

# **Protokoll Versuch A1**

Klonierung des Tyro3-D1D2-Fragments  
mittels PCR

**Gruppe 8**

Susanne Duncker und Friedrich Hahn

## Einleitung und Aufgabenstellung

Ziel dieses Versuchs ist es, das Gen für ein bestimmtes Protein in Bakterien einzubringen, so dass diese das Protein in für die Kristallographie ausreichend großen Mengen herstellen.

Beim hier verwendeten Protein handelt es sich um das D1D2-Fragment des Tyro3-Rezeptors, welcher ein Mitglied der Familie der Tyrosinkinasen ist. Das D1D2-Fragment stellt die Ligandenbindungsdomänen, Immunglobulindomänen, dar. Mittels Polymerasekettenreaktion (polymerase chain reaction, PCR) wurde das Zielgen vervielfacht und in *E. coli* eingebracht und die positiven Klone identifiziert. Die Analyse des exprimierten Proteins erfolgte im Versuch A2.

Hierfür wurde mittels PCR die Sequenz für das Fragment aus cDNA amplifiziert. Außerdem wurden dabei sowohl zwei Restriktionsschnittstellen für NdeI und XhoI sowie zwei Stoppcodons eingebaut.

## Teilversuch 1: Primerdesign

Da die Aminosäuren 41 – 222 des D1D2-Fragments mittels PCR amplifiziert werden sollten, mussten zunächst passende Primer gefunden werden. Unter Beachtung einiger im ausgeteilten Skript nachzulesenden Details wie z.B. die Berechnung der Annealingtemperatur auf S. 9, wurden von uns folgende Primersequenzen beschrieben:

Vorwärtsprimer: **GGAATTCCATATGG**CAGGTCTGAAGCTCATGG 60 °C  
**Blau:** Schnittstelle für NdeI  
 Rückwärtsprimer: **CCGCTCGAGTTATT**ATTGAAGGTGAAGAGTGGCTG 60 °C  
**Cyan:** Schnittstelle für XhoI  
**Grün:** Stoppcodon 1  
**Grün:** Stoppcodon 2

Der Vorwärtsprimer enthält eine Erkennungssequenz für die Restriktionsendonuclease NdeI, der Rückwärtsprimer für XhoI. Die Schnittstelle für NdeI enthält glücklicherweise bereits ein Startcodon (**ATG**, fett gedruckt), so dass das Leseraster des Plasmids für das D1D2-Fragment nicht von Belang war. Vor der Erkennungssequenz von XhoI wurden zwei Stoppcodons einkloniert, um den Abbruch der Translation zu gewährleisten.

Die beiden Restriktionsendonucleasen erzeugten sticky ends, wodurch die Ligation mit dem ebenfalls mit NdeI und XhoI geschnittenen Vektor pET21a<sup>+</sup> erleichtert wurde, da so die Religation des Plasmids verhindert und die richtige Leserichtung des Inserts gewährleistet wurde.

## Teilversuch 2: PCR

Um eine für die weitere Klonierung ausreichende Menge an Tyro3-D1D2-DNA zu amplifizieren, wurden zwei 70 µl-PCR-Ansätze nach folgendem Pipettierschema vorbereitet:

- Mastermix für 2 x 70 = 140 µl (+ 10 % → 154 µl)
- 15,4 µl PCR-Puffer
  - 7,7 µl MgCl<sub>2</sub>
  - 7,7 µl Vorwärtsprimer
  - 7,7 µl Rückwärtsprimer
  - 15,4 µl dNTP-Mix
  - 2,2 µl Template-**DNA**

- 2,2 µl Taq-Polymerase
- 95,7 µl MQ

Diese Ansätze wurden einer PCR unterzogen. Die PCR-Produkte wurden in Teilversuch 3 für den Restriktionsverdau sowie in Teilversuch 4 für die Ligation eingesetzt.

Des Weiteren wurden, um die PCR zu optimieren, analytische PCR-Ansätze erstellt, bei denen jeweils eine andere Menge an Primern eingesetzt wurde.

