Molekularbiologie I für Bioinformatiker

Praktikum

Ulrike Schmidt und Christina Siegel

Ulrike Schmidt (Matrikelnr. 3580043)
Christina Siegel (Matrikelnr. 3584999)

Gutes Protokoll.
i. O.

Siehe Anmerkungen
im Protokoll

17.4.01
Fuchs

Protokoll zu Versuch 1 (Isolierung von DNA aus Rindermilz)

Einleitung – Warum wurde dieser Versuch durchgeführt?

Der Versuch diente der Vertiefung der Kenntnisse von Aufbau und Struktur der DNA, der Organisation der DNA sowie von gentechnologischen Grundbegriffen.

Material und Methoden

Die Milz ist ein Körperorgan, das als Filter und zur Blutspeicherung in die Blut- und Lymphbahn eingeschaltet ist. Sie baut rote Blutkörperchen ab und bildet in den Lymphknötchen ihres Gewebes neue weiße Blutkörperchen.

Milzgewebe eignet sich besonders gut zur Isolierung von DNA, da darin eine besonders hohe Konzentration zu finden ist.

In diesem Versuch sollte DNA aus Rindermilz isoliert werden. Grundsätzlich musste man drei Hauptschritte durchführen.

- Aufbrechen der Zelle

Die Rindermilz wurde zunächst mit mechanischen Kräften zerkleinert (Schere) und homogenisiert (mit Homogenisationspuffer im Glaspistill).
Zellen und Kerne wurden durch das Detergens SDS (Sodiumdodecylsulfat im Homogenisationspuffer) lysiert, wobei Proteine denaturierten. Das EDTA schützt die DNA während der weiteren Aufarbeitung.

- Extraktion der DNA aus dem Homogenat

Durch Zugabe von Phenol und Zentrifugation werden DNA und Proteine von einander getrennt. Die obere Phase enthält die DNA und wird vorsichtig entnommen, ohne die Phasen wieder miteinander zu vermischen.

- Ausfällung der DNA

Durch Zugabe von NaCl und Ethanol wird die Hydrathülle der DNA vermindert, so dass sie ausfällt und auf einen Glasstab gewickelt werden kann.

Durchführung

Bei der Versuchsdurchführung wurde nicht von der Anleitung abgewichen (siehe auch Punkte 2 und 4)

Ergebnisse

Nach dem Homogenisieren von 2,5 g Rindermilz mit 20 ml Homogenisationspuffer konnte ein Volumen von 21 ml im Messzylinder abgelesen werden.

Es wurden 21 ml Phenol-Lösung hinzugegeben, sodass ein Gesamtvolumen von 42 ml vorhanden war. Zur Zentrifungation wurden davon jedoch 8,75 ml weggegossen. Es wurde mit einem Volumen von 33,25 ml weitergearbeitet.

Nach der Zentrifugation konnten 2,5 ml der obersten wässrigen Phase mit den Nukleinsäuren entnommen werden, ohne die Phasen zu verwirbeln.

Daraufhin wurde 0,25 ml NaCl Lösung in den Messzylinder mit den Nukleinsäuren gegeben und beide Lösungen gemischt.

Diese Lösung wurden daraufhin mit 5 ml Ethanol überschichtet.

Mit einem Glasstab konnte DNA entnommen und anschließend in 10 ml SSC-Lösung wieder aufgelöst werden.

Im Spektralphotometer wurde die Extinktion gemessen:

Extinktion bei 260 nm	Extinktion bei 280 nm	Quotient E260/E280	DNA-Konzentration in der Küvette mg/ml	Verdünnungs-faktor	Gesamtmenge DNA in 2,5 g Milz
0,594	0,358	1,659	0,029*	1:100	36 mg

*verdünnt; mit dem Verdünnungsfaktor verrechnet ergibt sich eine Konzentration von 2,9 mg/ml DNA

In einem ml SSC-Lösung waren 2,9 mg DNA enhalten. In 10 ml SSC-Lösung folglich 29 mg.

