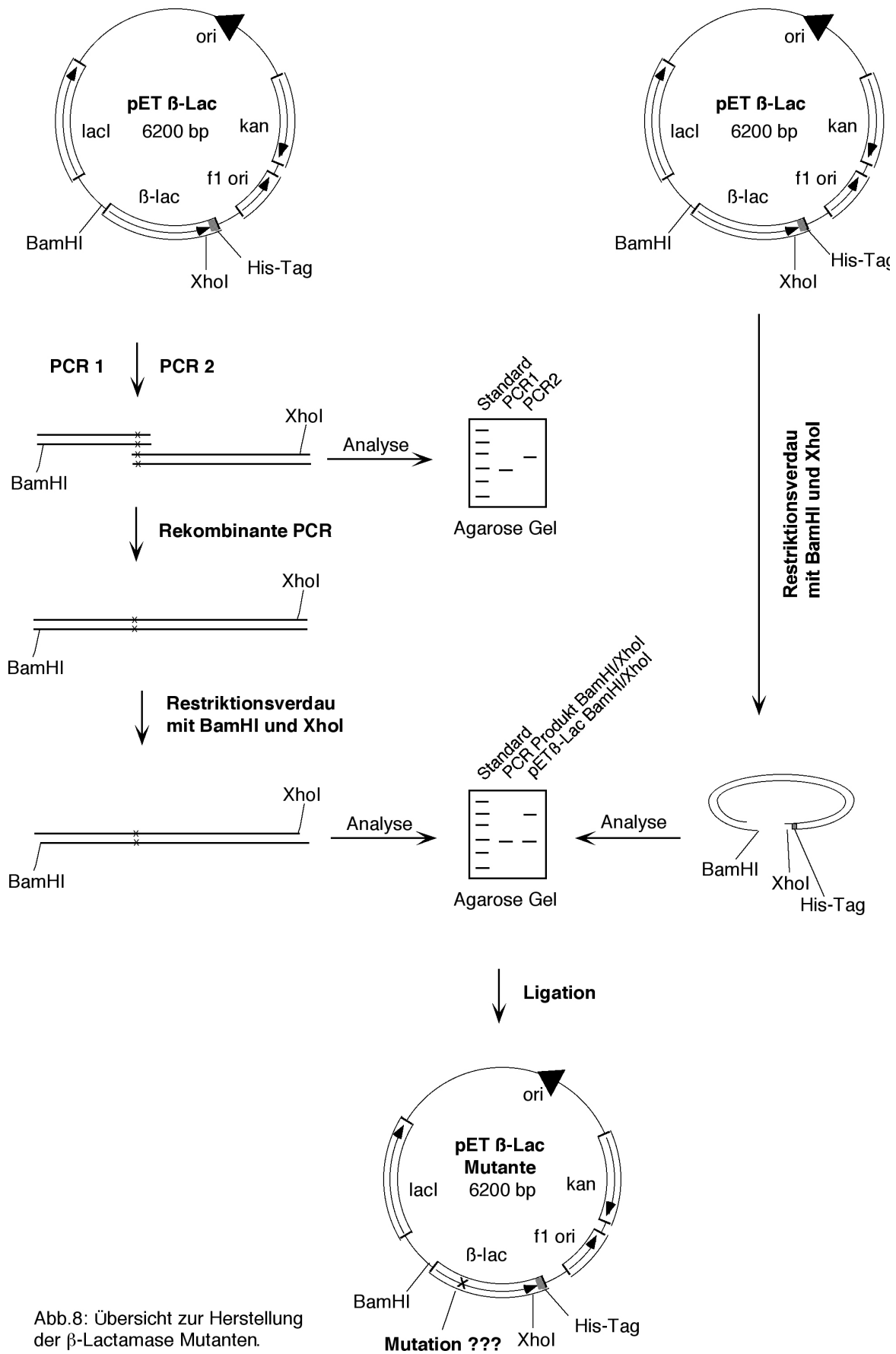


Abb.8: Übersicht zur Herstellung der β-Lactamase Mutanten.

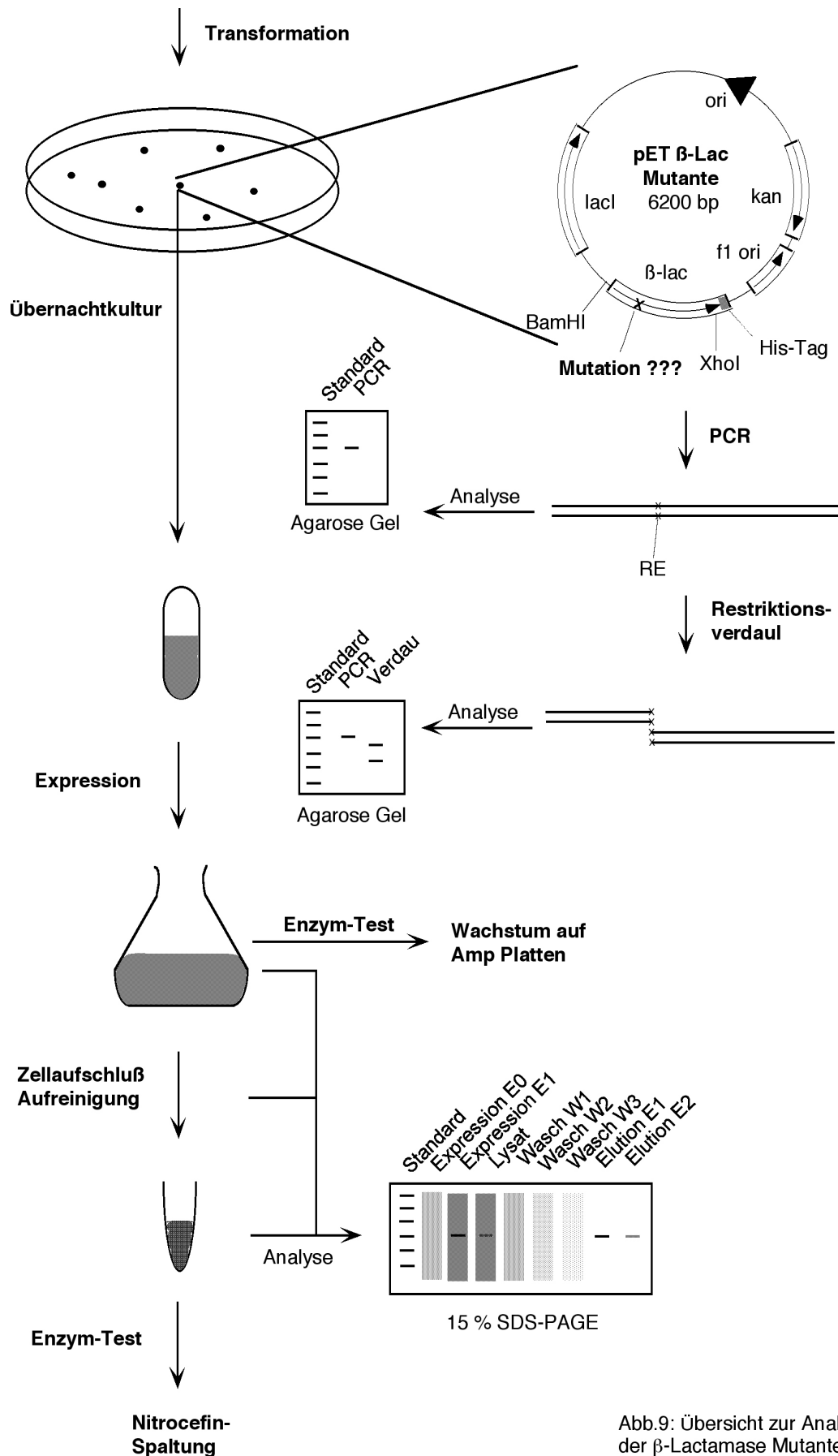


Abb.9: Übersicht zur Analyse der β -Lactamase Mutanten.

Durchführung

Ansetzen der PCR Reaktion I

Jede Gruppe setzt 2 PCR Reaktionen an, wobei mit der Kombination aus pET-Fw Primer und einem mutierten Rev Primer der 5' Bereich der β -Lactamase amplifiziert wird. Mit der Kombination aus einem mutierten Fw Primer sowie dem pET-Rev Primer wird entsprechend der 3' Bereich der β -Lactamase amplifiziert.

