

FRAGE:

Arbeite ich nach der Fällung der Proteine (Rohextrakt) mit dem Überstand weiter, oder mit dem Pellet?

Irgendwie widersprechen sich meiner Meinung die Aussagen, dass man dann konzentrieren kann und dass die löslichen Proteine noch im Puffer sind.

Zur Konzentration würde ich doch einfach den alten Puffer abnehmen und dann weniger neuen Puffer hinzugeben, also mit dem Pellet weiterarbeiten. Wenn es mir aber um die löslichen Proteine geht, dann würde ich mit dem Überstand arbeiten.

ANTWORT:

das kommt darauf an, wo sich das Protein befindet. Ist es im Pellet, gilt die Aussage der Konzentrierung. Das ist auch der Regelfall, den man anstrebt.

Manchmal allerdings wird das Protein nach AS-Fällung nicht (richtig) renaturiert. Dann muss man mit dem Überstand weiterarbeiten und die Konzentrierung z.B. durch Ultrafiltration bewerkstelligen (oder besser noch: wenn das Protein ein solches Sensibelchen ist, sollte man drüber nachdenken, das Thema zu wechseln ...).

Damit Sie wissen, wieviele Sonderpunkte Sie bereits gesammelt haben, liste ich hier die Matrikelnummern chronologisch auf. Wie in der Vorlesung erwähnt, werde ich für gute Beiträge oder gefundene Fehler und Ungenauigkeiten jeweils einen Sonderpunkt geben, der bei der Klausur angerechnet wird.

Erhaltene Sonderpunkte:

2664000

2596900

2571260

2676790

2663600

2568960

2596900 (schon der 2. Sonderpunkt! Klasse!)

2587690

FRAGE:

Wenn ich ein Primer erstelle, muss er ja bestimmten Bedingungen standhalten wie z.B. der Temperatur. Gibt es da Richtlinie zur Größe oder Zusammensetzung der Primer(zB. Je länger und je mehr GC Paarungen desto stabiler.) und wo er genau liegen muss, sodass er gut und zuverlässig synthetisiert?

ANTWORT:

aber sicher doch, und zwar nicht nur eine Richtlinie. Hier haben wir nur die wesentlichen Eigenschaften gemacht aber es gibt da ausgefeilte Algorithmen, die alles mögliche berücksichtigen. Daher läßt man sich den Primer am besten durch ein entsprechendes Softwareprogramm berechnen.

FRAGE:

können sie mir erklären weshalb es bei Isoschizomeren nicht zum Verlust der Schnittstelle kommt, wenn kompatible Schnittstellen legiert werden und bei allen anderen schon? ( Folie 4 Vorlesung 6, letzter Stichpunkt) Ich kann mir da den Unterschied nicht so richtig vorstellen.

ANTWORT:

aber sicher doch, schauen Sie sich mal das an:

A|ACGTT  
TTGCA|A

A|ACGTT  
TTGCA|A

sollen jetzt mal die Isoschizomeren sein.

Wenn Sie schneiden und ligieren entsteht:

A|ACGTT  
TTGCA|A

und das ist wieder die Ausgangsschnittstelle. Der einzige Unterschied zu vorher ist, dass Sie eine der beiden Schnittstellen und die Sequenz zwischen ihnen verloren haben.

Und nun nochmal zu den kompatiblen, nicht-Isoschizomeren:

C|ACGTG  
GTGCA|C

A|ACGTT  
TTGCA|A

hier ergibt sich

C|ACGTT  
GTGCA|A

hier führen die unterschiedlichen Basen an den Enden dazu, dass keins der beiden REs diese Sequenz noch erkennt.

Bei kompetitiven ELISA muss es natürlich heißen:

"... je mehr ANTIGEN in der Probe, desto weniger markiertes Antigen kann binden..."

FRAGE:

Uns ist momentan noch nicht klar, warum die Methylase und die Restriktionsendonuklease ein gemeinsames System bilden, obwohl sie ja eigentlich als Gegenspieler wirken. Liegen die beiden im Labor auch immer zu sammen vor? Das kann doch eigentlich nicht sein?!

