

Daniel Knobloch

Sequenzierung und Charakterisierung der Triocephosphat-Isomerase aus *Tenebrio molitor* (Mehlwurm)

Diplomarbeit

BEI GRIN MACHT SICH IHR WISSEN BEZAHLT



- Wir veröffentlichen Ihre Hausarbeit, Bachelor- und Masterarbeit
- Ihr eigenes eBook und Buch - weltweit in allen wichtigen Shops
- Verdienen Sie an jedem Verkauf

Jetzt bei www.GRIN.com hochladen
und kostenlos publizieren



Bibliografische Information der Deutschen Nationalbibliothek:

Die Deutsche Bibliothek verzeichnet diese Publikation in der Deutschen Nationalbibliografie; detaillierte bibliografische Daten sind im Internet über <http://dnb.d-nb.de/> abrufbar.

Dieses Werk sowie alle darin enthaltenen einzelnen Beiträge und Abbildungen sind urheberrechtlich geschützt. Jede Verwertung, die nicht ausdrücklich vom Urheberrechtsschutz zugelassen ist, bedarf der vorherigen Zustimmung des Verlanges. Das gilt insbesondere für Vervielfältigungen, Bearbeitungen, Übersetzungen, Mikroverfilmungen, Auswertungen durch Datenbanken und für die Einspeicherung und Verarbeitung in elektronische Systeme. Alle Rechte, auch die des auszugsweisen Nachdrucks, der fotomechanischen Wiedergabe (einschließlich Mikrokopie) sowie der Auswertung durch Datenbanken oder ähnliche Einrichtungen, vorbehalten.

Impressum:

Copyright © 2002 GRIN Verlag
ISBN: 9783638142779

Dieses Buch bei GRIN:

<https://www.grin.com/document/6779>

Daniel Knobloch

Sequenzierung und Charakterisierung der Triosephosphat-Isomerase aus *Tenebrio molitor* (Mehlwurm)

GRIN - Your knowledge has value

Der GRIN Verlag publiziert seit 1998 wissenschaftliche Arbeiten von Studenten, Hochschullehrern und anderen Akademikern als eBook und gedrucktes Buch. Die Verlagswebsite www.grin.com ist die ideale Plattform zur Veröffentlichung von Hausarbeiten, Abschlussarbeiten, wissenschaftlichen Aufsätzen, Dissertationen und Fachbüchern.

Besuchen Sie uns im Internet:

<http://www.grin.com/>

<http://www.facebook.com/grincom>

http://www.twitter.com/grin_com

Sequenzierung und Charakterisierung der Triosephosphat-Isomerase aus *Tenebrio molitor*

Diplomarbeit

im Studiengang Biotechnologie
der technischen Fachhochschule Berlin
zur Erlangung des akademischen Grades eines Diplom-Ingenieurs (FH)

vorgelegt von
Daniel Knobeloch
April/2002

Inhaltsverzeichnis

1.	Aufgabenstellung.....	1
2.	Zusammenfassung	2
3.	Abkürzungsverzeichnis	3
4.	Einleitung	5
4.1	Rolle der TIM im Stoffwechsel	6
4.2	Regulation der Glycolyse	7
4.3	Triosephosphat-Isomerase in Insekten	7
4.4	Struktur der Triosephosphat-Isomerase.....	8
4.4.1	Aktives Zentrum	8
4.5	TIM-Genomorganisation (Introns und Exons).....	10
4.5.1	Frühe-Intron-Theorie	10
4.5.2	Späte-Intron-Theorie	10
4.6	Sequenzierungsmöglichkeiten	11
4.7	Rekombinante Expression	11
4.8	Wahl des Organismus	12
5.	Material.....	14
5.1	Geräte	14
5.2	Fein- und Biochemikalien	14
5.3	Verbrauchsmaterialien.....	16
5.4	Puffer	16
5.4.1	Standardpuffer	16
5.4.2	Puffer für Agarosegelelektrophorese.....	16
5.4.3	Puffer für die Aktivitätsbestimmung	16
5.4.4	Puffer für Einschlusskörper-Reinigung	17
5.4.5	Puffer für Polyacrylamidgelelektrophorese.....	17
5.4.6	Puffer für Affinitätschromatographie	18
5.4.6.1	Ni-NTA-Säule	18
5.4.6.2	9E10-Säule	18
5.5	Kits	18
5.6	Primer	19
5.7	Vektoren	20
5.8	Proteine.....	20
5.9	Stämme	20
5.10	Marker	21
5.11	Präparat.....	21
5.12	Medien.....	21
5.13	Software.....	22
6.	Methoden.....	23

