Phillips Universität – Marburg

Biochemie Masterpraktikum BC-MPR

Wintersemester 2022/23

GENTECHNIK

vorgelegt von

[redacted]

Matrikelnummer: [redacted]

Studienfach: Chemie

Box 3, Platz 13

Betreuer: Alexandra Kilb & Kristin Velten (AG GRAUMANN)

Versuchsdatum: 24.10.22 Abgabedatum: 28.11.22

Inhaltverzeichnis:

1. Einleitung 1
1.1 Biologische Theorie 1
1.1.1 Gentechnik 1
1.1.2 Bakterium *E. coli* 2
1.1.3 *Mm*CPDII 3
1.1.4 Plasmid pET-28a(+) 3
1.2 Aufgabenstellung 4
2. Material 5
3. Methoden 5
3.1 PCR Fragmentation 5
3.2 DNA-Gelelektrophorese, DNA-Aufreinigung 6
3.3 Restriktionsverdau 6
3.4 Ligation und Transformation 7
3.5 Anzucht von Kolonien auf LB-Agarplatten, Bestimmung der relativen Transformationseffizienz 8
3.6 Plasmidpräparation und Kontrolle durch Gelelektrophorese 9
3.7 Vereinzelung von Mikroorganismen 10
4. Ergebnisse 10
4.1 PCR-Fragmentation, Aufreinigung mittels Gelelektrophorese, Restriktionsverdau 10
4.2 Ligation und Transformation 11
4.3 Bestimmung von Transformationseffizienz 12
4.4 Plasmidpräparation 14
4.5 Vereinzelung von Mikroorganismen 15
5. Diskussion 16
6. Literaturverzeichnis 17

1. Einleitung

Im Versuch wird eine Klonierung von genetisch modifizierten *E. coli* DH5α, wobei wird eine rekombinanter Plasmid-DNA pET-28a(+)-*Mm*CPDII in den entsprechende *E.coli* transformiert und weiter amplifiziert, danach wird die Konzentration dieser Plasmid-DNA mittels Nanophotometrie bestimmt.

1.1 Biologische Theorie

1.1.1 Gentechnik

Gentechnik ist die Technik zur Darstellung von rekombinanten DNA. Sie ist ein Teilgebiet der Biotechnologie und beschäftigt mit der Forschung und Modifizierung von Erbmaterial. In anderen Worten: das Erbgut von lebenden Organismen wird verändert, wobei fremden Genmaterials in Organismen übertragt und eingebaut werden. [1] Die genetische Klonierung von DNA in Bakterien ist ein wichtiges Teil der Molekularbiologie. Ein Klon von einer DNA wird erfolgreich dargestellt, welches eine identische Kopie zu dem entsprechenden DNA ist, und in einen Vektor (z.B ein Plasmid) intergiert und in Zellen eingebracht. [2] Das Einbau der DNA-Fragment, die als Insert genannt ist, in einen Vektor wird als die Ligation bezeichnet. Wird der neu dargestellte Klon in einer Bakterienzelle eingeführt, dann kann das Klon weiter nach der Replikation der Zellen an Tochterzellen weitergegeben werden. Die ursprüngliche DNA wird in Bakterienzellen vermehrt und in weitere Untersuchungen nach Eigenschaften, Modifikation oder anderen Prozessen verwendet werden.

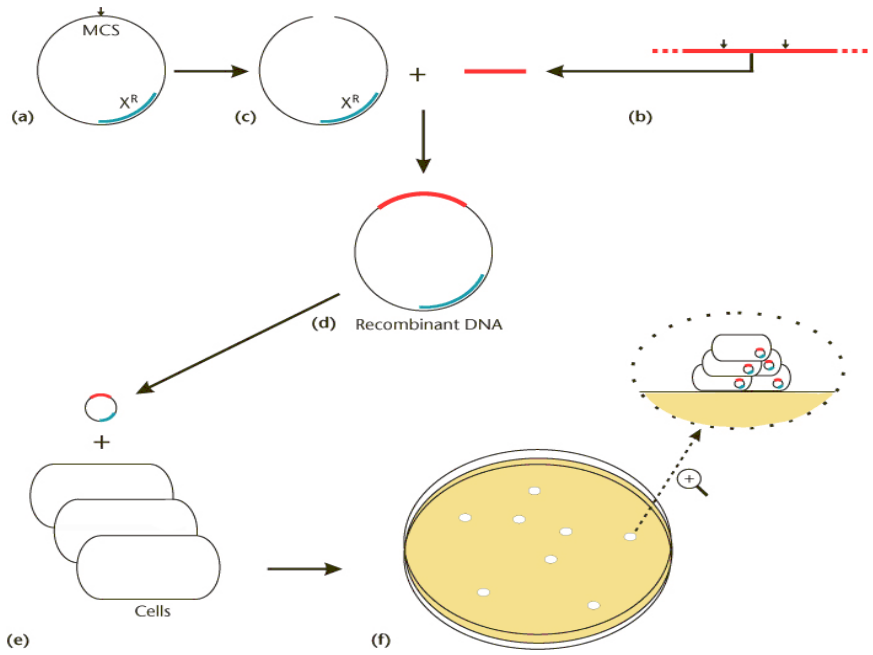


Abbildung 1. Schematische Darstellung einer Klonierung. In einen gewählten Vektor (a) wird das Gen (b) eingebaut und die rekombinante DNA (d) wird in kompetenten Bakterienzellen (e) transformiert. [2]

Aufgrund ihrer schnellen Produktionszeit, Kosteneffizienz, und Zuverlässigkeit wird Klonierung in mehreren Gebieten anwendet. In klinischer Untersuchung spielt die Klonierung eine Rolle, wobei sie als der Initiationschritt für weitere Forschungen mit rekombinanten Antigenen, antimikrobiellen Peptiden, modifizierten Impfstoffen… [3] Bei der Klonierung und Modifizieren einer DNA werden auch genetische Diversität von Molekülen allen Organismen untersucht. [4] Außerdem wird die Klonierung als eine häufig verwendete Methode in genetische Therapie: Multiplizieren von DNA hilft bei der Untersuchung und Reparieren von zerstörten oder fehlerhaften Gene bzw. ist für die Herstellung von künstlichen Organen und Prothesen notwendig. [5] In diesem Versuch befasst sich Gentechnik um die Fragmentation von Zielprotein, Ligation und Transformation der neuen Gene in *E. coli* Bakterien.

1.1.2 Bakterium *E. coli*

Das Bakterium *Escherichia coli* wird als Zielzelle untersucht, weil *E. coli* in der am besten untersuchten Bakteriengruppe (prokaryotische Organismen), leichter handhabbar und einfacher strukturiert als eukaryontische Organismen ist. *E. coli* ist ein stäbchenförmiges, ca. 2.4 µm langes Enterobakterium, das unter anderem im Darm von Tieren lebt. [6] Es kann sich bei 37°C und in LB-Medium kultiviert etwa alle 20 Minuten teilen – diese Eigenschaft ist für eine schnelle und exponentielle Replikation der Bakterienzellen bzw. die Klonierung von Erbgut mittels E. coli sehr wichtig. [7] Das Bakterium erhält keinen Zellkern, sondern liegt die ringförmig DNA im Cytoplasma vor. Wegen der einfachen Struktur ist die Änderung am Gen im Phänotyp sichtbar. *E. coli* Bakterien besitzen die Plasmide, die doppelsträngige, ringförmige DNA-Moleküle sind. Diese autonom replizierbaren Plasmide tragen Gene für die Inaktivierung von Antibiotika, die Produktion von Toxinen und den Abbau natürlicher Produkte. In diesem Versuch wird die modifizierte *E. coli* DH5α verwendet. Diese Zellen besitzt wegen der *rec*A1-Mutation eine vernünftige Rekombinationseffizienz, um bis zu sechs doppelsträngige DNA-Fragmente im Größenbereich von 150 bp bis mindestens 7 kbp in vivo zu Plasmiden zusammenzusetzen. [8] In der Biotechnologie wird diese Eigenschaft häufig benötigt, weil nur eine geringe DNA-Mengen gebraucht wird, um eine große Menge von Protein zu multiplizieren. Außerdem besitzt *E. coli* DH5α eine *end*A-Mutation, darauffolgt, dass die Zellen eine Aktivitätshemmung von Endonukleasen. Solche Mutation versichert, dass eine hochquantifizierte DNA-Produktion problemlos verlaufen kann. [9]

1.1.3 *Mm*CPDII

Das Protein *Mm*CPDII gehört zu der Klasse II Subtyp der Photolyasen aus der archaealen Gattung *Methanosarcina* und wird von dem Organismus *Methanosarcina mazei Gö1* gewonnen. [9] Das Protein *Mm*CPDII ist eine der CPD-Photolyasen (engl. *Cyclobutane pyrimidine dimer photolyase*) sind DNA-Reparaturenzyme. Sie enthalten das Coenzym Flavin-Adenin-Dinukleotid (abg. FAD), welches mit der Energie des Sonnenlichts (350 – 450 nm) durch den Einelektronen-Übergang den Elektronden UV-induzierten Schaden CPD im Erbgutmaterialen wie DNA entfernen kann. [10]

1.1.4 Plasmid pET-28a(+)

Für den Versuch wurde das Insert *Mm*CPDII mittels eines Plasmids in eines kompetenten *E. coli*-Stamms eingebaut. Bei dem Einführen der DNA ist ein Transportplasmid (Vektor) benötigt, im Versuch wurde das Plasmid pET-28a(+) verwendet (Abb. 2) , um das *Mm*CPDII Gen in *E. coli*-Zellen einzubringen. Das Plasmid ist leicht isolierbar und replizieren sich unabhängig vom Genom am *origin of replication* (ori). Das verwendete Plasmid pET-28a(+) besitzt eine Schnittstelle für die Restriktionsenzyme *NcoI* und *XhoI*, über welche fremde DNA-Fragmente eingefügt werden (MCS multiple cloning site) können. Zusätzlich verfügt das Plasmid über eine Kanamycin-Resistenz sowie einen T7 Promotor.

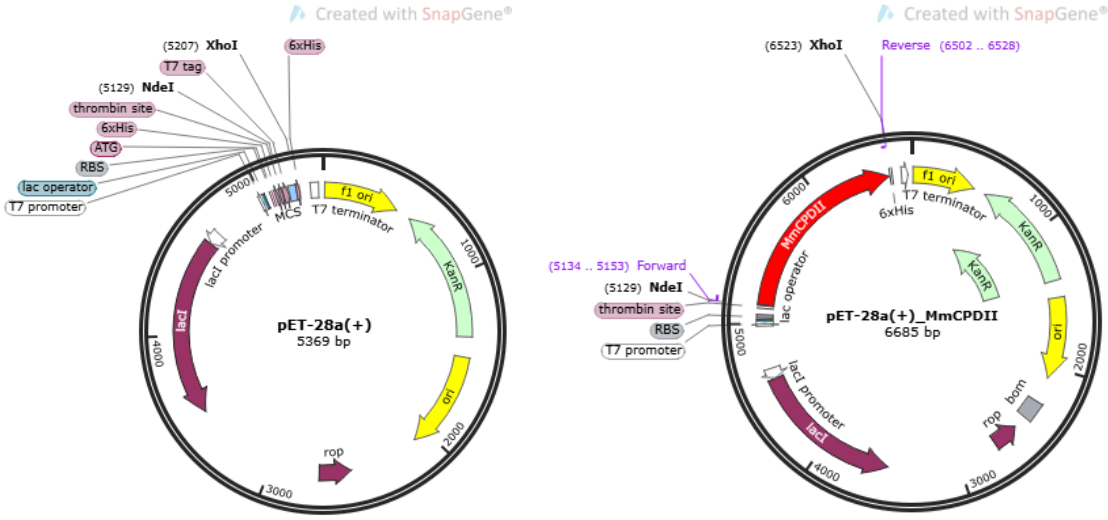


Abbildung 2. Darstellung der Plasmidkarten mittels des Programm SnapGene: Struktur des Plasmids pET-28a(+) (links) und des neu dargestellte Plasmid pET-28a(+)_MmCPDII. Die beide Enzyme NdeI und XhoI (fett) sowie die verwendete forward und reverse Primer (lila) sind auf der Karte beschriftet.

1.2 Aufgabenstellung:

In diesem Versuch sollen das Plasmid pET-28a(+)_*Mm*CPDII dargestellt werden. Die chromosomale DNA des Proteins *Mm*CPDII werden mittels PCR fragmentiert, durch den Verdau und Ligation wird das Gen *Mm*CPDII in Plasmid pET-28a(+) eingebaut. Das neu dargestellte Plasmid pET-28a(+)_*Mm*CPDII wird in *E. coli* Bakterienzellen transformiert (Klonierung) und weiter kultiviert. Die Plasmide werden aus Bakterienkultur isoliert und mittels weiterer Verfahren (Konzentrations- und Reinheitkontrolle) analysiert.

