

**Novartis Pharma AG
Schullabor**



Plasmid-DNA

**Auf der Suche nach dem Antibiotikaresistenz Gen
2019 / 1**

Herausgeber

Novartis Pharma AG, CH-4002 Basel

Kontaktadresse:

Novartis Pharma AG
Schullabor
WKL-122.2.26A
Postfach
CH-4002 Basel

Tel. 061/696 13 72

E-Mail: kontakt.schullabor@novartis.com

Internet: www.novartis.ch/schullabor

Nachdruck mit Einverständnis des Herausgebers und Quellennachweis erlaubt.
Kopien für den Schulgebrauch sind erwünscht.

(Ausgabe 2019; Praktikum im Schullabor)

Grundlagen

Bakterien, E.coli K12

Bakterien sind Einzeller und können neben ihrer genomischen DNA zusätzlich Plasmid-DNA enthalten. E.coli ist ein typisches Darmbakterium. Der E.coli Stamm K12 kann allerdings den Darm nicht mehr besiedeln. Es handelt sich um einen Sicherheitsstamm. Unter den richtigen Laborbedingungen lassen sich diese Bakterien problemlos halten und vermehren. Damit erfüllen sie ein wichtiges Kriterium für einen Modellorganismus. E. coli K12 gehört zu den molekularbiologisch am besten untersuchten und charakterisierten Organismen und wird heute vielfach als sicherer Wirtsorganismus zur Herstellung rekombinanter Proteine verwendet.

Plasmide

Plasmide sind kleine, ringförmige DNA-Moleküle. Sie kommen nur in Bakterien vor und werden hier als zusätzliches Reservoir genetischer Information genutzt. Das Bakterium ist auch ohne Plasmid-DNA lebensfähig. Plasmid-DNA wird unabhängig vom Zellzyklus in der Zelle vermehrt und bei der Zellteilung einfach zwischen den Tochterzellen aufgeteilt. Die genetische Information auf Plasmiden kann daher gut geändert, ersetzt oder ergänzt werden und der Effekt an einem Bakterium beobachtet werden, das zuvor keine Plasmid-DNA enthielt. Dieses Vorgehen wird als Transformation von Bakterien bezeichnet.

Die Plasmide pUC18 und pBluescript, welche im Kurs verwendet werden, sind synthetische DNA-Moleküle. Sie wurden eigens für den Gebrauch zu Forschungszwecken hergestellt. Solche Laborplasmide werden als Vektoren bezeichnet, da sie benutzt werden, veränderte genetische Informationen in Bakterienzellen einzuschleusen. Die Vektoren pUC18 und pBluescript besitzen folgende wichtige Funktionen: 1. Sie können sich sehr effektiv und unabhängig vom Zellzyklus replizieren (origin of replication), sodass man mit ca. 100 Kopien pro Zelle rechnen kann (high copy number). 2. Sie enthalten als Marker ein Gen für Antibiotikaresistenz. 3. Sie enthalten eine Region in die neu einkopierte Genabschnitte mittels bakteriellem Promotor abgelesen werden können (Multiple Cloning Site).

Antibiotikaresistenz

Als Selektionsmarker tragen die Plasmide pUC18 und pBluescript das Gen für das Enzym β -Lactamase, das für die Resistenz gegen Ampicillin verantwortlich ist. Resistenz gegen Ampicillin im humanen Bereich kann durch die Zugabe von Clavulansäure, einem β -Lactamase-Hemmer, begegnet werden. Daher kann das verwendete Ampicillin-Gen als risikoarm eingestuft werden.