Da wir bisher mit dem Gesamtvolumen 33,25 ml gerechnet haben, müssen wir das Ergebnis nach oben korrigieren (Dreisatz).

Daher ergibt sich eine Gesamtmenge DNA in 42 ml Lösung von 36 mg.

Diskussion

Die Reinheit unserer isolierten DNA lässt sich schlecht beurteilen, da uns keine Vergleichswerte vorliegen. (1)

Sie könnte jedoch durch verschiedene Verfahren gesteigert werden.

- Unter Umständen können Verunreinigungen die Ergebnisse beeinflussen. Sterile Arbeitsgeräte und –umgebung könnten dieses Risiko verringern.
- Durch noch genauere Messgeräte könnten Messfehler reduziert werden. Mechanisierte Vorgänge würden menschliche Fehler minimieren.
- Eine (geringe) Verwirbelung der Phasen nach der Zentrifugation ist nicht auszuschließen und kann die Messergebnisse im Spektralphotometer beeinflussen.
- Durch mehrfache Verdünnung erhöht sich das Risiko von Pipettier- und Rechenfehlern. Durch häufiges Umschütten gehen immer einige Mikroliter Flüssigkeit verloren, was bei Wiederholungen zu Verzerrungen führen kann.
- Es ist möglich, dass nicht die gesamte DNA entfernt wurde, was somit die Konzentration niedriger ausfallen lässt.

* aber bestes Ergebnis in der Praktikumsgruppe!

(1) Die Reinheit der DNA läßt sich am Quotienten E260/E280 beurteilen. 1,8 spricht für sehr reine DNA, < 1,8 zeigt Proteinverunreinigung an, > 1,8 zeigt RNA-Verunreinigung oder Reste von Ethanol an. Experimentell gilt der Bereich von 1,7 – 1,8 als akzeptabel. 1,66 ist etwas niedrig.*

Protokoll zu Versuch 2 (Spaltung und Nachweis von Plasmid-DNA)

Einleitung – Warum wurde dieser Versuch durchgeführt?

Der Versuch diente der Vertiefung der Kenntnisse von Aufbau und Struktur der DNA, der Organisation der DNA sowie von gentechnologischen Grundbegriffen.

Material und Methoden

In diesem Versuch erhielt man Plasmid-DNA, die mit Hilfe von Restriktionsendonukleasen gespaltet wurden. Mittels der Agarose-Gelelektrophorese wurden die Spaltprodukte aufgetrennt und mit Ethidiumbromid nachgewiesen.

Ethidiumbromid ist aufgrund seiner Interaktion mit der DNA mutagen. Besondere Vorsicht war daher geboten.

Dann wurde anhand der Bandenmuster bestimmt, ob die Enzymlösung EcoRI, BamHI oder beide Endonukleasen enthielt.

Bei einem Plasmid handelt es sich um ein kleines zirkuläres DNA-Molekül, das unabhängig vom Genom vermehrt wird. Es wird vielfach als Vektor für die Klonierung von DNA verwendet.

Restriktionsendonukleasen (Restriktionsenzyme) können DNA-Moleküle an einer Stelle mit einer spezifischen kurzen Basensequenz hydrolytisch spalten.

