

Praktikumsskript

1. Allgemeine Regeln bei Arbeiten im S1-Genlabor

Das Labor ist nur mit Schutzbrille und Labormantel zu betreten!

Im Labor darf weder gegessen noch getrunken werden. Bevor Sie außerhalb etwas essen, waschen Sie sich die Hände!

2. Arbeitsschritte

2.1 wichtige Puffer und Lösungen

Puffer/Lösung	Inhalt	Verwendung
Puffer A(pH 7,5)	20 mmol/l Natriumphosphat 200 mmol/l Natriumchlorid, 20 mmol/l Imidazol	Bakterienaufschluss, Äquilibrierung der Säule, Waschen der Säule
Puffer B(pH 7,5)	20 mmol/l Natriumphosphat 200 mmol/l Natriumchlorid, 500 mmol/l Imidazol	Vorbereitung der Säule, Elution des Proteins, Verdünnung der Gelelektrophoreseproben
Ladepuffer (2x)(pH 6,8)	125 mmol/l Tris-HCl 2 % SDS 10 % Glycerin 0,01 % Bromphenolblau 10 % Thioglycerin	Gelelektrophorese
Laufpuffer	25 mmol/l Tris-HCl 192 mmol/l Glycin 0,1 % SDS	Gelelektrophorese
Lysozymlösung(100x)	10 mg/ml Lysozym, in Puffer A	Bakterienaufschluss

2.2 Aufschluss der Bakterienpellets

Das Bakterienpellet wird bei Raumtemperatur aufgetaut und vorsichtig in einem Gesamtvolumen von 40 ml Puffer A resuspendiert (aufgeschlämmt, gelöst). Zum Abdauen der Zellwände wird Lysozym verwendet. Es werden 400µl Lysozymlösung zu der Zellsuspension gegeben. Die Lösungen werden im geschlossenen Zentrifugiergefäß durch leichtes Ansnipsen oder sanftes Schwenken vermischen. Die Zellsuspension mit Lysozym wird 30 min auf Eis auf dem Taumelschüttler inkubiert.

Danach werden die Zellen mit Ultraschall aufgebrochen. Dazu werden die zwei Proben in einem Zentrifugenbecher vereinigt und in einem Eis-Wasser-Bad in die Ultraschallkammer gestellt. Dann wird die Suspension sechs mal mit der Geräteeinstellung 53% Leistung, Duty Cycle 5, 10 sec sonifiziert. Zwischen den Ultraschallzyklen wird jeweils 1 min auf Eis pausiert, um eine Überhitzung der Suspension zu vermeiden.

In der Zwischenzeit beschriftet jede Gruppe folgende Gefäße mit der Gruppennummer, dem Datum und dem jeweiligen Probennamen. Der Probenname soll jeweils auf der Seite und auf dem Deckel des Gefäßes vermerkt werden.

Gefäßart und Anzahl	Beschriftung(en)	Bedeutung
zwei 50ml Zentrifugiergefäße	UF bzw. LF	unfiltrierte Fraktion; Ladefraktion
ein 50ml Zentrifugiergefäße	SA	Säulenabfall
ein 50ml Zentrifugiergefäße	FT	Flowthrough
ein Eppendorfgefäß	LF	Ladefraktion
ein Eppendorfgefäß	FT	Flowthrough
ein Eppendorfgefäß	W2	Waschfraktion 2
zehn Eppendorfgefäße	E1-E10	Elutionsfraktionen

2.3 Aufreinigung über Schwerkraftsäulen

2.3.1 Befüllen und Vorbereitung der Säule

Jede Gruppe erhält ein Säulengefäß. Dieses Säulengefäß wird mit einer Klemme an einem Stativ befestigt und so ausgerichtet, dass es senkrecht steht.

Das Säulenmaterial liegt in einer 50%igen Suspension in einem Lagerungspuffer vor. Pipettieren sie unter Anleitung eines Betreuers 4ml Suspension in das unten verschlossene Säulengefäß. **ACHTUNG:** Druckpunkte vor dem Arbeitsschritt durch einen Betreuer erklären lassen.

