**Praxisprojekt 5 (5. Semester)**

an der

Berufsakademie Sachsen

Staatliche Studienakademie Riesa

Studiengang Labor- und Verfahrenstechnik

Kurs: 14BT-1 Studienrichtung: Biotechnologie

Thema:

**Eingereicht von: Firma:**

Martin Schneider QuoData GmbH

Am Graben 2 Prellerstraße 14

01809 Dohna 01309 Dresden

**Betrieblicher Betreuer:** M. Sc. Martin Jähne

**Eidesstaatliche Erklärung**

Hiermit versichere ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig und ohne fremde Hilfe angefertigt und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet habe. Die eingereichte schriftliche Fassung der Arbeit entspricht der auf dem elektronischen Speichermedium. Weiterhin versichere ich, dass die vorliegende Arbeit noch nicht als Abschlussarbeit an anderer Stelle eingereicht wurde.

Ort, Datum Unterschrift

# **Abkürzungsverzeichnis**

|  |  |
| --- | --- |
| *E. coli* |  |
| IPTG |  |
| DTT |  |
| TAE-Puffer |  |
| LB-Medium |  |
| EtBr |  |
| DNA |  |
| SDS-PAGE |  |
|  |  |

Inhalt

[1 Einleitung 3](#_Toc445387516)

[1.1 Huminstoffe 3](#_Toc445387517)

[2. Zielstellung 4](#_Toc445387518)

[3 Material 5](#_Toc445387519)

[3.1 Chemikalien 5](#_Toc445387520)

[3.2 Puffer, Medien und Lösungen 5](#_Toc445387521)

[3.3 Enzyme und Mikroorganismen 5](#_Toc445387522)

[4. Methoden 6](#_Toc445387523)

[4.1 Extraktion von Huminsäuren aus Bodenproben 6](#_Toc445387524)

[4.2 Enzymatische Degradation 6](#_Toc445387525)

[4.3 Fenton-Reaktion 6](#_Toc445387526)

[4.4 A-YES 7](#_Toc445387527)

[4.5 A-YAS 7](#_Toc445387528)

[5 Ergebnisse 8](#_Toc445387529)

[5.1 Hormonelle Aktivität der Huminsäuren 8](#_Toc445387530)

[5.2 Enzymatische Degradation 12](#_Toc445387531)

[5.3 Fenton-Reaktion 12](#_Toc445387532)

[Literaturverzeichnis 13](#_Toc445387533)

# 1 Einleitung

## 1.1 *Escherichia coli* (*E.coli*)

Das stäbchenförmige Bakterium *Escherichia coli* (*E.coli*) wurde nach seinem Entdecker, dem Arzt Theodor Escherich benannt und zählt zu der Familie der Enterobakterien, wie der Systematik in Tabelle 1 zu entnehmen ist. [BÜLTE; 2014]

Tabelle 1 Systematik *E.Coli*

|  |  |
| --- | --- |
| Domäne | Bacteria |
| Reich | Proteobacteria |
| Klasse | Gamma Proteobacteria |
| Ordnung | Enteriobacteriales |
| Familie | Enterobacteriaceae |
| Gattung | Escherichia |
| Art | coli |

*E.coli* ist Gram-negativ, aerob oder fakultativ anaerob und peritrich begeißelt bzw. von einer Polysaccharid-Kapsel umgeben. Es kommt im Dickdarm und in den Fäkalien nahezu aller Tiere vor und ist ein fakultativ pathogener Organismus, da er Diarrhöen und Koliken hervorrufen kann. Aufgrund dessen findet *E.coli* in der Analytik von Wasserproben als Fäkalindikator Anwendung und wird zur Beurteilung der Wassergüte herangezogen. Weiterhin ist er einer der wichtigsten Wirtsorganismen bei der Klonierung und Expression von Wachstumshormonen, Gensequenzen in der Forschung und von Proteinen wie Insulin. [GÄNZLE; 2010]