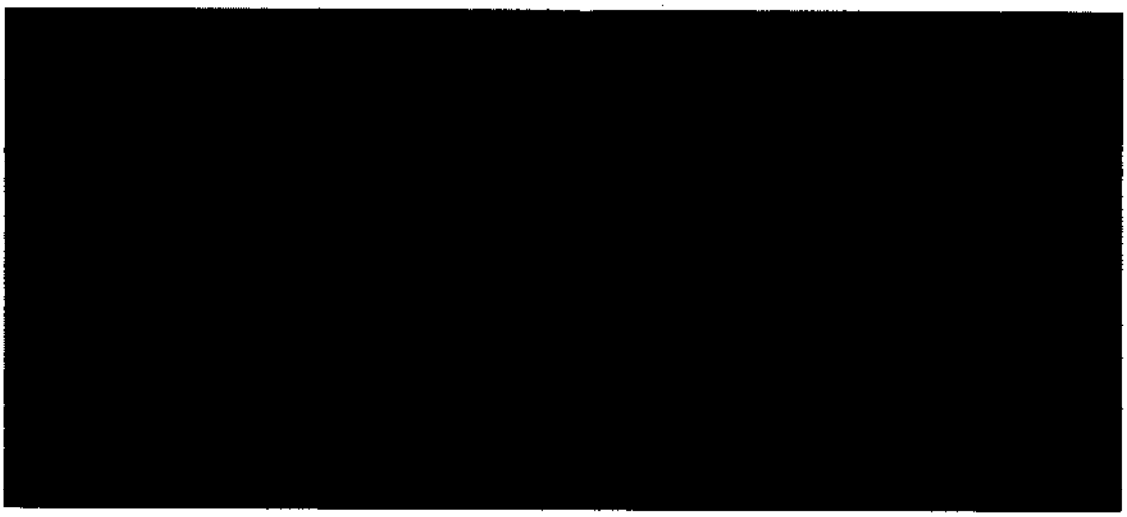
Durchführung

Bei der Versuchsdurchführung wurde nicht von der Anleitung abgewichen (siehe auch Punkte 2 und 4)

Bei der Elektrophorese als Methode zur Trennung unterschiedlich geladener Moleküle sind die Fragmentlänge sowie die elektrische Ladung entscheidend.

In diesem Versuch war die Größe der Fragmente entscheidend. Je kleiner das Fragment war, um so schneller konnte es durch die Gelporen zum Pluspol wandern.

Ergebnisse



Marker
BamHI + EcoRI
EcoRI
BamHI + EcoRI
ungeschnittenes Plasmid
BamHI
Marker
EcoRI
ungeschnittenes Plasmid

Proben-nummer	Restriktions-endonukleasen
1	BamHI + EcoRI
2	BamHI
3	EcoRI

Unser Plasmid (2. und 3. Bande von links) wurde von BamHI + EcoRI (Probennummer 3) gespalten.

Wir haben je drei Banden erhalten mit den ungefähren Fragmentlängen 750 bp, 1300 bp und 2900 bp. Dies waren auch die zu erwartenden Längen.

Diskussion

Da die Ergebnisse im großen und ganzen unseren Erwartungen entsprachen, kann behauptet werden, dass der Versuch erfolgreich war. Die Bandenmuster waren gut zu erkennen und eindeutig zu identifizieren.

Mögliche Fehlerquellen wären hier vor allem Pipettierfehler, da mit sehr kleinen Volumina gearbeitet wird, oder auch die Degradierung der Moleküle, wenn die Lösungen nicht immer auf Eis stehen.

Protokoll zu Versuch 3

Einleitung

Ziel des Versuches ist die Isolierung des Proteins Albumin aus Blutserum. Dazu sollen folgende Techniken angewandt werden: Chromatographie, Proteinbestimmung nach Lowry, Dialyse und SDS – page – Gelelektrophorese. Das Albumin soll durch chromatographische Trennung von den anderen Serumproteinen isoliert werden. Die erfolgreiche Isolierung soll dann durch eine Elektrophorese nachgewiesen werden.
Es sollen Erkenntnisse über Proteinstrukturen, ihre Funktion und Bindungstypen erzielt werden.

Dieser Versuch ist in 4 Schritte eingeteilt:

1. Affinitätschromatographie

Materialien und Methoden

Materialien: Serum, Wasch – Puffer, Elutions – Puffer
Affinitätschromatographie – Säule

Methode : Affinitätschromatographie zur Trennung der Serumproteine
Die Affinitätschromatographie dient zur Isolierung bestimmter Proteine.
Die Affinitätschromatographie-Säule besteht aus einem Gel aus quervernetzter Agarose mit blauem Farbstoff.
Auf der Säule sind protein- spezifische Liganden kovalent gebunden.
Über diese Säule wird das Probenmaterial gegeben, es sickert dann durch die Poren hindurch.
An die Säule anbinden können dann nur die Proteine, die in der Lage sind mit den Liganden eine Bindung einzugehen. Die restlichen im Serum enthaltenen Proteine werden mit dem Wasch – Puffer rausgewaschen.
Das an die Säule angebundene Albumin wird mit dem Elutions – Puffer von der Säule abgelöst und kann in entsprechende Gefäße aufgefangen werden.

