

## Bakterielle Plasmid-DNA in der Gelelektrophorese

(Artikelnr.: P8110100)

### Curriculare Themenzuordnung



#### Schwierigkeitsgrad



Schwer

#### Vorbereitungszeit



1 Stunde

#### Durchführungszeit



5 Stunden

#### empfohlene Gruppengröße



2 Schüler/Studenten

#### Zusätzlich wird benötigt:

- Kühlschrank
- Präzisionswaage (820g, 0,01g)

#### Versuchsvarianten:

#### Schlagwörter:

Biotechnologie, Chromosom, Plasmid, Bakterienzelle, Genom, Enzym, Restriktionsenzym, Agarose, Bakterien, Elektrophorese, Ladepuffer, Restriktionsverdau, rekombinante DNA, Agarosegel, Genetik, Molekulargenetik, Molekularbiologie

## Lehrerinformationen

### Einführung

**Wichtig: Bitte lagern Sie die Verbrauchsmaterialien (DNA und Puffer) im Kühlschrank bei ca. 4 °C sofort nach Erhalt der Ware.**

Ein Plasmid ist ein meist ringförmiges, immer doppelsträngiges DNA-Molekül, das aus 1.000 bis 1.000.000 Basenpaaren besteht und in der Zelle extrachromosomal, d.h. außerhalb des eigentlichen Chromosoms, liegt. Damit gehört es nicht zu dem eigentlichen Genom der Zelle dazu. Das Plasmid enthält DNA-Sequenzen, die ihm erlauben Transkriptionskomplexe der Wirtszelle zu nutzen und sich selbstständig zu replizieren. Plasmide kommen in Bakterien und Archaeen vor, in Eukaryonten sind sie selten (in Backhefe). Eine Zelle kann mehrere verschiedene Plasmide enthalten. Jedes Plasmid kann mehrere Gene beinhalten und repliziert autonom.

Ja nach Wirkung kann das Plasmid entweder keine Auswirkungen oder Vor- oder Nachteile für die Wirtszelle haben.

Zu Vorteilen zählen:

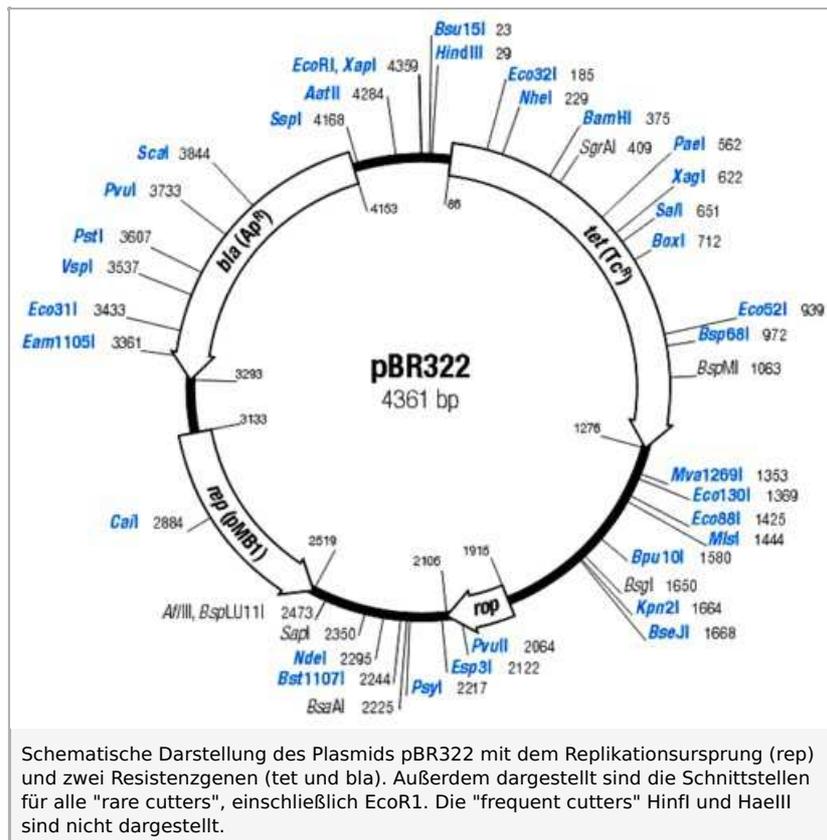
- Resistenz gegen Antibiotika (diese werden durch Proteine abgebaut oder verändert)
- Toxische Wirkung auf die um den Lebensraum konkurrierende Bakterienarten oder Pilze
- Erschließung neuer Nahrungsquellen, die sonst nicht verarbeitet werden könnten

Die Wirtszellen haben evolutive Vorteile gegenüber anderen Bakterien und können sich dadurch besser vermehren. Bakterien und Plasmide leben in Symbiose. Bringt das Plasmid Nachteile mit, kann es zum Absterben der Wirtszelle führen.

Für den Menschen interessant sind Hinweise darauf, dass Salmonellen, die ein Plasmid *Salmonella virulence plasmids* beinhalten, häufiger und schneller zum Tod der infizierten Tiere führen, als Salmonellen ohne das Plasmid. D.h. erst das Plasmid macht das Bakterium zu einem sehr gefährlichen Krankheitserreger.

