
ANALYSE EINES REPORTERVEKTORS („pGL3-Basic“)

Spaltung durch Restriktionsendonucleasen, Gelelektrophorese

Grundlagen

Plasmid, Klonierung, DNA-Konstrukt

Herstellung der **DNA-Konstrukte** wird in der Molekularbiologie häufig angewandt. Eine der wichtigsten Anwendungen ist die Durchführung der Synthese von bestimmten Proteinen in Bakterien oder Eukaryonten: Insulin war das erste Medikament das mit Hilfe von molekularbiologischen Methoden hergestellt wurde. Eine andere Möglichkeit ist die Verwendung von dem sog. Reporterkonstrukt, womit der Promotor eines Gens untersucht werden kann. DNA-Konstrukte bestehen aus zwei Hauptteilen: als **Vektor** kann beispielsweise ein Plasmid angewandt werden, das **Insert** (ein „fremder“ DNA-Abschnitt) wird in das Vektor durch Klonierung eingebaut.

Die Biosynthese von gegebenen Proteinen kann mit Hilfe von einem **Expressionskonstrukt** durchgeführt werden. In diesem Fall die kodierende Sequenz (CDS / ORF: offener Leseraster) eines Proteins stellt das Insert dar. Es wird zwischen einem starken Promotor und einem „poly-A Signal“ eingebaut, wodurch eine funktionierende Einheit entsteht, die die Synthese des gegebenen Proteins in Bakterien ermöglicht.

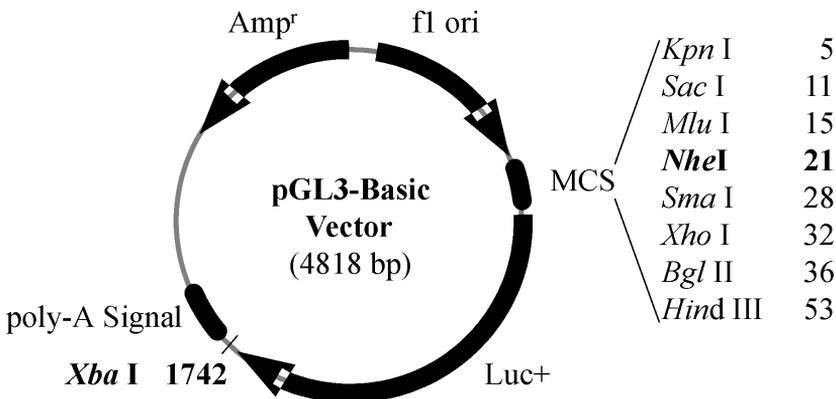


Abb. 1. Aufbau des pGL3-Basic Vektors. *Amp^r*: Gen der β -Laktamase für Ampicillin Resistenz, um Bakterienzellen, die den DANN-Konstrukt enthalten zu selektieren; *f1 ori*: Bereich für Replikation, *MCS*: Klonierungsstelle mit Erkennungsstellen der Restriktionsendonucleasen (multiple cloning site); *Luc+*: kodierende Sequenz der Luciferase, Zahlenwerten: Spaltungsstellen der Restriktionsendonucleasen; fettgedruckt: die 2 Enzyme, die in diesem Versuch angewandt werden.

Die **Reporterkonstrukte** sind in Promotoranalyse anwendbar. Das Insert ist in diesem Fall regelmäßig eine Promotor-Sequenz, die in das Vektor vor ein sog. Reportergen eingebaut wird. Das Produkt des Reportergens ist ein Enzym, dessen Aktivität bzw. Menge genau und einfach zu bestimmen ist. Häufig wird zu diesem Zweck das Gen des Enzyms **Luciferase** angewandt. Während der enzymkatalysierten Oxidation von Luciferin (Substrat) Licht wird emittiert. Die Intensität des Lichtes ist proportional zur Stärke des Promotors. Der **pGL3-Basic Vektor** (Abb. 1), der in diesem Versuch analysiert wird, ist ein Reportervektor mit dem Gen der Luciferase.

Restriktionsendonucleasen

Restriktionsendonucleasen sind Enzyme, die die beiden DNA-Stränge bei einer gegebenen Sequenz spalten. In der Molekularbiologie die Typ 2 Enzyme werden am häufigsten angewandt, die eine palindromische Sequenz erkennen und innerhalb dieses Bereiches spalten. Abhängig davon, wo die Spaltung stattfindet, entstehen stumpfe oder klebrige Enden (Abb. 2). Klebrige Enden sind leichter ligierbar.