2. Material

Tabelle 1: Verwendete Materialen nach Arbeitsschritten

PCR Fragmentation	• verdünnte chromosomale DNA des Proteins (ca. 50 ng, 1 µL) • dNTP (je 10 mM, 1 µL) • 5'-Primer (20 µM, 2 µL) • 3'-Primer (20 µM, 2 µL) • $MgCl_2$ (25 mM, 1 µL) • 5× Phusion-Puffer (10 µL) • Polymerase (Phusion) (0.5 µL) • DMSO (2.5 µL) Alle Ansätze wird auf 50 µL mit sterilem ddH_2O auffüllen
Gelelektrophore	• 50x TAE-Puffer (pH 8.5, 100 mL): Tris (24.2 g), Essigsäure (5.71 mL), Na2EDTA-Salz (1.86 g) • 1 % (w/v) Agarosegel: Agarose (0.6g), 1x TAE-Puffer (60 mL) • Midori Green Lösung • 6x Probenpuffer: Bromphenolblau 0,25% (w/v), Xylencyanol 0,25% (w/v), Ficoll-40 15% (w/v).
Qiagen-Säule Aufreinigung	• QIA quick PCR Purification Kits (Qiagen) • PB-Puffer • PE-Puffer • EB-Puffer • QG-Puffer

	• Isopropanol
Restriktionsverdau	• DNA (500 ng): PCR-Produkt/Insert (c=173.2 ng/µL, V=2.88 µL), Plasmid (c=70.2 ng/µL, V=7.12 µL) • Enzym *NdeI* (20 U, 1 µL) • Enzym *XhoI* (20 U, 1 µL) • 10x CS (Cut Smart)-Puffer (5 µL) • CIP-Enzym (1 µL) Alle Ansätze wird auf 50 µL mit sterilem ddH_2O auffüllen
Ligation	• DNA: Insert (c=19.6 ng/µL), Vektor (c=21.9 ng/µL, 30 ng) • 10x Lygase-Puffer (1 µL) • Ligase-Enzym (1 µL) Alle Ansätze wird auf 10 µL mit sterilem ddH_2O auffüllen
Transformation	• LB-Medium: Bactotrypton (10 g/L), Hefe (5 g/L), Natriumchlorid (10 g/L), ddH_2O. • LB-Agarplatten: 1.6% (w/v) Bacto Agar in LB-Medium, mit oder ohne Kanamycin.
Plasmidpräparation	• Qiaprep 2.0 spin-Säule • P1-Puffer: RNase A. • P2-Puffer: 96-100% Ethanol • N3-Puffer • PE-Puffer • EB-Puffer

3. Methoden

3.1 PCR Fragmentation:

In einem PCR-Gefäß wurde erstmal ddH_2O (30 µL), danach alle Ansätze (siehe Tabelle 1, PCR-Fragmentation), anschließend wurde die DNA pipettiert. Als Negativ-Kontrolle wurde ddH_2O anstatt DNA-Ansatz eingegeben. Die PCR-Gefäße wurden nach der Zugabe von DNA gemischt und kurz zentrifugiert (13 000 rpm, 1 Minute). Die PCR-Gefäße wurden auf einem Heizblock bei 66°C in 1 Minute erhitzt, danach wurden die beide PCR-Ansätze mittels Agarose (DNA)-Gelelektrophorese getrennt.

3.2 DNA-Gelelektrophorese, DNA-Aufreinigung:

Nach der PCR-Fragmentation soll die DNA auf das Agarosegel aufgetragen, elektrophoretisch getrennt und visualisiert werden (Abb. 4). Das 1 % (w/v) Agarosegels wurde aus Agarose (0.6 g) in 1x TAE-Puffer (60 mL) aufgekocht. Nach dem Abkühlen (auf ca. 40-50°C) wurde die Agaroselösung mit der Midori Green-Lösung (3 µL) versetzt und in eine 10 × 14 cm große Gelkammer gegossen. Der Kamm wurde direkt in das flüssige und luftblasenfreie Gel am oberen Ende eingesetzt. Nach dem Erstarren wurde das Agarosegel mit 1x TAE-Puffer überschichtet und der Kamm wurde entfernt. Die PCR-Fragmente (8 µL) wurden mit 6× Probenpuffer (2 µL) und ddH2O (2 µL) versetzt und in die Geltaschen pipettiert (insgesamt 12 µL). Auf dem Gel wurden auch die negative Kontrolle (12 µL) und 1kb-Leiter (4 µL) getragen. Die Elektrophorese erfolgte bei einer konstanten Spannung von 150 V in 30-40 Minuten. Anschließend wurden die DNA-Fragmente im UV-Durchlicht bei λ = 312 nm (Abb. 3) detektiert. Die PCR-Ansätze wurden mit dem Fünfachen Volumen an PB-Puffer versetzt und auf eine QIA *quick spin*-Säule (Qiagen Säule) aufgetragen, danach bei 13 000 rpm für 1 Minute zentrifugiert. Der Durchlauf wurde nochmal aufgetragen und nach der zweiten Zentrifugation verworfen, um das Ausbeute zu erhöhen. Nächsten wurde das Waschpuffer PE-Puffer (750 µL) auf die Säule pipettiert, wieder bei 13 000 rpm in 1 Minute zentrifugiert. Der Durchfluss wurde geworfen und die Säule wurde neu zentrifugiert, anschließend in einen neuen 1.5 mL Eppendorf-Cup gestellt. Die DNA auf der Matrix wurde mit EB-Puffer (40 µL) in 1 Minuten inkubiert, nach der Zentrifugation (13 000 rpm, 1 Minute) wurde die Elution gewonnen. Die Konzentration der eluierten DNA-Probe wurde mit Hilfe des Nanodrop-Photometers bestimmt.

3.3 Restriktionsverdau

Der Restriktionsverdaue wurde durchgeführt, um Vektor- und Insert-DNA auf die Ligation vorzubereiten. Die PCR-Fragment bzw. Plasmid wurden mit den Enzyme *NdeI*, *XhoI* und Cut-Smart-Puffer versetzt (siehe Tabelle 1, Restriktionsverdau).

Um die Selbst-Ligation in dem Plasmid zu vermeiden, wurde eine Plasmid-Dephosphorylierung während des Verdaus durchgeführt. In dem Plasmid-Ansatz wurde das *Calf-intestinal alkaline phosphatase* (abg. CIP) Enzym (1 µL) pipettiert, um die Phosphatgruppe zu hydrolysieren und freizusetzen. Die Verdau-Ansätze wurden bei 4ºC über Nacht inkubiert. Anschließend wurden die Restriktionsverdaue auf 0.8% (w/v) Agarosegel aufgetragen und elektrophoretisch getrennt. Die Gelschnitte des

Inserts und Vektors wurden ausgeschnitten; pro 100 mg Gel wurden mit QG-Puffer (300 µL) versetzt und bei 50ºC in 10 Minuten inkubiert, bis alle Gelschnitten verflüssigt und eine gelbe Lösung entstand. Für jeden Gelvolumen wurde mit dem gleichen Volumen des Isopropanol gemischt und bis maximal 800 µL des Gemisches wurde auf eine Qiagen-Säule in 2mL Eppendorf-Cup pipettiert und zentrifugiert (13 000 rpm, 1 Minute). Das Prozess wurde dreimal wiederholt, der Durchfluss wurde geworfen. Auf die Matrix wurde PE-Puffer (750 µL) gegeben, zentrifugiert (13 000 rpm, 1 Minute) und den Durchfluss verworfen. Die Säule wurde nochmal zentrifugiert und in ein neues 1.5 mL Eppendorf-Cup gestellt. EB-Puffer (25 µL) wurde in die Mitter der Matrix pipettiert, in 1 Minute inkubiert und die DNA wurde in Durchfluss nach Zentrifugation gewonnen.

3.4 Ligation und Transformation

In der Ligation wurden die beiden DNA-Fragmente (Insert und Vektor) enzymkatalysiert mittels des Enzyms Ligase verknüpft, wobei es zwischen das 3'-Hydroxy-Ende mit dem 5'-Phosphat-Ende der DNA einer Phosphodiesterbindung entstand. Die Ligation Ansätze für die Verhältnisse Vektor:Insert von 1:3 und 1:5 wurden versetzt (siehe Tabelle 1, Ligation). Das ddH_2O wurde am Ersten vorgelegt und das Ligase-Enzym zum Schluss gegeben. Die Ligation-Ansätze wurden bei RT über Nacht inkubiert. Die heterologe Genexpression wird danach als die Synthese eines Genprodukts, um ein bestimmtes Protein in einen anderen Organismus einzubringen. Nach der Ligation wurde das Plasmid pET-28a(+)_*Mm*CPDII (10 µL) in durch das $CaCl_2$-Salz kompetent gemachte *E. coli*-Zellensuspension (100 µL) versetzt und auf Eis in 10 Minuten gehalten. Durch einen kurzen Hitzeschock bei 42ºC in 2 Minuten könnten diese Zellen das gewünschte DNA-Schnitt aufnehmen, sie wurden erneut auf Eis in 5 Minuten gehalten. Danach wurde LB-Medium (700 µL) dazugegeben und bei 37ºC in 1 Stunde inkubiert. Die entstehende transformierte *E. coli*-Zellen wurden auf LB-Medium Agarplatte übertragen (siehe Tabelle 2). Kanamycin ist ein Antibiotikum, welches zur Entfernung der ohne fremdes Protein erhaltene Zellen und kontaminierter Organismen dient. Die LB Agarplatten wurden bei 37ºC über Nacht inkubiert.

Tabelle 2. Transformationsreihe des Plasmids auf LB Agarplatten

Vektor: Insert	positive Kontrolle	negative Kontrolle	eigene Ansatz
1:3	vor und nach Zentrifugation: auf LB + Kanamycin	vor Zentrifugation: auf LB ohne Kanamycin nach Zentrifugation: auf LB mit Kanamycin	ohne und nach Zentrifugation: auf LB mit Kanamycin
1:5	ohne und nach Zentrifugation: auf LB mit Kanamycin	ohne und nach Zentrifugation: auf LB mit Kanamycin	ohne und nach Zentrifugation: auf LB mit Kanamycin

3.5 Anzucht von Kolonien auf Agarplatten und Bestimmung der relativen Transformationseffizienz:

Zur Abschätzung der Transformationeffizienz wurden die Kolonien auf den Agarplatten gezählt werden. Das Plasmid mit der Konzentration von 25 ng/µL wurde in 100 µL Zellsuspension unter den gleichen Bedingungen wie 3.4 transformiert. Zwei Eppendorf-Cups für Plasmid (2 Ansätze: 50 ng und 100 ng) wurden vorbereitet, die Plasmide wurden mit LB-Medium (700 µL) versetzt. Eine Verdünnungsreihe den beiden Ansätzen wurde gemacht von 10^{-1} bis 10^{-9}-fach Verdünnung. Von jedem Ansatz wurden die 10^{-6} und 10^{-9} Verdünnungsgemische auf LB Agarplatten geimpft (siehe Tabelle 3).

Tabelle 3. Verdünnungsreihe der Bakterienkultur für die Bestimmung der relativen Transformationseffizienz

	10^{-6}	10^{-9}
50 ng	Auf LB Agarplatten (mit/ohne Kanamycin)	Auf LB Agarplatten (mit/ohne Kanamycin)
100 ng	Auf LB Agarplatten (mit/ohne Kanamycin)	Auf LB Agarplatten (mit/ohne Kanamycin)

Nach der Inkubation bei 37°C über Nacht wurde die Anzahl von Kolonien bestimmt und die Transformationseffizienz berechnet.

3.6 Plasmidpräparation und Kontrolle durch Gelelektrophorese:

In diesem Versuchsteil wurden die Plasmide aus Bakterienkulturen im Mini-Maßstab zur weiteren Verarbeitung isoliert. Die Plasmid-DNA aus *E. coli* wurde nach dem alkalischem Zellaufschluss aufgrund ihrer stabilen superhelikalen Struktur im Überstand gewonnen. Diese DNA wurde über die anionenaustausche Methode (Qiagen QIAprep® Spin Miniprep Kits) vereinigt. Die Kultur von der Transformation (2 mL) wurden zweimal in einen 2 mL Eppendorf-Cups bei 13 000 rpm in 5 Minuten zentrifugiert, der Überstand wurde nach jedem Schritt verworfen. Das Zellpellet wurde in P1-Puffer (250 µL) resuspendiert und mit P2-Puffer (250 µL) versetzt, schnell durch Invertieren vermischt. Das Gemisch wurde mit N3-Puffer (350 µL) versetzt und schnell durch Invertieren mischen, danach bei 13 000 rpm in 10 Minuten zentrifugiert. Nach der Zentrifugation wurde der Überstand (max. 800 µL) in eine QIAprep 2.0 spin Säule überführt bei 13 000 rpm in 1 Minute zentrifugiert, der Durchfluss wurde verworfen. Auf die Säule wurde PE-Puffer (750 µL) gegeben und erneut zentrifugiert, der Durchfluss wurde verworfen. Die Säule wurde in ein neues 1.5 mL Eppendorf-Cup gestellt; EB-Puffer (50 µL) wurde auf die Säule pipettiert und in 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurde die Säule bei 13 000 rpm in 1 Minute zentrifugiert. Im Folgenden wurden die Konzentration und Reinheit der erhaltenen Plasmide bestimmt werden.

Zu der Analysemethode ergibt sich die Bestimmung von DNA bzw. Proteinkonzentration mittels eines Nanophotometers und in Reinheit mittels der Gelelektrophorese. Die DNA-Konzentration in Lösung wurde durch Extinktionsmessung bei einer Wellenlänge von 260 nm und 280 nm. Das Verfahren basiert auf dem Absorptionmaximum der Nukleinsäuren bei 260 nm und Protein bei 280 nm. Die Absorption A von 1.0 entspricht einer DNA-Konzentration von 50 ng/µL (für doppelsträngige DNA (dsDNA)). Davon gilt:

$$c_{dsDNA}\ (\text{ng/µL}) = A_{260} \times 50\ \text{ng/µL}.$$

Eine reine DNA-Lösung kann durch das Quotient der Absorbtion bei 260- und 280 nm bestimmt. Besitzt das Quotient einen Wert zwischen 1.8 und 2.0, wurde die DNA-Lösung als „rein“ verzeichnet. Hier wurden 2 Plasmidproben gemessen:

Tabelle 4. Konzentrationsbestimmung mittels des Nanodrops.

	c(ng/µL)	$A_{260/280}$
Probe 1	173.2	1.58
Probe 2	51.2	1.61

Von der Probe 2 wurde die Probe 3 als ein Restriktionsverdau unter gleichen Bedingungen wie 3.3 dargestellt. Mittels der Gelelektrophorese wurden die DNA bzw. Proteine der drei Proben von anderen Bestandteilen getrennt Der hydrophile Teil der DNA ist stark negativ, er dient dazu, dass die Anode in einer elektrischen Spannung das negativ geladene Protein anzieht, die laufende Geschwindigkeit von Proteinen wird nach molekularer Masse unterschiedlich groß sortiert.

