

Seminarbericht Jugendakademie Mannheim

Stiftung Begabtenförderung der Stadt Mannheim

Oberstufe 2014/2015



The Chemical Company

Seminarthema: **Biotechnologisches Praktikum**

Ort: BASF Agrarzentrum Limburgerhof
BASF Ludwigshafen Gebäude H200

Datum: Donnerstag, 07.05.2015

Zeit: 8:00 Uhr – 17:30 Uhr

Verfasser: **Max Ackermann**

Anschrift: Mannbachweg 7, 69436 Schönbrunn-Haag

Einleitung

Das Programm der Jugendakademie Mannheim bot uns dieses Jahr wieder umfangreiche und interessante Seminare und Vorträge an. Eines dieser Seminare fand bei der BASF statt. Das Ziel des Seminars war es, die *Grundtechniken der Gentechnik* kennen zu lernen und etwas über die BASF und ihre Forschung in diesem Gebiet zu erfahren.

Ablauf

Um Pflanzen gezielt gentechnisch zu verändern, müssen unterschiedliche Techniken angewandt werden. Darunter an erster Stelle die *DNA-Isolation*, das Verändern der DNA mit den gewünschten Eigenschaften, das Vervielfältigen der DNA und die Überprüfung der Arbeit in einer *Gel-Elektrophorese* sowie das Einbringen der veränderten DNA in den Zielorganismus.

- **DNA-Isolation**

Als Zeichen des Lebendigen wird in der Biologie die Zelle gesehen. In einer Zelle befindet sich die Erbinformation eines Organismus, die *Desoxyribonucleinsäure*, kurz einfach DNA genannt. Dieses Molekül besteht aus zwei Strängen, die in einer *Doppelhelix* gewunden sind und über chemische *Wasserstoffbrücken* miteinander festgehalten werden. In dieser DNA ist wie in einer Bibliothek aus Büchern die gesamte Information über den Aufbau und den Stoffwechsel von Lebewesen enthalten. Allerdings nicht wie in Worten und

Sätzen wie in den Büchern, sondern in einem verschlüsselten Code aus vier unterschiedlichen *Basen*: abgekürzt A, T, G und C.

Um die DNA aus Zellen zu isolieren, gibt es unterschiedliche Wege: chemisch oder enzymatisch. Das hängt auch davon ab, ob chromosomale DNA oder Plasmid-DNA (kleine ringförmige DNA-Moleküle in Bakterien) isoliert werden soll. Wir haben DNA aus dem Zellkern von Zellen einer gentechnisch veränderten Maispflanze und Plasmid-DNA aus einem Bakterium isoliert. Vom Prinzip her werden Reagenzien verwendet, die die Bakterienzellwand aufbrechen. Hierzu können auch sogenannte Detergenzien (ähnlich wie Spülmittel) verwendet werden. In einem weiteren Schritt werden die Proteine zerstört und übrig bleibt dann die DNA. Damit DNA und Proteine voneinander getrennt werden können, benötigt man eine Trennmethode. Hierzu haben wir die Zentrifugation verwendet. Dabei kommt es bei hohen Umdrehungszahlen zu einem Absetzen von schwereren Teilchen am Boden des Zentrifugenröhrchens, während kleine und leichtere DNA-Plasmide in der wässrigen Lösung darüber schwimmen und leicht abgenommen werden können. In einem letzten Schritt wird die DNA dann noch gereinigt.

- **Vervielfältigen der DNA**

Zum Vervielfältigen der DNA haben wir eine geniale Methode kennengelernt: die PCR (*Polymerase-Kettenreaktion*; engl. ***Polymerase Chain Reaction***). Bei diesem Verfahren wird ein Molekül DNA exponentiell vervielfältigt, so dass am Ende der Reaktion so viel DNA vorhanden ist, um sie in einem *Gel* sichtbar zu machen und weiter mit ihr zu arbeiten.