Durchführung

Nachdem der Wasch – Puffer bis zum Gelrand abgelassen wurde, konnten 400 µl der Serumprobe auf die Säule aufgetragen werden. Die mit dem Wasch – Puffer rausgewaschen nicht gebundenen Serumproteine werden in 5 Eppendorfgefäße mit jeweils 6 Tropfen aufgefangen (S1 – S5). Danach wird Elutions – Puffer aufgetragen, die Albuminfraktionen von der Säule abgelöst und auch in 5 Eppendorfgefäße mit jeweils 6 Tropfen aufgefangen (A1 – A5). Alle gewonnenen Fraktionen werden sofort auf Eis gestellt, damit die Proteine nicht degenerieren. Zur Regeneration der Säule wird das Reservoir wieder mit Wasch – Puffer aufgefüllt.

2. Proteinbestimmung nach Lowry

Materialien und Methoden

Materialien: Lösung A (0,1 mol/l NaOH, 2% Na_2CO_3) ,
Lösung B (34 mmol/l Tri-NaCitrat, 20 mmol/l $CuSO_4$) ,
Folin- Phenol- Reagenz
Bovines – Serum – Albumin (BSA) (2 mg/ml)

Methode: Proteinbestimmung nach Lowry
Dabei entsteht ein bläulicher Komplex zwischen Peptidbindungen und Kupfer(II)-Ionen in alkalischer Lösung.
Durch die Reduktion von Heteropolysäuren entsteht dann ein blauer Farbstoff.

Durchführung

Zusammenmischen von 100 ml Lösung A und 2 ml Lösung B ergibt Lösung C.
Es werden nun 12 Reagenzgläser gefüllt:
Leerwert (50 µl dest. Wasser, 4950 µl Lösung C)
S1 – S5, A1 – A5, BSA (50 µl der jeweiligen Protein- Lösung, 4950 µl Lösung C)

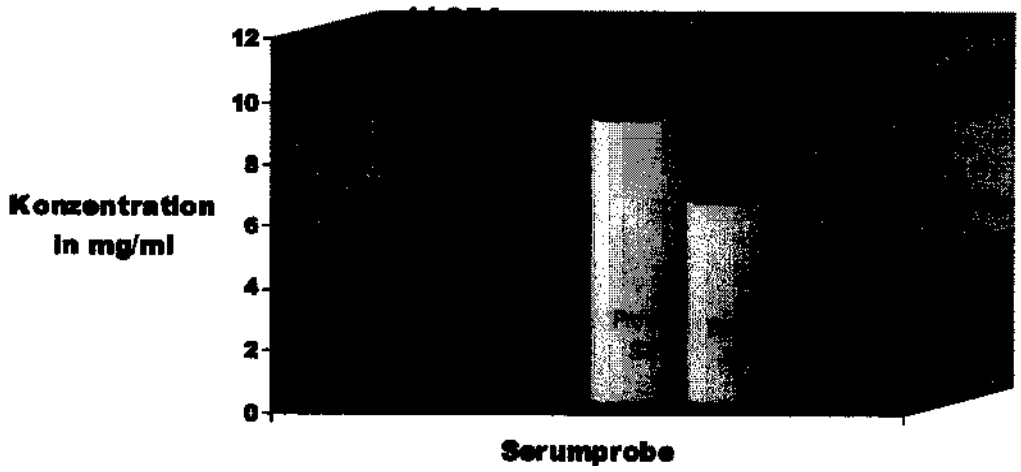
Nach 5- minütigen Stehen werden jeweils 0,5 ml Folin- Phenol- Reagenz, danach kommen die Lösungen 30 min bei 50°C in den Brutschrank.
Anschließend erfolgt die Messung der Extinktion aller Lösungen im Photometer bei einer Wellenlänge von 578 nm.
Die Messergebnisse werden in der folgenden Tabelle aufgeführt:

