

Forschung hautnah:
Wissenschaftliches Schülerpraktikum
vergeben durch den
Förderverein der BiologieOlympiade e.V.

Zoologisches Institut der Christian-Albrechts-Universität
Kiel
Arbeitsgruppe Bosch

Isolation und Vervielfältigung von zu untersuchenden Genen

Jacob Zeibig
Klassenstufe 12
Friedrich-Schiller-Gymnasium Pirna

01.08. – 26.08.2022

Einleitung

Mein Name ist Jacob Zeibig, ich bin achtzehn Jahre alt und habe bis vor kurzem das Gymnasium besucht. Nach meinem Abitur diesen Sommer hatte ich nun die Chance, als Preisträger der Biologie-Olympiade vor dem Beginn meines Studiums noch ein wissenschaftliches Praktikum zu absolvieren. Schon von klein auf interessierte ich mich anfangs für Natur und Tierwelt, später für alle Aspekte der Biologie. So habe ich mich auch schon immer intensiv mit dieser Wissenschaft beschäftigt und das Schulfach immer gemocht. Dazu war es schon seit langem mein Wunsch Biologie zu studieren. Um meinen theoretischen Kenntnissen nun zusätzlich praktische Erfahrungen hinzuzufügen, war dieses Praktikum eine ideale Möglichkeit. Ich verbrachte diese Zeit am zoologischen Institut der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel, genauer gesagt in der von Prof. Thomas Bosch geleiteten Arbeitsgruppe. Deren grundlegender Forschungsschwerpunkt ist der Polyp *Hydra*, hauptsächlich unter dem Aspekt des Metaorganismus, d.h. der eigentliche Organismus zusammen mit den in und auf ihm lebenden Bakterien (welche Auswirkungen haben diese auf seine Gesundheit, Evolution, Eigenschaften etc.). Daneben werden auch einige andere Projekte rund um *Hydra* durchgeführt.

Zwar habe ich im Laufe der vier Wochen einen Einblick in viele Bereiche der Forschung am Institut erhalten, doch ein Projekt will ich hier konkreter beschreiben. Dabei ging es darum, ein bestimmtes Gen von *Hydra* zu isolieren, zu vervielfachen und für die genauere Untersuchung vorzubereiten. Zu diesem Zweck wurde das Gen in eine Bakterienkolonie eingeschleust und vermehrt. Ein wichtiger Schritt war auch, herauszufinden, welche Bakterien das Gen überhaupt in sich tragen.



Abb. 1: Gebäude des zoologischen Instituts

Projektinformation

Das Projekt gehört in den Teilbereich der Genetik. Wichtiges Vorwissen, das vorher geklärt werden muss, sind einige wesentliche gentechnische Methoden.

Die erste für dieses Experiment wichtige Methode ist das sogenannte Blue-White Screening (Blau-Weiß-Selektion). Diese Methode dient dazu, Bakterien (der Art *E. coli*), die ein bestimmtes Gen in sich tragen (in diesem Fall das zu untersuchende Gen aus *Hydra*) zu identifizieren. Die wichtigste Grundlage ist, dass normale *E. coli*-zellen das Enzym β -Galactosidase, welches für die Verdauung von Laktose zuständig ist, produzieren. Wird nun ein fremdes Gen in das Bakterium eingefügt, wird das so durchgeführt, dass das Gen für die β -Galactosidase dabei entfernt wird. Anschließend wird ein Stoff namens X-gal hinzugegeben, der mit β -Galactosidase zu einem blauen Farbstoff reagiert; ohne dieses Enzym jedoch weiß bleibt. Das bedeutet, Kolonien, die das fremde Gen erfolgreich aufgenommen haben und keine β -Galactosidase mehr produzieren, erscheinen weiß; Kolonien, die das fremde Gen nicht eingeführt haben und immer noch β -Galactosidase produzieren, erscheinen blau. Da so Bakterienkolonien (auf ein Gen) überprüft werden, wird auch vom Colony-Check gesprochen. Weiterhin muss hier der Ablauf einer PCR (Polymerase chain reaction (Polymerasekettenreaktion)) beschrieben werden. Dazu wird ein Mastermix, der eine DNA, die

vervielfältigt werden soll, Taq-Polymerase, freie Nucleotide und Primer enthält, angesetzt. Im ersten Schritt wird das Gemisch erhitzt, wobei die doppelsträngige DNA denaturiert und einzelsträngig wird. Anschließend lagert sich der Primer an eine spezifische Stelle des Einzelstranges an. Hier beginnt die Polymerase komplementär zum vorhandenen Strang die freien Nucleotide anzufügen, sodass schließlich wieder der fertige Doppelstrang vorliegt. Wird der ganze Prozess mehrmals wiederholt, entstehen am Ende bis zu Millionen Kopien des Gens. Zuletzt ist es auch notwendig, zu behandeln, wie eine Gelelektrophorese abläuft. Hierbei wird zuerst das Gel angefertigt, indem Agarose in Wasser geschmolzen und durch Abkühlen wieder verfestigt wird. In dieses Gel werden kleine Taschen gestochen, in die die fertigen DNA-Proben gegeben werden. Nun wird am Gel eine Spannung angelegt, wodurch die leicht negativ geladenen DNA-Stücke zum Pluspol wandern. Je größer die Fragmente sind, umso weniger Weg schaffen sie jedoch in einer bestimmten Zeit, bis der Strom abgeschaltet wird. Durch eine radioaktive oder fluoreszente Markierung der DNA können die zurückgelegten Strecken, die Banden, sichtbar gemacht werden. Zusätzlich läuft noch eine Vergleichsprobe einer bekannten Größe mit. So kann am Ende an der Länge der Bande die Größe der ursprünglichen Probe bestimmt werden.