Die vorrangige Energiequelle *E.*coli´s ist das Monosaccharid Glukose. Ist dieses vorhanden, wird es unter Energiegewinnung in der Glykolyse abgebaut. Bei einem Mangel an Glukose wird zur Aufrechterhaltung der Lebensfunktionen auf Polymere wie Milchzucker, Stärke und weitere Reservestoffe zurückgegriffen. Das *lacZ*-Gen ist dabei ein Bestandteil des Lactose-Operons von *E.coli* und codiert das Enzym β-Galactosidase. Dieses ist für die Hydrolyse des Disaccharids Lactose zum Monosaccharid Galactose zuständig. Dies wird anschließend in die Glykolyse eingeschleust und dort unter ATP-Verbrauch und dem Wirken von Kinasen, Transferasen, Phosphorylasen und Epimerasen zur Energiegewinnung umgesetzt. In der Molekularbiologie ist dieses Gen von großem Nutzen, da es für das Blau-Weiß-Screening eingesetzt werden kann, welches die Identifikation rekombinanter Plasmide ermöglicht. [DINGERMANN; 1999]

## 1.2 Agarosegel-Elektrophorese

Bei der Agarosegel-Elektrophorese handelt es sich um eine einfache, schnelle und effektive Methode der DNA-Auftrennung nach Größe und Form. Dazu wird pulverförmige Agarose, ein Polysaccharid, das aus Rotalgen gewonnen wird, in Wasser suspendiert und erhitzt. Dabei kommt es zur Verbindung der Zuckermoleküle untereinander, auch crosslinking genannt. Es entsteht eine gelartige Masse, die in eine Elektrophoresekammer überführt, mit Puffer umgeben und mit DNA-Proben beladen wird. Das Gel wird Spannungen von 50 bis 150 V ausgesetzt. Aufgrund der negativen Ladung der DNA wandern die Fragmente unterschiedlicher Größe zur positiv geladenen Anode. Dabei werden größere Moleküle stärker durch die Gelporen retardiert und weisen eine geringere Wanderungsgeschwindigkeit auf. Weiterhin kann in verschiedene Topologien der DNA unterschieden werden. Die lineare DNA muss zunächst durch Restriktionsenzyme erzeugt werden, bewegt sich am langsamsten durch das Agarosegel und erlaubt dabei als einzige eine exakte Bestimmung der Länge. Die ringförmig superhelikale (supercoiled) DNA wandert schneller als die ringförmig relaxierte DNA (nicked), da sie dichter gepackt ist und so besser das Maschenwerk des Gels durchqueren kann (Vgl. Abb.3).

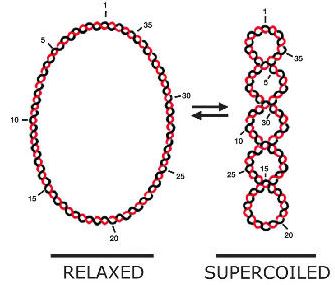


Abbildung 3 DNA-Konformationen [CAMPBELL; 2007]

Weitere Abhängigkeiten ergeben sich durch die angelegte Stromstärke, die Pufferbedingungen und die Agarosekonzentration. So lassen sich große DNA-Fragmente von 1000-15.000 Basenpaaren besser in niedrigen Agarosekonzentrationen von 0,5 % auftrennen, während DNA-Fragmente von 100-2.000 Basenpaaren Konzentrationen von   
1-2 % Agarose benötigen. Dies liegt in dem Entstehen von kleineren Porengrößen bei höheren Agarosekonzentrationen begründet, die eine effizientere Trennung kleinerer DNA-Fragmente ermöglicht. Um eine optische Untersuchung der Banden zu gewährleisten, ist die Zugabe eines Farbstoffes nötig. Für Nukleinsäuren kann dabei Ethidiumbromid (EtBr) verwendet werden. Die Farbstoffmoleküle interkalieren hierbei zwischen die Basen und verändern dabei ihr Absorptionsspektrum. Dies wird unter UV-Licht sichtbar und kann mithilfe eines Standards, der DNA-Leiter, ausgewertet werden. Je intensiver dabei die auftretende Fluoreszenz ist, desto höher ist die vorliegende Konzentration der Probe an dieser Stelle. Aufgrund der Toxizität und mutagenen Eigenschaften von EtBr können alternativ auch Farbstoffe wie Methylenblau, SYBR Green I oder Stains-all verwendet werden, die jedoch einen höheren Anschaffungspreis aufweisen und deren Mutagenität noch nicht hinreichend untersucht wurde. [KNIPPERS; 2001]

## 1.3 SDS-PAGE

## 1.4 Miniprep und Plasmid-Isolation

# 2. Zielstellung

Ziel dieser Arbeit war die in-vivo-Synthese und Isolation von Protein 1 und Protein 2 mittels transformierter *E.coli*-Zellen. Weiterhin sollten die verwendeten Plasmide mittels Miniprep aus den transformierten Zellen von *E.coli* XL1 extrahiert und durch Restriktionsverdau mit anschließender Agarose-Gelelektrophorese identifiziert werden.