Stellen sie den Säulenabfall in einem Ständer unter der Säule auf (untere Öffnung der Säule soll im das Abfallgefäß ragen).

Nehmen sie die untere Verschlusskappe ab und lassen sie den Lagerungspuffer aus der Säule fließen. Zur vollständigen Entfernung des Lagerungspuffers muss die Säule 3mal mit 5ml doppelt destilliertem Wasser (ddH₂O) gespült werden. Dazu werden jeweils 5ml vorsichtig auf die Säule pipettiert und diese vollständig ablaufen gelassen.

Dann wird in entsprechender Weise die Säule 3mal mit 2ml Puffer B gespült. Im Anschluss folgt die Äquilibration der Säule mit Puffer A. Dazu werden 4mal 5ml Puffer A auf die Säule pipettiert.

2.3.2 Vorbereitung der Probe

Das Zellysate wird bei 6000g für 20min bei 4°C zentrifugiert, um Zelltrümmer etc. abzutrennen. Dazu wird das Zellysate in die fünf mit UF beschrifteten 50ml Zentrifugiergefäße aufgeteilt. Ein sechstes Gefäß wird mit Wasser so gefüllt (gleiches Gewicht wie die Proben) und dient als Gegengewicht.

Nach der Zentrifugation wird der Überstand über eine Spritze mit einem Spritzenvorfilter in das mit LF beschriftete 50ml Zentrifugiergefäß filtriert.

Aus diesem Gefäß werden 30µl Probe in das Eppendorfgefäß mit der Beschriftung LF überführt. Der Rest wird nun auf die Säule geladen.

2.3.3 Ablauf der Aufreinigung

Laden

Erster Schritt der Aufreinigung. Unter die Säule mit das Zentrifugiergefäß mit der Aufschrift FT gestellt. Das aufgeschlossene und filtrierte Bakterienmaterial wird auf die Säule geladen (vorsichtig auf mehrere Male verteilt schütten). Das äquilibrierte Säulenmaterial bindet das rekombinante Protein = Laden. Material welches nicht gebunden hat, wird als Durchfluss oder Flow-Through (FT) bezeichnet. Aus dem Flowthrough werden 30µl in das entsprechend beschriftete Eppendorfgefäß umpipettiert.

Waschen

Der Waschschrift dient dazu, nicht oder unspezifisch an das Säulenmaterial gebundene Proteine und Verunreinigungen auszuwaschen. Der erste Waschschrift wird im Säulenabfall aufgefangen, der zweite Waschschrift soll im entsprechend beschrifteten Eppi aufgefangen werden, die restlichen wiederum im Säulenabfall. Pipettieren sie dazu 4mal jeweils 2ml Waschpuffer = Puffer A auf die Säule.

Elution

Im Elutionsschritt werden die spezifisch gebundenen Proteine (z.B. EGFP) vom Säulenmaterial gelöst und ausgeschwemmt. Die Elution erfolgt mit Puffer B, indem sie 10mal jeweils 1ml auf die Säule pipettieren und den Durchfluss im entsprechenden Eppendorfgefäß sammeln.

2.3.4 Fluoreszenzkontrolle der Elutionsfraktionen

Da EGFP unter UV-Anregung intensiver fluoresziert, sollen alle Elutionsfraktionen unter einer UV-Lampe verglichen werden. So können die Fraktionen mit der höchsten EGFP-Konzentration ermittelt werden. Alle zehn Elutionsfraktionen werden unter Aufsicht eines Betreuers unter eine UV-Lampe gelegt und fotografiert. Die intensivste Fraktion (E ?) jeder Gruppe soll dann gelektrophoretisch untersucht werden.

