

## **Versuch 1: Restriktionsenzyme als molekulare Werkzeuge**

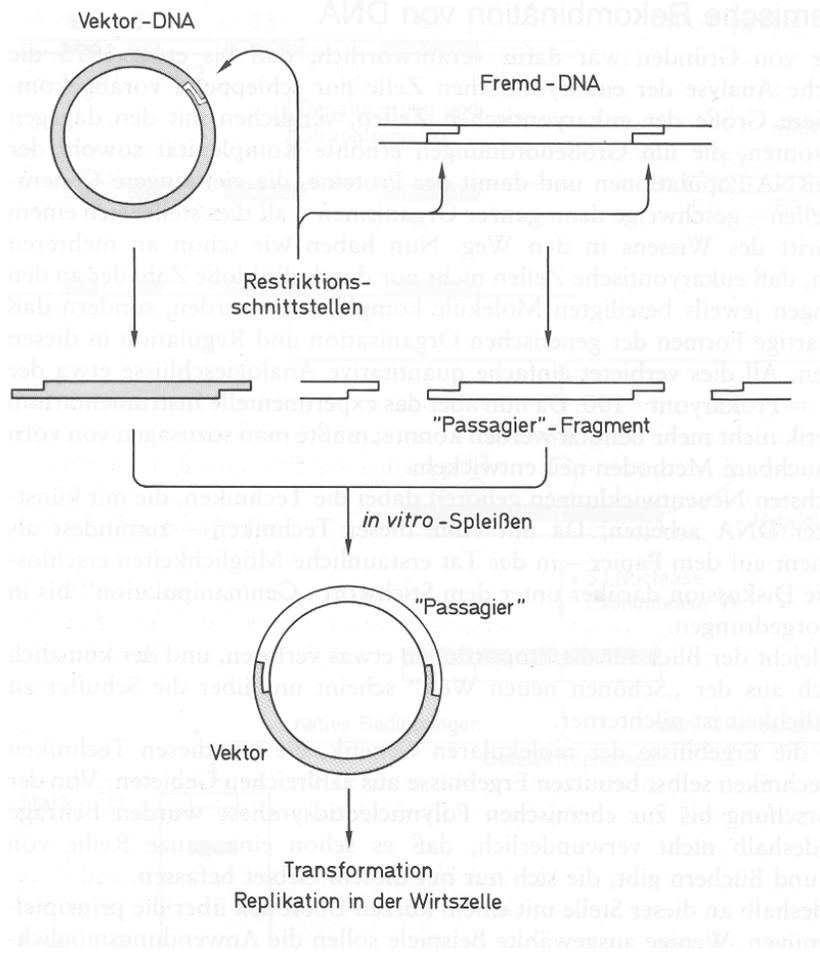
### **Versuchsinhalt**

Restriktion zweier Plasmide zur Erstellung einer physikalischen Karte, Grundlagen der DNA-Trennung und Analyse über Agarosegele

Zwei verschiedene Plasmide werden mit den Restriktionsenzymen *EcoRI* und *HindIII* behandelt. Die entstehenden DNA-Fragmente werden auf einem Agarosegel aufgetrennt und Restriktionskarten der beiden Plasmide werden erstellt.

### **Grundlagen**

Ein wesentlicher Grund für die rasche Entwicklung der modernen molekularen Genetik war die Entdeckung von Restriktionsendonukleasen, mit denen man DNA gezielt „schneiden“ kann. Von ihrem Wirkmechanismus her erkennen sie spezifisch eine kurze, meist palindromische DNA-Sequenz und zerschneiden den DNA-Doppelstrang an dieser Stelle. Je nach Enzym entstehen glatte oder um ein bis fünf Nucleotide gegeneinander versetzte Enden. Mit Hilfe einer DNA-Ligase lassen sich solche Enden wieder zusammenfügen. Mit dieser Technik können DNA-Moleküle auch aus völlig unterschiedlichen Organismen zusammengefügt (rekombiniert) werden, sofern die Enden zueinander passen. Häufig wird diese Technik dazu verwendet, DNA aus irgendeinem Organismus gezielt in kleine Fragmente zu zerlegen, im Reagenzglas mit sog. Plasmid-DNA (Vektor-DNA) zu rekombinieren und *E. coli* Zellen mit dieser neu zusammengefügt DNA zu transformieren. Diese Bakterien replizieren die heterologe DNA in großen Mengen, welche sich leicht gewinnen und weiter analysieren lässt. Ein solcher Klonierungsvorgang ist schematisch dargestellt in Abbildung 1.



**Abb.1:** Die Abbildung zeigt das Prinzip einer Klonierung von Fremd-DNA in *E. coli*.

## Versuchsdurchführung

### Ziele:

- Grundlagen der gezielten Manipulation von DNA
- Grundlagen der DNA-Trennung und Analyse über Agarosegele

### Material:

#### **Benötigte Bakterienstämme:**

Plasmide:

- a) pUC18
- b) pUC18 mit Insert (pKJL702A)

Chemikalien und Enzyme:

- c) Restriktionsenzyme *EcoRI* und *HindIII*
- d) Puffer für Restriktionsenzyme
- e) Molekulargewichtsstandard
- f) DNA-Färbelösung Methylblau

#### **Geräte und weiteres Zubehör:**

- Agarose
- Elektrophoresepuffer (1xTBE)
- Auftragspuffer (5xGLB)
- 1,5 ml Mikrozentrifugengefäße („Eppis“)
- Horizontal Gelelektrophoresekammer
- Gleichstrom Spannungsquelle (D.C. Power Supply)
- Mikropipetten (20µl /200µl) mit Spitzen
- Mikrowelle
- Erlenmeyerkolben
- Handschuhe
- Glasschalen für Färbelösungen

### **Durchführung:**

**1. Tag:** Theoretische Einführung in die Möglichkeiten zur gezielten Veränderung von DNA mit Hilfe von Restriktionsenzymen. Erklärung der Möglichkeiten der gezielten Rekombination von DNA aus unterschiedlichen Organismen.