Mittels des Expressionsstammes *E.coli* BL21 sollte eine Überexpression der Proteine erfolgen und die Proteine mit einer SDS-PAGE untersucht werden. Abschließend sollten die Proteine isoliert, gereinigt und für die langfristige Lagerung präpariert werden.

Im Zuge dieser Arbeit sollten zudem die nötigen Methoden erarbeitet, etabliert und soweit möglich optimiert werden.

# 3 Material

## 3.1 Chemikalien

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| Chemikalie | Spezifikation | Hersteller |
| Huminsäure Natriumsalz | 45 - 70 % | Acros |
| Dupla Cur |  | Dupla |
| p-Nitrophenylphosphat |  | Sigma |
| Kaliumiodid | >99 % | Roth |
| Eisensulfat | 99 % | Acros |
| Natriumacetat | >99 % | Fluka |
| L-Weinsäure |  | Merck |
| Mangansulfat | >99 % | Roth |
| Wasserstoffperoxid | 30 % | Roth |
| Essigsäure | 10 % | Roth |
| Kaliumpermanganat | 1 % | Apomix |

Das Huminsäure Natriumsalz wurde mit der Konzentration 1 g/l in Wasser gelöst und für alle Versuche verwendet. Da die Konzentration der Huminsäure in dem Dupla Cur unbekannt war, wurde für die Versuche von einer HS-Konzentration von 1 g/l ausgegangen.

## 3.2 Puffer, Medien und Lösungen

|  |  |
| --- | --- |
| Lösung | Zusammensetzung |
| Hefeminimalmedium (flüssig)  *(HMM)* | 250 ml 20 % C-Quelle (steril)  2,5 ml 1 % FeCl3 (steril)  2,5 ml Komponente II (steril)  2,5 ml 1 g/ml Ca(NO3)2 (steril)  0,5 ml Vitaminmix-Stammlösung (steril)  241,5 ml 10x Salze (steril) |
| Substratpuffer | 0,5 M Citratpuffer |
| Substratlösung | 1 mg/ml p-Nitrophenylphosphat in Substratpuffer |
| Fenton-Reagenz | 0,1 mM FeSO4  2 M H2O2 |

## 3.3 Enzyme und Mikroorganismen

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| Enzym | Spezifikation | Hersteller |
| Manganperoxidase | ≥ 20 U/g | Sigma |
| Katalase | 2000 – 5000 U/mg | Sigma |

Für die Versuche wurden die genmanipulierte Klone *Arxula adeninivorans* G1212/YIEC-69-TEF-AR-PHO5-GAA2HRE107-phyK-PHO5 für den A-YAS und *Arxula adeninivorans* G1214 YRC103-hERα-phyK für den A-YES verwendet.

## 3.4 Geräte

|  |  |
| --- | --- |
| Gerätetyp | Bezeichnung |
| Inkubator | Infors |
| Kühlzentrifuge |  |
| Vortexer |  |

# 4. Methoden

## 4.1 Chemisch kompetente Zellen

Als Vorkultur wurden 5 ml LB-Medium mit einigen Zellen von einer TSA-Agarplatte inokuliert und über Nacht bei 37 °C und 180 rpm inkubiert. Anschließend wurde 1 ml der Vorkultur in 100 ml LB-Medium überführt und weitere 3 h bei 37 °C und 170 rpm inkubiert, bis eine OD620 von 0,35 bis 0,4 erreicht wurde. Anschließend wurde die Kultur etwa 30 Minuten lang bei 4 °C gekühlt.