Die PCR besteht aus verschiedenen Schritten, die unsichtbar in einem Gerät (Thermocycler) ablaufen:

- 1. Schritt: *Denaturierung*

Hier werden die beiden Stränge, aus denen die DNA als Doppelhelix besteht, in Einzelstränge getrennt. Dies wird durch Erhitzen auf eine Temperatur von 94 °C erreicht.

- 2. Schritt: *Primer Annealing*

Hier werden zwei Starter an die jeweiligen Einzelstränge angelagert. Diese passen zu der DNA, weil sie zu ihr *komplementär* sind. Für diesen Schritt muss die Temperatur auf ca. 50 bis 65 °C abgekühlt werden.

- 3. Schritt: *Elongation*

Hier kommt nun das Enzym *Taq-Polymerase* zum Einsatz. Es erkennt die Starter, die mit der vorhandenen DNA ein kurzes Stück Doppelstrang gebildet haben und fängt an dieser Stelle an, nach der *Matrizen-DNA* einen komplementären neuen DNA-Strang zu bauen. Dies meint, dass der neue Strang *gegengleich* zum

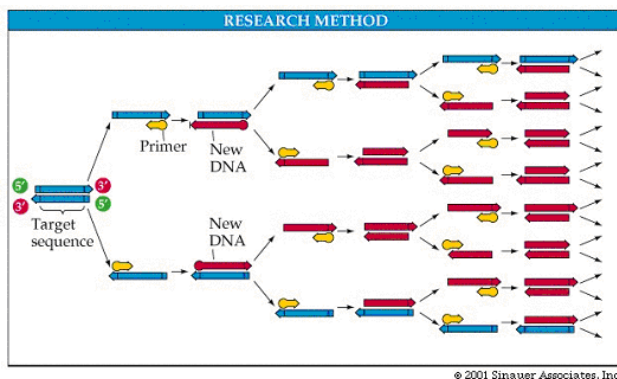
Ursprungsstrang ist und daher jede Base in diesem Strang auf dem neuen Strang als ihr Partner vorliegt. Partner sind hierbei immer:

Adenin - Thymin

Guanin - Cytosin

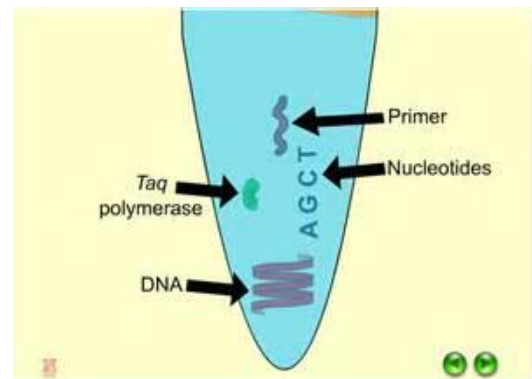
Die drei Schritte folgen dabei in mehreren *Zyklen* im Gerät direkt aufeinander. Meistens werden 20-30 Zyklen benötigt.

Dieses Gerät, in dem diese Zyklen stattfinden, kühlt und heizt den Raum dabei mithilfe von *Peltierelementen* relativ schnell auf die nötige Temperatur für den jeweiligen Schritt.



Der exponentielle Ablauf der PCR

Quelle: biotecnoman1809.blogspot.com



Alle beteiligten Moleküle

http://utcinnovationlabs.blogspot.de/2014_06_01_archive.html

Die Taq-Polymerase wird aus Bakterien gewonnen, die in heißen Quellen leben. Sie ist hitzebeständig, was extrem vorteilhaft für die PCR ist: Als man diese Methode noch mit dem nicht hitzebeständigen Enzym betrieb, musste man die Polymerase vor jedem Zyklus neu hinzugeben, da sie von Natur aus ein Protein ist und so nach jedem Erhitzen auf 94 °C *denaturiert* (wie die Eiweiße im gekochten Ei!) und damit funktionslos war.