Das alles kann der Mensch sich in der Gentechnik zunutze machen: durch Plasmide eingeschleuste DNA-Moleküle bewirken, dass die Bakterien die Stoffe produzieren, die vom Menschen benötigt werden. Dabei kann das Plasmid als Plasmid in der Wirtszelle verbleiben – oder besser: mit Hilfe bestimmter eingebauter DNA-Sequenzen in ihr Genom eingebaut werden. Während die Weitergabe des Plasmids an die Tochterzellen unsicher ist, ist die Weitergabe mit der Bakterien-DNA gesichert.

So können mittlerweile ca. 140 verschiedenen Medikamente gewonnen werden, wie z.B. Insulin (gegen Diabetes), Hormone (Behandlung von Wachstumsstörungen) oder Enzyme (gegen Mukoviszidose).



Um ein Plasmid nach Wunsch zu erhalten müssen die gewünschte Gene (DNA-Sequenzen) herausgeschnitten und nach Plan zum Plasmid zusammengesetzt werden. Dabei helfen Restriktionsenzyme, d.h. Proteine, welche die DNA zuschneiden können. Unterschiedliche Restriktionsenzyme existieren in allen Lebewesen. Für den Vorgang werden passende Enzyme ausgesucht, damit die DNA genau an der erwünschten Stelle zugeschnitten wird. Manche Enzyme schneiden beider Stränge der DNA an einer Stelle glatt durch, manche schneiden diese leicht versetzt, so dass „klebrige enden“ entstehen, die eine Neuzusammensetzung eines Plasmids begünstigen.

Im Versuch werden 4 DNA-Proben des Plasmids pBR322 getestet. Das pBR322 ist eines der ersten künstlich konstruierten Plasmide. In einer Probe liegt das Plasmid in ungeschnittener Form vor: in ccc-Form (covalently closed circle; geschlossener Ring) und in oc-Form (open circle; offener Ring). In den Proben wurde es mit Restriktionsenzymen behandelt, die jeweils aus einem anderen Bakterium gewonnen wurden und die DNA an einer anderen Stelle schneiden:

- EcoR1 (aus *Escherichia coli*, erzeugt klebrige Enden an 5'-G AATTC-3') - schneidet an einer Stelle und erzeugt damit die offene Ringform des Plasmids
- HinfI (aus *Haemophilus influenzae*, erzeugt klebrige Enden an 5'-G ANTC-3')
- HaeIII (aus *Haemophilus egyptius*, erzeugt glatte enden an 5'-GG CC-3')

Dadurch ergibt sich eine unterschiedliche Anzahl an unterschiedlich langen Fragmenten, die in der Gel-Elektrophorese sichtbar gemacht werden können.

## Lernziele

- Gelelektrophorese
- Bateriales Plasmid
- Recombinante DNA
- Restriktionsenzyme
- Bandenmuster
- DNA-Fragment

## Aufgabe

Im Versuch wird die DNA des Plasmids pBR322 im ungeschnittenen und geschnittenem Zustand mit Hilfe der Gel-Elektrophorese untersucht.

## Vorwissen

Die Schüler und Studenten sollen Gebots-, Verbots- und Gefahrenzeichen kennen und verstehen können. Begriffe wie Zelle, DNA, Plasmid, Chromosom, Biotechnologie, Enzyme sollten bekannt sein.

## P rinzip

Im Versuch werden 4 DNA-Proben untersucht: eine unbehandelte und drei, von denen jede mit einem anderen Restriktionsenzym aus jeweils einem anderen Bakterium behandelt wurden. Alle Proben enthalten deshalb unterschiedlich lange DNA-Fragmente. In der Gel-Elektrophorese werden diese Fragmente sortiert, da sie sich wegen ihrer Länge und ihrer Form unterschiedlich schnell durch das Gel bewegen können. So wird sichtbar, wie unterschiedlich Restriktionsenzyme verschiedener Bakterien gleiche Plasmide schneiden.

## Hinweise zu Lagerung, Vorbereitung, Aufbau und Durchführung

Experiment muss nicht an einem Stück durchgeführt werden. Es kann an einigen Stellen unterbrochen und die Proben in den Kühlschrank gestellt werden. Die Proben sind im Kühlschrank einige Tage haltbar.

Lagerung: Dank der Tatsache, dass die DNA-Proben lyophilisiert sind, sind sie sehr stabil und können einige Tage lang bei Raumtemperatur gelagert werden. Dasselbe trifft auch für die anderen Kitkomponenten zu. Allerdings wird empfohlen, den Kitinhalt mit Ausnahme von Agarose und TAE-Puffer im Kühlschrank zu lagern.

Das Lösen der DNA kann auch über Nacht im Kühlschrank erfolgen, so dass die gelösten DNA am anderen Tag direkt zur Verfügung stehen.

Der Gelladepuffer dient der „Beschwerung“ der DNA-Moleküle, die dadurch besser in die Geltasche absinken können. Der Farbstoff im Gelladepuffer erleichtert das Pipettieren in die Geltaschen und dient zusätzlich dazu, den Verlauf der Elektrophorese zu beobachten.

Gefriergetrocknete DNA ist transparent und ist daher kaum sichtbar in den Gefäßen (transparenter Film).

Das Färben nach der Gelelektrophorese sollte direkt in deren Anschluss erfolgen, da sonst die DNA-Banden im Gel diffundieren und unscharf werden.

Die DNA-Proben sind durch die Gefrier Trocknung äußerst stabil und können auch einige Tage bei Raumtemperatur gelagert werden. Gleiches gilt für die anderen Komponenten des Kits. Empfohlen wird vorsichtshalber eine Lagerung im Kühlschrank, lediglich Agarose und TAE-Puffer sollen bei Raumtemperatur gelagert werden.