- In zwei 0,5 ml Tubes werden jeweils 10 μ l steriles H₂O pipettiert.
- Die Tubes werden auf dem Deckel mit "1" und "2" beschriftet.
- Mit einem sterilen Zahnstocher wird eine Kolonie des Stammes pET β Lac/BL21(DE3)pLysS von einer Agar-Platte aufgenommen und die Kolonie durch mehrfaches Rotieren des Zahnstochers in dem Wasser von Tube 1 resuspendiert. Es ist dabei wichtig, dass lediglich Bakterien und kein Agar von der Platte aufgenommen werden! Für Tube 2 wird genauso verfahren. Dieses H₂O/Kolonie Gemisch dient als Template.
- Zu den Ansätzen wird folgendes pipettiert:

	1	2
Template	10 μ l	10 μ l
H ₂ O	36 μ l	36 μ l
dNTPs	20 μ l	20 μ l
Puffer	10 μ l	10 μ l
MgCl ₂	3 μ l	3 μ l
Primer pET-Fw	10 μ l	/
Primer pET-Rev	/	10 μ l
Primer Mut-Fw	/	10 μ l
Primer Mut-Rev	10 μ l	/
Taq-Polymerase	1 μ l	1 μ l
Endvolumen	100 μ l	100 μ l

Notieren Sie, welche Primer Sie zum Einfügen der Mutation bei der PCR verwendet haben:

Primer Mut-Fw:	
Primer Mut-Rev:	

- Beide Ansätze werden kurz anzentrifugiert, um Tröpfchen von der Gefäßwand zu entfernen.
- Im Thermocycler wird nun das PCR Programm PraktLac gestartet:

Für die PCR-Reaktion werden etwa 2,5 Stunden benötigt.

Schritt	Temperatur	Zeit
1. Primärdenaturierung	94°C	1 min
2. Denaturierung	94°C	10 sec
3. Hybridisierung	53°C	30 sec
4. DNA-Synthese	72°C	1 min
5. Goto 2, Repeat 29x		
6. DNA-Synthese	72°C	5 min

Analyse der PCR Reaktion I

Die Analyse der oben angesetzten PCR-Reaktion erfolgt mit einem 2 %igen Agarosegel, wobei ein Gel für den gesamten Kurs angesetzt wird.

- 2,4 g Agarose in einem 500 ml Erlenmeyerkolben abwiegen.
- 120 ml TAE-Puffer (1x) dazugeben und in der Mikrowelle erhitzen, bis sich die Agarose vollständig gelöst hat. Achten Sie darauf, dass die Lösung nicht überkocht!
- 12 µl Ethidiumbromid dazugeben. Da Ethidiumbromid mutagen ist, unbedingt Handschuhe anziehen!
- Der Gelschlitten wird in den Gießstand gestellt, mit einem Kamm (30er Taschen) bestückt (Handschuhe!) und die Agaroselösung in die Kammer gegossen, wenn sie sich auf etwa 50°C abgekühlt hat.
- Nach der Polymerisation wird der Kamm entfernt und das Gel in die Laufkammer mit den Taschen nach links gelegt.
- Die Kammer wird mit TAE-Puffer (1x) gefüllt, bis das Gel gerade eben bedeckt ist.

TAE-Puffer (50x): 121 g Tris, 28,5 ml HOAc, 50 ml 0,5 M EDTA pH 8,0 ad 500 ml H₂O

Analyse der PCR Reaktion I

Die PCR-Reaktion vom Vortag wird bei 150 V elektrophoretisch getrennt.

- 10 μ l der PCR Reaktion werden mit 2 μ l Beladungspuffer (6x) auf einem Streifen Parafilm vermischt und 10 μ l davon werden auf das Gel aufgetragen.
- Als Standard werden 10 μ l pUC Mix aufgetragen.

Notieren Sie in der untenstehenden Tabelle, welche Bahnen Sie belegt haben.

Bahn	Probe	Bahn	Probe
1.	pUC-Mix Standard	16.	
2.		17.	
3.		18.	
4.		19.	
5.		20.	
6.		21.	
7.		22.	
8.		23.	
9.		24.	
10.		25.	
11.		26.	
12.		27.	
13.		28.	
14.		29.	
15.		30.	

Belegung des Agarosegels zur Analyse der PCR Reaktion I

Nach Beendigung der Gelelektrophorese wird das Gel unter UV Licht betrachtet und dokumentiert. Welche Fragmentgrößen erwarten Sie? Stimmt Ihr Ergebnis mit den erwarteten Fragmentgrößen überein?

Entsorgung: Der Puffer der Laufkammer enthält Ethidiumbromid und wird in dem roten Kanister für halogenhaltige Lösungsmittel entsorgt.

Isolierung der DNA Fragmente aus den PCR Ansätzen

Um das DNA Fragment aus dem PCR Ansatz zu isolieren, wird ein *PCR Purification Kit* verwendet. Dabei wird die DNA an eine Membran gebunden, mit einer alkoholischen Lösung gewaschen und anschließend eluiert.

- Zwei *HiBind*-Säulen in jeweils ein 2 ml Gefäß stellen.
- Die Gefäße an der Seite mit "1" und "2" beschriften.
- Je 90 µl XP-1 Puffer zu den jeweils restlichen 90 µl der PCR Reaktion hinzugeben. Durch Vortexen sorgfältig mischen.
- Die Lösungen werden dann in die entsprechenden Säulen pipettiert.
- Durch Zentrifugation der Säule für 1 min bei 10.000 rpm wird die DNA an die Matrix gebunden.
- Der Durchlauf wird verworfen und die Säule wieder in das 2 ml Gefäß gestellt.
- Es werden 750 µl SPW-Waschpuffer zugegeben und erneut wie oben zentrifugiert.
- Es werden erneut 750 µl SPW-Waschpuffer zugegeben zentrifugiert.
- Der Durchlauf wird wiederum verworfen und die Säule nochmals zentrifugiert, um die restliche Flüssigkeit zu entfernen.
- Die Säule wird nun in ein 1,5 ml Tube gestellt und die Deckel mit "1" und "2" beschriftet.
- Anschließend werden 30 µl steriles H₂O direkt auf die Matrix gegeben und wiederum 1 min bei 10.000 rpm zentrifugiert. Im Durchlauf befindet sich die DNA.

Ansetzen der PCR Reaktion II

In dieser PCR sollen die beiden mit der Mutation versehenen 5'- und 3'-Bereiche der β -Lactamase miteinander verknüpft und aufgefüllt werden. Nach Zugabe der flankierenden pET-Fw und pET-Rev Primer wird das verknüpfte DNA Fragment nochmals mittels PCR amplifiziert.

- In einem 0,5 ml Tube wird folgender Ansatz zusammen pipettiert:

H ₂ O	38,6 µl
dNTPs	20 µl
Puffer	8 µl
MgCl ₂	2,4 µl
PCR Fragment 1	5 µl
PCR Fragment 2	5 µl
Taq-Polymerase	1 µl
Endvolumen	80 µl

Schritt	Temperatur	Zeit
1. Primärdenaturierung	94°C	1 min
2. Denaturierung	94°C	10 sec
3. Hybridisierung	53°C	2 min
4. DNA Synthese	72°C	4 min
5. Goto 2, Repeat 3x		
6. Hold	72°C	
7. Denaturierung	94°C	10 sec
8. Hybridisierung	53°C	30 sec
9. DNA Synthese	72°C	1 min
10. Goto 7, Repeat 29x		
11. DNA Synthese	72°C	10 min

Im Thermocycler wird nun das PCR Programm PraktHyb gestartet. Dabei werden zuerst die Doppelstränge denaturiert, dann die 5' - und 3' - Bereiche der β -Lactamase in dem überlappenden Bereich miteinander hybridisiert und anschließend zum Doppelstrang aufgefüllt. Dieser Zyklus wird insgesamt vier mal durchgeführt. Danach bleibt der Thermocycler bei 72°C stehen.

Zu dem PCR Ansatz werden nun die flankierenden Primer zugegeben:

- In einem Tube werden die beiden Primer sowie der Puffer nach dem obigen Schemata zusammen gegeben und die gesamten 22 μ l zu dem PCR Ansatz pipettiert.

Primer pET-Fw	10 μ l
Primer pET-Rev	10 μ l
Puffer	2 μ l
MgCl ₂	0,6 μ l
Endvolumen	102,6 μ l

Nach Zugabe der Primer wird die PCR fortgesetzt.