Material und Methoden

Zuerst werden aus dem Colony-Check (dieser wurde schon vorher durchgeführt und hängt nicht direkt mit dem hier geschilderten Experiment zusammen) mehrere weiße Kolonien (mit Gen) und zur Kontrolle auch blaue (ohne Gen) ausgewählt. Nun wird der Mastermix für die PCR angesetzt. In diesem Fall werden 39,6 µl Puffer, 4 µl dNTPs (Desoxynucleotidtriphosphate, also die Nucleotide) in einer 10 mM Lösung, jeweils 4 µl der beiden Primer T7 und SP6, 1 µl Taq-Polymerase sowie 145,5 µl destilliertes Wasser vermischt. Wichtig ist dabei, wegen der hohen Temperaturempfindlichkeit den ganzen Vorgang auf Eis durchzuführen. Der Mastermix wird auf Gefäße mit je 10 µl Inhalt verteilt. Anschließend werden mit einer Pipette Proben der ausgewählten Kolonien abgenommen, ein Teil auf eine Masterplatte übertragen (dort werden die Kolonien, falls sie tatsächlich erfolversprechend sind, später vermehrt; natürlich muss sie vorher so beschriftet werden, dass alle Kolonien zuzuordnen sind) und der andere Teil als DNA-Probe in je eines der vorbereiteten Gefäße mit Mastermix gegeben. Mit diesen vorbereiteten Gemischen wird jetzt in einer PCR-Maschine die PCR durchgeführt. Die Einstellungen dafür werden so gewählt, dass die Maschine die eingesetzten Proben zuerst 5 Minuten lang auf 94 °C erwärmt und dann 40 Zyklen durchführt. Für jeden dieser Zyklen gilt wiederum: 30 s lang Trennung der Doppelstränge bei 94 °C, 30 s Anlagerung der Primer bei 55 °C, 45 s Neusynthese des Stranges bei 72 °C und anschließend der nächste Zyklus. Am Ende werden die Proben bei 72 °C bis zur Weiterverarbeitung in der Maschine aufbewahrt. In der Zwischenzeit muss das Gel gegossen werden; dazu werden 0,5 g Agarose in 50 ml Puffer gelöst, die Lösung wird erhitzt, bis die Agarose schmilzt und wieder abgekühlt, sodass das Gel entsteht. Anschließend werden die DNA-Proben zusammen mit dem sichtbarmachenden Farbstoff in die Taschen des Gels gefüllt. Zum Schluss wird mit den vervielfältigten DNA-Fragmenten eine Gelelektrophorese durchgeführt (90 V, 135 mA, 13 W, 40 min), sodass die Länge bestimmt werden kann. Mit bloßem Auge sind die Banden nicht sichtbar, daher wird dafür eine spezielle Fluoreszenzkamera benötigt und das Bild letztendlich am Computer betrachtet. Da die Länge

des eingefügten Gens charakteristisch ist, kann hier ermittelt werden, ob es vorhanden ist oder nicht.

Versuchsergebnisse

Leider sind viele molekularbiologische und gentechnische Methoden (insbesondere die PCR) hochempfindlich für geringste Schwankungen der äußeren Bedingungen und sehr fehleranfällig, sodass es auch ein bisschen von Glück und Zufall abhängt, ob sie funktionieren. Es ist kann hin und wieder vorkommen, dass eine PCR trotz exakter Einhaltung des Protokolls nicht die gewünschten Ergebnisse bringt. Auch hier ist zwar schön den Kontrolllauf zu sehen (ganz links), aber nichts von den Proben aus den Bakterien.

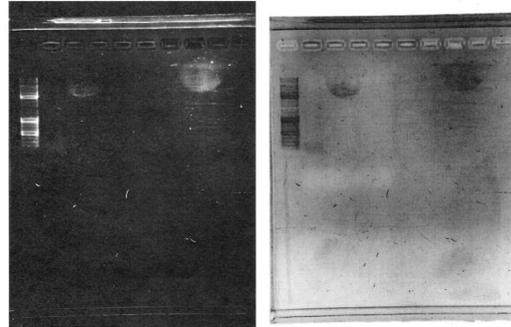


Abb. 2: Ergebnisse der PCR

Diskussion

Normalerweise müssten einige Banden zu erkennen sein, die bei einer bestimmten Länge eine deutliche Markierung haben (die mit Gen) und einige die sie nicht haben (die ohne Gen). Warum es nicht funktioniert hat, kann nicht immer mit Sicherheit gesagt werden; wie schon oben gesagt, ist das durchaus möglich und muss nicht mit eigenen Fehlern zusammenhängen. Das weitere Vorgehen wäre jetzt, den Versuch zu wiederholen, bis er funktioniert und dann die Bakterienkolonien mit dem gewünschten Gen zu vermehren, damit man möglichst viele Kopien des Gens erhält. Anschließend können mit dem Gen weitere Versuche und Projekte unternommen werden.

Fazit

Die vier Wochen im Labor waren eine schöne Zeit, in der ich viel über wissenschaftliches Arbeiten gelernt habe. Es waren wichtige Erfahrungen für mich, die ich im Studium und vielleicht auch später im Beruf verwenden kann und die mir dabei helfen werden. An dieser Stelle möchte ich auch noch einmal der gesamten Arbeitsgruppe für ihre Unterstützung und die Bereitwilligkeit, mir alles zu zeigen und zu erklären, danken.

Literaturverzeichnis

<https://www.sigmaaldrich.com/DE/de/technical-documents/technical-article/genomics/cloning-and-expression/blue-white-screening> Stand: 24.9.2022

Ansonsten versichere ich, dass alle meine Informationen und Bilder nicht aus fremden Quellen stammen.