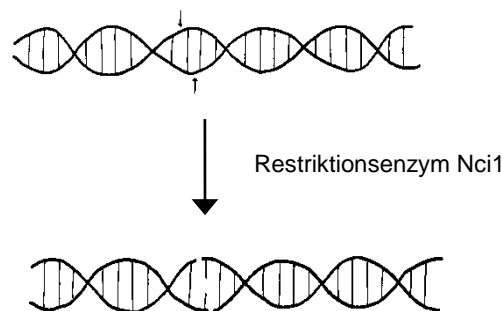
Enzyme, Restriktionsenzyme

Enzyme sind Eiweiße, die chemische Reaktionen (Stoffumwandlungen) katalysieren können. Restriktionsenzyme sind Endonucleasen, die nur an definierten Erkennungssequenzen innerhalb (Endo) doppelsträngiger DNA (Nucleinsäure) die Desoxyribose-Phosphorsäureester Bindung hydrolysieren, das heißt „schneiden“. Restriktionsenzyme werden daher auch gern vereinfacht als Genschere bezeichnet. Als Restriktionsenzym wird in diesem Kurs das Enzym Nci1 genutzt.

Experiment 1: Charakterisieren von DNA durch Restriktionsanalyse

Methode:

Es gibt Enzyme, die spezifische Nukleotidsequenzen (Buchstabenabfolgen) auf der DNA erkennen und an diesen Stellen die DNA schneiden können. Diese Enzyme stammen aus Bakterien und werden Restriktionsenzyme genannt. Ihre Verfügbarkeit bildet eine der Grundvoraussetzungen für das gezielte Bearbeiten von DNA. In diesem Experiment wird das Plasmid pBluescript und pUC18 vom Restriktionsenzym Nci1 geschnitten (verdaut). Die Erkennungssequenz bei diesem Restriktionsenzym ist: CC[↓](G/C)GG.



Arbeitsweise:

1. Arbeiten Sie zu zweit oder zu dritt. Beschriften Sie die Deckel eines weissen und eines blauen Röhrchens mit Ihrem Gruppenlogo.
2. Pipettieren Sie

ins blaue Röhrchen:

15,5 µl ddWasser
2µl Restriktionspuffer
2µl Plasmid **pBluescript**

ins weisse Röhrchen:

15,5 µl ddWasser
2µl Restriktionspuffer
2µl Plasmid **pUC18**

Zentrifugieren Sie beide Röhrchen für 15 Sekunden. Lassen Sie sich von Ihrer Kursleitung das Restriktionsenzym geben.

0,5 µl Restriktionsenzym Nci1

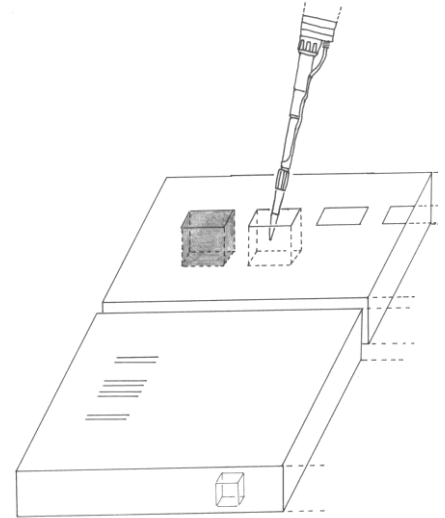
0,5 µl Restriktionsenzym Nci1

3. Verschliessen Sie die Röhrchen gut und zentrifugieren Sie beide nochmals 15 Sekunden.
4. Inkubieren Sie die Proben für 40 Minuten bei 37°C im Heizblock.

Experiment 2: Auftrennen und Sichtbarmachen von DNA-Fragmenten mit Hilfe der Gel-Elektrophorese

Methode:

In Experiment 1 haben Sie Plasmid-DNA mit einem Restriktionsenzym geschnitten (verdaut). Im folgenden Experiment werden die dabei entstandenen DNA-Stücke (Fragmente) der Grösse nach getrennt. Diese Auftrennung geschieht in einem elektrischen Feld. DNA ist negativ geladen und wandert folglich im elektrischen Feld zum positiven Pol. Bei der Gel-Elektrophorese müssen die DNA-Fragmente im elektrischen Feld ein Agarosegel durchwandern, das mit hintereinandergestellten „Gittern“ verglichen werden kann. Je kleiner die DNA-Fragmente sind, umso leichter können sie durch diese „Gitter“ wandern. Kleine DNA-Fragmente legen daher in der gleichen Zeit eine längere Strecke im elektrischen Feld zurück als grosse DNA-Fragmente. Fragmente gleicher Grösse formieren sich im Gel als Banden.