ANTWORT:

Im Labor spielen die Methylasen praktisch keine Rolle, daher ist es praktisch, dass bei Typ II Enzymen die beiden Funktionen auf getrennten Proteinen liegen.

Ein gemeinsames System bilden sie in der Natur: bei der Replikation methyliert die Methylase sequenzspezifisch die halb-methylierte DNA um so eine vollständige Methylierung der bakterieneigenen DNA zu erzielen, die dann durch das zugehörige RE nicht mehr geschnitten wird.

TR

FRAGE

Was genau ist denn diese "V"-Base am 3' Ende des Primers, dass sie in der Lage ist an alle Basen außer an A zu binden?

ANTWORT:

Für Basen in degenerierten Primern werden spezielle Notationen verwendet:

S für G oder C (das S steht wegen der drei Wasserstoffbrücken für strong H-Bond),

W steht entsprechend für weak, also A oder T.

Das K steht für G oder T und M für A oder C.

Sind drei verschiedene Basen möglich, ergibt sich der Buchstabe aus der fehlenden Base: es wird der nachfolgende Buchstabe dieser fehlenden Base verwendet. So ergibt sich: B (C, G, T) für „Nicht-A“, D (A, G, T) für „Nicht-C“ und H (A, C, T) für „Nicht-G“. Für „Nicht-T“ war das „U“ schon anderweitig belegt, so dass „V“ für A, C oder G verwendet wird.

Der Buchstabe N wird verwendet, wenn alle Basen an einer Position auftreten können.

TR

FRAGE

Was genau ist denn diese "V"-Base am 3' Ende des Primers, dass sie in der Lage ist an alle Basen außer an A zu binden?

ANTWORT:

Für Basen in degenerierten Primern werden spezielle Notationen verwendet:

S für G oder C (das S steht wegen der drei Wasserstoffbrücken für strong H-Bond),

W steht entsprechend für weak, also A oder T.

Das K steht für G oder T und M für A oder C.

Sind drei verschiedene Basen möglich, ergibt sich der Buchstabe aus der fehlenden Base: es wird der nachfolgende Buchstabe dieser fehlenden Base verwendet. So ergibt sich: B (C, G, T) für „Nicht-A“, D (A, G, T) für „Nicht-C“ und H (A, C, T) für „Nicht-G“. Für „Nicht-T“ war das „U“ schon anderweitig belegt, so dass „V“ für A, C oder G verwendet

wird.

Der Buchstabe N wird verwendet, wenn alle Basen an einer Position auftreten können.

TR

FRAGE:

Vorhin bei der Diskussion haben wir uns gefragt was genau der Sinn der Nested PCR ist. Dient sie nur dem Aufreinigen der großen genomischen DNA oder geht es auch um gezielte Amplifikate, wobei wir uns da gefragt haben, wie mit unspezifischen Primern und so einer Doppel- PCR solche AMplifikate hergetsellt werden, weil wenn man ein bestimmtes Amplifikat möchte, könnte man ja auch gleich den jeweiligen Primer nutzen.

ANTWORT:

aber nur, wenn man die genaue Sequenz kennt. Nested Primer werden eingesetzt, wenn man nur so ungefähr die Sequenz der zu amplifizierenden DNA weiß. Also solche Situationen, die wir letzten Mittwoch kurz angesprochen haben:

Sie wollen eine Hexokinasegen aus Nacktmull amplifizieren, haben aber nur Sequenzdaten aus Ratte, Maus und Kaninchen. Durch die nested PCR können Sie durch zwei nicht so gut passende Primer dennoch ein spezifisches Amplifikat erhalten. Selbst wenn Ihr erster nicht super passender Primer 100 Amplifikate erzeugt, wird durch das zweite nicht super gut passende Primerpaar nur das Gen amplifiziert, was beide Sequenzen so ungefähr enthält.

TR