Die Kultur wurde in vier Zentrifugenröhrchen aliquotiert und mit 3000 g bei 4 °C für 15 min zentrifugiert. Der Überstand wurde dekantiert und die Pellets in jeweils 10 ml eigekühltem 100 mM MgCl2 resuspendiert. Die Suspensionen wurden in einem Röhrchen vereint und mit 2000 g bei 4 °C 15 Minuten lang zentrifugiert. Der Überstand wurde dekantiert und das Pellet in 20 ml eisgekühltem 100 mM CaCl2 resuspendiert. Die Suspension wurde 20 Minuten lang bei 4 °C gekühlt.

Anschließend wurde die Suspension mit 2000 g bei 4 °C 15 Minuten lang zentrifugiert, der Überstand verworfen und das Pellet in 5 ml 85 mM CaCl2, 15 % Glycerin resuspendiert. Die Zellen wurden mit 1000  bei 4 °C 15 Minuten lang abzentrifugiert und anschließend in 200 µl 85 mM CaCl2, 15 % Glycerin resuspendiert. Die Suspension wurde in 2 ml Eppendorf-Reaktionsgefäße zu je 50 µl aliquotiert und bei -80 °C tiefgefroren.

## 4.2 Transformation

Für die Transformation wurden kompetente Zellen aus der Lagerung bei -80 °C verwendet. Es wurden Aliquote mit jeweils 50 µl Zellsuspension bei 4 °C aufgetaut und jeweils 1 µl des Plasmids mPDI bzw. 2 µl des Plasmids aPDI zugegeben. Die Suspension wurde durch sanftes Schütteln des Reaktionsgefäßes gemischt und anschließend 30 Minuten lang bei 4 °C gekühlt. Nach der Kühlung erfolgte ein Hitzeschock bei 42 °C für 10 Sekunden und eine Kühlung bei 4 °C für 5 Minuten. Dann wurden 950 µl SOC-Medium zugegeben und die Suspension eine Stunde lang bei 37 °C und 200 rpm inkubiert. Gleichzeitig wurden die Selektionsplatten auf 37 °C erwärmt. Als Selektionsplatten wurden TSA-Agar-Platten mit 50 µg/ml Kanamycin für aPDI-transformierte Zellen bzw. 100 µg/ml Ampicillin für mPDI-transformierte Zellen verwendet. 100 µl der Zellsuspension wurden auf den Selektionsplatten ausgespatelt und über Nacht bei 37 °C inkubiert.

## 4.3 Miniprep

### 4.3.1. Miniprep

Es wurde eine Kolonie der transformierten Zellen von der Selektions-Platte in 5 ml entsprechendem Selektionsmedium (100 µg/ml Ampicillin bzw. 50 µg/ml Kanamycin) in einem 50 ml Reaktionsgefäß inokuliert und bei 37 °C und 180 rpm über Nacht inkubiert.

1,5 ml der Zellsuspension wurde in ein 1,5 ml-Reaktionsgefäß überführt und bei 20000 rcf eine Minute lang zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in 100 µl GTE-Puffer (50 mM Glucose, 25 mM Tris-CL, 10 mM EDTA, pH 8) resuspendiert. Es wurden 200 µl Lyse-Reagenz (0,2 M NaOH, 1 % SDS) zugegeben und das Reaktionsgefäß mehrfach gedreht, um die Lösung zu mischen. Dann wurden umgehend 150 µl 5 M Natriumacetat (pH 4,8) hinzugefügt, um das SDS und die genomische DNA auszufällen. Der Ansatz wurde bei 20000 rcf eine Minute lang zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein neues 1,5 ml-Reaktionsgefäß überführt.

Zu dem Überstand wurden 0,5 ml Isopropanol gegeben und die Mischung 10 Minuten lang bei -20 °C gekühlt. Anschließend wurde der Ansatz bei 20000 rcf eine Minute lang zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und das Pellet in 0,4 ml TE Puffer (10 mM Tris-Cl, 1 mM EDTA, pH 7,5) gelöst. Es wurden 10 µl RNAse A Lösung (20 mg/ml) zugegeben, die Lösung gevortext und bei 37 °C für 30 Minuten inkubiert, um verbliebene RNA zu verdauen.