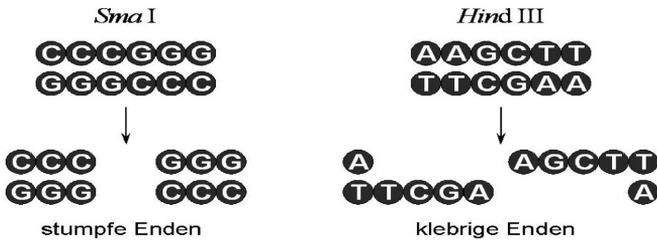


Abb. 2. Spaltung durch zwei Restriktionsendonucleasen durchgeführt. *Sma* I bildet stumpfe Enden, dagegen *Hind* III bringt klebrige Enden zustande.

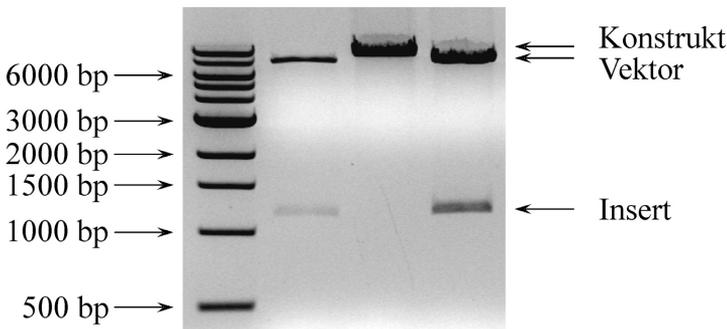


Abb. 3. Gelelektrophorese von DNA-Konstrukten. M: DNA-Leiter; 1 und 3: Ein Konstrukt wurde durch zwei Enzyme gespalten, das Insert ist aus dem Vektor ausgeschnitten. Im Falle von Probe 3 wurde eine vierfach größere Menge aufgebracht. 2: Das Konstrukt wurde nur mit einem Enzym behandelt, wodurch die kreisförmige DNA gerade wird.

Gelelektrophorese

Die Gelelektrophorese ist eine Methode, womit man auch DNA-Abschnitte (im Allgemeinen elektrisch geladene Teilchen) voneinander trennen kann. DNA wird häufig mit Hilfe horizontaler Agarose-Gelelektrophorese untersucht. Da DNA ein ungefähr identisches Ladung–Massenverhältnis unabhängig von der Länge der Kette besitzt, die Abschnitte werden hauptsächlich nach Größe getrennt. *Abb. 3* stellt das Ergebnis der Gelelektrophorese von DNA-Konstrukten dar.

Ausführung

Bei dem Versuch der pGL3-Basic Vektor wird zweierlei gespalten. (1) Der Vektor wird durch *Xba* I Endonuclease gespalten (Produkt: eine lineare **4818 bp** DNA-Kette). (2) Eine Doppelspaltung wird mit Hilfe von *Xba* I und *Nhe* I Enzymen durchgeführt, wodurch die kodierende Sequenz der Luciferase aus dem Vektor ausgeschnitten wird (Produkte: **1721 bp** und **3097 bp** Fragmente). (Die zwei Enzyme lassen sich in ein und demselben Reaktionsgemisch anwenden, nämlich die maximale Aktivität der beiden Enzyme erfolgt bei der gleichen Temperatur, Ionenstärke und dem pH-Wert.)

Linearisierung: **1 µl 10 U/µl *Xba* I Enzym** wird dem **19 µl Reaktionsgemisch** zugegeben. Das Reaktionsgemisch enthält den Reaktionspuffer und den pGL3-Basic Vektor.

Doppelspaltung: **1 µl 10 U/µl *Xba* I Enzym** und **1 µl 10 U/µl *Nhe* I Enzym** werden zu **18 µl Reaktionsgemisch** gegeben. Das Reaktionsgemisch enthält eine Pufferlösung und den pGL3-Basic Vektor.

Beide Proben werden für **60 Minuten** in Wasserbad (oder Thermoblock) mit **37 °C** gestellt.

Nach der Spaltung werden die Fragmente mit Hilfe horizontaler **Agarose-Gelelektrophorese** getrennt. Die Agarosegele (1%) sind schon vorbereitet. Das Gel enthält den GR Safe interkalierenden Farbstoff, welcher sich wie die anderen interkalierenden Verbindungen mit planarer Struktur zwischen G-C-Paare doppelsträngiger DNA schiebt. Im UV-Licht der Farbstoff emittiert sichtbares Licht, wodurch die Lage der einzelnen DNA-Abschnitte nachweisbar ist. **Interkalierende Verbindungen sind mutagen, man darf das Gel ausschließlich mit Handschuh berühren.**

Electrophorese

Das Gel liegt in dem Tank in einer Pufferlösung.