Als Orientierung für die unterschiedlichen Primermengen verwendeten wir die Angabe aus *Der Experimentator: Molekularbiologie / Genomics*, S.80:

Absolute Minimalmenge Primer	10 pmol / 50 µl
Optimum Primermenge	50 – 200 pmol / 50 µl

Umgerechnet auf unsere 15 µl-Ansätze entspricht das minimal 3 pmol / 15 µl bzw. optimal 15 – 60 pmol / 15 µl. Wir berechneten aufgrund dieser Angabe unsere variablen Primermengen (s. Tabellen 1a und 1b), wobei sich jedoch ein im Nachhinein nicht nachvollziehbarer Fehler einschlich – unsere variablen Primermengen lagen um das im Experimentator angegebene Minimum herum und kamen dem angegebenen Optimum nicht einmal nahe.

15 µl PCR-Puffer
7,5 µl MgCl <sub>2</sub>
15 µl dNTP-Mix
2 µl Template-DNA
2 µl Taq-Polymerase

**Tabelle 1a:** Mastermix für zehn PCR-Ansätze mit variablen Primermengen

	Primermenge	MQ-Menge
Je 0,1 µM Primer	0,3 µl	10,25 µl MQ
Je 0,15 µM Primer	0,45 µl	9,95 µl MQ
Je 0,2 µM Primer (entspricht laut Experimentator (s.o.) der einzusetzenden Minimalmenge)	0,6 µl	9,65 µl MQ
Je 0,25 µM Primer	0,75 µl	9,35 µl MQ
Je 0,3 µM Primer	0,9 µl	9,05 µl MQ
Je 0,35 µM Primer	1,05 µl	8,75 µl MQ
Je 0,4 µM Primer	1,2 µl	8,45 µl MQ
Je 0,45 µM Primer	1,35 µl	8,15 µl MQ
Je 0,5 µM Primer	1,5 µl	7,85 µl MQ

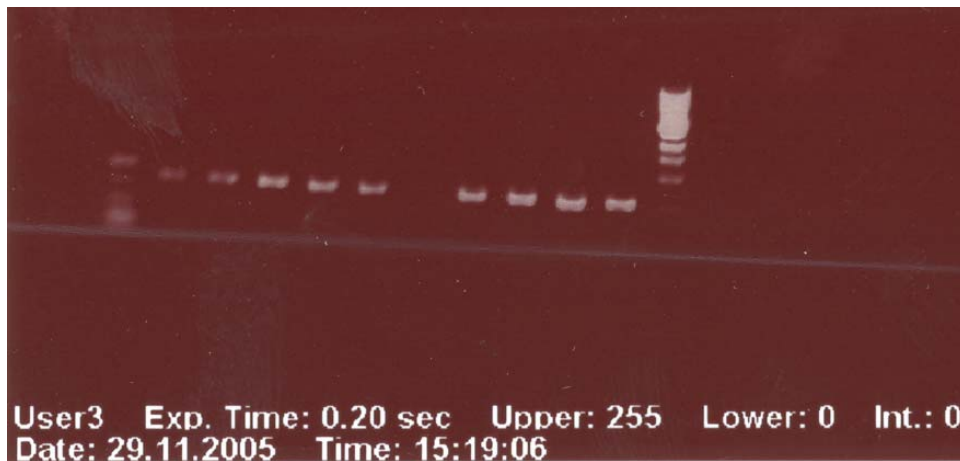
**Tabelle 1b:** die verschiedenen zum Mastermix hinzugegebenen Primer- und MQ-Mengen für die PCR

Die PCR wurde mit folgendem PCR-Programm gestartet:

- 5 min Denaturierung bei 95 °C
- 25 Zyklen
  - o 35 s Denaturierung bei 95 °C
  - o 35 s Annealing bei 60 °C
  - o 35 s Extension bei 72 °C
- 10 min Extension bei 72 °C
- Kühlen, 8 °C

Je 10 µl jedes analytischen PCR-Ansatzes wurden auf ein 0,8 %-Agarosegel geladen, das nach dem einstündigen Lauf bei 50 mA fotografiert wurde und weiter unten als Abbildung 1 zu sehen ist. Man kann erkennen, dass bei keinem der Ansätze überschüssiger Primer zu

sehen ist, wie es hätte sein müssen, wenn wir das Optimum an Primermenge erreicht und überschritten hätten. Dies liegt an der fehlerhaften Berechnung der Primermenge.