Proteinlösung	Leerwert	S1	S2	S3	S4	S5	A1	A2	A3	A4	A5	BSA
Extinktionswert	0,066	1,650	1,600	1,350	0,980	0,535	0,469	0,459	0,383	0,365	0,320	0,345
Extinktion minus Leerwert	0	1,584	1,534	1,284	0,914	0,469	0,403	0,393	0,317	0,299	0,254	0,279

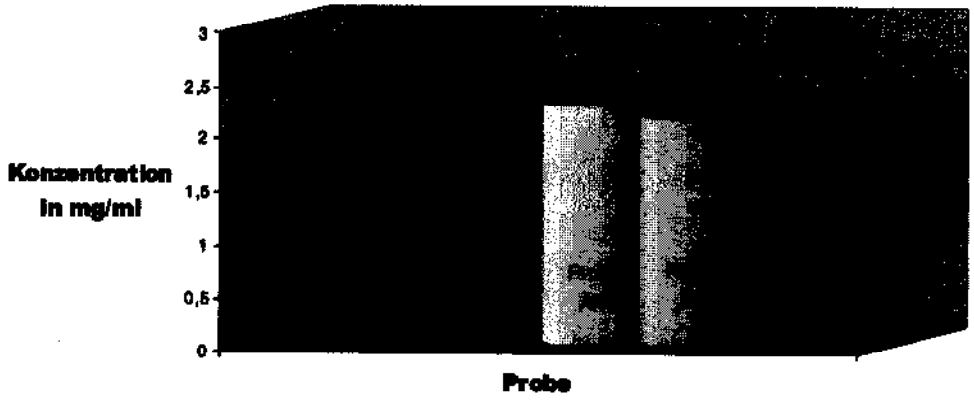
Um die Werte besser ablesen zu können, haben wir die Proben S1 – S4 1:10 mit dest. Wasser verdünnt.

Dann haben wir die einzelnen Proteinkonzentrationen berechnet. Die Berechnung erfolgte dabei unter Berücksichtigung der Konzentrationsangabe des Standards (BSA) mit 2 mg/ml.

Konzentration der nicht gebundenen Serumproteine



Konzentration der herausgelösten Albuminfraktionen



Für die elektrophoretische Trennung werden jeweils die 3 höchstkonzentrierten Fraktionen in ein Eppendorf gegeben. Aus dem Diagramm ist abzulesen, dass dies zu einem die Albuminproben A1 – A3 und zum anderen die Serumproben S1 – S3 sind. Wenn man jeweils den Mittelwert der zusammengemischten Fraktionen berechnet, ergibt sich für die Serumprobe eine durchschnittliche Konzentration von 10,518 mg/ml und für die Albuminprobe von 2,659 mg/ml.

3. Dialyse der Albuminfraktionen

Materialien und Methoden

Materialien: die 3 höchstkonzentrierten Albuminfraktionen (A1 – A3)
Dialyseschlauch, Dialysepuffer (dest. Wasser), Silbernitratlösung

Methode: Dialyse
Die Dialyse ermöglicht den Austausch von niedermolekularen Komponenten aus einer Lösung. In unserem Versuch muss das NaCl aus den Albuminproben entfernt werden. Sonst wäre die Albuminprobe negativer geladen als sie ist, und das würde zu verfälschten elektrophoretischen Ergebnissen führen. (2)
Die Dialyse funktioniert nach den Prinzip des Konzentrationsaustausches vom Ort der höheren Konzentration zum Ort der niederen Konzentration.