Die beiliegende ungeschnittene DNA kann auch für eigene Restriktionen verwendet werden. Die notwendigen Restriktionsenzyme können im Fachhandel bezogen werden.

Hinweise zu Färbung: Bitte beachten Sie, dass die oben genannten Pipettierempfehlungen sich auf gängige Mini- bzw. Midi-Gelformate beziehen bei einer Taschenbreite von ca. 3,5 mm und einer Laufstrecke von ca. 50 mm. Die genannten Volumina gelten für die Anfärbung mit Methylenblau. Falls Sie eine empfindlichere DNA-Anfärbung durchführen möchten, können die Volumina entsprechend reduziert werden.

Wir empfehlen Ihnen, vorab ein Testgel „zu fahren“, um zu sehen, ob Ihre Volumina zu Ihrer Gelgröße passen. Falls nicht, bitte die Volumen entsprechend anpassen.

Die für die Elektrophorese vorbereiteten Proben können im Kühlschrank für einige Tage gelagert werden, falls die Elektrophorese erst später durchgeführt werden soll.

Hinweise zu Agarose-Gelelektrophorese: In der Regel ist eine Trennstrecke von 5 – 8 cm ausreichend, um die entsprechenden DNA-Fragmente gut aufzutrennen. Der Farbstoff Bromphenolblau im Gelladepuffer dient Ihnen als „Anzeiger“ für den Verlauf der Trennung. Die Elektrophorese wird beendet, wenn der Farbmarker Bromphenolblau 2/3 bis 3/4 der Gellänge erreicht hat. Die Elektrophoresekammer ist an ein geeignetes Spannungsgerät ordnungsgemäß anzuschließen. Die elektrophoretische Trennung der DNA-Proben erfolgt bei einer Spannung: ca. 3-5 Volt / cm Elektrodenabstand bei Verwendung von TAE-Elektrophoresepuffer. Bitte beachten Sie auf jeden Fall die Angaben und Hinweise in der Bedienungsanleitung Ihrer Elektrophoreseapparatur. Möglicherweise ist Ihre Apparatur für die o.g. Spannungen nicht ausgelegt. Dann ist auf jeden Fall eine kleinere Spannung zu wählen.

## Material

| Position | Material   | Bestellnr.  | Menge |
|----------|--|-------------|-------|
| 1        | Mikroliterpipette 2-20 µl  | 47141-10    | 1     |
| 2        | Mikroliterpipette 20-200 µl  | 47141-11    | 1     |
| 3        | Spitzen lose 2-200 µl, gelb, 1000 Stück                                      | 47148-01    | 1     |
| 4        | DNA-Elektrophoresekammer, horizontal   | KLA-530-200 | 1     |
| 5        | Doppelspatel, Stahl, l = 185 mm  | 46952-00    | 1     |
| 6        | Löffelspatel, Stahl vernickelt, l = 180                                      | 33392-00    | 1     |
| 7        | Schutzbrille, farblose Scheiben  | 39316-00    | 1     |
| 8        | Färbewanne, UV-durchlässig, PETG, 143 mm x 100 mm x 25 mm                    | 35023-20    | 1     |
| 9        | Elektrophorese-Netzgerät, Stromversorgungsgerät 100V/200V                    | 65966-93    | 1     |
| 10       | Magnetrührer mit Heizung und Kontaktthermometeranschluss, für 3 Liter, 230 V | 35760-93    | 1     |
| 11       | Erlenmeyerkolben DURAN®, Enghals, 500 ml                                     | 36121-00    | 1     |
| 12       | Messzylinder (PP), hohe Form, 500 ml   | 46288-01    | 1     |
| 13       | Magnetrührstäbchen 50 mm, zylindrische Form                                  | 46299-03    | 1     |
| 14       | Watte, weiß, 200 g   | 31944-10    | 1     |
| 15       | Wasser, destilliert 5 l  | 31246-81    | 1     |
| 16       | Gummihandschuhe, Größe S (7)   | 39325-00    | 1     |
| 17       | Bakterielle Plasmid-DNA in der Gel-Elektrophorese                            | KLA-530-100 | 1     |

## Sicherheitshinweise



### Handschuhe und Schutzbrille tragen!

Während des Experiments sollten generell Laborkittel und Schutzbrillen getragen werden. Handschuhe sind ebenfalls vorzuhalten und bei Bedarf anzuziehen.

Beim Herstellen des Agarosegels sind isolierte Handschuhe zu tragen, damit es nicht zu Verbrennungen oder Verbrühungen an den Händen kommt.

Auf die Gefahren von Elektrizität ist zu achten. Alle Verbindungsstecker, Netzkabel und Arbeitsflächen (aber auch die Hände) müssen trocken sein, bevor die Bedienung von elektrischen Geräten erfolgt.

Weitere Maßnahmen zur Arbeitssicherheit: Lange Haare zusammen binden, möglichst keinen Schmuck tragen, enganliegende Ärmel etc, damit kein unerwünschter Kontakt mit Geräten, Chemikalien usw. auftreten kann.

Sämtliche Abfälle sind entsprechend den Anweisungen und den örtlichen Bestimmungen zu entsorgen.