DNA Minipräparation

Das PCR Fragment soll später in den Vektor pET β Lac kloniert werden. Zur Isolierung des Vektors fertigt jede Gruppe eine Minipräparation an. Die Zelle wird dabei über alkalische Lyse aufgeschlossen und die Plasmid-DNA an eine Matrix (*HiBind*-Säule) gebunden.

- Das 2 ml Tube mit der Kultur (pET β Lac/DH5 α) wird für 1 min bei 14.000 rpm zentrifugiert.
- Der Überstand wird mit der Wasserstrahlpumpe abgesogen.
- Das Zellpellet wird in 250 μ l Lösung I vollständig durch auf- und abpipettieren resuspendiert.
- Zu der Suspension werden 250 μ l Lösung II zugegeben und zum Durchmischen das Tube kurz geschüttelt.
- Der Ansatz wird 5 min bei RT inkubiert.
- Anschließend werden 350 μ l Lösung III zugegeben, kurz geschüttelt und für 5 min bei 14.000 rpm zentrifugiert.
- Der Überstand (etwa 850 μ l) wird abgenommen und auf die *HiBind*-Säule gegeben, welche in einem 2,0 ml Tube steckt.
- Es wird 1 min bei 10.000 rpm zentrifugiert, der Durchlauf verworfen und das Sammeltube weiter verwendet.
- Zentrifugensäule wieder in das 2 ml Tube stecken, 500 μ l HB-Puffer auf die Säule gegeben und für 1 min bei 10.000 rpm zentrifugieren. Säulendurchfluss verwerfen und Sammeltube weiter verwenden.
- Zentrifugensäule wieder in das 2 ml Tube stecken, 750 μ l DNA-Waschpuffer auf die Säule geben und für 1 min bei 10.000 rpm zentrifugieren. Säulendurchfluss verwerfen und Sammeltube weiter verwenden.
- Zentrifugensäule in das geleerte 2 ml Tube stecken und erneut durch 1 min Zentrifugation bei 10.000 rpm vollständig trocknen.
- Zentrifugensäule in ein sauberes 1,5 ml Tube stellen und 30 μ l H₂O auf die Matrix pipettieren. Erneut 1 min bei 10.000 rpm zentrifugieren. In dem Durchlauf befindet sich die Plasmid-DNA.

Isolierung des DNA Fragmentes aus dem PCR Ansatz

Um das DNA Fragment aus dem PCR Ansatz zu isolieren, wird ein *PCR Purification Kit* verwendet.

- Eine *HiBind*-Säule in ein 2 ml Gefäß stellen.
- Das Gefäß an der Seite mit „PCR“ und der Gruppennummer beschriften.
- 100 μ l XP-1 Puffer werden zu den 100 μ l der PCR Reaktion hinzugeben. Durch Vortexen sorgfältig mischen.
- Anschließend wird analog zu der Vorschrift auf S. 16 verfahren.

Restriktionsverdau

Um das PCR Produkt (nach der Isolierung!) in den Vektor pET β Lac zu klonieren, müssen sowohl der Vektor als auch PCR-Produkt mit den Enzymen BamHI und XhoI geschnitten werden.

- Drei 1,5 ml Tubes werden auf dem Deckel beschriftet.
- In Tube 1 wird der Mastermix nach folgendem Pipettierschema angesetzt.
- In die restlichen zwei Tubes werden je 10 μ l Mastermix pipettiert und anschließend die DNA (PCR Produkt bzw. die pET β Lac Präparation) zugegeben.
- Die zwei Ansätze werden über Nacht bei 37°C inkubiert.
- Die restliche pET β Lac DNA wird bei -20°C gelagert.

	Mastermix	Restriktionsverdau	
	1	2	3
H ₂ O	5 μ l		
Puffer Y ⁺	15 μ l		
BamHI	2,5 μ l		
XhoI	2,5 μ l		
Mastermix	25 μ l	10 μ l	10 μ l
PCR Produkt		20 μ l	/
pET β Lac		/	20 μ l
Endvolumen		30 μ l	30 μ l

Analyse des Restriktionsverdaus

Die Analyse des Restriktionsverdaus erfolgt mit einem 1 %igen Agarosegel, wobei zwei Gele angesetzt werden.

- Pro Gel werden 1,2 g Agarose abgewogen und analog zu der Vorschrift auf S.14 verfahren. Es wird jeweils ein 20er Kamm benötigt.
- Nach der Polymerisation werden die Gele mit etwas TAE-Puffer (1x) überschichtet, damit sie über Nacht nicht austrocknen.

Ansetzen von Über-Nacht Kulturen

Am nächsten Tag sollen kompetente *E. coli* Zellen (Stamm: Top10) hergestellt werden. Dazu müssen die Zellen über Nacht vermehrt werden.

- Von dem LB Medium werden 3 ml in ein steriles Kulturröhrchen gefüllt und dieses beschriftet. Dazu werden sterile 5 ml Pipetten benutzt und neben einem Bunsenbrenner gearbeitet.
- Eine 100 µl Pipette wird an dem Schaft mit einem Ethanol getränkten Tuch gereinigt und eine Pipettenspitze aufgesetzt.
- Mit der Pipettenspitze wird von einer LB Platte mit Top10 Zellen eine Kolonie abgestreift und die Spitze in das Kulturröhrchen abgeworfen.
- Die Kultur wird über Nacht bei 37°C und 220 rpm inkubiert.

Herstellung kompetenter Zellen

Um *E. coli* Zellen mit dem klonierten PCR Produkt zu transformieren, müssen die Zellen kompetent gemacht werden, d.h. sie besitzen dann die Fähigkeit, Plasmid DNA aufzunehmen. Dazu werden die Zellen bis zur logarithmischen Wachstumsphase kultiviert und anschließend mit salzfreien Lösungen gewaschen. Das Wachstum der Zellen wird photometrisch bei 600 nm verfolgt und die Inkubation bei einer OD₆₀₀ von 0,5 abgebrochen. Es ist darauf zu achten, dass das Wachstum der Zellen exponentiell erfolgt. **Die kompetenten Zellen müssen nach dem Waschen immer auf Eis bleiben, da sie sonst ihre Kompetenz verlieren!**

- In einem sterilen Erlenmeyerkolben werden 50 ml LB Medium gegeben.
- Von der Über-Nacht Kultur werden 500 µl in den Kolben gegeben.
- Die Kultur wird bei 37°C und 220 rpm geschüttelt.
- Zur photometrischen Messung wird 1 ml der Kultur mit einer sterilen Pasteurpipette entnommen und die OD₆₀₀ bestimmt.
- Wenn eine OD₆₀₀ von 0,5 erreicht ist, wird die Kultur unter stetigem Schwenken auf Eis abgekühlt.
- Die Zellen werden in ein vorgekühltes 50 ml Tube überführt und für 10 min bei 3.000 rpm und 4°C zentrifugiert.
- Der Überstand wird vorsichtig in den Erlenmeyerkolben abgegossen und die Zellen in 50 ml eiskaltem H₂O resuspendiert.
- Die Zellen erneut wie oben zentrifugieren.
- Den Überstand abnehmen und die Zellen in 50 ml eiskalten 10%igem Glycerol resuspendieren.
- Die Zellen erneut wie oben zentrifugieren.
- Den Überstand abnehmen und die Zellen in 25 ml eiskalten 10%igem Glycerol resuspendieren.
- Die Zellen wie oben zentrifugieren, den Überstand abnehmen und die Zellen in 250 µl 10%igem Glycerol aufnehmen
- Bis zur Transformation werden die Zellen auf Eis gelagert.

Analyse des Restriktionsverdau

- Die zwei Ansätze mit dem Restriktionsverdau werden kurz anzentrifugiert.
- Anschließend werden sie mit jeweils 7 µl Beladungspuffer (6x) versetzt und die gesamte Menge auf das Gel aufgetragen.
- Als Standard werden 10 µl λDNA/Eco 130I aufgetragen.

- Notieren Sie in der untenstehenden Tabelle, welche Bahnen Sie belegt haben.
- Die Fragmente werden bei 150 V getrennt.

Bahn	Probe	Bahn	Probe
1.	λ DNA Eco130I Standard	11	
2.		12	
3.		13.	
4.		14.	
5.		15.	
6.		16.	
7.		17.	
8.		18.	
9.		19.	
10.		20.	