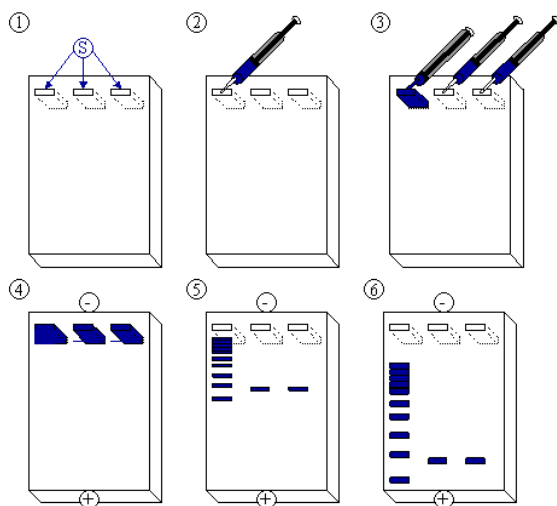
Am Ende der PCR-Reaktion hat sich die anfängliche DNA-Menge exponentiell vervielfacht. Dies lässt sich gut mit der „Schachbrett-Aufgabe“ veranschaulichen: Legt man auf einem Schachbrett mit seinen 64 Feldern auf das erste Feld ein Reiskorn und auf jedes weitere Feld jeweils die doppelte Anzahl an Reiskörnern vom vorherigen Feld, so hat man am Ende $9,2 \times 10^{18}$ Reiskörner (gerundet). Zur besseren Vorstellung dieser Zahl lautet sie ausgeschrieben: 920000000000000000 Reiskörner. Entsprechend wird die anfängliche Menge an DNA-Molekülen (entsprechen den Reiskörner) je nach Anzahl der Zyklen (entsprechen der Anzahl der Schachbrettfelder) vervielfältigt: dies sorgt bei 20-30 Zyklen für eine $10^6 - 10^9$ -fache Zunahme der ursprünglichen DNA-Menge – einfach genial!

- **Gel-Elektrophorese**

Aufgrund der *Phosphatgruppen* ist das DNA-Molekül *negativ geladen*. Diese Eigenschaft wird im Folgenden genutzt, um die Erbinformation genauer zu untersuchen.

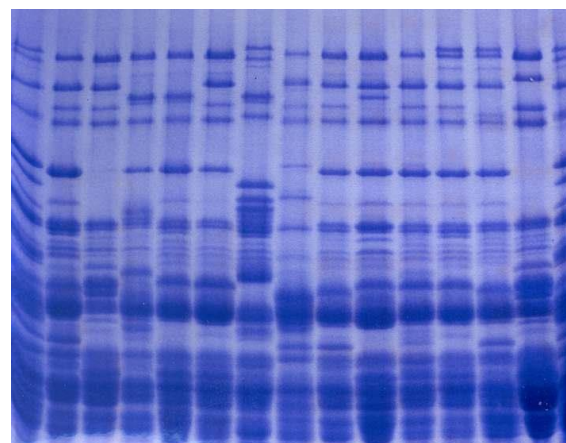
Die DNA liegt nicht als ein extrem langer Strang im Zellkern jeder Zelle eines Organismus vor, sondern in einzelne, unterschiedlich lange Abschnitte geteilt. Diese Abschnitte, die *Chromosomen*, sind untereinander nicht gekoppelt und daher frei beweglich.

Um nun genaue Aussagen über die Erbinformation eines Organismus treffen zu können, werden genau diese Abschnitte untersucht. Dabei wird die Proben-DNA zunächst mittels PCR (s.o.) vervielfältigt. Anschließend wird sie in eine Tasche aus dickflüssigem Gel (*Agarose*) gespritzt, an die auf zwei gegenüberliegenden Seiten *Elektroden* angelegt werden. Aufgrund der eigenen negativen Ladung beginnen die DNA-Abschnitte sich nun in Richtung Pluspol (Anode) zu bewegen. Das Gel kann man sich wie ein Netz oder Sieb vorstellen, dass die DNA-Moleküle auf ihrem Weg im elektrischen Feld (Gleichspannung) aufhält. Dabei kommen aufgrund der hohen Dichte der Agarose kleinere Fragmente schneller voran als größere, die mehr Reibung durch die Raumstruktur des Gels erfahren. Nach einer bestimmten Zeit wird der Strom abgekoppelt. Nun kann das entstandene Diagramm (*das Elektrospherogramm*) näher untersucht werden. Hierzu muss die DNA nur noch sichtbar gemacht werden. Je näher eine Bande am Pluspol zu liegen kommt, desto kleiner sind die enthaltenen DNA-Abschnitte. Die Länge eines solchen Abschnitts wird dabei in *Basenpaaren (bp)* angegeben.