### Mögliche Gefahren der Kit-Bestandteile

#### DNA-Proben

Die DNA-Proben enthalten einen Glycerin-Anteil von 10% sowie den Farbstoff Bromphenolblau in einer Konzentration von 0,25%. Der Stoff bzw. das Gemisch ist nach Verordnung (EG) Nr. 1272/2008 nicht als gefährlich eingestuft.

Nach Richtlinie 67/548/EWG bzw. Richtlinie 1999/45/EG ist der Stoff bzw. das Gemisch nicht als gefährlich eingestuft.

#### Elektrophoresepuffer, 50-fach konz.

Folgende Hinweise beziehen sich auf den konzentrierten Elektrophoresepuffer und müssen nicht zwangsläufig auch für den verdünnten Puffer (Arbeitslösung) gelten.

Einstufung gemäß Verordnung (EG) Nr. 1272/2008:

Gefahrenhinweise

H315: verursacht Hautreizungen

H319: verursacht Augenreizungen

H335: kann die Atemwege reizen

Sicherheitshinweise

P280: Schutzkleidung, Augenschutz tragen

P261: Einatmen vermeiden

P302+P352: Bei Kontakt mit der Haut mit viel Wasser und Seife waschen.

P305+P351+P338: Bei Kontakt mit den Augen einige Minuten lang behutsam mit Wasser Spülen, Kontaktlinsen ggf. entfernen, weiter spülen

#### Agarose

Nach Verordnung (EG) Nr. 1272/2008 ist der Stoff als nicht gefährlich eingestuft.

Nach Richtlinie 67/548/EWG bzw. Richtlinie 1999/45/EG ist der Stoff bzw. das Gemisch nicht als gefährlich eingestuft.

Empfehlung: Handschuhe und Schutzbrille tragen, Kontakt mit Haut und Augen vermeiden. Staubentwicklung vermeiden, Agarose nicht einatmen.

#### DNA-Färbelösung, 200-fach konz.

Die wässrige Lösung ist nach Verordnung (EG) Nr. 1272/2008 nicht als gefährlich eingestuft.

Nach Richtlinie 67/548/EWG bzw. Richtlinie 1999/45/EG ist der Stoff bzw. das Gemisch nicht als gefährlich eingestuft.

Empfehlung: Handschuhe und Schutzbrille tragen, Kontakt mit Haut und Augen vermeiden.

## Ergebnisse

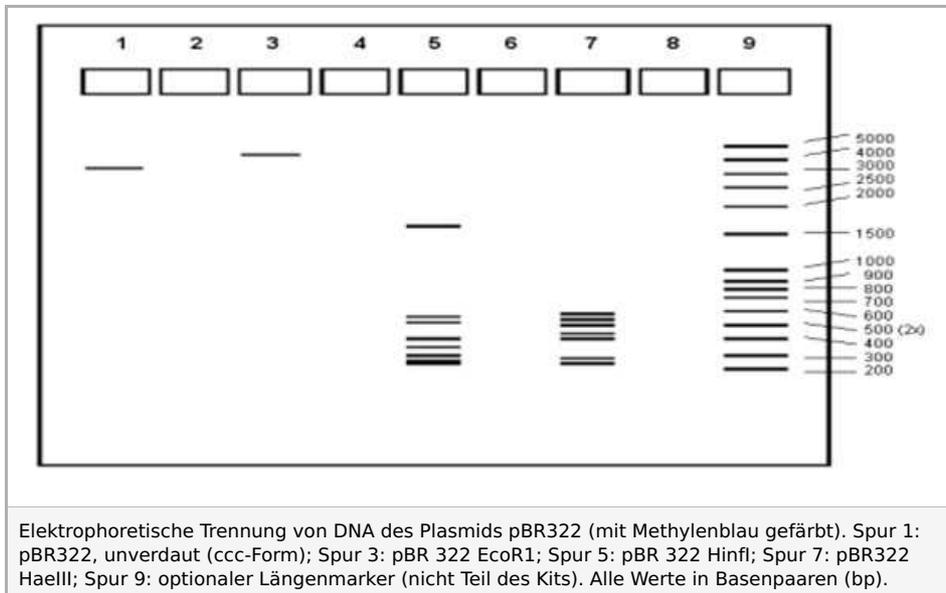
### Beobachtung und Auswertung

Beobachtung:

1: Nur bei optimaler Beladung und sensitiver Anfärbung sichtbar.

2: Einzelne niedermolekulare Fragmente trennen meistens nicht mehr auf.

Mit Methylenblau werden Fragmente unterhalb von 200 bp nicht ausreichend angefärbt, da der Farbstoff nicht so sensitiv ist wie z.B. der Fluoreszenzfarbstoff Ethidiumbromid. Dies kann jedoch toleriert werden und ist für die Auswertung von untergeordneter Bedeutung.



Bemerkung: der unverdaute Plasmid pBR322 (ccc-Form: "covalently closed circle") wandert schneller durch das Gel als der linearisierte Plasmid, der mit EcoRI an einer Restriktionsstelle geschnitten wurde. Die geknäuelte Konformation dieses Plasmids erfährt weniger Widerstand in dieser Trennmatrix und hat daher eine geringfügig schnellere Mobilität im Gel.