Nach dieser elektrophoretischen Auftrennung können die DNA-Fragmente im Gel sichtbar gemacht werden. Dem Gel wurde ein Fluoreszenzfarbstoff beigemischt, der die DNA-Banden unter UV-Licht grün leuchten lässt.

Arbeitsweise:

1. Pipettieren Sie zu den weissen und blauen Röhrchen je 5 μ l Ladepuffer.
2. Zentrifugieren Sie die Proben 15 Sekunden.
3. Lassen Sie sich die Elektrophorese-Apparatur erklären. Die Kursleiterin oder der Kursleiter pipettiert 8 μ l der Molekulargewichtsmarker-DNA in die erste Tasche.
4. Pipettieren Sie langsam 15 μ l einer Probe in eine der Vertiefungen (=Tasche) des Gels. Lassen Sie sich erklären, worauf Sie dabei achten müssen!
5. Wiederholen Sie diesen Vorgang mit der anderen Probe. Für jede Probe wird eine neue leere Tasche verwendet.
6. Die Elektrophorese dauert ca. 45 Minuten bei 230V.

Achtung: Bedienung der Geräte nur durch die Kursleitung!

Beschäftigen Sie sich inzwischen mit der Auswertung.

7. Nach Beendigung der Elektrophorese nimmt die Kursleitung den Gelträger heraus. Das Gel wird unter der UV-Lampe ausgewertet.

Achtung: UV-Licht kann die Augen verletzen. Der Schutzschild muss geschlossen sein, wenn das Gerät eingeschaltet ist!

Auswertung

Ziel des Kurses ist die Identifizierung des Genabschnitts für die Antibiotikaresistenz verschiedener Plasmide durch Restriktionsanalyse. Sie haben die Plasmide pUC18 und pBluescript untersucht. Im ersten Experiment haben Sie diese Plasmide mit einem Restriktionsenzym „geschnitten“ und im zweiten Experiment die entstandenen DNA-Stücke mittels Gel-Elektrophorese aufgetrennt. Am Ende des Kurses sollten Sie das DNA-Fragment, welches das Resistenzgen für Ampizillin enthält, isoliert haben.

Die folgenden Aufgaben sollen Ihnen bei der Bestimmung helfen:

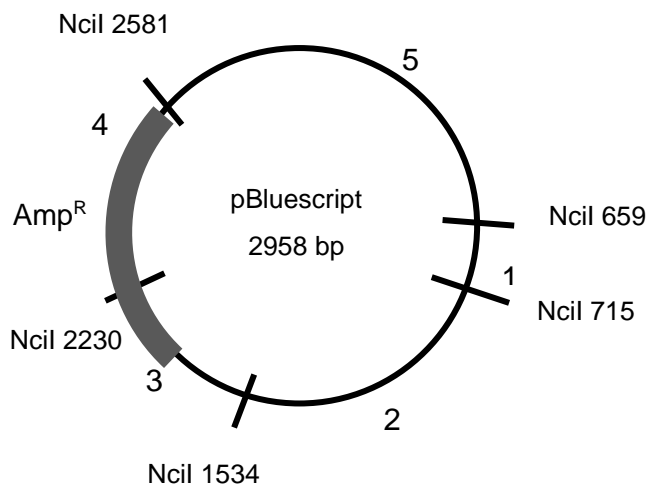
1. Berechnen Sie für beide Plasmide Anzahl und Grösse der zu erwartenden Fragmente. (Verwenden Sie zur Berechnung der Fragmentgrößen die Plasmidkarten)

In jedem Plasmid ist die für Nci1 spezifische Erkennungssequenz mehrmals vorhanden. Die Positionen dieser Erkennungssequenz sind unten in den Plasmidkarten angegeben. Daraus lassen sich die Größen der DNA-Fragmente berechnen.