6.1	Nukleinsäure-Analytik	23
6.1.1	RNA-Präparation	23
6.1.2	cDNA-Synthese	23
6.1.3	cDNA-Amplifikation	24
6.1.4	Gelelektrophorese	25
6.1.5	PCR-Reinigung	25
6.1.6	Amplifikation der TIM-Sequenz	25
6.1.7	DNA-Präparation und Sequenzierung	25
6.1.8	RACE-PCR	26
6.2	Konstruktion, Transformation und Expression	28
6.2.1	pGP-S100 Vektor	28
6.2.1.1	Ligation und Transformation	29
6.2.1.2	Expression	29
6.2.2	pGP-ST2 Vektor	29
6.2.2.1	Ligation und Transformation	29
6.2.2.2	Expression	29
6.2.3	pCR T7/NT Vektor	30
6.2.3.1	Konstruktion und Reinigung des Inserts	30
6.2.3.2	Ligation und Transformation	31
6.2.3.3	Expression	31
6.3	Zellaufschluss	32
6.3.1	French Press	32
6.3.2	Ultraschall	32
6.4	Proteinfraktionierung	32
6.4.1	Probenvorbereitung	32
6.4.2	Totallysat	32
6.4.3	Lösliche und unlösliche Proteine	32
6.4.4	Periplasma-Gewinnung	33
6.4.5	Einschlusskörper-Reinigung	33
6.5	Proteinreinigung (Affinitätschromatographie)	33
6.5.1	Ni-NTA-Säule mit Stufenelution (pGP ST2)	33
6.5.2	Ni-NTA-Säule mit linearer Elution (pCR NT/T7)	33
6.5.3	9E10-Säule mit einfacher Elution (pCR NT/T7):	34
6.6	Proteinanalytik	34
6.6.1	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese	34
6.6.2	Western-Blot	34
6.6.3	Coomassieblue-Färbung	35
6.6.4	Aktivitätsbestimmung	35
7.	Ergebnisse und Diskussion	36

7.1	Sequenzierung der Triosephosphat-Isomerase	36
7.1.1	RNA-Präparation	36
7.1.2	Reverse-Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion (RT-PCR)	37
7.1.3	Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	38
7.1.4	Reinigung, Minipräparation und Restriktionsanalyse	40
7.1.5	Sequenzierungsergebnis	40
7.1.6	Sequenzierung der DNA	43
7.1.7	Intronvergleich	44
7.1.8	<i>5'/3'-Rapid Amplification of either 5' or 3' cDNA Ends</i> -Polymerase Kettenreaktion	46
7.1.8.1	5' RACE-PCR	46
7.1.8.2	5' <i>Nested-PCR</i>	47
7.1.8.3	3'-RACE-PCR	48
7.2	Vektorenauswahl und Konstruktion der Inserts	49
7.2.1	Konstruktion des Inserts für den pGP-S100-Vektor	49
7.2.2	Konstruktion des Inserts für den pGP-ST2-Vektor	52
7.2.3	Konstruktion des Inserts für den pCR-NT/T7-Vektor	53
7.3	Expression in verschiedenen Systemen	54
7.3.1	Expression in XL1 <i>E.coli</i> Zellen mit dem pGP-S100-Vektor	54
7.3.2	Expression in XL-1 <i>E.coli</i> Zellen mit dem pGP-ST2-Vektor	56
7.3.3	Affinitätschromatographie an der Ni-NTA-Säule	57
7.3.4	Expression in BL21(DE3) pLysS <i>E.coli</i> Zellen mit dem pCR-T7/NT-Vektor	60
7.3.5	Affinitätschromatographie an der Ni-NTA-Säule	61
7.3.6	Affinitätschromatographie an der 9E10 Säule	64
7.4	Charakterisierung der Triosephosphat-Isomerase	66
7.4.1	Aktivitätsbestimmung	66
7.4.2	Strukturmodellierung	67
7.4.3	Strukturvergleich	68
7.5	Abschlußdiskussion	71
8.	Literatur	73