3.7 Vereinzelung von Mikroorganismen

In diesem Versuchsteil wurde eine Reinkultur aus gleichartigen Mikroorganismen dargestellt und angezüchtet, um einen genetisch untereinander identischen Klon zu gewinnen. Für die Vereinzelung wurden zwei verschiedene Methode verwendet: 13-Strich-Verfahren und 3-Ösenausstrich-Verfahren. Das Prinzip beider Methoden ist identisch: auf die Verdünnung (Verdünnungsaustrich) kann die Kultur möglich dünn verteilt, um einzelne Klonen zu anzüchten. Mit einer sterilen Pipettenspitze wurde ein Bakterienklon entnommen und in einer Linie in der Platte ausgestrichen. Für jede neue Linie oder Ösenausstrich wurde eine neue Spitze verwendet, um das Material möglich zu verdünnen. Nach dem Verdünnungssausstrich wurden die Agarplatte inkubiert.

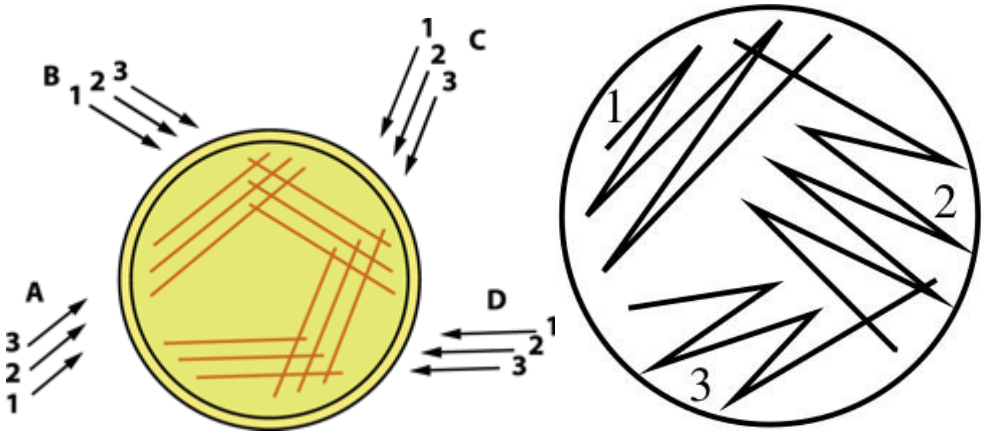


Abbildung 3. Schematische Darstellung von Vereinzelungsverfahren: 13-Strich-Verfahren (links) [12] und 3-Ösenausstrich-Verfahren (rechts) [13].

4. Ergebnisse

4.1 PCR-Fragmentation, Aufreinigung mittels Gelelektrophorese, Restriktionsverdau

Die PCR-Fragmentation war erfolgreich, indem die DNA-Fragmente sauber auf dem Agarosegel im UV-Licht beobachtet wurden (Abb. 4). Vor dem Restriktionsverdau wurde die DNA-Konzentration bestimmt, sie beträgt 54.2 ng/µL.

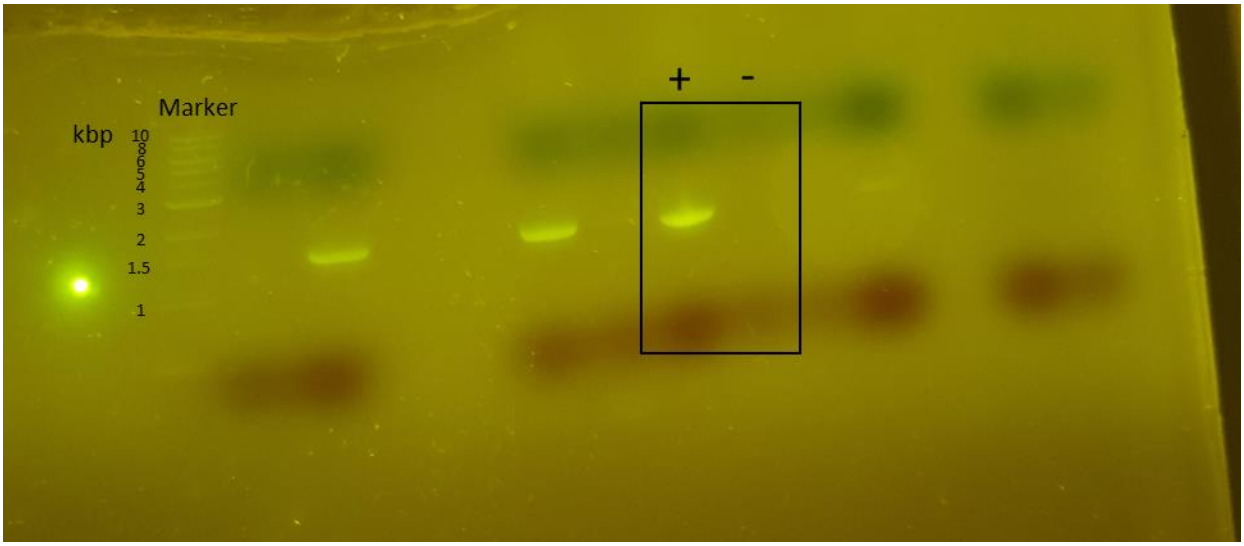


Abbildung 4. Die DNA-Fragmente wurden im UV-Durchlicht detektiert (in den schwarzen Kisten markiert: (+) PCR-Ansatz mit DNA, (-) negative Kontrolle. Bei ca. 1.5 kbp wurde das DNA des Proteins gefunden, weil die Amplifikat-Größe nach der PCR 1.4 kbp beträgt.

Nach dem Restriktionsverdau wurden die DNA-Ansätze von Insert und Vektor auf Agarosegel getrennt (Abb. 5). Aufgrund eines inhomogenen Gels wurde der Marker schräg gezeigt, was für die Analyse nicht optimal war, trotzdem waren das Insert und Vektor auf dem Gel zu sehen.

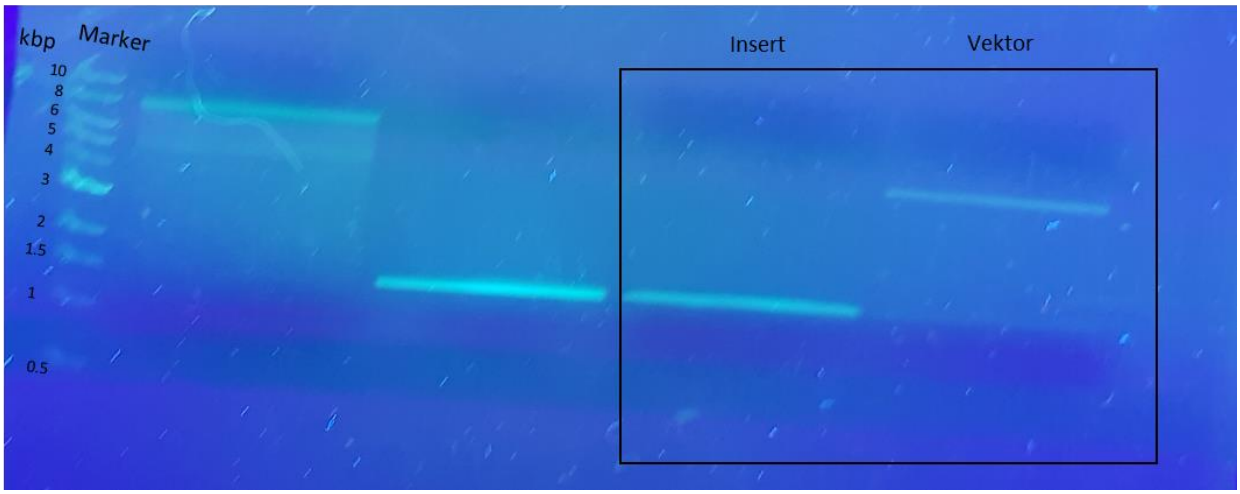


Abbildung 5. Die Restriktionsverdaue wurden im UV-Durchlicht detektiert (in den schwarzen Kisten markiert (links: Insert, rechts: Vektor). Bei ca. 1.5 kbp wurde das Insert (PCR-Fragment besitzt ca. 1400 bp) und den Vektor bei ca. 5 kpb (pET-28a(+) besitzt ca. 5369 bp) gefunden.

4.2 Ligation und Transformation

Während der Vorbereitung für die Ligation wurden das eigene Insert und Vektor in ddH_2O verdünnt, deshalb wurden andere DNA-Ansätze von Kommilitonen des

Praktikums für weitere Versuchsteile verwendet (siehe Tabelle 1, Ligation und Transformation). Nach der Ligation und Transformation wurde kein Klon auf der LB-Agarplatten mit und ohne Kanamycin gewonnen. Alle Agarplatten wurden bei RT nach 3 Tage weiter inkubiert, davon zeigte es nur bei der positiven Kontrolle erfolgreiche Transformation.

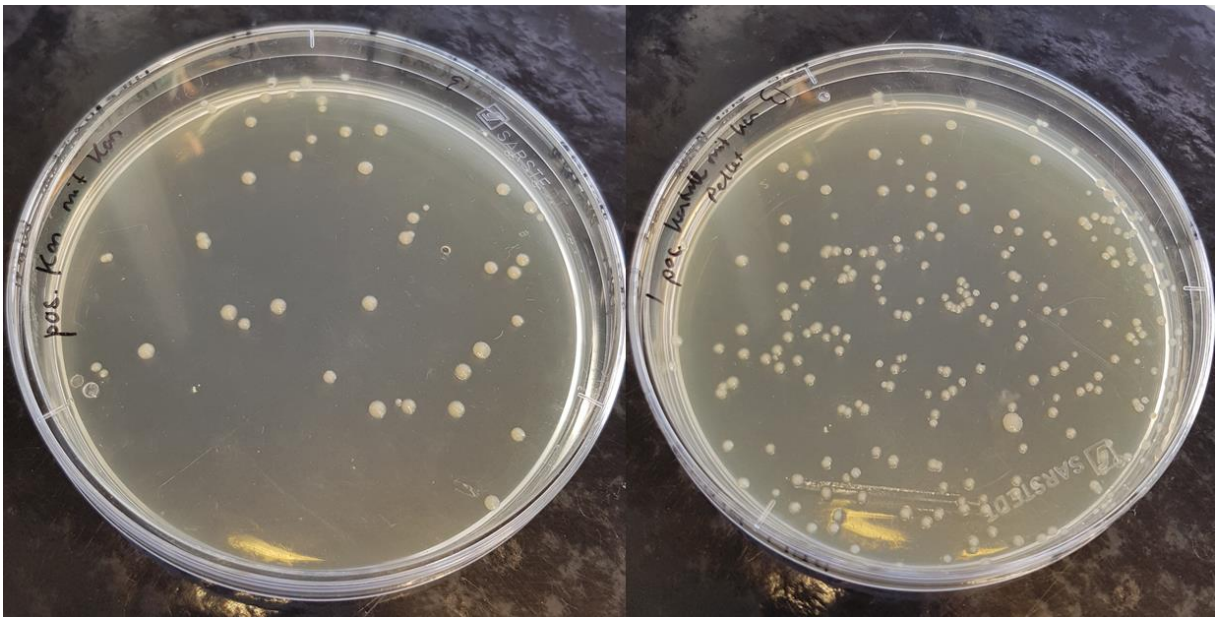


Abbildung 6. Die transformierte E. Coli Kolonien auf LB-Agarplatten mit Kanamycin (positive Kontrolle) nach 3 Tage-Inkubation bei RT. Das Ansatz vor der Zentrifugation (links) hat weniger Kolonien im Vergleich zu dem Pellet (rechts), da enthielt das Pellet nach der kurzen Zentrifugation höhere Plasmidkonzentration.

4.3 Bestimmung von Transformationseffizienz:

Nach der über Nacht Inkubation wurde die Anzahl von Kolonien auf jedem LB-Agarplatten bestimmt. Die LB-Agarplatten mit Kanamycin zeigten keine Kolonie von der transformierten *E. coli* Zellen, auf dem LB-Agarplatten ohne Kanamycin wurden die gewachsenen Kolonien gezählt (siehe Abb. 7).