Erkennungssequenz des Restriktionsenzym Nci1:

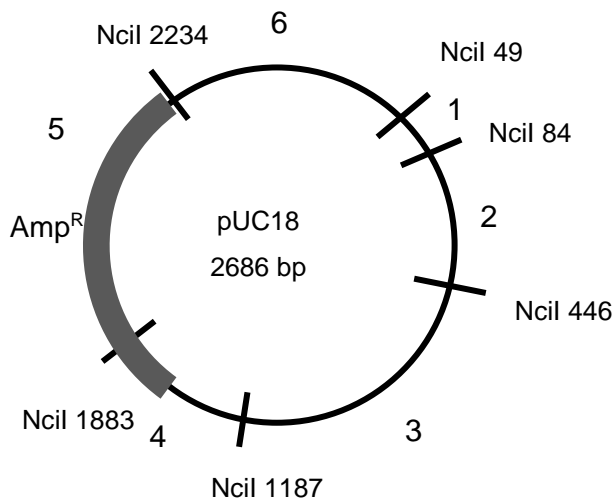
CC↓(G/C)GG

GG(C/G)↑CC



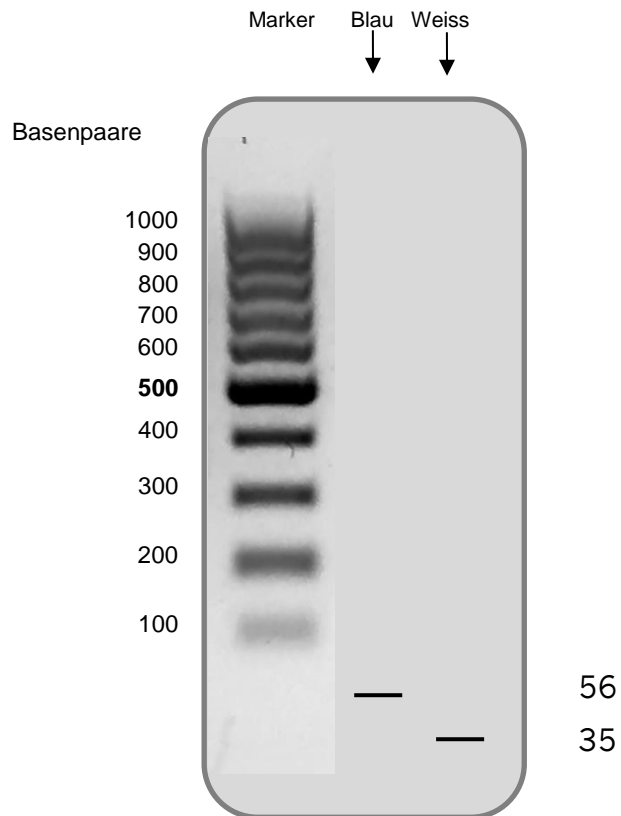
Fragmente in bp

1	56
2	
3	
4	
5	



1	35
2	
3	
4	
5	
6	

2. Zeichnen Sie das theoretisch ermittelte Ergebnis auf dem Foto ein. Mit Hilfe des Markers (Größenangaben siehe links am Foto) lässt sich die Lage der Banden für die berechneten Fragmente abschätzen.



3. Welches sind die Fragmente, die das Antibiotikaresistenz Gen enthalten?

4. Was fällt Ihnen beim Vergleich der Fragmente der beiden Plasmide auf?

5. Wie würden Sie vorgehen, um das Resistenzgen auf andere Organismen zu übertragen?

6. Wie sah das experimentelle Ergebnis im Vergleich zur Theorie (Aufgabe 2) aus?