Praktische Durchführung:

Jede Gruppe erhält und beschriftet 2 Eppendorf-Probengefäße. Hierin befinden sich die jeweilige Plasmid-DNA (pUC18 z.B. für Gruppe 1 und pKJL702A für Gruppe 2 etc.), der

Restriktionspuffer, ggf. BSA und Wasser. Jede Gruppe muss dann die Restriktionsenzyme entsprechend der Beschriftung hinzufügen. Bitte gut mischen !

Jedes Plasmid wird jeweils mit den Restriktionsenzymen *EcoRI* als Einzelverdau und mit der Mischung aus *EcoRI* und *HindIII* als Doppelverdau behandelt. Hierzu wird nach folgendem Schema pipettiert:

Reagenz	<i>EcoRI</i>	<i>EcoRI/HindIII</i>
Plasmid-DNA (Ansatz A oder B)	5,0 µl	5,0 µl
10 x Restriktionspuffer	1,0 µl	1,0 µl
BSA	-	1,0 µl
<i>EcoRI</i> (10u/µl)	1,0 µl	1,0 µl
<i>HindIII</i> (10u/µl)	-	1,0 µl
Wasser	3,0 µl	1,0 µl

Die Proben werden für mindestens eine Stunde bei 37 °C im Wasserbad inkubiert. Danach werden zu jeder Probe 2 µl Auftragspuffer (5xGLB) zugegeben und gemischt. Die Proben können danach bei -20°C bis zur weiteren Verwendung eingefroren werden.

## 2. Tag: Gelelektrophorese und Auswertung

- 1,0 g Agarose in einem 200 ml Erlenmeyerkolben abwiegen und 100 ml 1xTBE Puffer zugeben. Die Höhe der Lösung mit dem Marker markieren.
- In der Mikrowelle aufkochen bis die Agarose vollständig gelöst ist.
- Lösung etwas abkühlen lassen (gegebenenfalls die Lösung mit Wasser bis zur Markierung auffüllen) dann möglichst luftblasenfrei in eine vorbereitete Form oder auf eine entsprechende Glasplatte mit Kamm gießen und etwa 30 min abkühlen lassen.
- In der Zwischenzeit werden die Proben vorbereitet. Jeweils 10 µl der Restriktionsansätze werden mit 2µl Auftragspuffer (5xGLB) in einem 1,5 ml Reaktionsgefäß gemischt und kurz in der Mikrozentrifuge anzentrifugiert.
- Der Kamm wird aus dem ausgehärteten Gel herausgezogen und das Gel wird in eine mit 1xTBE gefüllte Elektrophoresekammer.
- Jeweils 12 µl der Proben werden auf das Gel aufgetragen. Zusätzlich werden in zwei Geltaschen 20 µl eines DNA-Molekulargewicht-Standardmarkers aufgetragen.
- Nach dem Auftragen der Proben wird der Deckel auf die Kammer gesetzt und der Strom eingeschaltet (auf richtige Polung achten!). Die Elektrophorese wird bei etwa 150 Volt durchgeführt für eine Stunde durchgeführt. Der Farbstoff Xylencyanolblau sollte sich dann etwa in der Mitte des Gels befinden.
- Das Gel wird aus dem Puffer genommen, mit Methylenblau etwa 5 min gefärbt und danach mit Wasser (häufiger wechseln) etwa 25 min. entfärbt. Den

Entfärbungsvorgang dabei ständig beobachten. Das Gel kann in Frischhaltefolie mehrere Tage aufbewahrt werden.

### **Fragen und Auswertung**

Die Wanderung der DNA Moleküle in Agarose ist umgekehrt proportional zum  $\log_{10}$  des Molekulargewichts (Größe oder Länge in Basenpaaren).

1. Erstellen Sie eine Standardkurve mit Hilfe der Markerbanden bekannter Länge. Bestimmen Sie die Entfernung (in mm) jeder Markerbande von der Startposition (Geltasche). Übertragen Sie die Messpunkte auf halb-logarithmisches Papier und konstruieren Sie die Kurve.

1. Welche Form hat die Kurve ?
2. Bestimmen Sie die Länge der DNA Fragmente.

### **Stichworte zur Auswertung:**

Was sind Plasmide? Welche charakteristischen Eigenschaften hat ein Plasmid (Replikationsursprung, Gen für Antibiotikumresistenz als Selektionsmarker, Multiple Klonierungssequenz zur Rekombination unterschiedlicher DNA-Fragmente)

Eventuell Besprechung des natürlichen Vorkommens von Plasmiden, horizontaler Gentransfer, Problem der Ausbreitung von Antibiotikaresistenzen

DNA-Sequenzierung, Genomprojekte, Modellorganismen  
genetische Komplementation