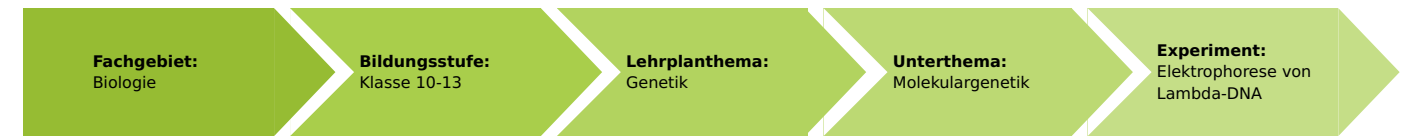


Elektrophorese von Lambda-DNA (Artikelnr.: P8110200)

Curriculare Themenzuordnung



Schwierigkeitsgrad



Schwer

Vorbereitungszeit



20 Minuten

Durchführungszeit



50 Minuten

empfohlene Gruppengröße



2 Schüler/Studenten

Zusätzlich wird benötigt:

- Wasserbad oder Mikrowellenherd
- Erlenmeyerkolben
- Optional zur Fragmentlängenbestimmung: DNA-Längenmarker mit Bromophenolblau-Färbung

Versuchsvarianten:

Schlagwörter:

Gentechnik, DNA, Chromosome, Virus, Phage, Bakteriophage, Zelle, Enzym, Restriktionsenzym, Restriktionsverdau, Bakterium, Agarose, Elektrophorese, Gelladepuffer

Lehrerinformationen

Einführung

Anwendung

Bakteriophagen werden Viren genannt, die auf Bakterien und Archaeen als Wirtszellen spezialisiert sind. Wie alle Viren besitzen sie keinen eigenen Stoffwechsel – sind also keine Lebewesen – und können sich ohne ihre Wirte nicht eigenständig reproduzieren. In einer Wirtszelle kann die Virus-DNA in die Wirts-DNA eingebaut werden, bei manchen Virusarten kann sie auch im Zellplasma als ringförmiges Plasmid verbleiben.

Außerhalb der Wirtszelle ist die virale DNA in eine Proteinkapsel verpackt (Virion) bis sie auf eine neue Wirtszelle trifft.

In der Virusforschung, der molekularen Genetik und in der Biotechnologie kommt der Bakteriophage Lambda eine besondere Bedeutung zu. Ihr DNA-Genom umfasst 48.502 Basenpaare.

Diese Phage hat *Escherichia coli* zum Wirt, ein Bakterium, das sich für Biotechnologie besonders gut eignet, weil es zur Darmflora des Menschen gehört und äußerst selten Allergien verursacht.

Die Phage selbst kann im Naturzustand im Bakterium den lysogenen Zyklus durchlaufen, d.h. sich im Bakterium vervielfältigen und zu seiner Zerstörung führen, oder aber den lysogen Weg durchlaufen, in dem die Phagen-DNA in das Bakterienchromosom eingebaut wird, dort ruht, und so auf die Tochterzellen weitergegeben wird bis die Phage ihren lysogenen Zyklus beginnt.

In der Biotechnologie macht man sich diese Eigenschaften der Bakteriophage Lambda zunutze. Der DNA-Abschnitt der Phage, der für den lytischen Zyklus verantwortlich ist wird durch gewünschte DNA-Sequenz ersetzt und diese so in die *E. coli* eingeschleust. Der lytische Weg ist nicht mehr möglich und die eingeschleuste DNA wird vom Bakterium an die Tochterzellen weitergegeben.

So werden Lambda-Phagen benutzt, um mittelgroße DNA-Sequenzen von bis zu 23.000 Basen Länge (23 kb) in die Bakterien einzubauen.

Auf diese Weise können u.a. Gene und Genkombinationen auf ihre Wirkung und Wechselwirkung miteinander untersucht werden, und ihre Transkriptionsprodukte, die Proteine, verglichen werden.