**Abb. 1:** Gelelektrophorese der PCR-Produkte mit variierten Primermengen

Auftragsschema: 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12

- 1) PCR-Marker
- 2) 0,1  $\mu$ M Primer
- 3) 0,15  $\mu$ M Primer
- 4) 0,2  $\mu$ M Primer
- 5) 0,25  $\mu$ M Primer
- 6) 0,3  $\mu$ M Primer
- 7) Beim Beladen des Gels versehentlich übersprungen
- 8) 0,35  $\mu$ M Primer
- 9) 0,4  $\mu$ M Primer
- 10) 0,45  $\mu$ M Primer
- 11) 0,5  $\mu$ M Primer
- 12) DNA-Standard

### **Teilversuch 3: Restriktionsverdau**

Die für das von uns gewünschte Protein codierende und durch PCR amplifizierte DNA-Sequenz wurde mit Hilfe des Vektors pET21a<sup>+</sup> in Bakterien eingebracht. Hierzu musste die Sequenz jedoch zunächst in den Vektor eingebracht werden, was durch zunächst Restriktion des Plasmids sowie der gewünschten DNA und darauf folgender Ligation (s. Teilversuch 4) erfolgte.

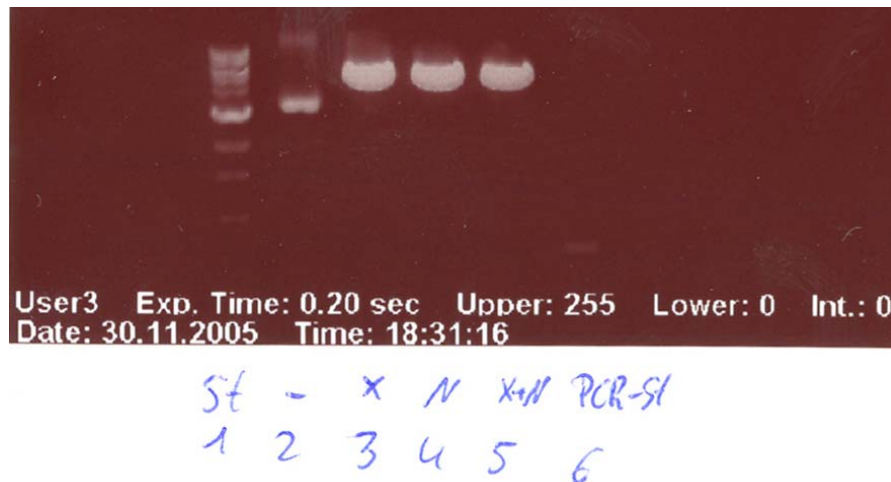
135  $\mu$ l PCR-Produkt wurden mit dem *QIAQuick PCR Purification Kit*<sup>1</sup> aufgereinigt (in Schritt 8 wurden, wie im Skript angegeben, nur 25  $\mu$ l Puffer EB eingesetzt) und für Restriktionsansätze entsprechend der Anleitung im Skript auf S. 13 verwendet.

Um das Schnittverhalten der Enzyme zu überprüfen, wählten wir folgende Ansätze als analytische Kontrollverdau:

- Ansatz ohne Enzym (Negativkontrolle)
- Ansatz nur mit dem Enzym NdeI
- Ansatz nur mit dem Enzym XhoI
- Ansatz mit beiden Enzymen, wie im Skript angegeben

<sup>1</sup> Die Anleitung hierzu findet sich auf der Homepage des Herstellers Qiagen unter dem direkten Link <http://www1.qiagen.com/HB/QIAquickSpin>

Diese Kontrollverdaus analysierten wir mit Hilfe einer Gelelektrophorese, deren Foto in Abbildung 2 dargestellt ist.