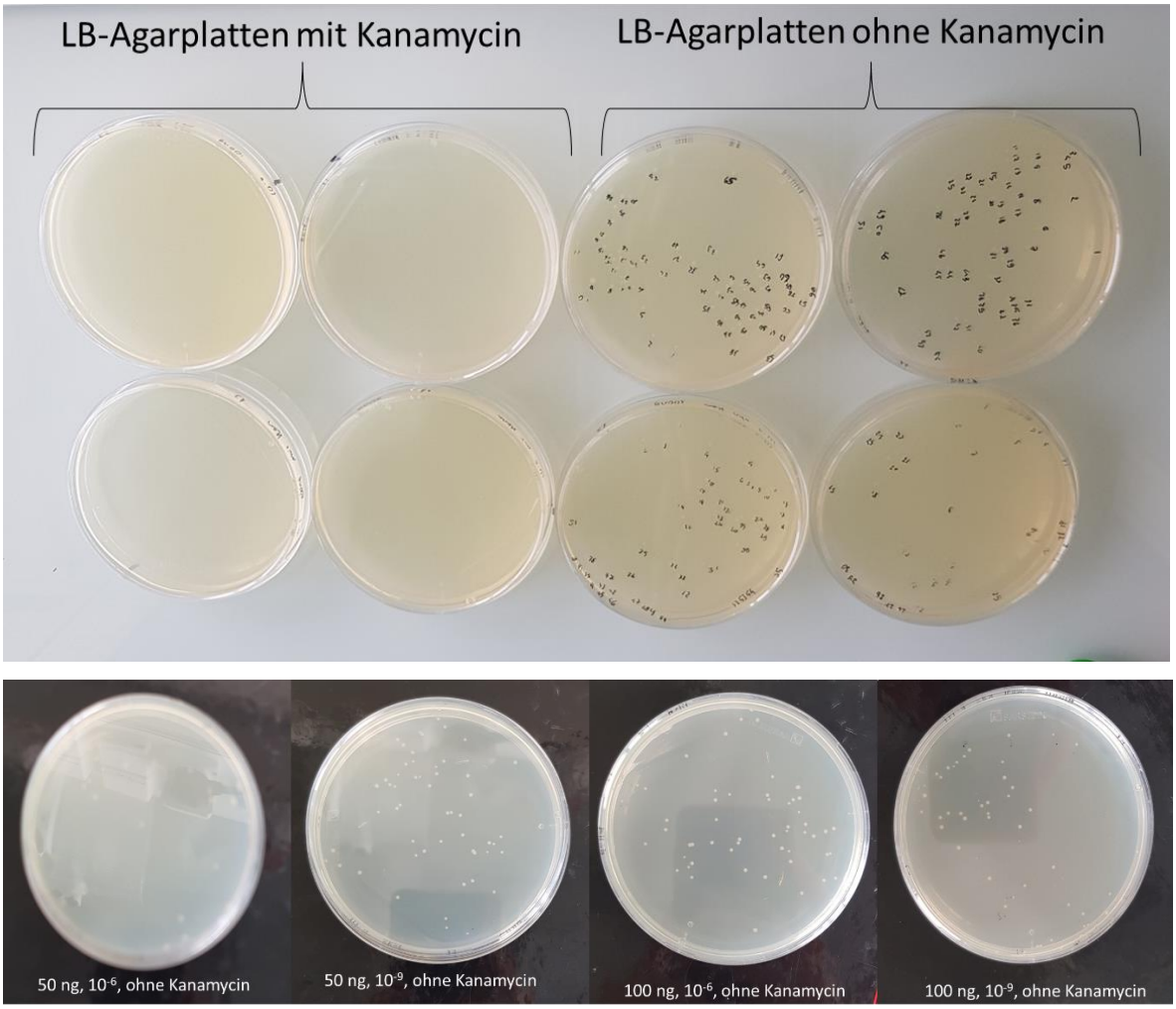


Abbildung 7. Oben: Ansatz für die Bestimmung von Transformationseffizienz: LB-Agarplatten mit (rechts) und ohne Kanamycin (links). Unten: Bakterienkolonien wachsen auf LB-Agarplatten ohne Kanamycin.

Die Transformationseffizienz wurde in CFU (eng. *colony forming units*) gegeben. Davon gilt: [14] [15]

Transformationsrate TF = Anzahl der Kolonien (mit Kanamycin) / Anzahl von Kolonien (ohne Kanamycin)
TE = TF/ mDNA in µg/ ursprüngliche Volumen der ausgegebenen Zellen in mL.

Da wurde keine Kolonie auf dem LB-Agarplatten mit Kanamycin zu betrachten, wurde die Anzahl von Kolonien auf LB-Agarplatten ohne Kanamycin bestimmt und tabelliert (Tabelle 5).

Tabelle 5. Bestimmung von Transformationseffizienz nach Verdünnungsreihe der Plasmidlösung

m DNA (µg)	Verdünnung	Kanamycin	Anzahl der Kolonien
0.05	10^{-6}	ohne	32
		mit Kan.	0
	10^{-9}	ohne	54
		mit Kan.	0
0.1	10^{-6}	ohne	66
		mit Kan.	0
	10^{-9}	ohne	55
		mit Kan.	0

Eine Beispielrechnung wurde für angegebene Daten (Tabelle 6) gezeigt.

Tabelle 6. Angegebene Daten der Plasmidpräparation aus Laborpraktikum.

m DNA (µg)	Verdünnung	Kanamycin	Anzahl der Kolonien
0.05	10^{-2}	mit	26
0.1	10^{-2}	mit	15
0.05	10^{-4}	mit	2
0.05	10^{-4}	ohne	183

Beispielberechnung:

Das Plasmid wurde in 100 µL Zellen transformiert. Bei der 10^{-4} Verdünnung wurden 2 Kolonien auf den LB-Agarplatten mit Kanamycin und 183 Kolonien auf dem LB-Agarplatten ohne Kanamycin gezählt. Das heißt:

Transformationsrate = 2/183 = 0.0109

TE = 0.0109/ 0.05 µg/ 0.1 mL = 2.18 cfu/µg/mL.

Da war der Verdünnungsfaktor um 10^{-4}-fach, gilt:

TE (ursprünglich) = TE/10^{-4} = 21 800 cfu/µg/mL.

4.4 Plasmidpräparation:

Auf dem Agarosegel wurden 3 Plasmid-Proben aufgetragen (siehe Abb. 6). Hier wurde der Unterschied vor und nach dem Restriktionsverdau betrachtet. Bei der beiden Plasmidproben 1 und 2 wurden das Plasmid zwischen 5 und 6 kbp gefunden, was die Größe des pET-28a(+)_*Mm*CPDII von 5639 bp entsprach. Die Probe 3 zeigte das

geschnitte Plasmid pET-28a(+) bei ca. 5 kbp und das Insert bei ca. 1.5 kpb. Die Plamidpräparation und der Restriktionsverdau sind vollständig abgelaufen.

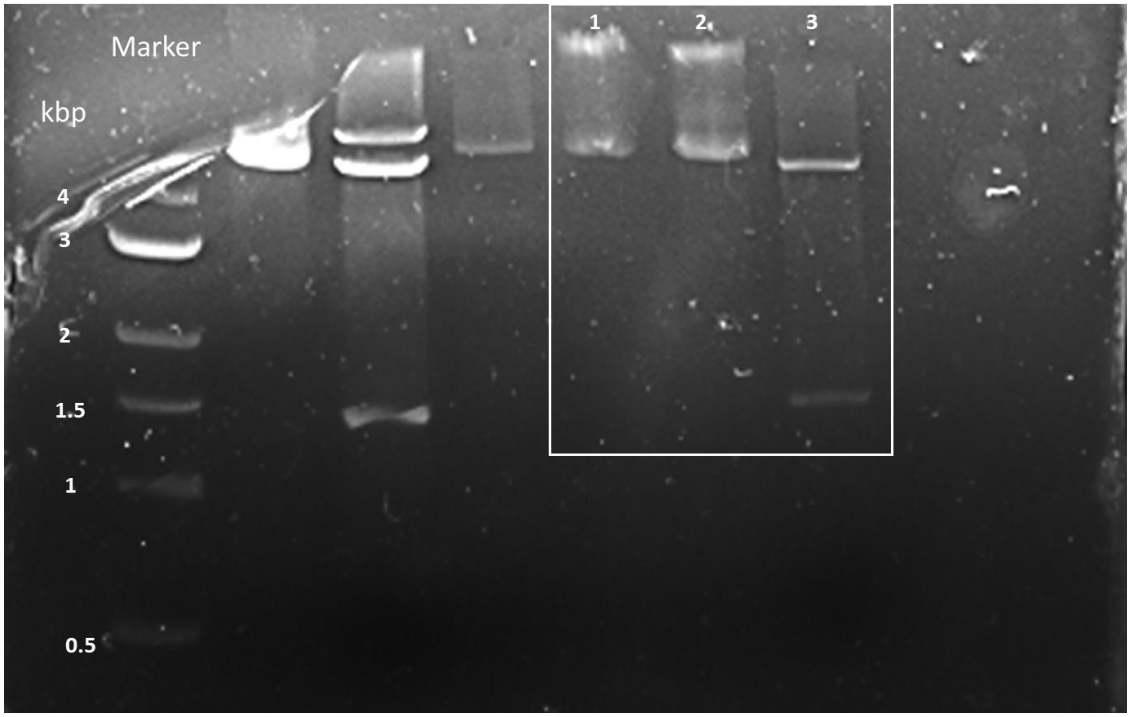


Abbildung 6. Gelelektrophorese der Plasmidpräparation. Hier wurden die Proben 1, 2 (Plasmidpräparation) und 3 (Restriktionsverdau) betrachtet. Auf der linken Seite des Gels befand sich der Marker, welcher durch ein inhomogenes Erstarren des Gels geschmiert wurde.

4.5 Vereinzelung der Mikroorganismen:

Nach der Inkubation wurden die LB-Agarplatten betractet. Mittels der 13-Strich-Verfahren und 3-Ösenausstrich-Verfahren wurde das Material verdünnt und einzelne Kolonien wurden einfach zu isolieren.

Abbildung 7. Vereinzelung der Mikroorganismen: 13-Strich-Verfahren (rechts) und 3-Ösenausstrich-Verfahren (links).

5. Diskussion

Im Rahmen des Praktikums wurde keine erfolgreiche Ligation bzw. Transformation durchgeführt. Der Restriktionsverdau wurde allerdings nach der Gelelektrophorese der Plasmidpräparation nachgewiesen. Da die im Praktikum Materialen unterschiedlich von den im Arbeitskreis waren, hier könnte der Fehler in die beiden Enzyme, Primer, Puffer oder die DNA-Produkte wegen der Denaturation oder Versenkung der Enzymaktivität liegen. Auch für die Ansätze des Inserts und Vektors waren die Konzentration geringer als erwartet, was die Ligation beeinflussen könnte.

Bei der positiven Kontrolle der Transformation wurden einige Bakterienkolonien gefunden, also der verwendeten Materialen (Zellsuspension, LB-Agarplatten, LB-Medium) waren in Ordnung. Die Transformation war aber nicht erfolgreich - es könnte an der unerfolgreiche Ligation oder der Denaturation des Plasmids bzw. Inserts liegen. Es könnte sein, dass eigene Insert und Vektor nach der Ligation zu verdünnt oder nicht kompetent waren.

Nach der Bestimmung von Transformationseffizienz wurden keine Kolonie auf LB-Agarplatten mit Kanamycin gewachsen. Es könnte sein, dass die Transformation in *E. coli* Zellen nicht funktionierte, dadurch enthielten die Bakterien keine Kanamycin-Resistenz.

6. Literaturverzeichnis

[1] A. Pühler, Forum Offene Wissenschaft WS 21/22, CeBiTec - Universität Bielefeld, **2021**.

[2] M. A. Quail, *DNA Cloning*, eLS, (Ed.), John Wiley & Sons, Ltd, **2005**, 1.

[3] K. Sharma, A. K. Mishra, V. Mehraj, G. S. Duraisamy, *Biotechnol. Genet. Eng. Rev.*, **2014**, 30 (1-2), 65-78.

[4] G. A. Weiss, *Curr. Opin. Chem. Biol.*, **2017**, 41, A3-A5.

[5] M. D. Cascalho, J. L. Platt, *Mayo. Clin. Proc.*, **2005**, 80 (3), 370-378.

[6] https://www.cdc.gov/ecoli/general/index.html, aufgerufen am **16.11.22** um 22:26.

[7] J. Jaruszewicz-Błońska J, T. Lipniacki, *BMC Syst. Biol.*, **2017**, 2, 11 (1), 117.

[8] https://www.thermofisher.com/de/de/home/life-science/cloning/competent-cells-for-transformation/competent-cells-strains/dh5a-competent-cells.html?s_kwcid=AL!3652!3!35873371030!e, aufgerufen am 15.11.22 um 01:21.

[9] J. J. Lin, *Proc. Natl. Sci. Counc. Repub. China B.*, **1992**,16 (1), 1-5.

[10] S. Kiontke, Y. Geisselbrecht, R. Pokorny, T. Carell, A. Batschauer, L.-O. Essen, *EMBO J.*, **2011**, 30, 4437–4449.

[11] A. Sancar, *Chem. Rev.*, **2003**, 103, 2203-2237.

[12] A. Steinbüchel, F. Oppermann-Sanio, C. Ewering, M. Pötter, *Mikrobiologisches Praktikum*, Springer Spektrum, **2013**, 5, 323.

[13] https://www.urologielehrbuch.de/urinkultur.html, aufgerufen am 19.11.22, um 15:14.

[14] *Skriptum zum Biochemisches Praktikum für Studierende im Master-Studiengang Chemie und Biologie, Wintersemester 2022/2023*, Philipps-Universität Marburg, Fachbereich Chemie (FB15), **2022**, 1, 22.

[15] https://international.neb.com/faqs/0001/01/01/how-should-i-calculate-the-transformation-efficiency-c2992, aufgerufen am 22.11.22, um 8:33.

Phillips Universität – Marburg

Biochemie Masterpraktikum BC-MPR

Wintersemester 2022/23

NUKLEINSÄUREANALYTIK/DATENBANKENSUCHE

vorgelegt von

PHAN THUY TIEN LUU

Matrikelnummer: 3304642 Luuph@students.uni-marburg.de

Studienfach: Chemie

Box 3, Platz 13

Betreuer: Rebecca Hinrichs & Daniel Hammerl (AG GRAUMANN)

Versuchsdatum: 28.10.22 Abgabedatum: 28.11.22

Inhaltverzeichnis:

1. Einleitung 19
   1.1 Theorie 19
   1.2 Aufgabenstellung 19
2. Ergebnisse 19
   2.1 Identifizierung und Analyse auf DNA-Ebene 19
      2.1.1 Identifizierung von DNA und Basisinformationen 19
      2.1.2 Restriktionskarte 19
      2.1.3 DNA-Strukturelemente 20
   2.2 Analyse auf Protein-Ebene 21
      2.2.1 Translation des Gens in seine Proteinsequenz 21
      2.2.2 Profil-Suche des Proteins 21
      2.2.3 Phylogenic tree/Protein-Stammbaum 25
      2.2.4 Proteinvorkommen 26
3. Literaturverzeichnis 28
4. Anhang 29

1. Einleitung

1.1 Theorie

Eine Datenbank ist eine Sammlung verwandter Datenelemente, die grundlegende bis komplexe Informationen über Gen, Organismus, Sequenz und zugehörige Zitate enthält. In der Molekularbiologie ist die Analyse von Genen meisten von den Datenbanken, die schon Informationen über untersuchten Genen besitzen, abhängig. Mit Hilfe von verschiedenen bioinformatischen Methoden kann selektive und breite Informationen über das Gen bzw. das Protein von einer Gensequenz zu erfassen.

1.2 Aufgabenstellung

In diesem Versuch wurden die Identifizierung und Analyse auf DNA- bzw. Protein aus einer angegebenen DNA-Sequenz mittels verschiedener Datenbanken und bioinformatischer Analysemethoden durchgeführt.