Belegung des Agarosegels zur Analyse des Restriktionsverdaus

Nach der Elektrophorese wird das Gel unter UV Licht betrachtet und die DNA Fragmente aus dem Agarosegel ausgeschnitten.

- Zwei 1,5 ml Tubes werden auf dem Deckel mit "P" und "V" beschriftet und gewogen (Tara Gewicht).
- Das geschnittene PCR Produkt ("P") als auch einer der geschnittenen pET β Lac Vektoren ("V") werden mit einem Skalpell aus dem Agarosegel ausgeschnitten. Dabei ist darauf zu achten, dass der Anteil an Agarose möglichst gering gehalten wird.

Isolierung von DNA aus dem Agarosegel

Um die DNA aus dem Agarosegel zu isolieren, wird ein *Gel Extraction Kit* verwendet. Dabei wird die Agarose durch Erhitzen in einem Puffer gelöst. Die DNA wird anschließend an eine Matrix (*HiBind*-Säule) gebunden, auf dieser Matrix gewaschen und schließlich mit Wasser von dem Harz eluiert.

- Das 1,5 ml Tube mit dem Gelstück wird gewogen.
- Nach Abzug des Tara Gewichtes werden zu einem Volumina Gel das gleiche Volumina Puffer XP2 gegeben.

Beispiel: Das Tube mit dem Gel wiegt 1,15 g. Abzüglich des Tara Gewichtes (z.B 1,0 g) wiegt das Gelstück 150 mg. Somit werden 150 μ l Puffer XP2 zugegeben.

- Der Ansatz wird für 7 Min bei 60 °C im Thermomixer geschüttelt.
- Eine *HiBind*-Säule in ein 2 ml Gefäß stellen.
- Das Gefäß an der Seite mit der Gruppennummer beschriften.
- Die gesamte Probe wird auf die *HiBind*-Säule gegeben.
- Es wird 1 min bei 10.000 rpm zentrifugiert, der Durchlauf verworfen und das Sammel tube weiter verwendet.
- Zentrifugensäule wieder in das 2 ml Tube stecken, 300 μ l XP2-Puffer auf die Säule gegeben und für 1 min bei 10.000 rpm zentrifugieren. Säulendurchfluss verwerfen und Sammel tube weiter verwenden.
- Zentrifugensäule wieder in das 2 ml Tube stecken, 750 μ l SPW-Waschpuffer auf die Säule geben und für 1 min bei 10.000 rpm zentrifugieren. Säulendurchfluss verwerfen und Sammel tube weiter verwenden.
- Zentrifugensäule in das geleerte 2 ml Tube stecken und erneut durch 1 min Zentrifugation bei 10.000 rpm vollständig trocknen.
- Zentrifugensäule in ein sauberes 1,5 ml Tube stellen und 20 μ l H₂O auf die Matrix pipettieren. Erneut 1 min bei 10.000 rpm zentrifugieren. In dem Durchlauf befindet sich die DNA.

Ligation des PCR Produkts in den Vektor

- Es wird folgender Ansatz in einem 0,5 ml Tube zusammenpipettiert:

pET β Lac BamHI/XhoI verdaut	7 μ l
PCR Produkt BamHI/XhoI verd.	10 μ l
T4 Puffer	2 μ l
T4 Ligase	1 μ l
Endvolumen	20 μ l

- Der Ansatz wird kurz anzentrifugiert, um Tröpfchen von der Gefäßwand zu entfernen.
- Die Ligation erfolgt bei 16°C für 2 Stunden.

Transformation

Kompetente *E. coli* Zellen des Stammes Top10 werden mit der ligierten DNA mittels Elektroporation transformiert. **Alle Arbeitsschritte werden auf Eis durchgeführt!**

- Zwei Elektroporationsküvetten werden mit "K" und "L" beschriftet und auf Eis gekühlt
- Zwei 1,5 ml Tubes werden auf dem Deckel ebenfalls mit "K" und "L" beschriftet und auf Eis gekühlt
- 50 μ l der kompetenten Zellen werden in die 1,5 ml Tubes pipettiert.
- Es werden 2 μ l des entsalzten Ligationsansatzes zu den Zellen in das Tube "L" pipettiert. **Dabei mit der Pipette nicht auf- und abpipettieren!**
- Es wird 1 μ l einer Kontroll-DNA (pET β Lac, verdünnt auf 10ng/ μ l) zu den Zellen in das Tube "K" pipettiert. **Dabei mit der Pipette nicht auf- und abpipettieren!**
- Die Zellen mit der DNA werden in die jeweiligen Elektroporationsküvetten pipettiert. Damit die Zellen sich auf dem Boden der Küvette befinden, einmal kurz mit der Hand nach unten schleudern.
- Die Küvette mit einem Papierhandtuch abwischen, mit der Nut nach vorne in die Halterung stellen und in das Gerät schieben.
- Die beiden *Pulse* Tasten gleichzeitig drücken. Beim Signalton sofort loslassen.
- Die Küvette auf Eis stellen und 250 μ l SOC Medium zugeben.
- Die Zellen in ein 1,5 ml Tube pipettieren und 1 h bei 37°C wachsen lassen. Dabei gelegentlich schütteln.
- Es werden jeweils 20 und 50 μ l der beiden Ansätze auf LB Platten mit Kanamycin ausplattiert.
- Die Platten werden mit dem Deckel nach unten bei 37°C über Nacht inkubiert.

Konzentrationsbestimmung von DNA

Es wird die Konzentration und die Reinheit der pET β Lac DNA bestimmt. Die pET β Lac DNA dient bei der Transformation als Positivkontrolle und muss auf eine Konzentration von 10 ng/ μ l verdünnt werden.

Screening der *E. coli* Kolonien mittels PCR/Ansetzen von Kulturen

Die über Nacht gewachsenen Kolonien müssen überprüft werden, ob die aufgenommenen pET-Plasmide das mutierte β -Lactamase Gen enthalten. Dazu wird eine PCR angesetzt, bei der die Bakterienkolonie als Matrize dient. Zur Amplifikation werden die Primer pET-Fw und pET-Rev benutzt, die das Insert flankieren. Jede Gruppe untersucht 3 Kolonien. Gleichzeitig werden von diesen Kolonien Kulturen angesetzt.

- In drei 0,5 ml Tubes werden jeweils 10 μ l steriles H₂O pipettiert.
- Die Tubes werden auf dem Deckel mit "1", "2" und "3" beschriftet.
- 3 Kulturröhrchen werden mit jeweils 3 ml LB Medium/Kanamycin gefüllt und ebenfalls wie die Tubes beschriftet.
- Mit einem sterilen Zahnstocher wird eine Bakterienkolonie von der Agar Platte aufgenommen und die Kolonie durch mehrfaches Rotieren des Zahnstochers in dem Wasser von Tube 1 resuspendiert. Es ist dabei wichtig, dass lediglich Bakterien und kein Agar von der Platte aufgenommen werden! Dieses H₂O/Kolonie Gemisch dient als Template.
- Anschließend wird der Zahnstocher in das erste Kulturröhrchen gegeben und somit die Kultur angeimpft.
- Für die anderen beiden Tubes wird genauso verfahren.
- Nun wird der Mastermix (siehe nächste Seite) angesetzt und jeweils 40 μ l zu den drei Tubes gegeben.

Zur Kontrolle der PCR werden zwei weitere Reaktionen angesetzt. In zwei 0,5 ml Tubes (mit "4" und "5" beschriftet) werden je 10 μ l steriles H₂O pipettiert. In Tube 4 wird eine Kolonie des Stammes pET β Lac/Top10 gegeben (positive Kontrolle) und in Tube 5 eine Kolonie des Stammes Top10 (negative Kontrolle). Dann werden die Reagenzien zur PCR entsprechend der oben stehenden Tabelle zugegeben. Diese Kontrollen werden im Kurs nur einmal angesetzt.

Im Thermocycler wird wiederum das Programm PraktLac gestartet.

Die Kulturen werden über Nacht bei 37°C und 220 rpm inkubiert.