Mittels PCIA (etwa 0,3 ml) wurden die Proteine ausgefällt. Der Ansatz wurde etwa 30 Sekunden lang gevortext und dann bei 20000 rcf fünf Minuten lang zentrifugiert. Der wässrige Überstand wurde in ein frisches 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und mit 100 µl 7,5 M Ammoniumacetat und 1 ml reinem Ethanol versetzt. Die Lösung wurde 10 Minuten lang bei -20 °C inkubiert und dann bei 20000 rcf fünf Minuten lang zentrifugiert. Der ethanolische Überstand wurde abgenommen und das DNA-Pellet in 50 µl Wasser gelöst.

### 4.3.2 Miniprep via P1, P2, P3

Für diese Miniprep wurden die Reagenzien P1, P2 und P3 verwendet, die Zusammensetzung ist in Tabelle 2 dargestellt.

Tabelle 2: Rezepte der Reagenzien P1, P2 und P3 für die Miniprep

|  |  |
| --- | --- |
| Reagenz | Rezept |
| P1 | 6,1 g/l Tris  3,7 g/l EDTA  pH 8 |
| P2 | 8 g/l NaOH  1 % SDS |
| P3 | 29,4 g KaliumAcetat  50 ml Wasser  Mit Essigsäure auf pH 5,5 einstellen  Mit Wasser auf 100 ml auffüllen |

Die Zellsuspension wurde wie unter 4.3.1 beschrieben über Nacht inkubiert. 1,5 ml der Kultur wurden in einem 1,5 ml Eppendorf Reaktionsgefäß mit 16000 g für 2 Minuten zentrifugiert und das Pellet in 250 µl P1 gelöst. Anschließend wurden 250 µl P2 zugegeben und das Reaktionsgefäß mehrmals gedreht, um eine Durchmischung zu erreichen. Die einsetzende Zelllyse sollte nach weniger als 5 Minuten durch die Zugabe von 350 µl P3 beendet. Das Reaktionsgefäß wurde mehrfach gedreht und bei 16000 g für 10 Minuten zentrifugiert. 700 µl des Überstandes wurden zu 700 µl Isopropanol in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß pipettiert und 15 Minuten lang bei -20 °C gekühlt.

Das Reaktionsgefäß wurde bei 16000 g 30 Minuten zentrifugiert. Anschließend wurden 250 µl gekühlter, 70 % Ethanol hinzugefügt und das Reaktionsgefäß 10 Minuten lang bei 16000 g zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und das Pellet an der Luft getrocknet. Das trockene Pellet wurde abschließend in 50 µl Wasser gelöst.

## 4.4 Agarose-Gelelektrophorese

### 4.4.1 Restriktionsverdau

Es wurde mithilfe des Online-Tools RestrictionMapper (http://www.restrictionmapper.org/, Stand Dezember 2016) für die Plasmide geeignete Restriktionsenzyme gesucht und ein theoretischer Verdau durchgeführt. Für den Verdau von aPDI wurde HIND III verwendet, für den Verdau von mPDI EcoR I. Der theoretische Verdau der Plasmide ergab die folgenden zu erwartenden Banden:

Tabelle 3: Zu erwartende DNA-Banden nach Restriktionsverdau

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| Plasmid | Restriktionsenzym | Erwartete Fragmente |
| aPDI | HIND III | 6436 bP |
| 770 bP |
| mPDI | EcoR I | 6558 bP |
| 674 bP |

Für die Restriktionsansätze wurden 5 µl des mitgelieferten Restriktionspuffers mit etwa 1 µg DNA und 10 units Restriktionsenzym gemischt und anschließend mit Reinstwasser auf 50 µl Gesamtvolumen aufgefüllt. Die Restriktion erfolgte eine Stunde lang bei 37 °C und wurde durch einen Hitzeschock bei 68 °C für 10 Minuten beendet. Anschließend wurden 25 µl der Ansätze mit jeweils 6 µl 6x-Ladepuffer vermischt und pro Tasche 20 µl Probe aufgetragen.

### 4.4.2 Gießen des Agarosegels

Es wurde ein Agarosegel mit 1 % Agarose verwendet. Es wurden 0,5 g Agarose mit 50 ml TAE-Puffer auf 80 °C erhitzt und nach dem Abkühlen auf unter 60 °C mit 0,5 µg/ml EtBr vermischt. Etwa 30 ml Gel wurden in der Gießkammer gegossen und ein Kamm eingesetzt. Nach dem Erkalten des Gels wurde der Kamm entfernt und das Gel mit TAE-Puffer mit 0,5 µg/ml EtBr übergossen, bis der Puffer etwa 3 mm über dem Gel stand.

