

Musterprotokoll Biochemie Praktikum

Formelles:

Schriftgröße: 12 pt, Zeilenabstand: 1,5 Zeilen, Schrift: Times, Arial, Helvetica o.ä.
Bildunterschriften: können auch mit 10 pt und 1 Zeilenabstand beschriftet werden.
Seitenränder: Word Standardeinstellungen (oben: 3 cm, unten: 2 cm, links: 3 cm, rechts: 2,5 cm)

Maximale Seitenzahl: 5 Seiten (Proteinchemie I : 10 Seiten)

Abgabetermin: 2 Wochen nach Ende des Praktikums.

Korrekturen: die Erstversionen wieder mit abgeben.

Gliederung:

Einleitung:

Aus Blättern der Mistel soll die cDNA für das Mistellektin 3 isoliert und in den Vektor pMal kloniert werden. Dazu werden die Blätter in flüssigem Stickstoff gefroren, mit einem Mörser zerkleinert und die gesamte mRNA mit immobilisierten Oligo-dT isoliert. Mit einer RT-PCR wird durch die Verwendung von spezifischen Primern das Gen für das Mistellektin 3 amplifiziert. Durch Schneiden mit den Enzymen BamHI und EcoRI wird das PCR-Produkt in den mit BglII und EcoRI geschnittenen pMal Vektor ligiert. Eine Überprüfung der Klone erfolgt durch Restriktion mit BamHI und EagI und Analyse im Agarosegel.

Kommentar: Hier soll kurz die Aufgabenstellung erläutert werden. Bitte keine Methoden erklären. Die Leser sind fachkundig und müssen nicht über Lehrbuchwissen aufgeklärt werden

Durchführung:

Die Durchführung erfolgte wie im Skript *Molekularbiologie III V.1.8* angegeben. Lediglich die Transformation der *E. coli* Zellen erfolgte mit dem Stamm BL21 statt DH5 α und die Restriktion der DNA erfolgte für 3 statt 2 Stunden.

Kommentar: Auf das Skript verweisen. Bei Abweichungen vom Skript hier darauf hinweisen.

Kommentar: Organismen, lateinische Wörter etc in kursiv schreiben.

Ergebnisse:

Um das Gen des Mistellektin 3 zu Isolieren, wurde eine RT-PCR mit spezifischen Primern durchgeführt. Zur Kontrolle der RT-PCR wurde die Probe in einem Agarosegel untersucht. Die erwartete Bande von etwa 5 kb ist eindeutig zu sehen (Abb.1). Die Restriktionen des PCR-Produktes und des Vektors pMal mit den Enzymen BamHI bzw. BglII und EcoRI lieferten die erwarteten Fragmente von

Kommentar: Alle relevanten Daten und Abbildungen sind darzustellen. Die Ergebnisse nachvollziehbar und im Zusammenhang darstellen (roter Faden!). Bei Messwerten alle Daten + Kontrollen angeben und grafisch Darstellen (Balkendiagramm). Berechnungen nachvollziehbar machen.

Kommentar: Jede dargestellte Abbildung muss im Text erwähnt werden.

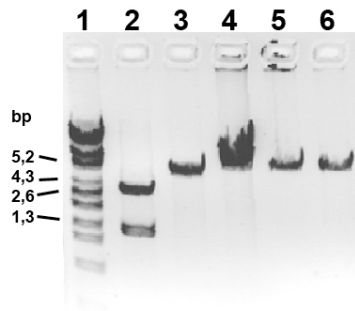


Abb. 1: Amplifikation des Mistellektin 3 Gens durch RT-PCR. Bahn 1: λ DNA Eco 130 I Standard, Bahn 3: eigener RT-PCR Ansatz, alle anderen Bahnen: Ansätze anderer Gruppen. 1 %iges Agarosegel.

Kommentar: Die Abbildungsbeschriftung neben oder unter das Bild setzen. Es müssen nicht alle Bahnen beschriftet werden. Der eigene Ansatz, die Kontrollen und der Standard sind wichtig. Beim Standard müssen die Banden in dem relevanten Größenbereich zugeordnet werden. Nicht in das Bild reinmalen (Pfeile, Kästen etc).

etwa 5kb für das PCR-Produkt und 5,5 kb für den Vektor (Abb.2). Zusätzlich sind bei beiden Ansätzen im Gel schwache Banden bei etwa 3 kb zu sehen.