	Mastermix	PCR Screening			Kontrolle	
	M	1	2	3	4	5
Template		10 µl	10 µl	10 µl	10 µl	10 µl
H ₂ O	44,8 µl				12,5 µl	12,5 µl
dNTPs	35 µl				10 µl	10 µl
Puffer	17,5 µl				5 µl	5 µl
MgCl ₂	5,2 µl				1,5 µl	1,5 µl
Primer pET-Fw	17,5 µl				5 µl	5 µl
Primer pET-Rev	17,5 µl				5 µl	5 µl
Taq Polymerase	3,5 µl				1 µl	1 µl
Mastermix	140 µl	40 µl	40 µl	40 µl	/	/
Endvolumen		50 µl	50 µl	50 µl	50 µl	50 µl

Gießen von SDS-Polyacrylamidgelen

Zur Analyse der Expression und Reinigung der β -Lactamase Mutanten wird ein 15 %iges SDS-Polyacrylamidgel benötigt. Dazu werden in einem Gelgießstand fünf Sandwiches, bestehend aus je einer Alox-Platte, zwei Spacern sowie einer Glasplatte, zusammengesetzt. Anschließend wird das Trenngel gegossen, mit jeweils 500 µl Isopropanol überschichtet und 1 h polymerisiert. Dann wird das Sammelgel gegossen, die Gele mit den Kämmen bestückt und 2 h polymerisiert.

	15 % Trenngel	4 % Sammelgel
Acrylamid (30%ig)	15 ml	2 ml
H ₂ O	7,4 ml	9,2 ml
Trenngelpuffer	7,5 ml	-
Sammelgelpuffer	-	3,75 ml
APS (10%ig)	90 µl	60 µl
TEMED	24 µl	12 µl

Nach der Polymerisation werden die Gelsandwiches aus dem Gelgießstand genommen, überschüssiges Sammelgel mit einem Skalpell entfernt und die Rückseite der Alox-Platte von Trenngelresten gesäubert. Die Gele werden anschließend in Frischhaltefolie verpackt und im Kühlschrank aufbewahrt.

Trenngelpuffer (4x): 1,5 M Tris, 0,4 % (w/v) SDS, pH 8,8

Sammelgelpuffer (4x): 0,5 M Tris, 0,4 % (w/v) SDS, pH 6,8

Analyse des PCR Screenings

Die Analyse der oben angesetzten PCR Reaktion erfolgt mit einem 1,5 %igen Agarosegel, wobei zwei Gele angesetzt werden.

- Pro Gel werden 1,8 g Agarose abgewogen und analog zu der Vorschrift auf S.14 verfahren. Es wird ein 20er Kamm pro Gel benötigt.

Nach Beendigung der PCR Reaktion wird das Gel beladen:

- 10 µl der PCR Reaktion werden mit 2 µl Beladungspuffer (6x) auf einem Streifen Parafilm vermischt und 10 µl davon auf das Gel aufgetragen.
- Als Standard werden 10 µl λDNA/Eco 130I aufgetragen.

Bahn	Probe	Bahn	Probe
1.	λDNA Eco130I Standard	11	
2.	Kontrolle pETβLac/Top10	12	
3.	Kontrolle Top10	13.	
4.		14.	
5.		15.	
6.		16.	
7.		17.	
8.		18.	
9.		19.	
10.		20.	

- Notieren Sie in der untenstehenden Tabelle, welche Bahnen Sie belegt haben.
- Die Fragmente werden bei 150 V getrennt.

Nach Beendigung der Elektrophorese wird das Gel unter UV Licht betrachtet und dokumentiert. Welche Fragmentgrößen erwarten Sie? Stimmt Ihr Ergebnis mit den erwarteten Fragmentgrößen überein?

Restriktionsverdau

Um zu überprüfen, ob die in der PCR identifizierten positiven Klone auch tatsächlich die gewünschte Mutation tragen, wird ein Restriktionsverdau durchgeführt. Das PCR-Fragment wird dabei an der Stelle der Mutation spezifisch durch ein Restriktionsenzym geschnitten.

- Je nachdem wie viele positive Klone Sie haben, werden 1,5 ml Tubes auf dem Deckel beschriftet.
- In die Tubes werden je 26 μ l von dem PCR Fragment pipettiert.

Je nachdem, welche Mutation eingebaut wurde, wird nun der Restriktionsverdau angesetzt. Dabei ist zu beachten, dass jedes Restriktionsenzym einen spezifischen Puffer benötigt und bei einer speziellen Temperatur aktiv ist:

Mutation	S70A	E104K	S130G	N132S	K234H
PCR Ansatz	26 μ l	26 μ l	26 μ l	26 μ l	26 μ l
Puffer	3 μ l NEB 4	3 μ l G ⁺	3 μ l NEB 4	3 μ l NEB 3	3 μ l G ⁺
Enzym	1 μ l MscI	1 μ l SspI	1 μ l NcoI	1 μ l TfiI	1 μ l BclI
Endvolumen	30 μ l	30 μ l	30 μ l	30 μ l	30 μ l
Inkubation	37°C	37°C	37°C	65°C	55°C

Der Restriktionsverdau wird für 2 h bei den entsprechenden Temperaturen inkubiert.

Analyse des Restriktionsverdaus

Der Restriktionsverdau von dem PCR-Fragment wird in einem 2 %igen Agarosegel analysiert, wobei zwei Gele angesetzt werden. Zum Vergleich wird neben dem geschnittenen PCR-Fragment zusätzlich das ungeschnittene PCR-Produkt aufgetragen.

- Es werden 2,4 g Agarose abgewogen und analog zu der Vorschrift auf S.14 verfahren. Pro Gel wird ein 20er Kamm benötigt.
- Zu dem Rest der PCR Reaktion (14 μ l) werden 3 μ l Beladungspuffer (6x) gegeben und 12 μ l davon auf das Gel aufgetragen.
- Der Ansatz mit dem Restriktionsverdau wird mit 5 μ l Beladungspuffer (6x) versetzt und die gesamte Menge auf das Gel aufgetragen.
- Als Standard werden 10 μ l pUC Mix aufgetragen.

- Notieren Sie in der untenstehenden Tabelle, welche Bahnen Sie belegt haben.
- Die Fragmente werden bei 150 V getrennt.

Bahn	Probe	Bahn	Probe
1.	pUC Mix Standard	11	
2.		12	
3.		13.	
4.		14.	
5.		15.	
6.		16.	
7.		17.	
8.		18.	
9.		19.	
10.		20.	

Nach Beendigung der Elektrophorese wird das Gel unter UV Licht betrachtet und dokumentiert. Welche Fragmentgrößen erwarten Sie? Stimmt Ihr Ergebnis mit den erwarteten Fragmentgrößen überein?

Expression

Die Übernachtskultur eines im Restriktionsverdau positiven Klones wird zum animpfen einer neuen Kultur benutzt. Beim Erreichen der logarithmischen Wachstumsphase wird die Expression durch Zugabe von IPTG induziert und der Ansatz für 2 h weiter inkubiert.

- In einem 250 ml Erlenmeyerkolben werden 50 ml LB Medium sowie 30 μ l Kanamycin und 50 μ l Chloramphenicol gegeben.
- Die Kultur wird mit 0,5 ml der Übernachtskultur angeimpft und bei 37°C und 220 rpm inkubiert, bis eine $OD_{600\text{ nm}}$ von 0,5 erreicht ist.
- Zur Induktion werden 500 μ l IPTG zugegeben, so dass die Endkonzentration 1 mM beträgt.
- Zur späteren SDS-PAGE Analyse werden nach der IPTG Zugabe 200 μ l von der Zellsuspension abgenommen und in ein 1,5 ml Tube gegeben. Das Tube wird mit "Ex0" beschriftet, 1 min bei 14.000 rpm zentrifugiert, der Überstand abgesogen, das Pellet in 50 μ l Probenpuffer (2x) aufgenommen und bei -20°C gelagert.
- Der Expressionsansatz wird bei 37°C und 220 rpm für 2 h inkubiert.
- Es werden wiederum 200 μ l abgenommen und in ein 1,5 ml Tube gegeben, das Tube mit "Ex1" beschriftet und wie oben verfahren.

β -Lactamase-Test

Um die Aktivität der exprimierten β -Lactamase Mutante zu testen, wird das Wachstum der *E. coli* Zellen in Gegenwart von Ampicillin untersucht.

- 10 μ l des Expressionsansatzes werden auf eine LB Amp Platte mit einem Drigalski Spatel ausplattiert.
- Die Platte wird umgedreht über Nacht bei 37°C inkubiert.