### 4.4.3 Durchführung der Elektrophorese

Die Taschen wurden nach Tabelle 1 belegt.

Tabelle 4: Belegung des Agarose-Gels; M... Marker, A1-A6... Plasmide aus aPDI-transformierten Zellen, M1-M6... Plasmide aus mPDI-transormierten Zellen

|  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| Tasche | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 |
| Probe | M | A1 | A2 | A3 | A4 | A5 | M1 | M2 | M3 | M4 | M5 | M |
| Volumen [µl] | 10 | 20 | 20 | 20 | 20 | 20 | 20 | 20 | 20 | 20 | 20 | 10 |

Die Kammer wurde an eine Energieversorgung angeschlossen. Es wurden 75 V mit maximal 200 mA angelegt. Nach etwa 45 Minuten wurde die Kammer von der Energieversorgung getrennt und das Gel in ein Gelauswertesystem überführt.

## 4.5 SDS-Page

### 4.5.1 Probenvorbereitung

Es wurden Klone der transformierten Zellen von den Selektionsplatten in jeweils 5 ml Selektionsmedium angeimpft und bei 37 °C und 180 rpm inkubiert, bis eine OD620 von etwa 0,5 erreicht wurde. Zu den Ansätzen wurde jeweils 0,4 mM IPTG gegeben, um die Überexpression der Gene und dementsprechend eine erhöhte Synthese der Proteine zu erzielen. Die Ansätze wurden über Nacht bei Raumtemperatur und sanftem Schütteln inkubiert.

Anschließend wurde die OD620 der Suspension gemessen und so viele Zellen abzentrifugiert, wie in 1 ml Suspension mit OD620 = 2 enthalten wären. Die Zellen wurden in 50 µl SDS-Ladepuffer resuspendiert und für 10 Minuten gekocht. Bis zum Auftragen auf das Gel wurden die Proben bei 4 °C gelagert.

### 4.5.2 Gießen des Gels

Es wurde ein Trenngel mit 12 % Acrylamid verwendet. Die Zusammensetzungen des Trenn- und des Sammelgels sind in Tabelle 3 und Tabelle 4 aufgelistet.

Tabelle 5: Zusammensetzung des Sammelgels, ergibt 2,5 ml

|  |  |
| --- | --- |
| Chemikalie/Reagenz | Verwendetes Volumen |
| Reinstwasser | 1,4875 ml |
| 0,5 M Tris-HCl, pH 6,8 | 0,625 ml |
| 10 % SDS | 25 µl |
| Bis-/Acrylamid (1 %/ 29 %) | 0,335 ml |
| 10 % Ammoniumpersulfat | 25 µl |
| TEMED | 2,5 µl |

Tabelle 6: Zusammensetzung des Trenngels, ergibt 5 ml

|  |  |
| --- | --- |
| Chemikalie/Reagenz | Verwendetes Volumen |
| Reinstwasser | 1,6 ml |
| 1,5 M Tris-HCl, pH 8,8 | 1,3 ml |
| 10 % SDS | 50 µl |
| Bis-/Acrylamid (1 %/ 29 %) | 2 ml |
| 10 % Ammoniumpersulfat | 50 µl |
| TEMED | 5 µl |

Das Trenngel wurde in die Gießkammer gefüllt und mit Isopropanol überschichtet. Nach dem Auspolymerisieren wurde die Gießkammer mit Sammelgel gefüllt und ein Kamm mit 13 Zähnen eingesetzt. Wenn das Gel nicht sofort verwendet wurde, wurde es ohne Kamm in Silberfolie und feuchte Tücher gewickelt bei 4 °C gelagert.

### 4.5.3 Gelelektrophorese

Es wurde ein vertikales Doppelgelsystem verwendet, aber nur ein Gel eingesetzt. Der Platz für das zweite Gel wurde mit einer Blindplatte verschlossen. Das obere Pufferreservoir wurde mit Laufpuffer gefüllt, bis die kürzere Glasplatte etwa 5 mm weit überschichtet war. Das untere Reservoir wurde gefüllt, bis der Puffer etwa 3 mm über dem unteren Rand des Gels stand. Die Gelkammer wurde an eine Stromversorgung mit einer Stromstärke von 40 mA angeschlossen. Nach etwa 2 h wurde die Elektrophorese beendet und das Gel mit Roti Blue® gefärbt.