2. Ergebnisse

2.1 Identifizierung und Analyse auf DNA-Ebene

2.1.1 Identifizierung des Gens:

Die Identifizierung des Gens mit BLASTN [1] wurde durchgeführt, wobei die angegebene DNA-Sequenz innerhalb einer Nukleotide-Datenbank gesucht und mit ähnlichen Sequenzen verglichen. Es geht um einer DNA translocase „FtsK“ aus dem Organismen *Helicobacter pylori*. Das GC-Gehalt des Gens wurde mit NEB-Cutter Programm [2] bestimmt (siehe Tabelle 1).

Tabelle 1. Zusammenfassung der Identifizierung des Gens FtsK.

Name	DNA translocase „FtsK“
Organismen	Helicobacter pylori
GC-Gehalts	41%

2.1.2 Restriktionskarte:

Eine Restrikstionskarte nach NEB-Cutter in Abb. 1 gezeigt. Aus der Enzymreihe im Rahmen des Praktikums [3] wurde nur das Enzym *Eco*RI gefunden. Andere mögliche Enzyme der Restriktionskarte wurden in Tabelle 2 gegeben.

Tabelle 2. Enzymreihe der Restriktionskarte nach NEB Cutter [2] und Vergleich mit der Reihe des Praktikums [3]

Enzymreihe nach NEB Cutter	*Bam*HI, *Eco*RI, *Hin*dIII, *Bgl*II, *Pst*I, *Pvu*II, *Not*I, *Xho*I, *Alu*I, *Sac*I, *Spe*I, *Pst*I
Enzymreihe der Restriktionskarte nach [3]	SspI, BsmFI, BssHII, MmeI, AfeI, FspI, TseI, ApeKI, BbvI, PfoI, BsaXI, TaqI, BspDI; ClaI, BclI, NaeI, NgoMIV, TspGWI, BstEii, XmnI, BstYI, EcoRI, EciI, HaeIII, Sau96I, Eco0109I, MluCI, BtgZI, RsaI, CviQI, AcuI, TspRI, BtsIMutI, BsaJI, Bsp1286I, BaeGi, AvaI, BsoBI, BsrBI, BcgI, TauI
Überlappung	*Eco*RI

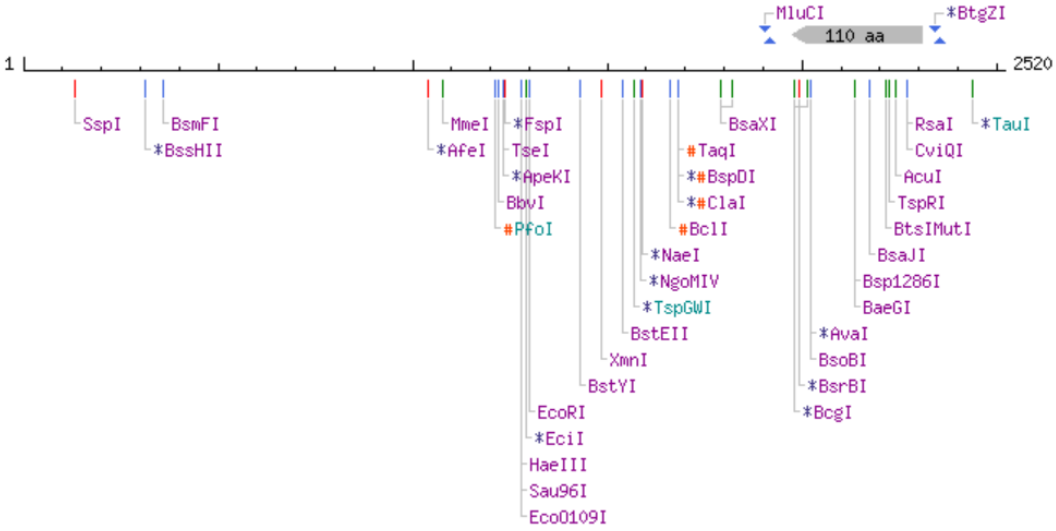


Abbildung 1. Ergestellte Restriktionskarten nach NEB-Cutter.

2.1.3 DNA-Strukturelement:

Um die Sekundärestruktur des Gens zu finden, wurde die DNA-Sequenz im *RNA-structure Predictor* [4] gesucht. Es gab 20 Vorschläge über die Sekundärestruktur des Gens, in Abb. 2 wurde die erste Struktur gezeigt.

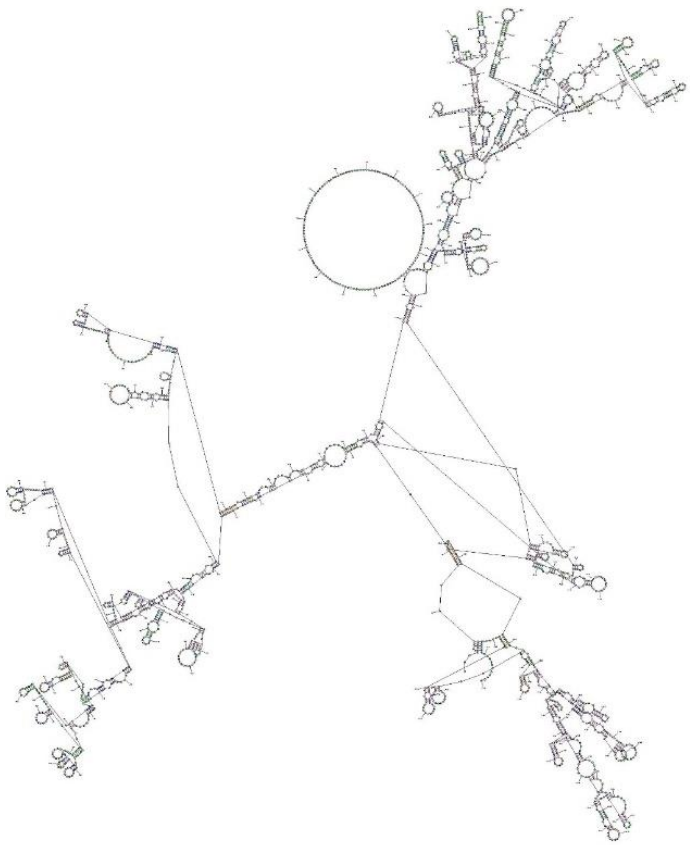


Abbildung 2. Sekundärstruktur des Gens FtsK.

2.2 Analyse auf Protein-Ebene:

2.2.1 Translation des Gens in seine Proteinsequenz

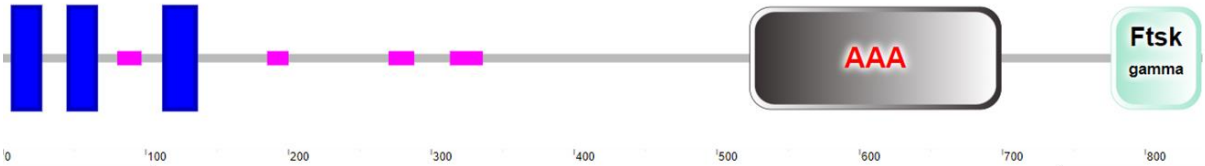
Die DNA-Sequenz wurde mittels *Expasy* [5] in einer Protein-Sequenz übersetzt (siehe Anhang). Mittels des *Protparam* Programm [6] wurden die theoretische Molaremasse MW, der isoelektrischer Punkt pI und das Methionin Gehalts bestimmt.

Tabelle 3. Ermittlung der Informationen über das kodierte Protein.

Molaremasse MW (Da)	94391.99
Anzahl der Aminosäuren	840
Theoretischer pI	6.85
Methionin--Gehalt	1.9%

2.2.2 Profil-Suche des Proteins:

Eine charakteristische Gruppierung von Sekundärstrukturelementen wird als Supersekundärstrukturen oder Motive bezeichnet. Große Polypeptidketten falten sich in zwei oder mehrere globuläre Einheiten, die als Domänen erkannt werden. [7]
Um diese Eigenschaften des Proteins zu untersuchen, wurde das *SMART* [8] verwendet. Die Protein-Sequenz wurde eingegeben, um die vorhergesagte Protein-Domäne zu finden (Abb. 3). Mittels *UniProt* [9] wurde die Protein-Sequenz analysiert, wobei die Bindungsstelle des Proteins (ATP-binding) zwischen der Aminosäure 531 und 538 sich befindet (Abb.4).



Confidently predicted domains, repeats, motifs and features:

Name	Start	End	E-value
transmembrane region	7	26	N/A
transmembrane region	46	65	N/A
low complexity	80	97	N/A
transmembrane region	113	135	N/A
low complexity	185	200	N/A
low complexity	270	288	N/A
low complexity	313	336	N/A
AAA	523	699	0.00249
Ftsk_gamma	776	839	1.91e-16

Click on a row to highlight the feature in the diagram above. Click the feature name for more information.

Features NOT shown in the diagram:

Name	Start	End	E-value	Reason
S_TKc	6	409	1210	threshold
Bac_rhodopsin	6	185	51100	threshold
DM16	14	57	733	threshold
G3P_acyltransf	15	133	88200	threshold
RGS	20	162	1590	threshold
PSN	37	523	3180	threshold
SHR3_chaperone	65	331	57100	threshold
LON	107	609	889	threshold
FH2	144	696	1630	threshold
Pro-rich	162	323	273000	threshold
Amelogenin	235	365	19500	threshold
SARA	259	291	204000	threshold
DUF3402	260	521	38800	threshold
HintN	337	451	1270	threshold
rADc	381	492	1240	threshold
PWI	427	498	176	threshold
DBB	455	561	17500	threshold
DEXDc	475	706	85.7	threshold
malic	510	605	197000	threshold

smart.embl-heidelberg.de/smart/job_status.pl?jobid=952231841992189016674982 42PjoPUofdCk 1/2

DUF3385	540	663	58200	threshold
TRCF	568	638	111000	threshold
WSN	649	715	624	threshold
HTH_GNTR	782	835	628	threshold

Click on a row to highlight the feature in the diagram above. Click the feature name for more information.

© 2021 EMBL | Privacy PolicySend comments to Ivica Letunic

Abbildung 3. "Prediction" über die Protein-Domänen nach SMART-Programm

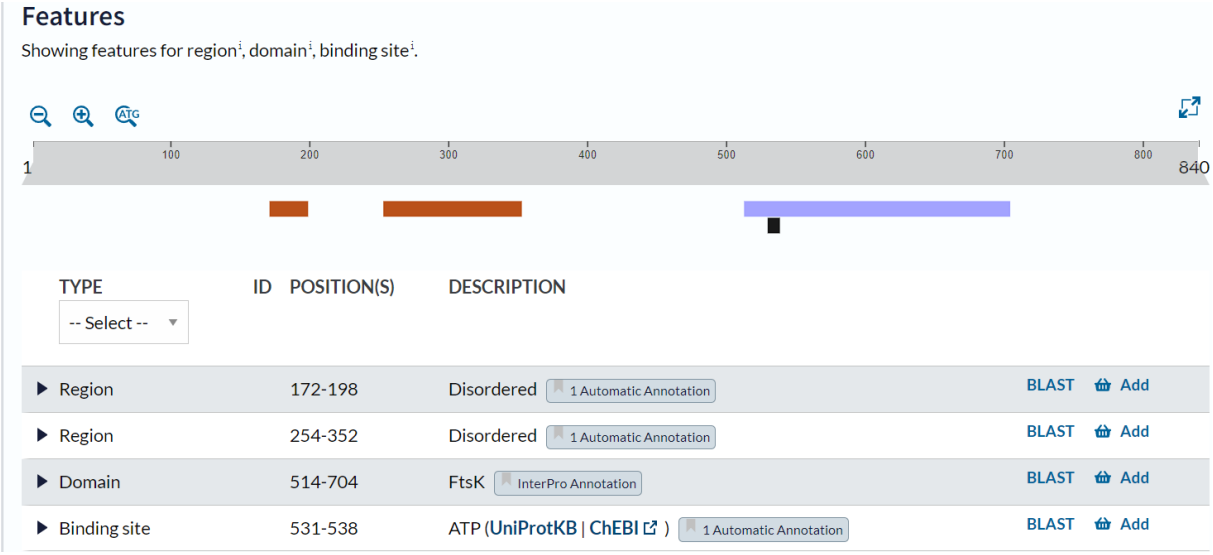


Abbildung 4. Die Protein-Bindungstelle wurde mittels UniProt Funktion "Features" bezeichnet.