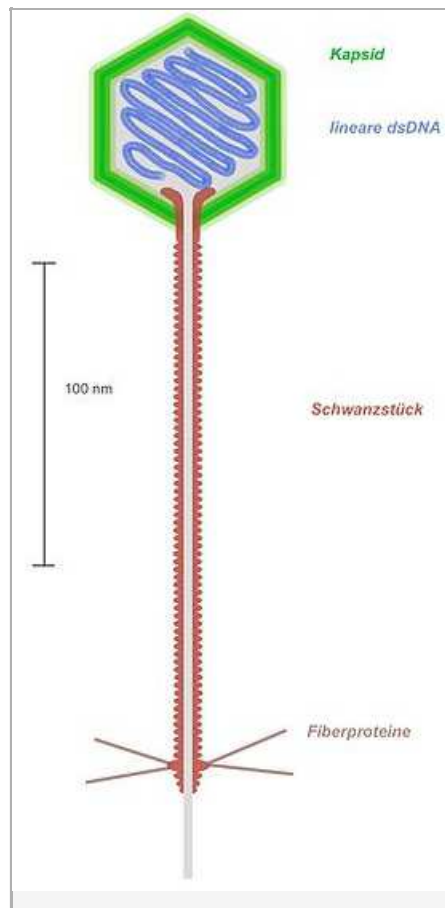


Abbildung 1: Bakteriophage Lambda; Gleiberg at de.wikipedia; Stand 20.10.2014; <http://commons.wikimedia.org/wiki/File:Lambda-Phage-01.jpg>

Im Versuch werden 4 DNA-Proben des Phagen Lambda getestet.

In einer Probe liegt die DNA der Phage in ungeschnittener Form vor. In zwei anderen Proben wurde es mit Restriktionsenzymen behandelt, die jeweils aus einem anderen Bakterium gewonnen wurden und die DNA an einer anderen Stelle schneiden. In der vierten Probe wurde die DNA der Phage Lambda mit beiden Enzymen behandelt.

Die verwendeten Enzyme, EcoRI und HindIII, schneiden beider Stränge der DNA leicht versetzt, so dass „klebrige enden“ entstehen, die eine Neuzusammensetzung der DNA begünstigen, was in der Gentechnik von Vorteil ist:

Enzym	Herkunft	Erkennungs- sequenz	Schnittstelle	Bemerkungen
EcoRI	Escherichia coli	5'-GAATTC-3' 3'-CTTAAG-5'	5'-G AATTC- 3' 3'-CTTAA G- 5'	5'-Überhang mit vier Basen, „klebrige Enden“
HindIII	Haemophilus influenzae	5'-AAGCTT-3' 3'-TTCGAA-5'	5'-A AGCTT- 3' 3'-TTCGA A- 5'	5'-Überhang mit vier Basen, „klebrige Enden“

A: Adenin T: Thymin G: Guanin C: Cytosin N: beliebige Base

Lernziel

Es soll Wissen über die Nutzung natürlich vorkommender Systeme in der Gentechnik vermittelt werden.

Aufgabe

Im Versuch wird die DNA der Phage Lambda im ungeschnittenen und geschnittenem Zustand mit Hilfe der Gel-Elektrophorese untersucht.

Vorwissen

Die Schüler sollen Gebots-, Verbots- und Gefahrenzeichen kennen und verstehen können. Begriffe wie Zelle, DNA, Virus, Phage, Chromosom, Gentechnik, Enzyme sollten bekannt sein.

Prinzip

Im Versuch werden 4 DNA-Proben untersucht: eine unbehandelte und 3, von denen 2 mit jeweils mit einem anderen Restriktionsenzym aus jeweils einem anderen Bakterium behandelt wurden, und eine, die mit beiden Restriktionsenzymen behandelt wurde.

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 DNA-Sequenzen schneiden.

Hinweise zur Vorbereitung, Aufbau und Durchführung

Die DNA-Proben sind gebrauchsfertig und können direkt in der Gelelektrophorese eingesetzt werden.