**Tabelle 1: Fragmentlängen, die nach den entsprechenden Restriktionsspaltungen auftreten (Angaben in Basenpaaren (bp)):**

| pBR322-DNA EcoRI | pBR322-DNA HinfI | pBR322-DNA HaeIII |
|------------------|------------------|-------------------|
| 4.361            | 1.632            | 587               |
|                  | 517              | 540               |
|                  | 504              | 502               |
|                  | 396              | 458               |
|                  | 344              | 434               |
|                  | 298              | 267               |
|                  | 221              | 234               |
|                  | 220              | 213               |
|                  | 154              | 192               |
|                  | 75 (1)           | 184               |
|                  |                  | 124               |
|                  |                  | 123               |
|                  |                  | 104               |
|                  |                  | 89                |
|                  |                  | 80,64,57          |
|                  |                  | 51,21,18,         |
|                  |                  | 11, 8 (2)         |

1: Nur bei optimaler Beladung und sensitiver Anfärbung sichtbar. 2: Einzelne niedermolekulare Fragmente trennen meistens nicht mehr auf.



## Bakterielle Plasmid-DNA in der Gelelektrophorese (ArtikelNr.: P8110100)

### Einführung

### Prinzip und Anwendung

Der Zweck dieses Versuchs ist es, mit der am häufigsten verwendeten Arbeitstechnik vertraut zu machen, die es in der Molekularbiologie gibt, und zwar der Agarose-Gelelektrophorese. Die Methode ermöglicht es, DNA, und zwar insbesondere kleine DNA-Fragmente, sichtbar zu machen und diese DNA-Fragmente nach deren Länge voneinander zu trennen.

Diese Methode wird in vielen Anwendungen genutzt, z.B.

- Feststellen, ob ein bestimmtes DNA-Fragment vorhanden ist, z.B. der Teil eines Genes,
- Vaterschaftsbestimmung,
- Überführung eines Verdächtigen über den DNA-Nachweis,
- Reinigung eines DNA-Fragments.

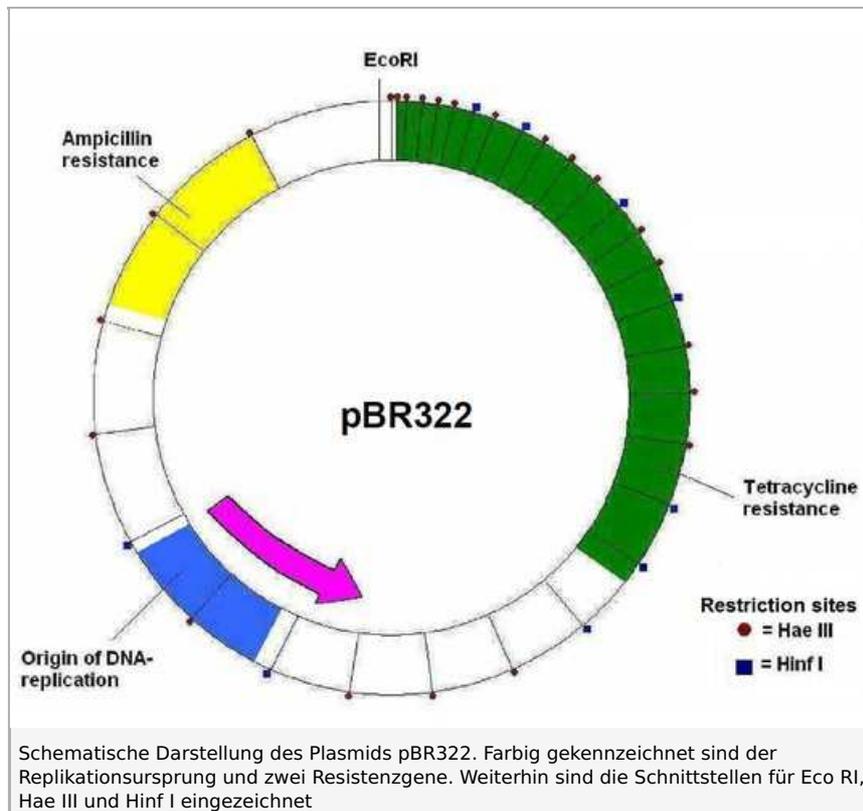
Im Versuch wird die DNA des künstlich konstruierten Plasmids pBR322 mit Hilfe der Gel-Elektrophorese untersucht. Dafür liegen 4 verschiedene DNA-Proben vor.

In einer Probe liegt das Plasmid - es handelt sich dabei um das Plasmid pBR322, eines der ersten künstlich konstruierten Plasmide - in unbehandelter, ungeschnittener Form vor: in ccc-Form (covalently closed circle; geschlossener Ring) und in oc-Form (open circle; offener Ring).

In den drei anderen Proben wurde es mit Restriktionsenzymen behandelt, die jeweils aus einem anderen Bakterium gewonnen wurden und die DNA an einer anderen Stelle schneiden. Dadurch ergibt sich eine unterschiedliche Anzahl an unterschiedlich langen Fragmenten, die in der Gel-Elektrophorese sichtbar gemacht werden können.

Das Plasmid enthält zwei Resistenzgene und zahlreiche Restriktionsstellen, die spezifisch sind für bestimmte Restriktionsenzyme. Damit wird das Plasmid in kleine Fragmente geschnitten, die dann voneinander elektrophoretisch aufgetrennt werden.