Der Ablauf der Gelelektrophorese

Quelle: <http://de.academic.ru/dic.nsf/dewiki/36698>



Ein Elektrospherogramm

Quelle: http://plantbreeding.boku.ac.at/957308/hg/qu_cereal_1.htm

- **Einbringen der veränderten DNA in den Zielorganismus**

Um die gentechnisch veränderte DNA nun in einen Organismus einbringen zu können, gibt es verschiedene Techniken, die je nach Zielorganismus gewählt werden. In unserem Praktikum schleusten wir beispielsweise veränderte DNA in ein Bakterium ein. Hierbei nutzten wir, um die Membran der Zellen lokal durchlässig zu machen und damit Öffnungen für die DNA zu schaffen, zwei Techniken:

- zum einen die Hitzeschock-Behandlung mit Calciumchlorid
- und zum anderen den Elektroschock (Elektroporation)

Am Schluss verglichen wir diese Techniken auf ihre Effektivität. Dabei stellten wir fest, dass beide Methoden funktionieren, aber die Elektroschockbehandlung effektiver verlief, also mehr Bakterien die veränderte DNA in sich trugen.

Doch warum sind diese Techniken von Bedeutung für ein Unternehmen wie die BASF?

Nun, ein Teil der BASF, genau genommen das Agrarzentrum, ist dafür zuständig, Nutzpflanzen resistent gegen verschiedene Schädlinge zu machen, also zum Beispiel Pilze, Bakterien oder Insekten. Früher wurden solche Experimente in Form von Kreuzungen von verschiedenen Pflanzen durchgeführt. Das ist zum einen sehr unsicher, da meist schon die nachfolgende Generation an Pflanzen andere genetische Eigenschaften besitzt und zum anderen ist es ein extrem langwieriger Prozess, der sich über Jahrzehnte hinziehen kann. Ein weiterer Nachteil von Züchtungen ist, dass man z.B. Mais nur mit anderen Mais-Sorten, nicht aber mit Radieschen oder Knoblauch kreuzen kann. Wenn also keine Mais-Sorte gegen eine bestimmte Krankheit resistent ist, aber zum Beispiel ein Bakterium, hat man durch Züchtung keine Chance. In der Gentechnik sieht das schon ganz anders aus: Die DNA des Bakteriums wird isoliert, der interessante Abschnitt, also der, in dem sich die Resistenz begründet, lokalisiert und wiederum isoliert und dann in die Mais-Samen eingebracht.

Durch diese Technik eröffnen sich extrem viele neue Möglichkeiten. Nicht nur Resistenz lässt sich durch Gentechnik verbessern, sondern auch der Ertrag und die Größe oder Stabilität und Qualität einer Pflanze. Sogar die Inhaltsstoffe einer Frucht lassen sich durch Gentechnik bestimmen. So gibt es die Züchtung einer Anti-Matsch-Tomate! Die BASF ist laufend dabei, neue Pflanzen zu testen und auf den Markt zu bringen. Der Prozess von der Idee bis zum Produkt ist jedoch extrem lang und kann mehrere Jahrzehnte dauern.

Danksagung

Ich möchte mich an dieser Stelle bei Inge Weber und allen Mitwirkenden der BASF für die ausgezeichnete Leitung des Seminars bedanken, wie auch bei der Jugendakademie Mannheim, die mir diesen Besuch ermöglicht hat. Vielen Dank an Frau König, die uns begleitet hat.

Haag, Juni 2015

Max Ackermann