Vorbereitung: Entlang der Startlinie sind Höhlungen (sog. Taschen) im Gel gebildet. Geben wir in die erste Tasche **6 µL** Lösung, in der 14 DNA-Fragmente unterschiedlicher aber bekannter Länge (250, 500, 750, 1000, 1500, 2000, 2500, 3000, 3500, 4000, 5000, 6000, 8000, 10000 bp) enthalten sind. Das nach der Trennung im UV-Licht entstandene Bild sieht einer Leiter ähnlich (*Abb. 3* „M“). Mit Hilfe dieser DNA-Leiter kann die Länge der untersuchten DNA-Sequenz(en) ziemlich genau bestimmt werden.

Ergänzen wir die beiden, mit Restriktionsendonucleasen behandelten Proben (je 20 µL) mit **4 µL** Pufferlösung hoher Dichte, in der auch zwei Farbstoffe enthalten sind (60%

Glycerin pH=7,6; 0,03 % Bromphenolblau und 0,03 % Xylene-cyanol). Die Wanderung der zu trennenden Komponenten ist durch Anwendung der Farbstoffe verfolgbar. Nämlich diese Farbstoffe sind relativ stark negativ geladen und verfügen über verhältnismäßig niedrige Molekülmasse, demzufolge die elektrophoretische Mobilität (Wanderungsgeschwindigkeit) dieser Substanzen ist größer als die der DNA-Abschnitte. Die Lage der Farbe ist während der Elektrophorese kontinuierlich sichtbar. (DNA wird nicht gefärbt.) Das gesamte Volumen (**24 µL**) der ersten Probe kommt in die zweite und ebenso das gesamte Volumen der zweiten Probe in die dritte Tasche.

Die letzte Probe enthält den ursprünglichen, intakten Vektor: **2 µL pGL3-Basic Vektor + 14 µL H₂O + 4 µL Pufferlösung** (Glycerin + Farbstoffe). Die Lösung (20 µl) kommt in die vierte Tasche des Gels.

120 V konstante Spannung soll für **45 Minuten** angelegt werden! Es ist wichtig auf die Polarität zu achten (Abb. 4)! DNA besitzt negative Ladung, deshalb die Moleküle bewegen sich zu dem positiven Pol. Nach der Trennung das Gel wird mit **UV-Licht** bestrahlt, um die DNA-Bänder **sichtbar** zu machen. **UV-Licht ist augenschädlich, deshalb die Lichtquelle darf erst dann eingeschaltet werden, nachdem das Gerät mit der Schutzplatte bedeckt wurde.** Abb. 4 stellt eine kurze Zusammenfassung der Ausführung des Versuches dar.

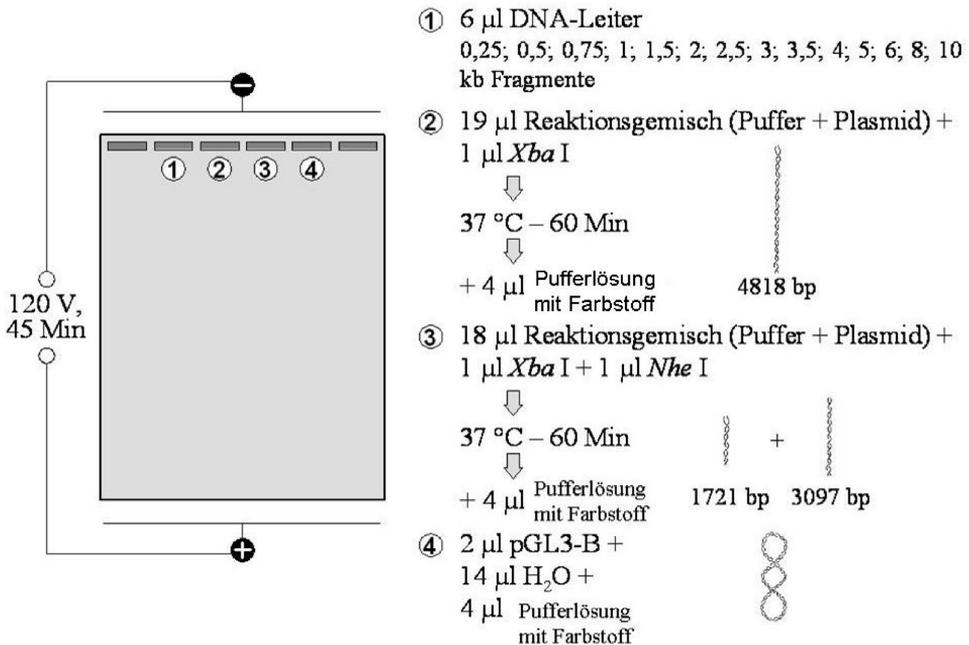


Abb. 4. Zusammenfassung des Versuches