Die Restriktionsenzyme, die im Versuch verwendet werden, sind EcoRI, für das es im Plasmid eine Restriktionsstelle gibt, sowie HaeIII und HinfI, die an mehreren Stellen schneiden können:



Der Grund, warum bakterielle Plasmide in der Molekularbiologie verwendet werden, liegt daran, dass deren Wirte, Bakterien, leicht und schnell vermehrt werden können, was sie zu idealen Arbeitstieren machen. Das Bakterium, das mit dem Plasmid pBR322 verwendet wird, ist *Escherichia coli*, das häufigste in der Molekularbiologie verwendete Bakterium (das allerdings in diesem Versuch nicht verwendet wird; es wird ausschließlich mit der Plasmid-DNA gearbeitet).

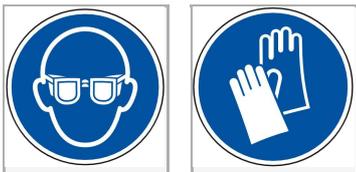
Plasmide sind seit dem Aufkommen der Polymerasekettenreaktion (PCR) etwas aus der Mode gekommen, da mit der PCR direkt und auch um ein Vielfaches schneller DNA vermehrt werden kann, ohne den Umweg über die Arbeit an lebenden Organismen.

Erst mit der Vervielfältigung von DNA, entweder über Plasmide oder mittels der PCR ist es möglich, DNA in der Gelelektrophorese sichtbar zu machen, da die Fragmente in sehr großer Zahl vorliegen und durch einfache Färbemethoden leichter sichtbar gemacht werden können.

## Material

| Position | Material   | Bestellnr.  | Menge |
|----------|--|-------------|-------|
| 1        | DNA-Elektrophoresekammer, horizontal   | KLA-530-200 | 1     |
| 2        | Electrophoresis power supply 100V/200V   | 65966-93    | 1     |
| 3        | Bakterielle Plasmid-DNA in der Gel-Elektrophorese  | KLA-530-100 | 1     |
| 4        | Precision Balance, Sartorius ENTRIS822-1S, 820 g / 0,01 g                                  | 49295-99    | 1     |
| 5        | Hotplate Magnetic Stirrer with connection for electroniccontact-thermometer, 3 ltr., 230 V | 35760-93    | 1     |
| 6        | Microliterpipette 2-20 µl  | 47141-10    | 1     |
| 7        | Microliterpipette 20-200 µl  | 47141-11    | 1     |
| 8        | Staining dish, UV permeable, PETG  | 35023-20    | 1     |
| 9        | Grad.cylinder,high,PP,500ml  | 46288-01    | 1     |
| 10       | Water, distilled 5 l   | 31246-81    | 1     |
| 11       | Pipette tips, 2-200 µl, racked   | 47148-11    | 1     |
| 12       | Protecting glasses, clear glass  | 39316-00    | 1     |
| 13       | Erlenmeyer flask,narrow n.,500 ml  | 36121-00    | 1     |
| 14       | Spoon, nickel-plated, 180 mm   | 33392-00    | 1     |
| 15       | Cotton wool, white 200 g   | 31944-10    | 1     |
| 16       | Rubber gloves, size S (7)  | 39325-00    | 1     |
| 17       | Spatula, steel, l=185mm  | 46952-00    | 1     |
| 18       | Magnetic stirring bar 50 mm, cylindrical   | 46299-03    | 1     |

## Sicherheitshinweise



Achten Sie bitte auf die Anweisungen Ihres Lehrers/Betreuers hinsichtlich der Verwendung der elektrischen Geräte und den möglichen Gefahren beim Umgang mit den Chemikalien. Beachten Sie bitte die Vorschriften zur Entsorgung der verwendeten Chemikalien.

## Aufbau und Durchführung

### Aufbau

#### Inhalt des Verbrauchsmittel-Kits:

- pBR322 DNA, ungeschnitten (ccc- und oc-Form sichtbar im Gel): 10 µg lyophilisiert
- pBR322 DNA, Eco RI geschnitten: 10 µg lyophilisiert
- pBR322 DNA, Hinf I geschnitten: 10 µg lyophilisiert
- pBR322 DNA, Hae III geschnitten: 10 µg lyophilisiert
- Gelladepuffer zum Lösen der 0,5 ml (gebrauchsfertig) gefriergetrockneten Plasmid-DNA, enthält Bromphenolblau als Farbmarker  
Agarose: 6 g
- TAE-Puffer (50-fach konz.): 50 ml
- DNA-Färbelösung (200-fach konz.): 1,5 ml

#### Hinweise:

- 1) Der Gelladepuffer dient der „Beschwerung“ der DNA-Moleküle, die dadurch besser in die Geltasche absinken können. Der Farbstoff im Gelladepuffer erleichtert das Pipettieren in die Geltaschen und dient zusätzlich dazu, den Verlauf der Elektrophorese zubeobachten.
- 2) Gefriergetrocknete DNA ist transparent und ist daher kaum sichtbar in den Gefäßen (transparenter Film).
- 3) Lagerung: Die DNA-Proben sind durch die Gefrierdrying äußerst stabil und können auch einige Tage bei Raumtemperatur gelagert werden. Gleiches gilt für die anderen Komponenten des Kits. Empfohlen wird vorsichtshalber eine Lagerung im Kühlschrank, lediglich Agarose und TAE-Puffer sollen bei Raumtemperatur gelagert werden.