**Abb. 2:** Kontrollverdau zur Überprüfung des Schnittverhaltens der Restriktionsenzyme

Auftragsschema: 1 2 3 4 5 6

- 1) DNA-Leiter
- 2) Negativkontrolle (kein Enzym)
- 3) XhoI
- 4) NdeI
- 5) NdeI + XhoI
- 6) PCR-Standard

Die aus Abbildung 2 ersichtlichen Ergebnisse entsprachen unseren Erwartungen: Bande 2 zeigt den ungeschnittenen Vektor, in den Banden 3 – 5 liegt der Vektor linearisiert vor. Dass sich die beiden mit nur einem Enzym geschnittenen Banden nicht von der mit zwei Enzymen geschnittenen Bande zu unterscheiden scheinen, liegt daran, dass beim Schneiden mit zwei Restriktionsenzymen ein nur ca. 100 bp großes DNA-Stück weggeschnitten wird, was bei der hier verwendeten Gellaufzeit nicht auffällt.

Die Ansätze wurden bei 37 °C über Nacht inkubiert und am nächsten Morgen laut Skript S. 14 durch 20minütiges Erhitzen auf 65 °C inaktiviert. Zum Vektorverdau gaben wir laut Anleitung einen µl SAP – dieses Enzym katalysiert die Dephosphorylierung des 5'-Phosphats des Vektors, wodurch dieser nicht mehr mit seinem eigenen 3'-Ende religieren kann. Die SAP wurde eine Stunde lang bei 37 °C mit den geschnittenen Vektoren inkubiert und anschließend 20 min bei 65 °C deaktiviert.

Nach der Inaktivierung reinigten wir die geschnittenen Vektoren und PCR-Produkte über eine Gelelektrophorese in einem 0,8 % Agarosegel; um die Identifizierung der richtigen Banden zu erleichtern, ließen wir 1 kb DNA-Standard sowie PCR-Standard mitlaufen.

Unsere Vektorbande war gut zu sehen, die Bande des durch PCR amplifizierten Tyro3-D1D2-Gens leider nur extrem schwach. Dennoch verwendeten wir, wissend, dass wir nur sehr wenig DNA extrahieren können, diese Bande ebenfalls.

Die Vektor- sowie die PCR-Produkt-Bande wurde unter UV-Licht ausgeschnitten (die Vektorbande wog 0,15 g, die des PCR-Produkts 0,21 g). Die DNA extrahierten wir mit dem

*QiaEX II Gel Extraction Kit*<sup>2</sup> nach der beiliegenden Anleitung mit den auf S. 14 im Skript angegebenen Modifikationen.

### **Teilversuch 4: Ligation**

Die im Teilversuch 3 aufgereinigte DNA des linearisierten Vektors und der amplifizierte Tyro3-D1D2-DNA wurden in diesem Versuch zu einem vollständigen Plasmid ligiert, das in Bakterien eingebracht werden konnte.

Da wir aufgrund unserer äußerst schwachen Tyro3-D1D2-Bande vermuteten, dass wir kaum DNA darin finden würden, vermaßen wir je 1,5 µl unserer extrahierten DNA mit dem *NanoDrop*, welcher uns die in Tabelle 2 dargestellten Ergebnisse lieferte.

	Messergebnis mit NanoDrop
Vektor	24,5 ng/µl
PCR-Produkt	4,8 ng/µl

*Tabelle 2: Messergebnisse des NanoDrop*

Laut Skript versuchten wir dann, das Konzentrationsverhältnis von Vektor und Insert durch Gelelektrophorese zu bestimmen – das Gelfoto sieht man in Abbildung 3.



*Abbildung 3: Bestimmung des Mengenverhältnisses von PCR-Produkt zu Vektor*

Unsere Banden befanden sich, wie über das Foto geschrieben wurde, in den Taschen 6 und 7. In Tasche 6 sieht man deutlich die Bande des Vektors, in Tasche 7 hingegen ist nichts zu sehen. Wir bekamen für unsere weiteren Versuche DNA von Gruppe 7 und führten die weiteren Versuche jeweils mit dieser DNA sowie mit unseren sehr geringen DNA-Mengen durch, um zu sehen, ob es funktioniert.