Durchführung

In unserem Fall befinden sich im Dialyseschlauch die 3 höchstkonzentrierten Albuminfraktionen (A1 – A3), vermischt mit NaCl, das sich nach der Affinitätschromatographie in den Albuminproben befindet. Der Schlauch wird in ein mit dest. Wasser gefülltes Gefäß gelegt und aus einen Magnet - Rührer gestellt. Die Na – und Cl – Ionen diffundieren durch die Poren aus dem Schlauch (Ort der höheren Salzkonzentration) in das umgebende dest. Wasser (Ort der niederen Salzkonzentration). Wasser - Ionen diffundieren aus dem Puffer (Ort der höheren H_2O – Konzentration) in den Dialyseschlauch (Ort der niederen H_2O – Konzentration) hinein.
Um den Vorgang zu beschleunigen wird der Dialysepuffer mehrmals gewechselt. Wenn man in eine vom benutzten Puffer genommene Probe Silbernitrat – Lösung gibt, kann man prüfen ob noch NaCl austritt (bei weißen Niederschlag).
Wenn kein NaCl – Austritt mehr nachgewiesen werden kann, ist die Albuminprobe gereinigt und kann für die folgende Elektrophorese vorbereitet werden.

(2) Typische Ausschlußvolumen für Dialyseschläuche sind 10 kDa oder 30 kDa, d.h. alle Moleküle, die kleiner sind, können durch den Schlauch hindurch diffundieren und unterliegen dem Konzentrationsaustausch.

4. Elektrophoretische Trennung der Serumproteine

Materialien und Methoden

Materialien: Serum (das wir am Anfang des Versuchs bekommen haben)
die 3 höchstkonzentrierten nichtgebundenen Serumfraktionen (S1 – S3)
die 3 höchstkonzentrierten, dialysierten Albuminfraktionen (A1 – A3)

alle Substanzen für die Gele (genau nach Skript)

die Gel – Elektrophorese – Apparatur, sowie Marker, Coomassie-Färbelösung und Entfärbelösung (auch genau nach Skript)

Methode: SDS – Gel – Elektrophorese
Dabei werden die Proteine nach der Größe und Ladung der Moleküle getrennt.

Durchführung

Die Substanzen für das Trenn - Gel und das Sammel - Gel wurden nach Anleitung der Assistentin zusammenpipettiert. Das Trenn - Gel wird zwischen die Glasplatten gegossen und mit Wasser überschichtet. Nachdem das Gel polymerisiert ist, wird das Wasser abgegossen und das Sammel - Gel aufgetragen. Dann wird der Kamm rein gesteckt und gewartet bis das Gel polymerisiert ist.
Die Apparatur wurde nach Anleitung aufgebaut.
Vor dem Auftragen müssen die Proben noch vorbereitet werden. Es sollen 40 µg pro Fraktion geladen werden

Ergebnisse des Versuchs

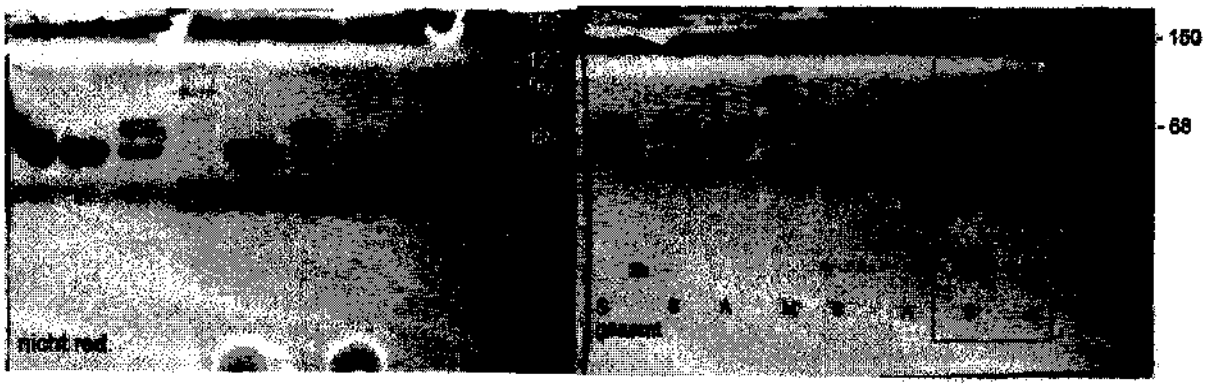
Nun sollen die fertigen Gele beschriftet und interpretiert werden und der Erfolg der Isolierung vom Albumin aus dem Serum nachgewiesen werden :