Die DNA-Proben beinhalten den Farbstoff Bromphenolblau (BPB). Dieser Farbstoff dient dazu, den Fortgang der Gelelektrophorese verfolgen zu können. Die Anfärbung der DNA-Fragmente geschieht im Anschluss an die Gelelektrophorese mit Hilfe der beiliegenden DNA-Färbelösung.

Methodische Bemerkungen

Für eine längere Lagerung der DNA-Proben sollten diese bei -18°C eingefroren aufbewahrt werden.

Erfahrungsgemäß macht das Pipettieren mit der Mikroliterpipette zu Anfang etwas Schwierigkeiten. Das Pipettieren und Auftragen von Proben in die Geltaschen eines Agarosegels sollte daher vor dem Experiment an einem Stück Agarosegel geübt werden. Als Übungslösung eignet sich eine Lösung aus blauer Tinte (2 Volumen) und Glycerin (1 Volumen). Diese Übungslösung hat in etwa die Viskosität der beiliegenden DNA-Proben und lässt sich für Übungszwecke hervorragend einsetzen.

Häufig auftretende Fehler: Die Geltaschen werden zu Anfang schlecht getroffen und überfüllt. Es kommt auch vor, dass die Pipettenspitze zu tief in die Geltasche eingeführt und so der Boden der Geltasche beschädigt wird. Das Herausziehen der Pipettenspitze aus der Geltasche erfolgt zu schnell und die gerade eingefüllte Probe wird teilweise herausgewirbelt. Der Druckknopf der Mikropipette bleibt beim Herausziehen der Pipettenspitze nicht gedrückt und saugt so die Probe wieder an.

Material

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	Elektrophorese von Lambda-DNA	KLA-530-110	1

Sicherheitshinweise

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.

Auch der Umgang mit den Geräten sowie Risiken bei der Nutzung sollten bekannt sein. Insbesondere 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: Schutzbekleidung, 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

Fragmentlängen, die nach den entsprechenden Restriktionsspaltungen auftreten (Angaben in Basenpaaren (Bp):

Lambda-DNA ungeschn.	Lambda-DNA EcoRI	Lambda-DNA	Lambda-DNA EcoRI / HindIII
48.502*	21.226*	23.130*	21.226*
	7.421	9.416	5.148
	5.804	6.557	4.973
	5.643	4.361	4.268
	4.878	2.322	3.530
	3.530	2.027	2.027
		564	1.904
		125	1.584
			1.375
			947
			831
			564
			125

*: DNA-Fragmente mit kohäsiven (klebrigen) Enden

Die kleinen DNA-Fragmente sind häufig nicht zu sehen, da die Anfärbung mit dem beiliegenden Farbstoff nicht die hohe Empfindlichkeit aufweist, um relativ kurze DNA-Stücke darzustellen.

Bei zu kurzen Trennwegen können DNA-Fragmente mit ähnlichen Längen unter Umständen nicht voneinander getrennt werden und es treten Doppelbanden auf.

Für die Auswertung und das prinzipielle Verstehen der Methodik sind beide Effekte jedoch unerheblich.

Elektrophorese von Lambda-DNA (Artikelnr.: P8110200)

Einführung

Sicherheitshinweise



Handschuhe und Schutzbrille tragen!

Fragestellung:

Wie ist es in der Biotechnologie möglich mit Hilfe von Bakteriophagen (Viren, die auf Bakterien spezialisiert sind) in das Bakteriengenom einzugreifen um Medikamente herzustellen?

Anwendung

Bakteriophagen werden Viren genannt, die auf Bakterien und Archaeen als Wirtszellen spezialisiert sind. Wie alle Viren besitzen sie keinen eigenen Stoffwechsel – sind also keine Lebewesen – und können sich ohne ihre Wirte nicht eigenständig reproduzieren. In einer Wirtszelle kann die Virus-DNA in die Wirts-DNA eingebaut werden, bei manchen Virusarten kann sie auch im Zellplasma als ringförmiges Plasmid verbleiben.