Bei Gruppe 7 (Tasche 2 und 3) scheint die Vektorbande (Tasche 3) ca. doppelt so hell wie die Tyro3-D1D2-Bande (Tasche 2). Das Vektormolekül ist ungefähr achtmal so groß wie das Tyro3-D1D2-Gen, das ergibt ein Verhältnis von 2:8 → die Tyro3-Bande enthält folglich viermal so viele Moleküle wie die Vektorbande.

<sup>2</sup> Die Anleitung hierzu findet sich auf der Homepage des Herstellers Qiagen unter dem direkten Link <http://www1.qiagen.com/HB/QIAEXII>

Die Ligationsansätze pipettierten wir wie in Tabelle 3 angegeben und verfahren damit wie im Skript auf S. 15 beschrieben.

	Ansatz 1 DNA von Gruppe 7	Ansatz 2 unsere DNA	Ansatz 3 Negativkontrolle
Vektor	5 µl	1 µl	1 µl
Tyro3-D1D2-DNA	3 µl	7 µl	7 µl
Puffer	1 µl	1 µl	1 µl
Ligase	1 µl	1 µl	0 µl dafür 1 µl MQ

**Tabelle 3:** Ligationsansätze

Am nächsten Tag transformierten wir nach den Anweisungen im Skript auf S. 15f kompetente *XL 10-Gold E. coli* und inkubierten sie über Nacht bei 37 °C im Brutschrank.

### **Teilversuch 5: Colony PCR**

Um herauszufinden, ob die transformierten Bakterienkolonien das gewünschte Insert enthielten, führten wir eine Kolonie-PCR durch.

Die transformierten Bakterienkolonien wurden nach der Übernachtsinkubation ausgezählt. Wir erhielten die in Tabelle 4 angegebenen mageren Ergebnisse.

Ansatz 1	1 Kolonie
Ansatz 2	1 Kolonie
Ansatz 3	0 Kolonien

**Tabelle 4:** Koloniezahlen der transformierten Bakterien

Je zwei Gruppen erhielten unterschiedliche Primer, um die Kolonie-PCR durchzuführen. Wir verwendeten dieselben Primer wie schon in Teilversuch 2, erwarteten also genau so große DNA-Fragmente wie dort (ca. 550 bp), während die Gruppen, die den T7-Promotor-Primer sowie den T7-Terminator-Primer verwendeten, ein deutlich größeres DNA-Fragment (ca. 800 bp) erhalten sollten.

Für unsere elf PCR-Ansätze (s. Tabelle 6) stellten wir den in Tabelle 5 beschriebenen Mastermix für zwölf Ansätze zusammen und gingen nach der Anleitung im Skript auf S. 16 vor.

PCR-Puffer	24 µl
MgCl <sub>2</sub>	12 µl
Vorwärtsprimer	12 µl
Rückwärtsprimer	12 µl
dNTP-Mix	24 µl
Taq-Polymerase	3 µl
MQ @ 240 µl	153 µl

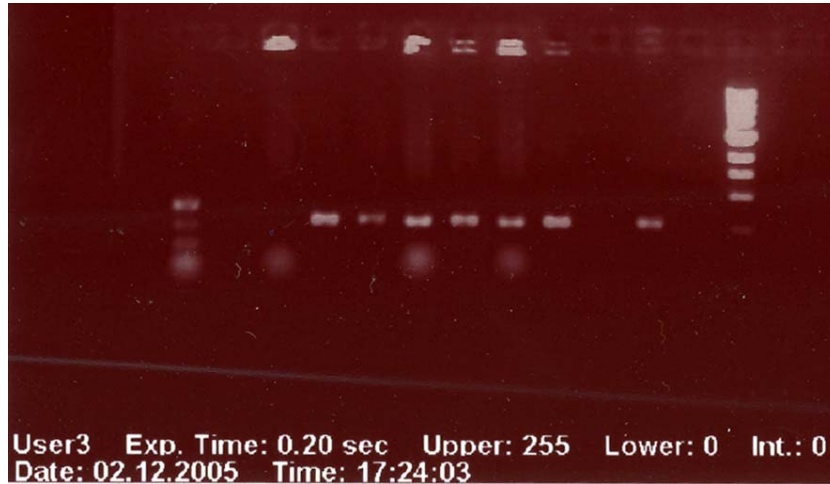
**Tabelle 5:** für die Kolonie-PCR verwendeter Mastermix