### 4.5.4 Nachträgliche Ethidiumbromid-Färbung

Alternativ zur Färbung der Banden durch Ethidiumbromid im Gel und im Laufpuffer besteht die Möglichkeit, ein Gel nach dem Lauf in einer 0,5 µg/ml Ethidiumbromidlösung einzulegen und unter sanftem Schütteln zu färben. Die Färbedauer kann dabei zwischen

# 5 Durchführung

## 5.1 Transformation

Bei jeder Transformation wurde als Negativkontrolle ein weiterer Transformationsanstz mitgeführt, bei dem kein Plasmid zugegeben wurde. Die Negativkontrolle wurde anschließend sowohl auf Selektionsplatten mit Ampicillin als auch auf Selektionsplatten mit Kanamycin ausgespatelt und mit den Transformationsansätzen inkubiert. In keinem der Versuche bildete die Negativkontrolle Kolonien aus.

### 5.1.1 XL1 Blue

Der Stamm XL1 wurde wie unter 4.1 beschrieben behandelt und als kompetente Zellen bei -80 °C tiefgefroren. Anschließend wurden die Zellen wie unter 4.2 beschrieben transformiert, es wurden aber 1 µl aPDI bzw. 1 µl mPDI eingesetzt. Die transformierten Zellen wurden auf Selektionsplatten ausgestrichen und nach der Inkubation ausgezählt. Die mit 1 µl mPDI transformierten Zellen wiesen eine gute Transformationseffizienz auf, es wurden über 100 Kolonien gezählt. Die mit 1 µl aPDI transformierten Zellen bildeten 3 Kolonien.

Die Transformation wurde mit 1 µl mPDI bzw. 2 µl aPDI wiederholt. Die mit mPDI transformierten Zellen bildeten erneut über 100 Kolonien, die mit aPDI transformierten Zellen bildeten etwa 20 Kolonien. Die im zweiten Versuch transformierten Zellen wurden für alle weiteren Versuche verwendet.

### 5.1.2 BL21

Für die erste Transformation des Produktionsstammes wurden chemisch kompetente Zellen verwendet, die vom Leibniz-Institut für Pflanzengenetik und Kulturpflanzenforschung in Gatersleben bezogen wurden. Die kompetenten Zellen wurden wie unter 4.2 beschrieben transformiert und auf Selektionsplatten ausgespatelt. Weder die aPDI-transformierten Zellen noch die mPDI-transformierten Zellen bildeten in diesem Versuch Kolonien aus.

Anschließend wurden neue, chemisch kompetente Bl21-Zellen nach 4.1 hergestellt und für die Transformation verwendet. Es bildeten sich 5 aPDI-transformierte Zelle und etwa 30 mPDI-transformierte Kolonien. Die im zweiten Versuch transformierten Zellen wurden für alle weiteren Versuche verwendet.

## 5.2 Miniprep

Von den Selektionsplatten der transformierten XL1-Zellen wurden jeweils fünf aPDI-transformierte (A1-A5) und fünf mPDI-transformierte (M1-M5) Klone ausgewählt und wie unter 4.3.1 beschrieben für die Miniprep eingesetzt. In einigen Ansätzen konnte vor dem Lösen des DNA-Pellets in Wasser ein weißes Pellet im Reaktionsgefäß festgestellt werden. Aufgrund eines Produktionsfehlers in dem Verschluss eines der verwendeten Reaktionsgefäße ging der Ansatz des Klons A3 während der Miniprep verloren.

Die Absorption der extrahierten DNA-Proben der Klone wurde anschließend mit einem Spektrometer bei 260 nm gemessen. Es wurden jeweils 100 µl einer 1:50-Verdünnung gegen 100 µl Reinstwasser als Referenz gemessen. Die Messwerte sind in Tabelle 7 zusammengefasst.

