

Informationsblatt zu den Blue Genes Versuchen für Lehrer

Blue Genes Versuch 1

Schneiden des pGEM®-5Zf(+) Vector mit PvuI und EcoRV

Benötigte Materialien

Promega

P2241 pGEM®-5Zf(+) Vector
R6351 EcoRV, 2000u, 10u/μl (inkl. Buffer D, 10x, BSA)
V4251 TBE Buffer, 10X, Molecular Biology Grade
V3121 Agarose, LE, Analytical Grade
G5711 1kb DNA Ladder
P1193 Nuclease-Free Water, 50ml (*oder P1197* 500ml)

Sigma

A4043-5G Azure B-Chlorid, 5g

NEB

R3150S PvuI-HF, 500u, 20u/μl

Verbrauchsmaterialien und Geräte siehe S.2

Blue Genes Versuch 2

- A. Schneiden des pGEM®-5Zf(+) Vector mit EcoRV
- B. Ligieren des Kontroll-Inserts in den pGEM®-T Vector

Benötigte Materialien

A.

Promega

P2241 pGEM®-5Zf(+) Vector
R6351 EcoRV, 2000u, 10u/μl (inkl. Buffer D, 10x)
V4251 TBE Buffer, 10X, Molecular Biology Grade, 1000ml
V3121 Agarose, LE, Analytical Grade, 100g
G5711 1kb DNA Ladder
P1193 Nuclease-Free Water, 50ml (*oder P1197* 500ml)

Sigma

A4043-5G Azure B-Chlorid, 5g

B.

Promega

A3610 pGEM®-T Vector System II
inklusive:
- Control Insert DNA
- T4 DNA Ligase
- 2X Rapid Ligation Buffer
- 6 x 200μl JM109 Competent Cells, High Efficiency
9PROPBLUE Blue Genes Control Insert (*id. Control Insert DNA*)
V3955 IPTG
V3941 X-Gal
Optional: **L2001** JM109 Competent Cells, H.E., 5 x 200μl

Sigma

T7293-250G Tryptone
92144-500G-F Yeast Extract
S5150-1L Sodium Chloride Solution 5M
(*Alternative zu obigen 3 Produkten:*
L2542-500ML LB Broth)
A9518-5G Ampicillin

Bio-Rad
166-0600EDU LB-Agar, 20 g

Bio-Rad

164-5050EDU Netzgerät PowerPac Basic mit 4 Ausgängen (Anschlüsse für 4 Elektrophorese-Zellen)
166-4270EDU Mini-Sub Cell GT System mit 7 x 7cm Gelträger, 1x 8-well-Kamm und Gelgießbrücken
170-4465EDU 15-well Kamm
223-9347EDU TBR-35 Pipettenspitzen, 5 Racks à 200 Stück mit Deckel, gesteckt
223-9318EDU MTP-38-S Pipettenspitzen, 10 Racks à 96 Stück mit Deckel, gesteckt, steril
223-9038EDU BR-38 Pipettenspitzen, 1000 Stück, lose im Beutel
223-9480EDU Micro Test Tubes natur, 1,5 ml Polypropylen, 500 Stück
166-0551EDU Bio-Rad Classroom Digital Micropipet 2-20 µl mit Spitzenabwerfer
166-1002EDU Blue Genes Accessory Kit enthält: 20 kleine Petrischalen, je 10 große und kleine autoklavierbare Abfallbeutel, 10 Färbeschälchen und 10 Schaumstoff-Racks

Bestellungen

Promega	Bio-Rad	Sigma-Aldrich (Merck)	NEB
Auftragsannahme	Bestellannahme	Customer Service	Kundenservice
+49 621 8501-291	+49 89 31884-311	+49 89 6513 0	0800-2465227 (D) 00800/24652277 (AT)

Bitte beachten Sie, dass die kompetenten Zellen per Terminzustellung auf Trockeneis geliefert werden und weiter auf Trockeneis bzw. bei -70°C gelagert werden müssen, was max. 2 im verschlossenen Paket möglich ist. Eine Lagerung bei -20°C ist nicht ausreichend. Planen Sie daher Ihr Experiment so, dass Sie die Zellen nicht an einem Montag oder Dienstag Vormittag benötigen.

Technische Fragen zum Experiment richten Sie bitte an die Technische Beratung der Firma Promega:
+49 621 8501-290 de_techserv@promega.com
oder im Chat auf promega.com/de (bei Kontakt auf Technische Beratung klicken)

Kommentar zur Biologischen Sicherheit

Gemäß Gentechnikgesetz § 3c. gilt nicht als Verfahren der Veränderung genetischen Materials

- c) Selbstklonierung nicht pathogener, natürlich vorkommender Organismen, bestehend aus
- aa) der Entnahme von Nukleinsäuresequenzen aus Zellen eines Organismus,
 - bb) der Wiedereinführung der gesamten oder eines Teils der Nukleinsäuresequenz (oder eines synthetischen Äquivalents) in Zellen derselben Art oder in Zellen phylogenetisch eng verwandter Arten, die genetisches Material durch natürliche physiologische Prozesse austauschen können, und
 - cc) einer eventuell vorausgehenden enzymatischen oder mechanischen Behandlung.

Zur Selbstklonierung kann auch die Anwendung von rekombinanten Vektoren zählen, wenn sie über lange Zeit sicher in diesem Organismus angewandt wurden.

Entscheidend für das Klonierungs-Experiment mit pGEM®-T Vector ist der letzte Satz. Das Produkt mit Vektor und Kontrollinsert ist seit über 20 Jahren am Markt.

Erläuterungen zum Versuch 2

Die Klonierung eines Inserts in den pGEM®-T Vector unterbricht die für β -Galaktosidase kodierende Sequenz, wodurch rekombinante Klone als weiße Kolonien auf Blau/Weiß-Selektionsplatten identifiziert werden können.

Die Control Insert DNA aus dem pGEM®-T System ist ein 542 bp langes Fragment aus dem pGEM®-luc Vector (E1541), die so mutiert wurde, dass sie in allen sechs Leserahmen mehrere Stoppkodons enthält.

Durch geringe Verunreinigungen mit ungeschnittenem und nicht mit T-Überhängen versehenem geschnittenem Vektor ergibt sich ein gewisser Hintergrund an blauen Kolonien, die auch in der Kontrollreaktion ohne Insert wachsen (bei der im Versuch verwendeten Verdünnung kann man zwischen 0 und maximal einem Dutzend blauer Kolonien erwarten).

Hinweise:

Das pGEM®-T Vector System II enthält 12 μ l Control Insert DNA, d.h. es muss in jedem Fall zusätzliches Control Insert bestellt werden (Bestell-Nr. 9PROPBLUE Blue Genes Control Insert, 40 μ l).

Das Kit enthält 6 x 200 μ l kompetente Zellen. Dies reicht für 4 Gruppen plus Kontrollreaktionen. Der Vektor im Kit reicht für bis zu 10 weitere Gruppen. Dafür können weitere kompetente Zellen (Produkt-Nr. L2001, 5 x 200 μ l) für je 5 Gruppen bestellt werden.

Bitte beachten Sie, dass die Abpackung zu 6 Röhrchen à 200 μ l ausschließlich als Bestandteil des pGEM®-T Vector System II (Teilprodukt-Nr. L2004) erhältlich ist und nicht einzeln bestellt werden kann.