Zellaufschluss

Um die Zellen zu lysieren, werden sie wiederholt eingefroren und aufgetaut. Dabei wird die innere Zellmembran der *E. coli* Zellen zerstört. Durch Zugabe von Lysozym wird die äußere Zellmembran enzymatisch zersetzt. Die so freigesetzte genomische DNA würde die Lösung sehr viskos machen, so dass sie nicht zu pipettieren und nur

schlecht zu zentrifugieren wäre. Deshalb wird Benzonase, ein Enzym welches unspezifisch DNA und RNA spaltet, zugesetzt.

- Der Expressionsansatz wird in ein 50 ml Tube überführt und für 10 min bei 3.000 rpm zentrifugiert.
- Der Überstand wird dekantiert und das Zellpellet in 2 ml Lysis Puffer resuspendiert.
- Die Zellen werden in flüssigen Stickstoff gefroren und anschließend bei 42°C wieder aufgetaut.
- Das Einfrieren/Auftauen wird insgesamt fünf mal durchgeführt.
- Es wird eine Spatelspitze Lysozym sowie 5 µl Benzonase zugegeben und für 30 min auf Eis inkubiert.
- Die Zellsuspension wird nun in ein 2,0 ml Tube überführt und für 20 min bei 14.000 rpm und 4°C zentrifugiert.
- Der Überstand wird abgenommen und in ein neues 2,0 ml Tube überführt.
- 20 µl von dem Überstand werden mit 20 µl Probenpuffer (2x) in einem 1,5 ml Tube versetzt, das Tube mit "L" beschriftet und bei -20°C gelagert.
- Das Pellet wird in 50 µl H₂O resuspendiert, mit 50 µl Probenpuffer (2x) versetzt, mit "P" beschriftet und ebenfalls bei -20°C gelagert.

Isolierung der β-Lactamase

Die Isolierung der β-Lactamase aus dem Zelllysats erfolgt mit Hilfe von *Ni-NTA Spin Säulen*. Dabei wird das Protein über den His-Tag an die Nickel Matrix gebunden, auf der Matrix gewaschen und anschließend eluiert.

- Es werden fünf 1,5 ml Tubes mit jeweils 20 µl Probenpuffer (2x) gefüllt und die Tubes mit "D", "W1", "W2", "E1" und "E2" beschriftet.
- Eine Ni-NTA Spin Säule wird auf dem Deckel beschriftet und in ein 2,0 ml Gefäß gestellt.
- Die Ni-NTA Spin Säule wird zuerst mit Lysispuffer äquilibriert. Dazu werden 600 µl Lysis Puffer in die Säule gefüllt und mit geöffnetem Deckel bei 2.000 rpm für 2 min zentrifugiert.
- Der Durchlauf wird verworfen und 600 µl des Zelllysats auf die Säule gegeben.
- Es wird wiederum für 2 min bei 2.000 rpm mit geöffnetem Deckel zentrifugiert.
- Von dem Durchlauf werden 20 µl in das 1,5 ml Tube "D" pipettiert und der restliche Durchlauf wird verworfen.

- Es werden wiederum 600 μl des Zelllysats auf die Säule gegeben, bei 2000 rpm für 2 min zentrifugiert und der Durchlauf verworfen.
- Es werden die restlichen 600 μl des Zelllysats auf die Säule gegeben, für 2 min bei 2000 rpm zentrifugiert und der Durchlauf verworfen.
- Die Säule wird nun mit 600 μl Waschpuffer gewaschen und für 2 min bei 2.000 rpm zentrifugiert. Von dem Durchlauf werden 20 μl in das Tube "W1" gegeben und der Rest wird verworfen.
- Der Waschschrift wird wiederholt und 20 μl von dem Durchlauf in das Tube "W2" gegeben. Der Rest von dem Durchlauf wird verworfen.
- **Zur Elution wird die Säule in ein neues 1,5 ml Tube gestellt** und das Tube auf dem Deckel mit "Elution1" beschriftet. Es werden 200 μl Elutionspuffer in die Säule gegeben, und für 2 min bei 2.000 rpm zentrifugiert.
- Die Elution wird nochmals mit 200 μl Elutionspuffer wiederholt. Zum Auffangen wird eine neues 1,5 ml Tube verwendet, welches mit "Elution2" beschriftet wird.
- Je 20 μl der Elutionsfraktionen werden in die Tubes "E1" und "E2" gegeben.
- Die beiden Elutionsfraktionen ("Elution1" und "Elution2") werden über Nacht im Kühlschrank aufbewahrt.

Lysis Puffer: 50 mM NaH_2PO_4 , 300 mM NaCl , 10 mM Imidazol, pH 8,0

Wasch Puffer: 50 mM NaH_2PO_4 , 300 mM NaCl , 20 mM Imidazol, pH 8,0

Elutions Puffer: 50 mM NaH_2PO_4 , 300 mM NaCl , 250 mM Imidazol, pH 8,0

SDS-PAGE Analyse

Um die Expression und die Reinigung der β -Lactamase zu analysieren, wird eine SDS-Polyacrylamid Gelelektrophorese durchgeführt.

- Ein 15%iges SDS-Polyacrylamidgel wird in eine Laufkammer eingespannt und mit Laufpuffer gefüllt.
- Die Proben "Ex 0", "Ex 1", "P", "L", "D", "W1", "W2", "E1" und "E2" werden für 3 min im Wasserbad aufgekocht.
- Die Ansätze werden 1 min bei 14.000 rpm zentrifugiert und das Gel nach folgendem Schema beladen:

Bahn	Probe	Volumen
1.	PageRuler Protein Ladder	6 μ l
2.	Expressionsansatz "Ex0"	20 μ l
3.	Expressionsansatz "Ex1"	20 μ l
4.	Pellet "P"	5 μ l
5.	Zellysat "L"	20 μ l
6.	Durchlauf "D"	20 μ l
7.	Waschschritt "W1"	20 μ l
8.	Waschschritt "W2"	20 μ l
9.	Elution "E1"	20 μ l
10.	Elution "E2"	20 μ l

- Die Elektrophorese wird bei 180 V unter Wasserkühlung durchgeführt.
- Anschließend wird das Gel aus der Laufkammer genommen, die Glasplatte vorsichtig abgenommen und mit einem Kunststoffspatel das Sammelgel abgetrennt.
- Das Trenngel wird vorsichtig in Coomassie Färbelösung gelegt und für 20 min unter leichtem Schütteln inkubiert.
- Das Gel wird in den Entfärber transferiert und für 5 min entfärbt.
- Um eine gute Bandenfärbung und einen geringen Hintergrund zu bekommen wird das Gel schließlich über Nacht in 10 % Essigsäure entfärbt.

Laufpuffer (5x): 0,125 M Tris, 0,96 M Glycin, 0,5 % (w/v) SDS, pH 8,3

Färbelösung: 0,25 % (w/v) Coomassie Brilliant Blue R250, 45 % (v/v) Ethanol, 10 % (v/v) HOAc

Entfärber: 45 % (v/v) Ethanol, 10 % (v/v) HOAc

Entsorgung: Färbe- und Entfärbelösungen werden in dem blauen Kanister für halogenfreie Lösungsmittel gesammelt.

Nitrocefin-Spaltung

Nitrocefin ist ein chromogenes Substrat der β -Lactamase mit einem Extinktionsmaximum bei $\lambda = 390$ nm (gelb). Wird die Amidbindung des β -Lactam Ringes hydrolysiert, so verschiebt sich das Extinktionsmaximum zu $\lambda = 486$ nm (rot). Da Nitrocefin sehr lichtempfindlich ist, wird es lichtgeschützt aufbewahrt.

Versuchen Sie, anhand der Intensität der Bande im Coomassie gefärbten Gel, die Konzentration der gereinigten β -Lactamase Mutante abzuschätzen.

- In einem 1,5 ml Tube werden 950 μ l Phosphatpuffer vorgelegt.
- Dazu werden etwa 1 μ g der gereinigten rekombinanten β -Lactamase Mutante pipettiert.
- Es werden 25 μ l der Nitrocefinlösung zugegeben und kurz durchmischt.
- Anschließend wird die Lösung in eine Mikroküvette gegeben und die Absorption bei 486 nm im Photometer gemessen. Das Photometer wird dabei gegen 500 μ l Phosphatpuffer geeicht.
- Nach 30 min wird die Reaktion erneut im Photometer vermessen.

Die Nitrocefinspaltung wird in einem zweiten Durchgang bei pH 5,5 mit MES Puffer durchgeführt.

Tragen Sie die Ergebnisse in die unten stehende Tabelle ein.