Ein Membranprotein besitzt eine oder mehrere Transmembran-Alpha-Helix-Domänen, welche für viele Funktionen wie z. B. Enzymkatalyse, Transport über Membranen, Signaltransduktion als Rezeptoren von Hormonen und Wachstumsfaktoren und Energietransfer bei der ATP-Synthese verantwortlich sind. Diese Transmembrandomänen sind nicht nur strukturelle Einheiten, sondern auch wichtig für die allgemeine Aktivität des Proteins. [10] In diesem Versuch wurde die Transmembran-Domäne mittels *DTU Health Tech* [11] vorausberechnet, indem die Wahrscheinlichkeit von geladenem und hydrophobem Anteil der Membran berechnet wurde (Abb. 5).

```
# seq_24839 Length: 840
# seq_24839 Number of predicted TMHs:  3
# seq_24839 Exp number of AAs in TMHs: 66.1652200000002
# seq_24839 Exp number, first 60 AAs:  35.99859
# seq_24839 Total prob of N-in:        0.81443
# seq_24839 POSSIBLE N-term signal sequence
seq_24839       TMHMM2.0        inside       1     6
seq_24839       TMHMM2.0        TMhelix      7    26
seq_24839       TMHMM2.0        outside     27    45
seq_24839       TMHMM2.0        TMhelix     46    65
seq_24839       TMHMM2.0        inside      66   112
seq_24839       TMHMM2.0        TMhelix    113   135
seq_24839       TMHMM2.0        outside    136   840
```

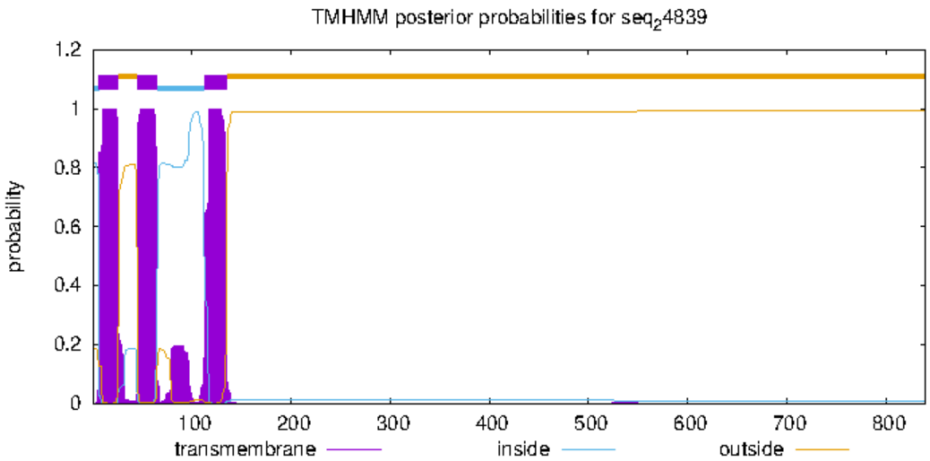


Abbildung 5. THM-Vorschlag des Proteins mittels DTU: die lila markierte Bereiche entsprechen die hohe Wahrscheinlichkeit auf der Protein-Sequenz (0-135 aa), wo die Trans-Helix-Membran sich befinden könnte.

Die gleiche Methode wurde auch für coiled-coil-Domäne des Proteins mittels *Waggawagga* [12], welches ein „coiled coil prediction“ Programm für Darstellung und Besichtigung von dieser spezifischen Protein-Domäne ist. 2 „Helical wheel“ wurden auf der Protein-Sequenz in der Aminobereich ca. 317-346 aa und ca. 405-438 aa mit hoher Wahrscheinlichkeit definiert (Abb. 6). Die Wahrscheinlichkeiten wurden in Abb. 7 graphisch bezeichnet.

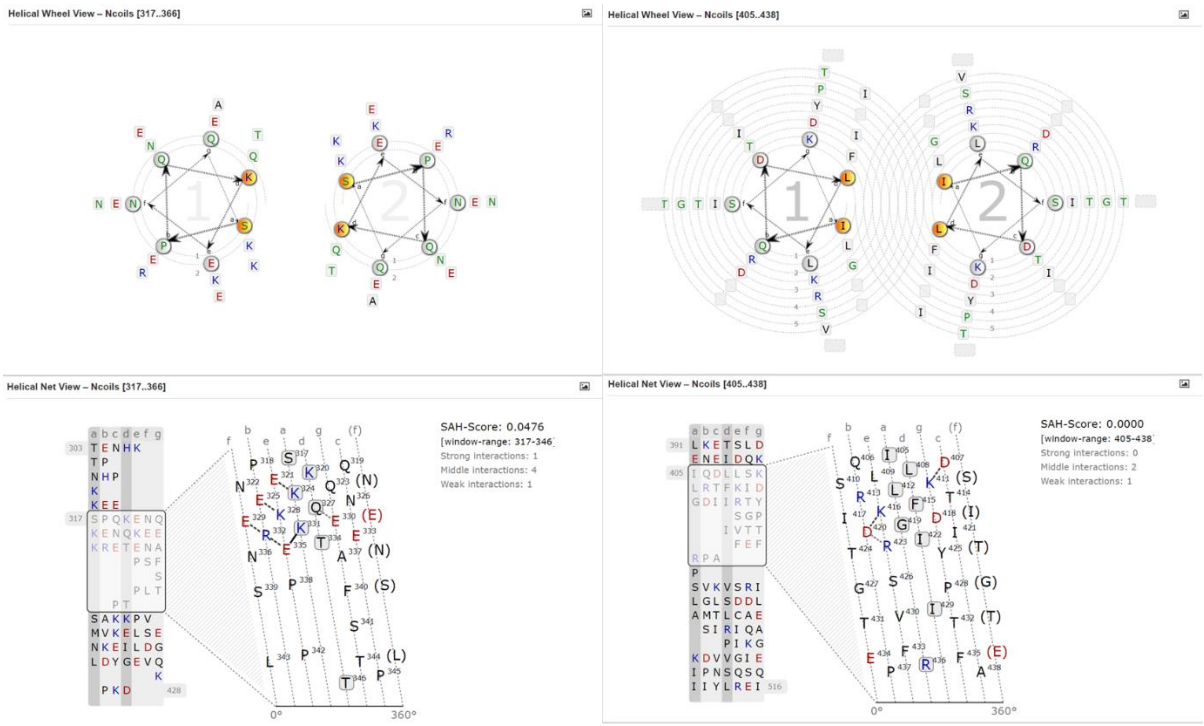


Abbildung 7. Helica wheel von der beiden coiled-coil-Domäne des Proteins: zwischen ca. 317-346 aa (links) und ca. 405-438 aa (rechts).

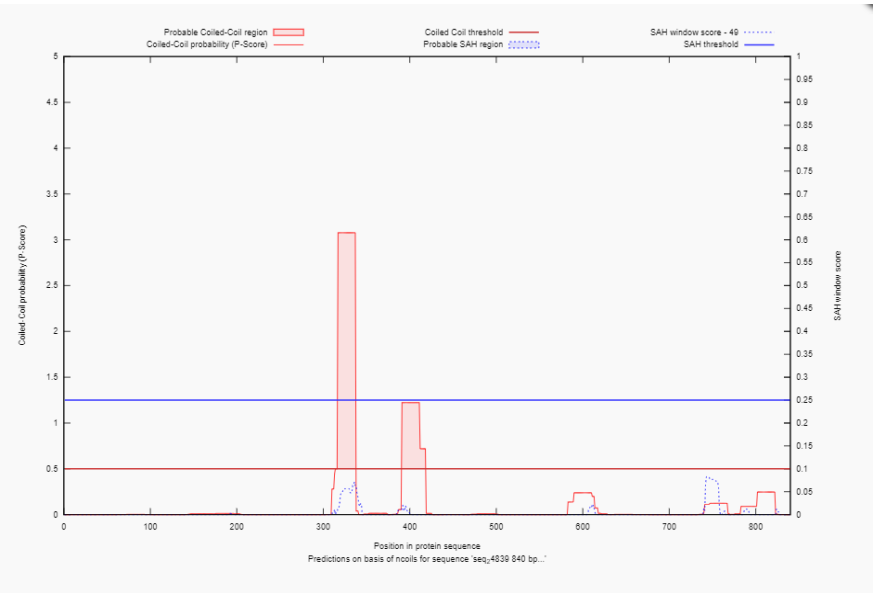


Abbildung 8. Graphische Darstellung ´von der ncoil-Wahrscheinlichkeit P auf Aminosäureposition. Zwischen 300-350 und 380-430 befindet sich die höchste Wahrscheinlichkeit, um coiled-coil-Domäne des Proteins zu betrachten.

2.2.3 Phylogenic tree/Protein-Stammbaum:

Ein phylogenetischer Baum, auch bekannt als Phylogenie, ist ein Diagramm, das die evolutionären Beziehungen verschiedener Arten, Organismen oder Gene eines

gemeinsamen Vorfahren darstellt. [13] Um der Stammbaum des Proteins darzustellen, wurden einige DNA-translocase von verschiedenen Organismen aus der Protein-Datenbank *UniProt* gesucht und mittels des Programms *ClusterW* [14] in einen Stammbaum zusammengebaut. Hier wurde „*Fast Tree full*“ Modeverwendet: es ist eine Methode, welche phylogenetische Bäume mit ungefähr maximaler Wahrscheinlichkeit (engl. *approximately-maximum-likelihood*) aus dem Alignments von Nukleotid- oder Proteinsequenzen ab. Der Alignments wurde aus 6 verschiedenen Organismen, welche das DNA translocase FtsK Protein enthalten und aus ca. 800 - 850 aa gebildet werden.

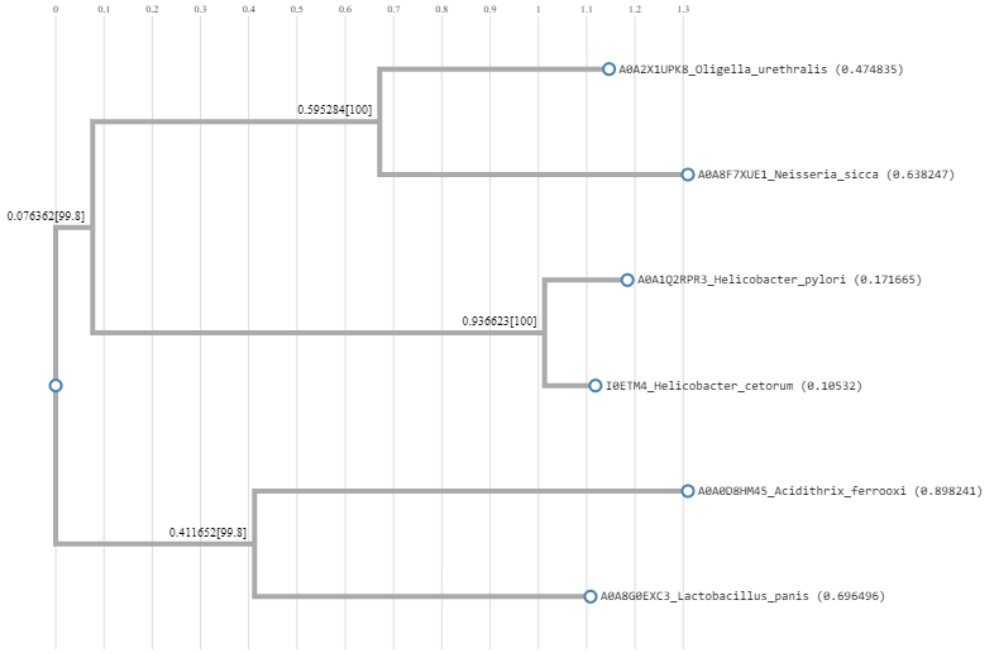


Abbildung 9. Graphische Darstellung des Protein-Stammbaums nach ClustalW

2.2.4 Proteinvorkommen:

Das Vorkommen des Proteins wurde mittels NCBI-Datenbank bestimmt:

Bacteria; Proteobacteria; Epsilonproteobacteria; Campylobacterales; Helicobacteraceae; Helicobacter, Helicobacter pyroli → DNA translocase FtsK Protein.

Um den Vorkommen des Proteins mit den 3-Urreichen (Archae, Eubacteria/Bacteria und Eukarya) zu vergleichen, wurde ein Stammbaum aus 3 Proteinsequenzen des FtsKs von 3 Organismen in jeder Urreiche (Abb. 10) dargestellt.

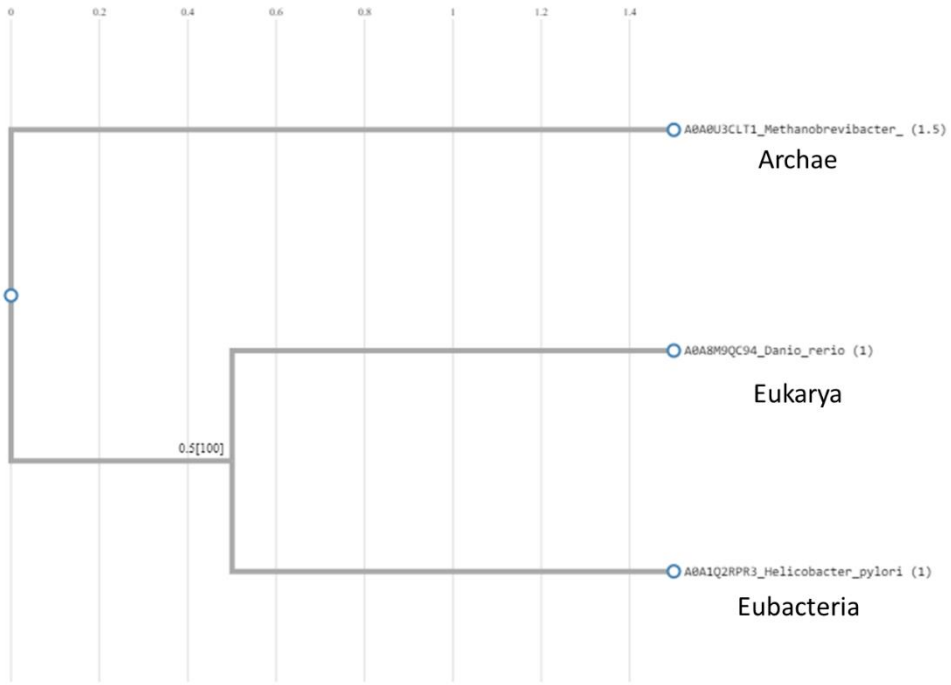


Abbildung 10. Vergleich des Proteinsvorkommen in 3 Organismen-Urreichen.

3. Literaturverzeichnis

[1] https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi, aufgerufen am 28.10.22, um 11:12.

[2] https://nc2.neb.com/NEBcutter2/, aufgerufen am 28.10.22, um 11:12.

[3] *Skriptum zum Biochemisches Praktikum für Studierende im Master-Studiengang Chemie und Biologie, Wintersemester 2022/2023*, Philipps-Universität Marburg, Fachbereich Chemie (FB15), **2022**, 1, 22.

[4] https://rna.urmc.rochester.edu/RNAstructureWeb/Servers/Predict1/Predict1.html, aufgerufen am 20.11.22, um 01:22.

[5] https://web.expasy.org/translate/, aufgerufen am 28.10.22, um 11:13.

[6] https://web.expasy.org/protparam/, aufgerufen am 28.10.22, um 11:19.

[7] D. Voet, J. G. Voet, C. W. Pratt, *Lehrbuch der Biochemie*, Wiley-VCH, **2010**, Auflage 2, 6 (B), 165-166.