Tabelle 7: Absorption der Miniprep-Proben bei 260 nm, 1:50 verdünnt und unverdünnt

|  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| Klon | A1 | A2 | A4 | A5 | M1 | M2 | M3 | M4 | M5 |
| Averdünnt | 0,47 | 0,14 | 0,71 | 0,31 | 0,31 | 0,36 | 0,29 | 0,41 | 0,33 |
| Aunverd. | 23,5 | 7 | 35,5 | 15,5 | 15,5 | 18 | 14,5 | 20,5 | 16,5 |

Die Proben wurden wie unter 4.4 beschrieben mit den Restriktionsenzymen EcoR I bzw. HIND III verdaut und auf einem Agarose-Gel aufgetragen. Probe A3 wurde in diesem Versucht durch einen Restriktionsansatz von Probe A1 ohne Restriktionsenzyme ersetzt. Das Gel ist in **Hier Bild einfügen** gezeigt.

**Bild von Gel ohne Banden**

Es konnten keine Banden in den Spalten der Proben festgestellt werden.

## 5.3 Miniprep via P1, P2, P3

Für die Miniprep via P1, P2, P3 wurden die Klone A1-A3 und M1-M3 eingesetzt. Die Miniprep wurde wie unter 4.3.2 beschrieben durchgeführt und die DNA-Pellets in Wasser gelöst. Die Absorption der extrahierten DNA-Proben der Klone wurde anschließend mit einem Spektrometer bei 260 nm gemessen. Es wurden jeweils 100 µl einer 1:10-Verdünnung gegen 100 µl Reinstwasser als Referenz gemessen. Die Messwerte sind in Tabelle 8 zusammengefasst.

Tabelle 8: Absorption der Miniprep-Proben bei 260 nm bzw. 280 nm und 260/280 Verhältnis

|  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| Klon | A1 | A2 | A3 | M1 | M2 | M3 |
| A260 | 0,683 | 0,477 | 0,495 | 0,605 | 0,66 | 0,356 |
| A280 | 0,393 | 0,296 | 0,345 | 0,322 | 0,333 | 0,202 |
| R260/280 | 1,738 | 1,611 | 1,435 | 1,879 | 1,982 | 1,762 |

Die Proben wurden wie in 4.4 beschrieben mit Restriktionsenzymen verdaut und mit einem Agarose-Gel aufgetrennt. Die Belegung des Gels ist in Tabelle 9 zusammengefasst.

Tabelle 9: Belegung des Agarosegels zur Untersuchung der DNA-Proben der Miniprep via P1, P2, P3; A1-A3, M1-M3 ... DNA-Extrakte der Klone; PK ... Positivkontrolle ohne Restriktionsenzyme; aPDI, mPDI ... Plasmidproben aus Kryostocks; M … Marker

|  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| Probe | M | A1 | A2 | A3 | A1 PK | M2 PK | M1 | M2 | M4 | aPDI | mPDI | M |
| Volumen | 7 µl | 10 µl | 10 µl | 10 µl | 10 µl | 10 µl | 10 µl | 10 µl | 10 µl | 10 µl | 10 µl | 7 µl |
| Restr.-Enzym | - | HIND  III | HIND  III | HIND  III | - | - | EcoR I | EcoR I | EcoR I | HIND III | EcoR I | - |

# Literaturverzeichnis

[1] Thieme Römpp „Huminstoffe“, J. Hartmann-Schreier (2002)

<https://roempp.thieme.de/roempp4.0/do/data/RD-11-00600>

[2] International Humic Substances Society Homepage, 07.03.2016

<http://www.humicsubstances.org/index.html>

[3] Lei Chen, Chaofeng Shen et al. (2012) Estrogenic effects of dissolved organic matter and its impact on the activity of 17β-Estradiol, Environ Sci Pollut Res 19:522-528

[4] Kari Timo Steffen, Annele Hatakka, Martin Hofrichter (2002) Degradation of Humic Acids by the Litter-Decomposing Basidiomycete Collybia dryophila, Appl Environ Microbiol 68(7):3442-3448

[5] Ji Ho Lee, John L. Zhou, Sang Don Kim (2011) Effects of biodegradation and sorption by humic acid on the estrogenicity of 17β-Estradiol, Chemosphere 85 1383-1389

[6] Jiho Lee, Jaewon Cho, Sang H. Kim, Sang D. Kim (2011) Influence of17b-estradiol binding by dissolved organic matter isolated from wastewater effluent on estrogenic activity, Ecotoxicology and Environmental Safety 74 1280-1287