Auswertung des Elektrophorese – Ergebnisses :

Das linke Gel ist das Ergebnis der Elektrophorese mit nicht reduzierendem Probenpuffer, das rechte Gel das mit reduzierendem Probenpuffer. Reduzierendes Probenpuffer bedeutet, dass ~~große~~ Proteine aufgespaltet werden. / (3) / (3)

Abkürzungen:	S	➔	Serumfraktion
	A	➔	Albuminfraktion
	M	➔	Marker
	BSA	➔	BSA (Albuminkonzentration: 2 mg/ ml)
	S gesamt	➔	gesamte Serumprobe
Zahlen:	1	➔	Albumin
	2	➔	Immunglobulin
	3	➔	Transferrin

Die rot umrahmten S – und A – Banden sind unsere Serum – bzw. Albuminfraktionen.



Durch die Elektrophorese soll die erfolgreiche Isolierung des Albumins aus dem Serum nachgewiesen werden. Betrachtet wird das Gel mit n. red. Probenpuffer :
Die A-Banden-Muster zeigen alle eine Bande (1) bei 68, wie die Bande des BSA-Musters, mit etwa der gleichen Größe, also waren die Proben auch ähnlich hoch konzentriert. Die A-Banden sind größer als die des Gesamtserums, d.h. die Konzentration des Albumins in den A-Proben ist höher als im Gesamtserum. Die Isolierung des Albumins ist also gut gelungen.
Bei den S – Proben zeigen sich bei 150 eine Bande (2) eine bei 68 (1) und zwei knapp darüber. Die 150-iger Bande (2) ist Immunglobulin, sie werden auch Antikörper genannt und ~~markieren~~ körperfremde Verbindungen können an binden
Die Bande, die bei 68 (1) liegt, könnte Albumin sein, weil die Säule nicht soviel Albumin binden konnte wie aufgetragen wurde, und es dann zusammen mit den anderen nicht gebundenen Serumproteinen rausgewaschen wurde. Oder es könnte ein Serumprotein sein, welches zufällig die gleiche Größe wie Albumin hat.
Die Bande darüber (3) ist Transferrin, ein Glycoprotein. Es kann 2 Atome dreiwertigen Eisens (Fe^{3+}) binden und transportiert Eisen im Blut.
Was die Bande darüber ist, wissen wir nicht.
Das Gel mit red. Probenpuffer zeigt ähnliche Muster. Die A-Proben zeigen die Bande bei 68 (1), das ist das Albumin, auch hier der Nachweis, dass die Isolierung erfolgreich war. Nur die Muster der S-Proben sehen anders aus. Sie haben eine Bande bei 68 (1), Albumin oder ein Protein gleicher Größe. Darunter liegt eine breit Bande (2a) und noch weiter unten eine weitere (2b). Das ist Immunglobulin, allerdings wurde es durch das reduzierende Probenpuffer in „schwere Ketten" (2a) (langkettige Moleküle) und „leichte Ketten" (2b) (kurzkettige Moleküle) aufgespaltet.

(3), sofern das Molekül aus mehreren Untereinheiten besteht.

Diskussion

Wie man anhand der Ergebnisse der elektrophoretischen Trennung sehen kann, ist der Versuch sehr gut gelungen und das Ziel, das Albumin aus dem Serum zu isolieren, erreicht.
Das schließt darauf, dass die einzelnen Schritte gewissenhaft und genau durchgeführt wurden.
Allerdings hatten wir keine Vergleichsmöglichkeit (z.B. ein fertiges Gel o.ä.), aber dennoch ist das Ergebnis sehr deutlich.
Da es ein Versuch war, der aus mehreren Schritten besteht, gibt es sicher einige mögliche Fehlerquellen, z.B. Messfehler, Pipettierfehler
Es mussten verschiedene Lösungen zusammen gemischt werden oder Konzentrationen und benötigte Probenvolumenmengen berechnet werden, auch dabei können Fehler austreten, wie z.B. Rechenfehler.
Je länger und aufwendiger ein Versuch wird, desto höher ist wahrscheinlich auch die Fehlerquote.