Phosphatpuffer: 100 mM NaPhosphat, pH 7,5

MES Puffer: 50 mM Morpholino Ethan Sulfonsäure, pH 5,5

Nitrocefinlösung: 1 mM Nitrocefin, 5 % (v/v) DMSO, 100 mM NaPhosphat, pH 7,0

Entsorgung: Nitrocefinlösung wird in dem blauen Kanister für halogenfreie Lösungsmittel gesammelt.

Mutation	Nitrocefin Spaltung pH 5,5		Nitrocefin Spaltung pH 7,5		Wachstum auf Amp Platten
	Messung 1	Messung 2 (nach 30 min)	Messung 1	Messung 2 (nach 30 min)	
Puffer-Kontr.					
Wildtyp					
S70A					
S70A					
E104K					
E104K					
S130G					
S130G					
N132S					
N132S					
K234H					
K234H					

Platzabgabe - Eichen der Mikropipetten

Um zu überprüfen wie genau die Mikropipetten funktionieren, wird das für die jeweilige Pipette maximale Volumen mit Wasser pipettiert und an der Feinwaage das Gewicht des pipettierten Volumens bestimmt.

- Stellen Sie die 100 – 1000 μl (blauer Hub) auf das maximal Volumen und setzen Sie eine blaue Spitze auf.
- Stellen Sie ein leeres 10 ml Becherglas auf die Feinwaage und tarieren Sie die Waage auf null.
- Pipettieren Sie 1 ml dH_2O in das Becherglas auf die Waage und notieren Sie das Gewicht.
- Stellen Sie die Waage wieder auf null und wiederholen Sie den Versuch vier mal.
- Verfahren Sie mit den anderen Pipetten genauso und tragen die Werte in die Tabelle ein.
- Ermitteln Sie den Mittelwert und bestimmen Sie die Abweichung der Pipette.

Pipette	100 – 1000 μl	20 – 200 μl	2 – 20 μl	0,5 – 10 μl
Versuch 1				
Versuch 2				
Versuch 3				
Versuch 4				
Versuch 5				
Mittelwert				
Abweichung [%]				

Zum Vergleich tragen Sie hier bitte die Abweichung der Mikropipetten zu Beginn des Praktikums ein:

Abweichung [%]

Sollten sich zu große Abweichungen zu den ersten Messungen ergeben, ist dies auf unsachgemäße Bedienung zurückzuführen und Sie müssen für die Reparatur der Mikropipetten aufkommen!

Auswertung

Jede Gruppe hat ein Protokoll über die Praktikumswoche anzufertigen. Das Protokoll sollte maximal 5 Seiten umfassen. Der Schwerpunkt sollte dabei folgendermaßen aussehen:

1. Einleitung

1/6

Was soll in dem Versuch gemacht werden? Welche Mutation wurde untersucht? Wie wird die Mutation analysiert?

2. Durchführung

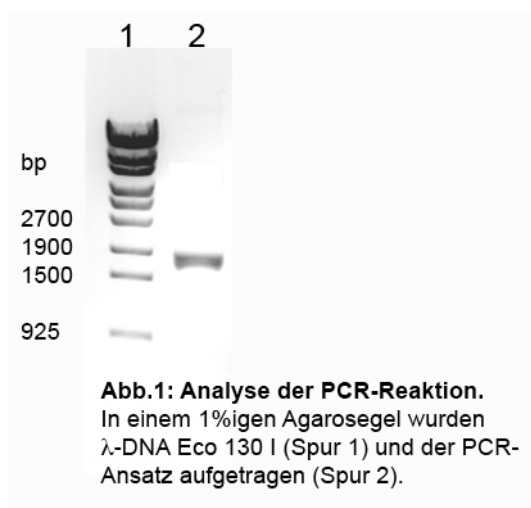
1/6

Sollte für Personen, die mit den Grundlagen der Molekularbiologie vertraut sind, kurz aber nachvollziehbar dargestellt werden.

3. Ergebnisse

3/6

Hierbei sollten die eigenen Ergebnisse und nicht die des Kurses im allgemeinen dargestellt werden. Abbildungen sind grundsätzlich mit einem Text zu beschriften, entsprechende Banden und Marker in Gelen sind zuzuordnen. Die Gele sind dabei folgendermaßen zu beschriften



A: Klonierung

PCR I → Bandengrößen?

PCR II → Bandengrößen?

Restriktionsverdau → Bandengrößen?

Ligation → Welche Banden ausgeschnitten?

DNA-Minipräparation → Konzentration und Reinheit der DNA?

Transformation → Wie viele Klone?

B: Analyse	Screening → wie viele Klone? Bandengröße? Restriktionsverdau → Bandengrößen? Klone positiv?
C: Expression und Funktions -Test	Expression → Zeitverlauf? Reinigung → Größe des Proteins, Ausbeute? β-Lactamase-Test → Wachstum der Zellen? Nitrocefin-Spaltung → Aktivität? → Graphische Darstellung der Werte

4. Diskussion

1/6

In der Diskussion soll sich die Gruppe kritisch mit ihren Ergebnissen auseinandersetzen. Warum hat etwas nicht geklappt? Fehleranalyse. Wie sind die Ergebnisse zu bewerten? Was wäre zu erwarten gewesen? Einfluss der Mutation auf die Aktivität? Reaktionsmechanismus der β-Lactamase? Mögliche Funktion der ausgetauschten Aminosäure?

Anhang

cDNA Sequenz der RTEM β -Lactamase

```

5'          9          18          27          36          45          54
          ATG AGT ATT CAA CAT TTC CGT GTC GCC CTT ATT CCC TTT TTT GCG GCA
          --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- ---
          Met Ser Ile Gln His Phe Arg Val Ala Leu Ile Pro Phe Phe Ala Ala

          63          72          81          90          99          108
TTT TGC CTT CCT GTT TTT GCT CAC CCA GAA ACG CTG GTG AAA GTA AAA GAT GCT
--- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- ---
Phe Cys Leu Pro Val Phe Ala His Pro Glu Thr Leu Val Lys Val Lys Asp Ala

          117          126          135          144          153          162
GAA GAT CAG TTG GGT GCA CGA GTG GGT TAC ATC GAA CTG GAT CTC AAC AGC GGT
--- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- ---
Glu Asp Gln Leu Gly Ala Arg Val Gly Tyr Ile Glu Leu Asp Leu Asn Ser Gly

          171          180          189          198          207          216
AAG ATC CTT GAG AGT TTT CGC CCC GAA GAA CGT TTT CCA ATG ATG AGC ACT TTT
--- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- ---
Lys Ile Leu Glu Ser Phe Arg Pro Glu Glu Arg Phe Pro Met Met Ser Thr Phe

          225          234          243          252          261          270
AAA GTT CTG CTA TGT GGC GCG GTA TTA TCC CGT ATT GAC GCC GGG CAA GAG CAA
--- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- ---
Lys Val Leu Leu Cys Gly Ala Val Leu Ser Arg Ile Asp Ala Gly Gln Glu Gln

          279          288          297          306          315          324
CTC GGT CGC CGC ATA CAC TAT TCT CAG AAT GAC TTG GTT GAG TAC TCA CCA GTC
--- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- ---
Leu Gly Arg Arg Ile His Tyr Ser Gln Asn Asp Leu Val Glu Tyr Ser Pro Val

          333          342          351          360          369          378
ACA GAA AAG CAT CTT ACG GAT GGC ATG ACA GTA AGA GAA TTA TGC AGT GCT GCC
--- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- ---
Thr Glu Lys His Leu Thr Asp Gly Met Thr Val Arg Glu Leu Cys Ser Ala Ala

          387          396          405          414          423          432
ATA ACC ATG AGT GAT AAC ACT GCG GCC AAC TTA CTT CTG ACA ACG ATC GGA GGA
--- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- ---
Ile Thr Met Ser Asp Asn Thr Ala Ala Asn Leu Leu Leu Thr Thr Ile Gly Gly

          441          450          459          468          477          486
CCG AAG GAG CTA ACC GCT TTT TTG CAC AAC ATG GGG GAT CAT GTA ACT CGC CTT
--- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- ---
Pro Lys Glu Leu Thr Ala Phe Leu His Asn Met Gly Asp His Val Thr Arg Leu

          495          504          513          522          531          540
GAT CGT TGG GAA CCG GAG CTG AAT GAA GCC ATA CCA AAC GAC GAG CGT GAC ACC
--- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- ---
Asp Arg Trp Glu Pro Glu Leu Asn Glu Ala Ile Pro Asn Asp Glu Arg Asp Thr

          549          558          567          576          585          594
ACG ATG CCT GTA GCA ATG GCA ACA ACG TTG CGC AAA CTA TTA ACT GGC GAA CTA
--- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- ---
Thr Met Pro Val Ala Met Ala Thr Thr Leu Arg Lys Leu Leu Thr Gly Glu Leu