## Durchführung

### Lösen der DNA im Gelladepuffer

Die DNAs werden im Gelladepuffer möglichst steril gelöst. Die Endkonzentration der gelösten DNAs richtet sich nach der Empfindlichkeit der DNA-Anfärbung. Für die Anfärbung mit Methylblau, so wie es in diesem Kit-System vorgesehen ist, werden die DNAs wie folgt gelöst:

- pBR322 DNA, ungeschnitten + Zugabe von 110 µl Gelladepuffer
- pBR322 DNA, Eco RI geschnitten + Zugabe von 130 µl Gelladepuffer
- pBR322 DNA, Hinf I geschnitten + Zugabe von 110 µl Gelladepuffer
- pBR322 DNA, Hae III geschnitten + Zugabe von 110 µl Gelladepuffer

Die Lösungsvorgang dauert ca. 15 Minuten, die Gefäße dabei ab und an auf einem Tischmischer kräftig mischen oder mit der Hand kräftig schütteln. Am Ende des Lösungsvorgangs kurz an zentrifugieren oder die Gefäße kurz auf den Tisch stoßen, so dass sich die gesamte Flüssigkeit wieder am Boden des Gefäßes sammelt.

**Tip:** Das Lösen der DNA kann auch über Nacht im Kühlschrank erfolgen, so dass die gelösten DNAs am anderen Tag direkt zur Verfügung stehen.

### Gießen des Agarosegels

Für die Darstellung der PCR-Produkte eignet sich ein 1,4 %iges Agarosegel, welches mit dem mitgelieferten 50-fach konzentrierten TAE-Elektrophoresepuffer hergestellt wird. Dieser wird zuvor 1:50 mit destilliertem Wasser verdünnt.

1. Die Agarosemenge wird für ein 1,4 %iges Gel abgewogen und in einem Erlenmeyerkolben gegeben.
2. Eine entsprechende Menge 1-fach-konz. Elektrophoresepuffer wird im Messzylinder abgemessen und hinzugegeben.
3. Die Agarose wird in der Mikrowelle oder im kochenden Wasser solange erhitzt, bis sie vollständig geschmolzen ist. Zwischendurch den Erlenmeyerkolben herausnehmen und schwenken, damit ein gleichmäßiges Schmelzen der Agarose erfolgen kann. **Vorsicht:** Hitzeabweisende Handschuhe tragen zum Anfassen des heißen Erlenmeyerkolbens. Außerdem kann Siedeverzug auftreten, so dass die Agarose herausspritzen kann (**Schutzbrille !**).
4. Die flüssige Agarose auf ca. 80°C abkühlen lassen und dann das Gel gießen.
5. Den Kamm einstecken und das Agarosegel erstarren lassen (ca. 20 Min.).
6. Das Gel mit Elektrophoresepuffer überschichten und den Kamm vorsichtig entfernen.
7. Durch die Zähne des Kamms sind in der festen Agarose Geltaschen entstanden, in die später die Proben pipettiert werden.

**Tip:**

Falls Sie die Elektrophorese erst am nächsten Tag durchführen möchten, lassen Sie den Kamm im Gel stecken und überschichten Sie das Gel lediglich mit Elektrophoresepuffer und decken alles mit etwas Haushaltsfolie ab, damit das Gel nicht austrocknet.

**Hinweis:**

Der Elektrophoresepuffer kann mehrfach verwendet werden, die Lagerung erfolgt bei Raumtemperatur.

### Auftragen der DNA-Proben

Sowohl von den verschiedenen Plasmid-Proben als auch vom DNA-Längenmarker werden 10 µl in die Taschen des Agarosegels gegeben. Die Spitze der Mikropipette taucht dabei in die Tasche ein, wobei man nicht in den Taschenboden stechen darf. Dann die Probe vorsichtig in die Tasche „laufen“ lassen. Die im Gelladepuffer gelösten Proben sind schwerer als der Elektrophoresepuffer, so dass die Proben leicht in die Tasche absinken.

**Achtung:**

Bitte beachten Sie, dass die oben genannten Pipettierempfehlungen sich auf gängige Mini- bzw. Midi-Gelformate beziehen bei einer Taschenbreite von ca. 3,5 mm und einer Laufstrecke von ca. 50 mm. Die im Kapitel "Lösen der DNAs im Gelladepuffer" genannten Volumina gelten für die Anfärbung mit Methylblau. Falls Sie eine empfindlichere DNA-Anfärbung durchführen möchten, können die Volumina entsprechend reduziert werden. Wir empfehlen Ihnen, vorab ein Testgel „zu fahren“, um zu sehen, ob Ihre Volumina zu Ihrer Gelgröße passen. Falls nicht, bitte die Volumen entsprechend anpassen. Die für die Elektrophorese vorbereiteten Proben können im Kühlschrank für einige Tage gelagert werden, falls die Elektrophorese erst später durchgeführt werden soll.

## Agarose-Gelektrophorese

In der Regel ist eine Trennstrecke von 5 – 8 cm ausreichend, um die entsprechenden DNA-Fragmente gut aufzutrennen. Der Farbstoff Bromphenolblau im Gelladepuffer dient Ihnen als „Anzeiger“ für den Verlauf der Trennung. Die Elektrophorese wird beendet, wenn der Farbmarker Bromphenolblau 2/3 bis 3/4 der Gellänge erreicht hat.