Ansatz 1	Kolonie aus Transformationsansatz 1
Ansatz 2	Kolonie aus Transformationsansatz 2
Ansatz 3	Kolonie aus Transformationsansatz 3 von Gruppe 7
Ansatz 4	Kolonie aus Transformationsansatz 3 von Gruppe 7
Ansatz 5	Kolonie aus Transformationsansatz 1 von Gruppe 6
Ansatz 6	Kolonie aus Transformationsansatz 1 von Gruppe 6
Ansatz 7	Kolonie aus Transformationsansatz 2 von Gruppe 6
Ansatz 8	Kolonie aus Transformationsansatz 1 von Gruppe 6
Ansatz 9	Agarkontrolle aus Transformationsansatz 3

Ansatz 10	Positivkontrolle (1 µl pET21a <sup>+</sup> Tyro3-D1D2)
Ansatz 11	Negativkontrolle

*Tabelle 6: für Kolonie-PCR verwendete Ansätze*

Nach der PCR trugen wir je 8 µl PCR-Produkt auf ein 0,8 % Agarosegel auf und führten eine Gelelektrophorese (s. Abb. 4) durch.

*Abb. 4: Elektrophorese der Kolonie-PCR-Produkte*

- Auftragsschema: 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13
- 1) PCR-Standard
  - 2) Ansatz 1 (Kolonie aus Transformationsansatz 1, DNA von Gr. 7)
  - 3) Ansatz 2 (Kolonie aus Transformationsansatz 2, unsere DNA)
  - 4) Ansatz 3 (Kolonie aus Transformationsansatz 3 von Gruppe 7)
  - 5) Ansatz 4 (Kolonie aus Transformationsansatz 3 von Gruppe 7)
  - 6) Ansatz 5 (Kolonie aus Transformationsansatz 1 von Gruppe 6)
  - 7) Ansatz 6 (Kolonie aus Transformationsansatz 1 von Gruppe 6)
  - 8) Ansatz 7 (Kolonie aus Transformationsansatz 2 von Gruppe 6)
  - 9) Ansatz 8 (Kolonie aus Transformationsansatz 1 von Gruppe 6)
  - 10) Ansatz 9 (Agarkontrolle aus Transformationsansatz 3)
  - 11) Ansatz 10 (Positivkontrolle (1 µl pET21a<sup>+</sup> Tyro3-D1D2))
  - 12) Ansatz 11 (Negativkontrolle)
  - 13) DNA-Standard

Das erste augenscheinliche Ergebnis unserer Gelelektrophorese ist, dass 4,8 ng/µl DNA leider doch zu wenig sind, um eine erfolgreiche Ligation zu ermöglichen – Spur 3 enthält keine amplifizierte Tyro3-D1D2-Bande. Spur 2, in der unser Ansatz 2 mit der DNA von Gruppe 7 laufen sollte, enthält gar nichts – hier haben wir wohl beim Eintauchen der Pipettenspitze in die Kolonie etwas falsch gemacht. Spur 4 und 5 zeigen, dass Transformationsansatz 3 von Gruppe 7 zwei Kolonien erzeugte, die das gewünschte Insert enthalten. Transformationsansatz 1 und 2 von Gruppe 6 stehen dem, wie die Spuren 6 – 9 zeigen, in nichts nach. Unsere Agarkontrolle in Spur 10 zeigt, wie erhofft, keinerlei Banden. Die Positivkontrolle in Spur 11 verhält sich auch den Erwartungen entsprechend und liefert eine Bande. Spur 12 mit der Negativkontrolle ist leer.