```

```

        603          612          621          630          639          648
CTT ACT CTA GCT TCC CGG CAA CAA TTA ATA GAC TGG ATG GAG GCG GAT AAA GTT
--- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- ---
Leu Thr Leu Ala Ser Arg Gln Gln Leu Ile Asp Trp Met Glu Ala Asp Lys Val

        657          666          675          684          693          702
GCA GGA CCA CTT CTG CGC TCG GCC CTT CCG GCT GGC TGG TTT ATT GCT GAT AAA
--- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- ---
Ala Gly Pro Leu Leu Arg Ser Ala Leu Pro Ala Gly Trp Phe Ile Ala Asp Lys

        711          720          729          738          747          756
TCT GGA GCC GGT GAG CGT GGG TCT CGC GGT ATC ATT GCA GCA CTG GGG CCA GAT
--- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- ---
Ser Gly Ala Gly Glu Arg Gly Ser Arg Gly Ile Ile Ala Ala Leu Gly Pro Asp

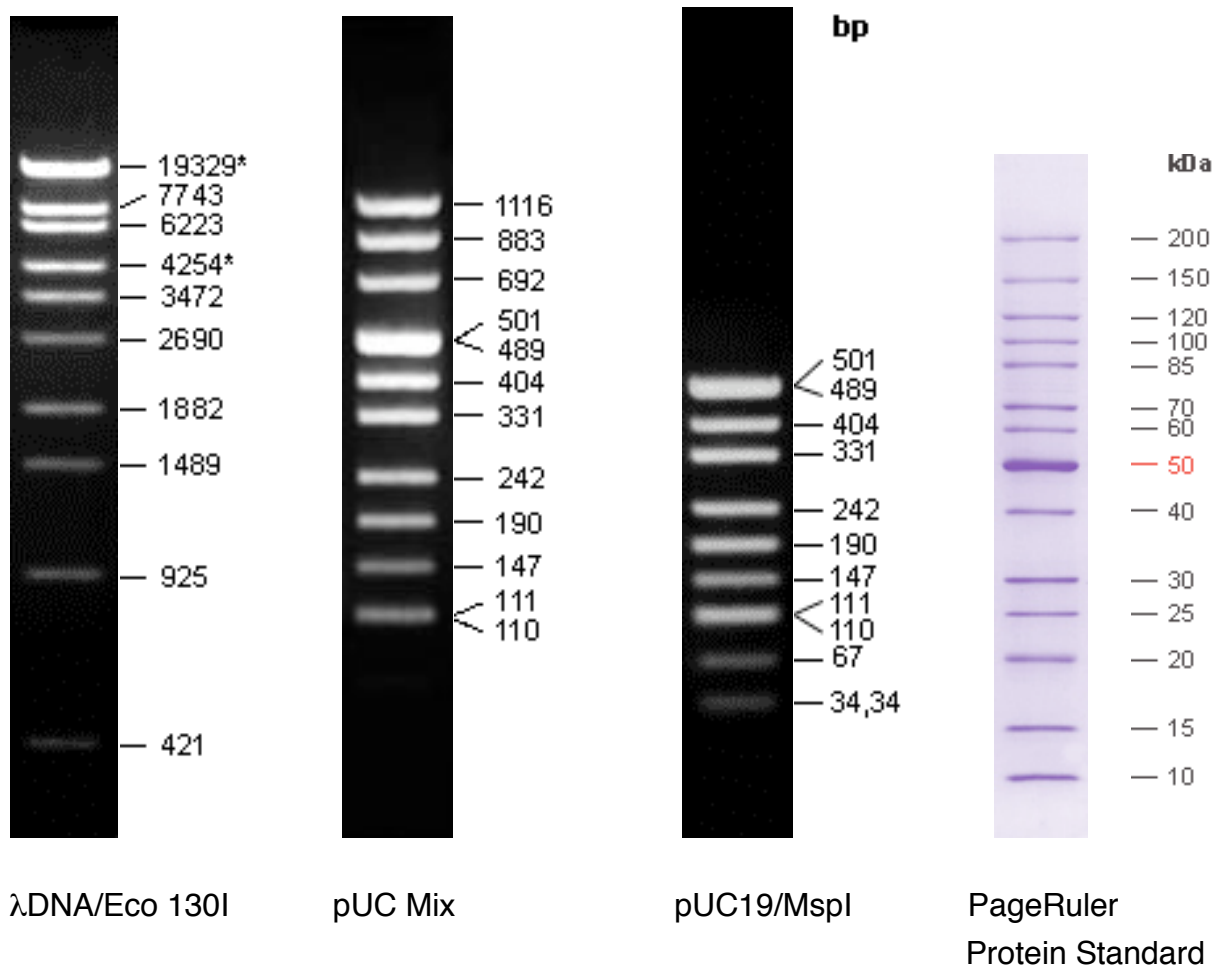
        765          774          783          792          801          810
GGT AAG CCC TCC CGT ATC GTA GTT ATC TAC ACG ACG GGG AGT CAG GCA ACT ATG
--- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- ---
Gly Lys Pro Ser Arg Ile Val Val Ile Tyr Thr Thr Gly Ser Gln Ala Thr Met

        819          828          837          846          855          864
GAT GAA CGA AAT AGA CAG ATC GCT GAG ATA GGT GCC TCA CTG ATT AAG CAT TGG
--- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- ---
Asp Glu Arg Asn Arg Gln Ile Ala Glu Ile Gly Ala Ser Leu Ile Lys His Trp

```

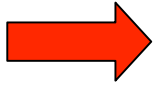
TAA 3'

Verwendete DNA und Protein Standards



Literatur

- (1) Waley, S.G. () β -Lactamase: mechanism of action. In: *The Chemistry of β -Lactams*, Ed M.I. Page, 199 - 228.
- (2) Sutcliffe, J.G. (1978) Nucleotide sequence of the ampicillin resistance gene of *Escherichia coli* plasmid pBR322. *Proc. Natl. Acad. USA*, 75, 3737-3741.
- (3) Jelsch, C., Lenfant, F., Masson, J.M., Samama, J.P. (1992) β -Lactamase TEM1 of *E. coli*. Crystal structure determination at 2,5 Å resolution. *FEBS Letters*, 299, 135 - 142.
- (4) Matagne, A., Frere, J.-M. (1995) Contribution of mutant analysis to the understanding of enzyme catalysis: The case of class A β -lactamases *Biochem. Biophys Acta*, 1246, 109 – 127.



Zur Prüfungsakte verfügen

Verwendete KMR Substanzen

Nachname: Matrikelnummer:

Vorname: Studiengang:

Praktikum / Arbeitsbereich: **Biochemisches Praktikum (CHE 61-021.5)**

Zeitraum / Datum:

Auflistung der verwendeten KMR-Substanzen, Kat. I und II:

Cas-Nummer	Stoffname (IUPAC) und Cat.	Verfahren und eingesetzte Menge	Kategorie (I oder II)
79-06-1	Acrylamid	30-40%ige wässrige Lösungen zur Polymerisation. Menge: 30 ml	K1B, M1B, R _F 2
1239-45-8	Ethidiumbromid	10mg/ml wässrige Lösungen zur Färbung von Agarosegelen (0,5 µg/ml Endkonzentration). Menge: 50 µl	M2
108-95-2	Phenol	1:1 Gemisch aus Phenol/Chlo-roform zur DNA-Extraktion. Menge: 1,5 ml	M2
50-00-0	Formaldehyd	37 %ige Lösung zur Silberfärbung von Proteinen. Menge: 50 µl	K2
68-12-2	N,N-Dimethylformamid	BCIP-Lösung zur Färbung von Western-Blots,. Menge: 500 µl	R _E 1B
67-66-3	Chloroform	1:1 Gemisch aus Phenol/Chlo-roform zur DNA-Extraktion. Menge: 1,5 ml	K1B*/s, M2*, R _E 2*

.....
Datum

.....
Unterschrift Studierende/r

.....
Datum

.....
Unterschrift Praktikumsleitung