2.4 SDS-PAGE (Gelelektrophorese)

2.4.1 Vorbereitung der Proben

Auf SDS-Polyacrylamid-Gelen sollen die gesammelten Proben aus der Affinitätsaufreinigungen der fünf Gruppen (LF, FT, W2, E?) aufgetragen werden. Jedes Gel hat 10 Spuren, wovon 2 mit Markern beladen werden müssen. Pro Gel bleiben 8 Spuren, welche mit Proben beladen werden können.

Zu den Proben LF und FT in den Eppendorfgläsern werden jeweils noch 30 µl Puffer A zupipettiert, um diese etwas zu verdünnen. Von der Waschfraktion W2 und der ausgewählten Elutionsfraktion werden jeweils 60 µl in ein neues, vorher entsprechend beschriftetes Eppendorfglas umpipettiert. Alle 4 Fraktionen, die auf das Gel geladen werden sollen werden mit je 60 µl Ladepuffer versetzt. Die Eppendorfgläser werden mit einem Zusatzdeckel (Betreuer) verschlossen und die Proben dann im Eppendorfschüttler 5min bei 95°C denaturiert. Danach wird das Probenmaterial abkühlen gelassen.

Nach dem Abkühlen der Proben können diese auf das Gel geladen werden.

2.4.2 Beladen und Lauf der Gele

Die Gelkammern werden mit Laufpuffer befüllt und es werden die Kämme gezogen.

Das Ladevolumen pro Tasche beträgt 30 µl. Von den Markern werden 2,5 µl auf das Gel geladen, von ihren Proben jeweils 25 – 30 µl. Das Laden der Proben wird unter Aufsicht und Anleitung eines Betreuers durchgeführt.

Der Gellauf erfolgt unter Kühlung auf 10°C. Die angelegte Spannung beträgt pro Gel 30 mA. Der Lauf ist beendet, wenn die Lauffront (blau) fast aus den Glasplatten läuft.

Dann werden die Gelkassetten unter Anleitung eines Betreuers ausgebaut und die Gele über Nacht gefärbt.

2.5 Inaktivierung von EGFP durch Änderung des pH-Werts

Die Abhängigkeit der Funktionsfähigkeit des EGFPs vom pH-Wert soll analysiert werden. Es werden fünf Eppendorfgeläße vorbereitet und nach folgendem Schema beschriftet:

Gr1 / EGFP A

Gr2 / EGFP B

Gr3 / EGFP C

Gr4/ EGFP D

Gr5/ EGFP E

Jede Gruppe befüllt ihr Gefäß mit 20 µl eines Mixes der drei stärksten Fraktionen E₁ - E₃ der aus der Säule gewonnen Proben E. Entsprechend der unten stehenden Tabelle gibt jede Gruppe 20 µl der entsprechenden Lösung zu und beobachtet die Reaktion im Gefäß. Beobachtungen sollen in der Tabelle notiert und gesammelt werden.

Gruppe	Zugegebene Lösung	Beobachtung
Gruppe 1	Wasser	
Gruppe 2	Verd. HCl	
Gruppe 3	Konz. HCl	
Gruppe 4	Verd. Natriumhydroxidlösung	
Gruppe 5	Konz. Natriumhydroxidlösung	

DUE – biochemische Anwendung

Feedbackbogen

Kurzumfrage – Feedbackbogen

Bitte füllen Sie den kurzen anonymen Meinungsbogen aus. Kreuzen Sie dazu einfach auf der gepunkteten Linie an, was ihrer persönlichen Meinung nach zutrifft.

Die Vorbereitung im Unterricht auf das Praktikum:

kam zu kurz war angemessen

Der während der Unterrichtseinheit und des Praktikums behandelte Stoff war:

zu schwierig angemessen

Ich konnte die inhaltlichen Grundlagen des Praktikums an Hand der Unterrichtseinheit:

verstehen nicht nachvollziehen

Ich fand das Praktikum

zu anspruchsvoll zu leicht

Das Praktikum war:

abwechslungsreich langweilig

Platz für: Kritik, Anregung,...