[8] http://smart.embl-heidelberg.de/, aufgerufen am 29.10.22, um 15:56.

[9] https://www.uniprot.org/, aufgerufen am 30.10.22, um 13:22.

[10] T. Ramasarma, *Indian J. Biochem. Biophys.*, **1996**, 33 (1), 20-29.

[11] https://services.healthtech.dtu.dk/service.php?TMHMM-2.0, aufgerufen am 30.10.22, um 13:24.

[12] https://waggawagga.motorprotein.de/, aufgerufen am 16.11.22, um 20:54.

[13] D. Baum, *Reading a Phylogenetic Tree: The Meaning of Monophyletic Groups. Nature Education*, **2008**, 1 (1), 190.

[14] https://www.genome.jp/tools-bin/clustalw, aufgerufen am 21.11.22, um 16:33.

[15] https://bio.libretexts.org/Bookshelves/Microbiology/Book%3A_Microbiology_%28Bruslind%29/07%3A_Archaea, aufgerufen am 23.11.22, um 23:01.

4. Anhang

- *Gegebene DNA-Sequenz:*

ATGAAATCTAAAAAACTTTACTTGGTTTTAATCATAGGGGTTTTATTAGCGTTTTTAACCCTATCTTCAT
GGCTGGGTAATAGTGGGTTAGTGGGGCGTTTTGGGGTGTGGTTTGCTACAATCAATAAAAAATATTTTGG
GTATCTTTCATTCATCAACTTACCCTATTTGGCGTGGGTTTTATTCCTTTTATACAAGGCTAAAAACCCT
TTTACAGAAATCGTTTTAGAAAAAACTTTAGGGCATCTATTAGGCATTTTATCTTTGCTCTTTTTGCAAT
CTAGCCTGTTAAATCAAGGGGAAATCGGCAACAGCGCGCGTTTGTTTTTACGCCCTTTTATAGGGGACTT
TGGGCTTTATGCGCTGATAATGCTTATGGTAGTTATTTCTTATTTGATTCTATTCAAACTGCCCCCTAAA
AGCGTTTTTTACCCTTATATAAACAAAACGCAAAACCTTTTAAAAGAGATTTATAAACAATGCTTGCAGG
CTTTTAGCCCAAATTTTAGCCTGAAAAAAGAGGGTTTTGAAAACACCCCATCAGATTCTCAAAAAAAAGA
AACCAAAAACCCTAAAGAAAAAGAAAATCTCAAAGAAAATCCTATTGATGAAAACCACAAACCCCCTAAC
GAAGAATCCTTTTTAGCGATCCCTACCCCCTATAACACGACTTTAAATGATTCAGAACCGCAAGAAGGCT
TAGTCCAAATTTCCCCACACCCCCCTACCCATTACACCATTTACCCTAAAAAAAACCGATTTGATGATTT
GACTAACCCCACTAACCCCACTTTAGAACCCCAACAAGAAACCAAAGAAAGAGAACCCACGCTAAAAAAA
GAAACGCCCACCACACTCAAACCTATCATGCCCATATCCACACCCAACACAGAAAATGACAACAAAACAG
AAAACCACAAAACCCCCAACCACCCTAAAAAAGAAGAAAGCCCACAAAAAGAAAATCAAAAAGAAAATCA
AAAAGAAGAAAAAAGAGAAACAGAGAACGCTCCAAGCTTTAGCCCACTAACCCCCACCAGCGCTAAAAAA
CCCGTTATGGTTAAAGAATTGAGCGAAAATAAAGAGATATTAGACGGGTTGGATTATGGCGAAGTGCAAA
AACCCAAAGATTATGAGCTTCCCACAACGCAATTATTGAATGCGGTTTGCTTGAAAGAAACTTCTTTAGA
CGAAAACGAGATTGACCAAAAAATCCAGGATTTATTGAGCAAGCTGCGCACCTTTAAAATTGATGGCGAT
ATTATCCGCACTTATTCAGGCCCTATTGTAACCACCTTTGAATTCCGCCCAGCCCCTAGCGTTAAGGTGA
GCCGTATTTTAGGCTTGAGCGATGATTTAGCGATGACTTTATGTGCTGAATCCATCCGCATTCAAGCCCC
TATCAAAGGCAAGGATGTTGTCGGCATTGAGATCCCTAACAGCCAAAGCCAAATTATTTACTTGAGAGAA
ATTTTAGAAAGCGAATTGTTTCAAAAATCCAGCTCGCCCTTAACCCTAGCTTTAGGCAAAGACATTGTGG
GTAACCCTTTCATCACGGATTTAAAAAAGCTCCCTCACTTGCTCATCGCCGGCACGACAGGAAGCGGTAA
GAGCGTGGGCGTGAATGCGATGATTTTATCCTTACTTTATAAAAACCCCCCTGATCAACTCAAATTAGTG
ATGATCGATCCCAAAATGGTAGAATTTAGCATTTATGCGGACATCCCTCATTTGCTCACGCCCATTATCA
CCGACCCTAAAAAAGCTATTGGGGCTTTACAAAGCGTGGCTAAAGAAATGGAGCGCCGGTATTCTTTAAT
GAGCGAATACAAGGTTAAAACCATTGATTCTTATAATGAGCAAGCCCAAAGTAACGGCGTTGAAGCGTTC
CCCTATTTGATTGTGGTGATTGATGAATTAGCGGATTTGATGATGACAGGGGGCAAAGAAGCGGAGTTTC
CTATCGCTAGAATCGCTCAAATGGGGCGAGCGAGCGGTTTGCATCTCATTGTAGCGACCCAACGCCCGAG
CGTGGATGTCGTAACCGGCTTGATTAAAACCAACTTGCCTTCAAGGGTGAGTTTTAGGGTAGGCACTAAG
ATTGATTCTAAAGTGATTTTAGACACCGATGGGGCACAAAGCTTGCTAGGAAGGGGCGATATGCTCTTTA
CCCCCCCAGGAACGAACGGGTTAGTGCGCTTGCATGCCCCCTTTGCCACTGAAGATGAAATCAAAAAAAT
CGTGGATTTTATTAAAGCCCAAAAAGAGGTACAATACGATAAAGATTTCTTGCTAGAAGAATCGCGCATG
CCTTTAGACACCCCTAACTATCAAGGCGATGACATCCTAGAAAGGGCTAAAGCGGTGATTTTAGAAAAAA
AAATCACTTCTACGAGTTTTTTACAACGCCAATTAAAAATCGGCTACAACCAAGCCGCCACCATTACTGA
CGAATTAGAAGCTCAAGGCTTTTTATCCCCAAGAAACGCCAAAGGCAACAGAGAGATTTTGCAAAATTTT

- *Protein-Sequenz*

```
MKSKKLYLVLIIGVLLAFLTLSSWLGNSGLVGRFGVWFATINKKYFGYLSFINLPYLAWVLFLLYKAKNPFTEIV
LEKTLGHLLGILSLLFLQSSLLNQGEIGNSARLFLRPFIGDFGLYALIMLMVVISYLILFKLPPKSVFYPYINKT
QNLLKEIYKQCLQAFSPNFSLKKEGFENTPSDSQKKETKNPKEKENLKENPIDENHKPPNEESFLAIPTPYNTTL
NDSEPQEGLVQISPHPPTHYTIYPKKNRFDDLTNPTNPTLEPQQETKEREPTLKKETPTTLKPIMPISTPNTEND
NKTENHKTPNHPKKEESPQKENQKENQKEEKRETENAPSFSPLTPTSAKKPVMVKELSENKEILDGLDYGEVQKP
KDYELPTTQLLNAVCLKETSLDENEIDQKIQDLLSKLRTFKIDGDIIRTYSGPIVTTFEFRPAPSVKVSRILGLS
DDLAMTLCAESIRIQAPIKGKDVVGIEIPNSQSQIIYLREILESELFQKSSSPLTLALGKDIVGNPFITDLKKLP
HLLIAGTTGSGKSVGVNAMILSLLYKNPPDQLKLVMIDPKMVEFSIYADIPHLLTPIITDPKKAIGALQSVAKEM
ERRYSLMSEYKVKTIDSYNEQAQSNGVEAFPYLIVVIDELADLMMTGGKEAEFPIARIAQMGRASGLHLIVATQR
PSVDVVTGLIKTNLPSRVSFRVGTKIDSKVILDTDGAQSLLGRGDMLFTPPGTNGLVRLHAPFATEDEIKKIVDF
IKAQKEVQYDKDFLLEESRMPLDTPNYQGDDILERAKAVILEKKITSTSFLQRQLKIGYNQAATITDELEAQGFL
SPRNAKGNREILQNF
```

- *Fasta-Format des Proteins:*

```
>tr|A0A1Q2RPR3|A0A1Q2RPR3_HELPX DNA translocase FtsK OS=Helicobacter pylori
OX=210 GN=HPF94_0875 PE=3 SV=1
MKSKKLYLALIIGVLLAFLTLSSWLGNSGLVGRFGVWFAAINKKYFGYLSLVNLPYLAWV
LFLLYKTKNPFTEIVLEKTLGHLLGILSLLFLQSSLLNQGEIGNSARLFLRPFIGDFGLY
ALIMLMVVISYLILFKLPPKSVFYPYINKTQSLLKEIYKQCLQAFSPNFSPKKEGFENAP
SDIQKKETKNDKEKENLKENPINETLNHKISNEESFLAIPTPYNTTLNALEPQEGLVQIS
SHPPTRYTIYPKRNRFNDLSNPTNPTLKEVKQETKEREPTPKPATLKPVMPASAPNTEND
NKTENHKAPNYPIKEERTKENMQEENIKEEEKEVQNAPSFSPETPTRAKKPVMVKELSEN
KEILDGLDYGEVQKPKDYELPTTQLLNALCLKDTSLDENEIDQKIQDLLSKLRTFKIDGD
IIRTYSGPIVTTFEFRPAPNVKVSRILGLSDDLAMTLCAESIRIQAPIKGKDVVGIEIPN
SQSQTIYLREILESELFQKSSSPLTLALGKDIVGNPFITDLKKLPHLLIAGTTGSGKSVG
VNAMILSLLYKNPPDQLKLVMIDPKMVEFSIYADIPHLLTPIITDPKKAIGALQSVAKEM
ERRYSLMSEYKVKTIDSYNEQAPNNGVEAFPYLIVVIDELADLMMTGGKEAEFPIARIAQ
MGRASGLHLIVATQRPSVDVVTGLIKTNLPSRVSFRVGTKIDSKVILDTDGAQSLLGRGD
MLFTPPGSNGLVRLHAPFATEDEIKKIVDFIKAQKEVEYDKDFLLEESRMPLDTPNYQGD
DILERAKAVILEKKITSTSFLQRQLKIGYNQAATITDELEAQGFLSPRNAKGNREILQNF
```

- *Multi-alignment des Protein-Stammbaums:*

```
>tr|A0A1Q2RPR3|A0A1Q2RPR3_HELPX DNA translocase FtsK OS=Helicobacter pylori
OX=210 GN=HPF94_0875 PE=3 SV=1
MKSKKLYLALIIGVLLAFLTLSSWLGNSGLVGRFGVWFAAINKKYFGYLSLVNLPYLAWV
LFLLYKTKNPFTEIVLEKTLGHLLGILSLLFLQSSLLNQGEIGNSARLFLRPFIGDFGLY
ALIMLMVVISYLILFKLPPKSVFYPYINKTQSLLKEIYKQCLQAFSPNFSPKKEGFENAP
SDIQKKETKNDKEKENLKENPINETLNHKISNEESFLAIPTPYNTTLNALEPQEGLVQIS
SHPPTRYTIYPKRNRFNDLSNPTNPTLKEVKQETKEREPTPKPATLKPVMPASAPNTEND
NKTENHKAPNYPIKEERTKENMQEENIKEEEKEVQNAPSFSPETPTRAKKPVMVKELSEN
KEILDGLDYGEVQKPKDYELPTTQLLNALCLKDTSLDENEIDQKIQDLLSKLRTFKIDGD
IIRTYSGPIVTTFEFRPAPNVKVSRILGLSDDLAMTLCAESIRIQAPIKGKDVVGIEIPN
SQSQTIYLREILESELFQKSSSPLTLALGKDIVGNPFITDLKKLPHLLIAGTTGSGKSVG
VNAMILSLLYKNPPDQLKLVMIDPKMVEFSIYADIPHLLTPIITDPKKAIGALQSVAKEM
ERRYSLMSEYKVKTIDSYNEQAPNNGVEAFPYLIVVIDELADLMMTGGKEAEFPIARIAQ
MGRASGLHLIVATQRPSVDVVTGLIKTNLPSRVSFRVGTKIDSKVILDTDGAQSLLGRGD
MLFTPPGSNGLVRLHAPFATEDEIKKIVDFIKAQKEVEYDKDFLLEESRMPLDTPNYQGD
DILERAKAVILEKKITSTSFLQRQLKIGYNQAATITDELEAQGFLSPRNAKGNREILQNF
>tr|A0A8F7XUE1|A0A8F7XUE1_NEISI DNA translocase FtsK 4TM domain-containing
protein OS=Neisseria sicca OX=490 GN=LPB402_00700 PE=4 SV=1
MTAKSSKTQTKKRVSTKPAAKPTTRKSTKAQTQADNKVSQRLKAAKELQKNEEKKARPEH
VVNLINDALWLFGLVITIYLAISLASFSMDDPAWSRSVPKSNDVANLGGLFGSYLSDVGY
YLFGLSFWWWIAASCVFLYKNFRPMKKQENHKPYNHGVAALALFLLLVCSPIIEHFLFDN
ALSESLPVGAGGLVGLLAGSGLAWLLGKSGSLLIMLVMLLLSISLLAQVSWLEVMAKSGS
```