## Ergebnis

4,8 ng/µl Insert-DNA sind, wie wir jetzt nicht nur aus Methodenbüchern wissen, zu wenig, um eine erfolgreiche Ligation mit Vektormolekülen zu erreichen. Doch die Konstruktion des Plasmids klappte bei uns zumindest theoretisch und bei den anderen Gruppen auch praktisch – die von den anderen Gruppen erzeugten Plasmide waren geeignet, um *E. coli* zu



transformieren, so dass diese Bakterien bzw. deren Produkt in Versuch A2 hätten weiterverwendet werden können, wäre dieser Versuch nicht zeitgleich durchgeführt worden.

## **Beantwortung der im Skript auf S. 17 gestellten Fragen**

- 1) *Was ist bei der Wahl geeigneter Restriktionsenzyme für eine Klonierung zu beachten? Warum benutzt man überhaupt zwei unterschiedliche Enzyme für die Klonierung von Expressionsplasmiden?*

Bei der Wahl geeigneter Restriktionsenzyme ist darauf zu achten, dass die Enzyme

- nicht unspezifisch schneiden
- nur eine Schnittstelle im Vektor haben
- bei ggf. vorhandener Methylierungssensitivität entsprechend behandelte DNA vorgesetzt bekommen

Man verwendet zwei verschiedene Restriktionsenzyme, damit

- das ebenfalls mit zwei Enzymen geschnittene Insert nur in einer Richtung eingebaut werden kann
- der Vektor nicht so leicht religieren kann

- 2) *Worin unterscheiden sich thermostabile Polymerasen wie Taq- oder Pfu-Polymerase? Warum ist der Einsatz von Taq-Polymerase für eine präparative PCR eigentlich nicht die beste Wahl?*

	Taq	Pfu
Proofreading-Aktivität?	Nein	Ja
Genauigkeit	1 Fehler / 1.000 bp	1 Fehler / 10.000 bp
Temperaturoptimum	74 °C	75 °C
Syntheserate	~ 2.800 Nukleotide / min	~ 550 Nukleotide / min
Erzeugte Enden	Sticky ends	Blunt ends

Aufgrund ihrer durch fehlende Proofreading-Aktivität bedingten höheren Fehlerrate ist die Taq-Polymerase für präparative PCR weniger geeignet.

- 3) *Welche Methoden, DNA aufzureinigen, kennen Sie? Worin unterscheiden sich unter Umständen diese Methoden? Welche Fehler/Probleme können während der Klonierung auftreten, wenn die DNA nicht zwischen den einzelnen Arbeitsschritten wiederholt aufgereinigt wird?*

Folgende Methoden eignen sich für die DNA-Aufreinigung:

- Phenolextraktion
- Aufreinigung über Glasmilch
- Anionenaustauschsäulen, z.B. *QIAprep Spin Miniprep Kit*
- Gelfiltration

Wird die DNA nicht wiederholt aufgereinigt, erhält man bei der Klonierung nicht nur das gewünschte Stück DNA, sondern auch noch z.B. genomische DNA (falls Plasmide kloniert werden sollten), die in den Vektor hinein ligieren. Auch andere Verunreinigungen wie z.B. durch Proteine o. ä. sind möglich und stören das gewünschte Ergebnis.

- 4) *Was versteht man unter der Dephosphorylierung eines geschnittenen Vektors? Welchem Zweck dient dieser Zwischenschritt?*

Bei der Dephosphorylierung des geschnittenen Vektors werden mittels eines Enzyms die Phosphatgruppen an den Enden des Vektors entfernt. Dadurch soll die Religation verhindert werden, da ohne diese Gruppen keine energiereiche Bindung vorhanden ist, die die Energie für die Ligation liefern kann.