Hinweise für den Fall, dass Sie nicht das PHYWE-Elektrophorese-Netzgerät verwenden:

Die Elektrophoresekammer ist an ein geeignetes Spannungsgerät ordnungsgemäß anzuschließen. Die elektrophoretische Trennung der DNA-Proben erfolgt bei einer Spannung: ca. 3-5 Volt / cm Elektrodenabstand bei Verwendung von TAE-Elektrophoresepuffer. Bitte beachten Sie auf jeden Fall die Angaben und Hinweise in der Bedienungsanleitung Ihrer Elektrophoreseapparatur. Möglicherweise ist Ihre Apparatur für die o.g. Spannungen nicht ausgelegt. Dann ist auf jeden Fall eine kleinere Spannung zu wählen.

## Färben des Agarosegels

1. Zunächst wird die DNA-Färbelösung vorbereitet, indem 1 ml des Färbekonzentrats mit 200 ml destilliertem Wasser verdünnt wird. Die Färbelösung kann übrigens mehrfach verwendet werden und wird in einem Gefäß verschlossen bei 4°C im Kühlschrank gelagert.
2. Nach der Elektrophorese wird das Agarosegel vorsichtig mit einem Küchen-Pfannenwender o.ä. in eine Schale überführt und mit der Färbelösung übergossen.
3. Das Gel wird ca. 10-15 Min. gefärbt, Schale dazu ab und an etwas schwenken.
4. Anschließend die Färbelösung zum Aufbewahren in eine beschriftete Flasche gießen und im Kühlschrank aufbewahren. Das Gel wird dann mit Leitungswasser so lange entfärbt, bis der Hintergrund ausreichend hell erscheint und sich die gefärbten DNA-Banden gut von dem Hintergrund abheben.
5. Die blau gefärbten DNA-Banden können durch Fotografieren des Gels im Durchlicht (z.B. Leuchtkasten zur Diabetrachtung) dokumentiert werden.

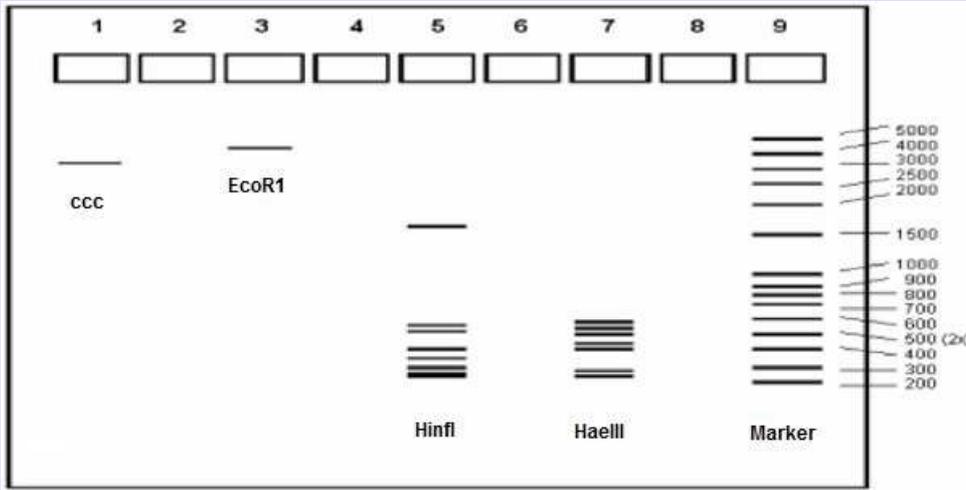
### **Tipp:**

Es empfiehlt sich, das Gel über Nacht im Kühlschrank zu lagern, da die Färbung der DNA-Banden sich in der Regel intensiviert. Das Gel dazu in Haushaltsfolie einwickeln oder in einer kleinen Kunststofftüte aufbewahren. Gegebenenfalls kann am Folgetag der Färbung auch noch weiter entfärbt werden, wenn der Hintergrund noch zu blau erscheint.

## Protokoll: Bakterielle Plasmid-DNA in der Gelelektrophorese

### Ergebnisse und Beobachtungen (10 Punkte)

Zeichnen Sie die Banden in diese Vorlage ein und ordnen Sie die Namen der vier DNA-Proben den einzelnen Spuren zu:



## Optionale Zusatzfrage (10 Punkte)

Optional kann die Elektrophorese auch mit einem DNA-Längenmarker durchgeführt werden, der in eine der leeren Geltaschen aufgetragen werden kann (nicht Teil des Kits).

Für den Fall, dass Sie einen Längenmarker verwenden, bestimmen Sie die Fragmentgrößen der vier Proben in Basenpaaren (bp). Wenn Sie keinen Längenmarker verwenden, kann Ihnen der Lehrer/Betreuer die Längen dreier Fragmente nennen, so dass Sie mit deren Hilfe die Längen der anderen DNA-Fragmente bestimmen können. Alternativ können Sie auch im Internet recherchieren. Da das Plasmid pBR322 weit verbreitet ist, ist es leicht, Informationen darüber zu erhalten.

| pBR322-DNA EcoRI | pBR322-DNA HinfI | pBR322-DNA HaeIII |
|------------------|------------------|-------------------|
| 4.361            | 1.632            | 587               |
|                  | 517              | 540               |
|                  | 504              | 502               |
|                  | 396              | 458               |
|                  | 344              | 434               |
|                  | 298              | 267               |
|                  | 221              | 234               |
|                  | 220              | 213               |
|                  | 154              | 192               |
|                  | 75 (1)           | 184               |
|                  |                  | 124               |
|                  |                  | 123               |
|                  |                  | 104               |
|                  |                  | 89                |
|                  |                  | 80,64,57          |
|                  |                  | 51,21,18,         |
|                  |                  | 11, 8 (2)         |