HMGGLFGNLMKKLSQFRNKKEDVCSEALETQNTRRMVKEAKTITATPVTPLAGSSSNRKT
VAVSVAPPPKIQTSLFDDTEPKNNGEYHKPNMNLLRMPSEEPVAVNPDELQQTAELIEAK
LAEFGIGVQVVSATSGPVITRYEIEPAQGVKGSQIVALSKDLARSMSLQAVRIVETIAGK
NTMGIELPNEKRQDVMLSEILSSSVFTDAKSKLTVALGKDIAGTPVVGDLAKMPHLLVAG
MTGSGKSVGVNGMIMSMLFKATPDEVRFIMIDPKMLELSIYDGIPHLLCPVVTDMREAGQ
ALNWCVAEMEKRYRLLSHAGVRNLDGFNQKVEQAKAAGKPLLNPFSLNPDDPEPLEKLPL
IVVVIDELADLMMTERKSVEQQIARLAQKARAAGIHMIVATQRPSVDVVTGLIKANIPTR
MAFTVQSKIDSRTILDQMGADELLKYGDSLFLQPGSAEPTRLQGAFVSDDEVHQVVNFVK
EQAPTNYVEGLLSGEAAIETTNIVNPNANSDELFDQAVAFVLESRKTSISALQRQLRIGY
NRAANLIDALENAGVLSPADINGSRRILAQKDQL
>tr|A0A0D8HM45|A0A0D8HM45_9ACTN DNA translocase FtsK OS=Acidithrix
ferrooxidans OX=1280514 GN=ftsK1 PE=3 SV=1
MRARRTEADVAGLIILGGVIFGLLSLFSVLGGVGTSFDHLFAAAFGYGRVLFYAYIGYYG
LVLVLDIRPSLKRRYLSSGALTIVTLLAFSSFLIFELLHPHRNPSLAERGGLIGWYTFRG
IAALVSPGGAGILIFVVVVFSLLDLFGHSPIAIVRRYRHRIARHFNDGSDAREIQGAPLS
LDEPHTSSPPLVHKPTRSRSRSRMPSVPVYDYAEDSLSNEAYLGADRGSKDLGNPESKVI
NIPVPPLEAVAEGSDSQELDEELLLGGSNADAFDSSPADEDLDSQDGVAQDFDEKADERV
VAWKLPPGNILRRSAVRALDKDELWKRGRILCDALATHKVETSLVGMTVGPTVTRYELEL
GAGVKVARVTSLNKDIAYAMAAADVRILAPIPGRSAIGVEVPNERRVIVALGDVLGAPEA
AANLHPLAVAIGRDISGKATLANLAEMPHVLIAGSTGSGKSSCLNSILTSILMRSTPDEV
RMILIDPKRVELGQYNGVPHLLTPVVTNPKKAANALAWAVKEMEQRYDLLSELGARDIVG
YNQIVENLQREASEEDKADLPFVDAANETSSEIELGPSPLFDSIKEKSYRHLPYIVVVVD
ELNDLMMVAARDVEESICRIAQMARAVGIHLVIATQRPSVDVITGLIKANIPSRMAFSVS
SLADSRVILDQPGAERLIGKGDMLMLGASTSHPQRLQAPWVAEEEIRKVVASWIRQGRTS
FVGDFEVVETTSDSSDSKEDEDELFMAALELVVSSQLGSTSMLQRKLRVGFSRAGRLMDL
LERRGIVGPLEGSKPRVVLMGKEEFESYKDQRLIG
>tr|A0A8G0EXC3|A0A8G0EXC3_9LACO DNA translocase FtsK OS=Lactobacillus
panisapium OX=2012495 GN=GYM69_03655 PE=3 SV=1
MPKKKKTTKARKKTQNAGITWAVVGLVEIIIVFLAVAKFGILGKQIANIFRLFFGDSYLL
TAGLCAIFGLVMLIYNKPMHFKFKRSCGLFLAILGILLIQSSIYFERELVNNAFMNVFWH
EMSAEFGRAAITKSVGGGGIGAMCYQLFYPLLGHIGLRVFAVLFIPIGILMFFDVKFVDV
INKFQKFSQLFISKNKEAGTKLKDKYSSLREKQAEKKQEQLAKDFHDPLSSESPVFPNVD
DFTDKNDTETQADNQEPDEDISQIDFALDEVAQSEPEESKEQIQISSHDERNSFANKTNF
EPDNKDLPKSHSFDDEDEKMKQELGSVDHGDLEQSATSRPKVEYKKPPITLLDPVKNTDQ
SADKASIRKNTQKLQATFKSFGVNVIIKRAILGPTITRYEVQPAVGVKVSRIVNLADDLA
LALAAKDIRIEAPIPGKPFIGIEVPNRATSVVAFKDVMQNQDAKAKADPMEVPLGKDVSG
QIISANLAKMPHLLIAGSTGSGKSVAINTILTSILMKATPDQVKLILIDPKMVELSVYNG
VPHLLIPVVTDPKLAANALSKAVKEMERRYKLFAASGARNMGEFNEKVRINNQDKTKPVM
KPLPYILVVVDELSDLMMVGGHDVEGAIVRLGQMARAAGIHMILATQRPSVDVITGLIKA
NVPSRISFAVSSGVDSRTILDQTGAEKLLGRGDMLFMPVGASKPERIQGAYIASHEVEKV
ISWVSNQQKPEYDEGMIPQKNEETAENNSDEPEDEFYEQAVDLVRRQQTASVSMLQRRFR
IGYNRAARIVDEMEAKGVVGPSEGSKPRQVLLPPLKEDDKG
>tr|A0A2X1UPK8|A0A2X1UPK8_9BURK DNA translocase FtsK OS=Oligella urethralis
OX=90245 GN=ftsK PE=3 SV=1
MAMAKTSKTPYIGRGKRNIRLRSPEQVLMNSRFMMMLREARWVLYLIAAVSLAVMLFTWH
ATDPGWVSTSGSDEIQNAFGAFGAYFSSILLYLLGFSAWWLVVLCLQRLFVGYKTLMSRY
ANLDPEQVLPSLKWHVPIGFIMLILGSIGLESTQLQSVGEQLPGHAGGVLGALFSGLLIR
NIGSAPALFAMAAMFFFGFSWFFNFSWLNLAERLGSTIAGLFTKFDRLRAERIDRRIGEA
VQEEMDEQITAHKEQLPPADRPLKIEPPIKAFPISSKAIEAKQAKLFDNHAAAVSEPEPT
ASDAGASRDTTVAPTKAAVKAPSKATPSYAASGDLPGLELLDPAADFVEPVGEDTIEYNS
RLIEKKLSDFNVQVEVVAAQAGPVITRYEIEPASGVKGVQIVNLSKDLARALSMVRLRVV
ETIPGKNLMGIELPNPRRQIVRLAEIIGSQAYEKSKSLLTVALGKDIAGNPIVADLAKMP
HLLVAGTTGSGKSVGINAMILSLLYKADPSEVRLILIDPKMLEMSVYEGIGHLLAPVVTD
MRQASNALNWCVGEMEKRYKLMSKMGVRNIAGYNSKIKEAEARGETIDNPFSLTPDSPEP
LKTLPMIVVIIDELADLMMVQGKKIEELIARLAQKARAAGIHLILATQRPSVDVITGLIK
ANIPTRIAFQVSSKVDSRTILDQMGAESLLGMGDMLYMPPGSGLPQRVHGAFVSDDEVHR
VVEYLKEQGEPDYVDGVLEGGVAGETGDGLGSVTGFADSESDPLYDQAVDIVLRTRRASI
SSVQRQLRIGYNRAARLLEQMEQAGIVSAMGANNSREILVPANTGADEDAEA
>tr|I0ETM4|I0ETM4_HELCM DNA translocase FtsK, membrane protein
OS=Helicobacter cetorum (strain ATCC BAA-540 / MIT 99-5656) OX=1163745
GN=HCD_06455 PE=3 SV=1
MKSKKLYLTLVIGAILVFLTLSSWLGNSGLVGRFGVWFATLNKEYFGYFSFINLPYLAFV

```
LLLLSKTKNPPTEIVLEKTLGHLLGGLSLLLLQSSFFNEGEIGNSVCLFLRPLIGNFGLY
ALIILMALIAYLILFKLPPKNALLSPKLQNFFKQVYKQCLQAFSPSKHPKESLEKTLNKQ
DNTLQESLKELENQELESSPKESNETLLAIPTPYNSTLNNIEAPKGLVQISSHTPTNYTI
YPKRNKLDDLSSPTQSELESPLQKTLTEHKEIKQEVQEIEPAHKKETPTPISTPITEDNN
KVESPSKENPNCPTNTPQERKQESPQEETPKQPRLEENALDFSKITPISHNTKKPIVIKE
LSENKEMLDELEYGEVEKPKNYELPTTQLLNEVCLKDTSLDENEIDQKIQDLLSKLRTFK
IDGDIIRTYSGPIVTTFEFRPAPNVKVSRILGLSDDLAMTLCAESIRIQAPIKGKDVVGI
EIPNSQSQIIYLREILESELFQKSSSPLTLALGKDIVGNPFITDLKKLPHLLIAGTTGSG
KSVGVNAMILSLLYKNPPEQLKLVMIDPKMVEFSIYADIPHLLTPIITDPKKAIGALQSV
AKEMERRYSLMSEYKVKTIDSYNEQAKNNGVEAFPYLIVVIDELADLMMTGGKEAEFPIA
RIAQMGRASGLHLIVATQRPSVDVVTGLIKTNLPSRVSFRVGTKIDSKVILDTDGAQSLL
GRGDMLFTPPGVNGLVRLHAPFATENEIKRIVDFIKAQKEVEYDKDFLLEESRMPLNVSS
NQSDDILERAKAVILEKKITSTSFLQRQLKIGYNQAATITDELEAQGFLSPRNAKGNREI
LQNS
```

- Vergleichen des Vorkommens in den drei Organismen-Urreichen: Multi-alignment :

```
>tr|A0A1Q2RPR3|A0A1Q2RPR3_HELPX DNA translocase FtsK OS=Helicobacter pylori
OX=210 GN=HPF94_0875 PE=3 SV=1
MKSKKLYLALIIGVLLAFLTLSSWLGNSGLVGRFGVWFAAINKKYFGYLSLVNLPYLAWV
LFLLYKTKNPFTEIVLEKTLGHLLGILSLLFLQSSLLNQGEIGNSARLFLRPFIGDFGLY
ALIMLMVVISYLILFKLPPKSVFYPYINKTQSLLKEIYKQCLQAFSPNFSPKKEGFENAP
SDIQKKETKNDKEKENLKENPINETLNHKISNEESFLAIPTPYNTTLNALEPQEGLVQIS
SHPPTRYTIYPKRNRFNDLSNPTNPTLKEVKQETKEREPTPKPATLKPVMPASAPNTEND
NKTENHKAPNYPIKEERTKENMQEENIKEEEKEVQNAPSFSPETPTRAKKPVMVKELSEN
KEILDGLDYGEVQKPKDYELPTTQLLNALCLKDTSLDENEIDQKIQDLLSKLRTFKIDGD
IIRTYSGPIVTTFEFRPAPNVKVSRILGLSDDLAMTLCAESIRIQAPIKGKDVVGIEIPN
SQSQTIYLREILESELFQKSSSPLTLALGKDIVGNPFITDLKKLPHLLIAGTTGSGKSVG
VNAMILSLLYKNPPDQLKLVMIDPKMVEFSIYADIPHLLTPIITDPKKAIGALQSVAKEM
ERRYSLMSEYKVKTIDSYNEQAPNNGVEAFPYLIVVIDELADLMMTGGKEAEFPIARIAQ
MGRASGLHLIVATQRPSVDVVTGLIKTNLPSRVSFRVGTKIDSKVILDTDGAQSLLGRGD
MLFTPPGSNGLVRLHAPFATEDEIKKIVDFIKAQKEVEYDKDFLLEESRMPLDTPNYQGD
DILERAKAVILEKKITSTSFLQRQLKIGYNQAATITDELEAQGFLSPRNAKGNREILQNF
```

```
>tr|A0A0U3CLT1|A0A0U3CLT1_9EURY DNA translocase FtsK OS=Methanobrevibacter
millerae OX=230361 GN=sm9_1701 PE=4 SV=1
MNKLGNTLKFVSGIILFVIGVVISYEVMVYNLVDVLLMVGFLIAIVGIILIISYFVDSNA
EKTSGLIKDFLNSGEFNKSSINFPKRNSKSNSDFDNNGPLIMRPEHDDYDYGKNIDDSGL
WEYYESEENSTLSPREYFDAPEIDESKAVLRVVNTEEKEVDLDKELNFTPNYEKPIKVTR
KPKKRSKDYIYEETPIVEQSVDKTEEIKKALSQDLEPAIVSQTVPTQRDIAIDINNPERL
PVPDSLKGNVLIGNELVTSNDAFEELAVGVNKEIMLEIPSLNTLSDRFLSHVPTIYSRVI
IDEFDLSDISYTVLIASLLKQGVHIKTVPKVHTVNLITDDSHAMIISDGYVSGNPEYGAI
YDDRASISNIRADFEKTWNIASNLDENVILNSIAGGVA
>tr|A0A8M9QC94|A0A8M9QC94_DANRE DNA translocase FtsK 1-like isoform X1
OS=Danio rerio OX=7955 GN=LOC100536098 PE=4 SV=1
MSNLLQFVYFEPVVKEFSNISLFISFISENPEKRRKGNKASAFFKRAWKAVKRPFLCCGR
NRVAPFEPQSDIDDCEHLPVPGPSRTVAAHADLEPVWLPGQVCEDPQPLSVPGPSRIKQT
ADPARPEFSKALTGHVDTELVCLPGQILEDPQPISVHGLTNIKNMTDADSACPESPPSVQ
DPSDIDGTDEKPKKGRKGKRVSAFFKRVWKAATRPFLCCDTDVVQHLTPQPEPEPEPESE
PEPESESEPESEPESESESESEAESELRPESEPGLENEADPEAVPAEIMPEIAEPADPES
VCLPGPAPEEPKEASVPTRSKSSFPSVFFNS
```