- 5) *Welche konformationellen Zustände können bei Plasmiden auftreten? Wie lassen sich diese unterscheiden?*

Plasmide können linear, entspannt zirkulär (oc, open circle) und als supercoils (ccc, covalently closed circle) auftreten. Diese Zustände unterscheiden sich in ihrer Laufgeschwindigkeit in einem Gel. Die oc-Form läuft am langsamsten, da der entspannte Ring relativ sperrig ist, die linearisierte Form etwas schneller. Am schnellsten läuft, aufgrund ihrer hohen Kompaktheit, die ccc-Form.

- 6) *Warum ist es entscheidend für den Klonierungserfolg, dass der Vektor während des Restriktionsverdau vollständig geschnitten wird? An welcher Stelle im Klonierungsschema würden selbst minimale Mengen ungeschnittenen Vektors ernste Probleme bereiten?*

Wird der Vektor nicht vollständig geschnitten, kann das Insert nicht in jedes Vektormolekül eingebaut werden. Dies würde besonders bei der Ligation Probleme bereiten: es käme zur vermehrten Koloniebildung von Stämmen ohne Insert, was einen hohen Screening-Aufwand erzeugt, um Kolonien mit Insert zu finden.

- 7) *Welche Methoden könnten zusätzlich zur Colony-PCR durchgeführt werden, um den Erfolg der Klonierung abzusichern? Wie funktionieren diese Methoden? Welche Methode würden Sie als die zuverlässigste bewerten?*

Man könnte zusätzlich das Plasmid sequenzieren (zuverlässig, sehr genau, aber auch aufwändig und teurer) oder zusätzliche Selektionsmarker ins Insert einbauen (etwas umständlich, aber immer noch zuverlässig genug).

- 8) *Wie funktioniert „Blue/White-Screening“? Welche Voraussetzungen müssen dafür gegeben sein (Konstruktion des Plasmids / Bakterienstamm)?*

Das Blue/White-Screening beruht auf der Expression der  $\beta$ -Galaktosidase (lacZ) als Selektionsmarker in einen galaktosidasedefizienten Hintergrund (lacZ<sup>-</sup>). Die Schnittstelle für das Insert liegt in dem Galaktosidasegen auf dem Vektor. Kolonien, die ein Plasmid mit Insert aufgenommen haben, können die farblose Substanz X-Gal (5-Brom-4-chlor-3-indolyl- $\beta$ -D-galactosid) in einen blauen wasserunlöslichen Indigofarbstoff umwandeln. Die gewünschten Kolonien mit Insert bleiben so weiß, da das Insert den Leserahmen des lacZ-Gens zerstört. Die Induktion der  $\beta$ -Galaktosidase erfolgt mit Hilfe von IPTG (Isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactosid), welches dem Medium zugesetzt ist. Normal ist nicht das komplette lacZ-Gen auf dem Plasmid, sondern nur das lacZ'-Fragment, welches die in Laborstämmen häufige lacZ $\Delta$ M15-Mutation komplementiert.

Hierfür benötigt man einen Bakterienstamm, der das lac-Operon enthält.

- 9) *Welche genetischen Eigenschaften sollten E.coli-Stämme, die bevorzugt für Klonierungen bzw. Stammhaltung eines Plasmids eingesetzt werden, mitbringen?*

Für die Plasmidstammhaltung eingesetzte E.coli-Stämme dürfen nicht viele eigene Resistenzgene besitzen und müssen protease- und nucleasedefizient sein, damit sie fremde (eingebrachte) DNA und fremde (neu exprimierte) Proteine nicht schneiden.

- 10) *Kennen Sie andere Klonierungsverfahren für PCR-Produkte außer der Klonierung über Restriktionsverdau / „sticky ends“? Wie funktionieren diese? Welche Vor- bzw. Nachteile bringen sie u.U. mit sich?*

Man kann auch mit blunt ends klonieren, Enden, die glatt abgeschnitten sind und keinen Basenüberhang haben. Vorteile dieses Systems sind z.B., dass jede beliebige Sequenz ligiert werden kann, da keine spezifischen Basenüberhänge notwendig sind.

Nachteil ist, dass z.B. die Richtung, in der ein Insert eingebaut wird, nicht bestimmt werden kann und Religationen nicht leicht verhindert werden können.