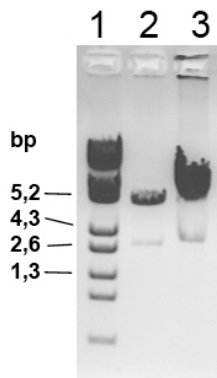


Abb.2: Restriktion des PCR-Produktes und des Vektors pMal. Bahn 1: λ DNA Eco 130 I Standard, Bahn 2: RT-PCR Ansatz geschnitten mit BamHI und EcoRI, Bahn 3: pMal geschnitten mit BglII und EcoRI. 1 %iges Agarosegel.

Nach der Ligation von Vektor und PCR-Produkt und anschließender Transformation von *E. coli* Zellen wuchsen bei der Positiv-Kontrolle (mit 1 ng pMal Vektor DNA) 237 Kolonien (entspricht einer Transformationseffizienz von $2,4 \times 10^6$ cfu/ μ g DNA), bei er Negativ-Kontrolle keine und bei dem Ligationsansatz 27 Kolonien. Drei Klone davon wurden nach DNA-Minipräparation mit den Enzymen XhoI und EagI geschnitten. Positive Klone sollten Banden bei 8 und 2 kb ergeben.

Kommentar: Dezimalstellen werden in der deutschen Rechtschreibung als Komma dargestellt und nicht als Punkt.

Alle 3 Klone ergaben die erwarteten Banden, die Klonierung verlief also erfolgreich (Abb. 3). Die hergestellten Klone wurden als pMal-ML3 1-3 bezeichnet.

Kommentar: Neu hergestellten Materialien, Verbindungen etc einen Namen geben und diesen dann fortlaufend verwenden.

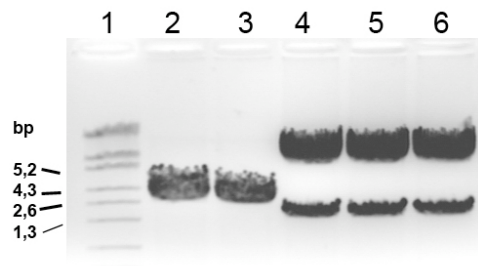


Abb. 3: Restriktion von pMal-ML3. Bahn 1: λ DNA Eco 130 I Standard, Bahn 2 und 3: pMal-ML3 Klone 1 und 2, Bahn 4-6: pMal-ML3 Klone 1 - 3 geschnitten mit XhoI und EagI. 1 %iges Agarosegel.

Diskussion:

Die Klonierung der Mistlektin 3 DNA in den Vektor pMal war erfolgreich. Die RT-PCR lieferte die gewünschte Bande bei 5 kb (siehe auch Eck *et al.* 1999) und auch die Restriktion des PCR-Produktes und des Vektors ergab die erwarteten Banden bei 5 bzw 5,5 kb. Im Gel war hier allerdings in beiden Präparationen eine schwache Bande bei 3 kb zu sehen, deren Ursprung nicht eindeutig ist. Möglich wäre eine DNA-Kontamination eines Puffers oder Restriktionsenzym. Die Transformation von *E. coli* Zellen mit dem ligierten Vektor lief erfolgreich. Die Transformationseffizienz von $2,4 \times 10^6$ cfu/ μ g DNA lag zwar weit unter dem Bereich bei der Elektroporation, trotzdem wuchsen auf den Kulturplatten 27 Kolonien. Drei pMal-ML3 Klone wurden durch Restriktion untersucht und alle drei ergaben die erwarteten Fragmente.

Kommentar: Die Ergebnisse noch mal zusammenfassen und kritisch, auch im Zusammenhang mit anderen Daten/Publicationen/Ergebnissen von anderen Kursteilnehmern bewerten.

Literatur:

Skript *Molekularbiologie III* V.1.8, Institut für Biochemie und Molekularbiologie, Universität Hamburg.

J. Eck *et al.* (1999) Cloning of the mistletoe lectin gene and characterization of the recombinant A-chain, *Eur J Biochem.*, 264, 775-84.

Kommentar: Das Skript mit der Versuchsdurchführung und weitere für das Protokoll relevante Artikel und Lehrbücher sollten zitiert werden.