Außerhalb der Wirtszelle ist die virale DNA in eine Proteinkapsel verpackt (Virion) bis sie auf eine neue Wirtszelle trifft.

In der Virusforschung, der molekularen Genetik und in der Biotechnologie kommt der Bakteriophage Lambda eine besondere Bedeutung zu. Ihr DNA-Genom umfasst 48.502 Basenpaare.

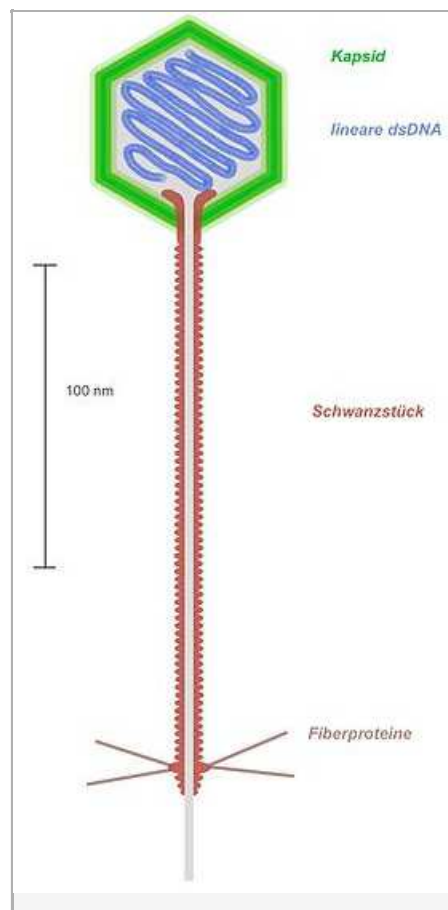
Diese Phage hat *Escherichia coli* zum Wirt, ein Bakterium, das sich für Biotechnologie besonders gut eignet, weil es zur Darmflora des Menschen gehört und äußerst selten Allergien verursacht.

Die Phage selbst kann im Naturzustand im Bakterium den lysogenen Zyklus durchlaufen, d.h. sich im Bakterium vervielfältigen und zu seiner Zerstörung führen, oder aber den lysogen Weg durchlaufen, in dem die Phagen-DNA in das Bakterienchromosom eingebaut wird, dort ruht, und so auf die Tochterzellen weitergegeben wird bis die Phage ihren lysogenen Zyklus beginnt.

In der Biotechnologie macht man sich diese Eigenschaften der Bakteriophage Lambda zunutze. Der DNA-Abschnitt der Phage, der für den lytischen Zyklus verantwortlich ist wird durch gewünschte DNA-Sequenz ersetzt und diese so in die *E. coli* eingeschleust. Der lytische Weg ist nicht mehr möglich und die eingeschleuste DNA wird vom Bakterium an die Tochterzellen weitergegeben.

So werden Lambda-Phagen benutzt, um mittelgroße DNA-Sequenzen von bis zu 23.000 Basen Länge (23 kb) in die Bakterien einzubauen.

Auf diese Weise können u.a. Gene und Genkombinationen auf ihre Wirkung und Wechselwirkung miteinander untersucht werden, und ihre Transkriptionsprodukte, die Proteine, verglichen werden.


 Abbildung 1: Bakteriophage Lambda; Gleiberg at de.wikipedia; Stand 20.10.2014; <http://commons.wikimedia.org/wiki/>

In diesem Versuch werden die Restriktionsenzyme, EcoRI und HindIII verwendet. Sie schneiden beider Stränge der DNA leicht versetzt, so dass „klebrige enden“ entstehen, die eine Neuzusammensetzung der DNA begünstigen, was in der Gentechnik von Vorteil ist:

Enzym	Herkunft	Erkennungssequenz	Schnittstelle	Bemerkungen
EcoRI	Escherichia coli	5'-GAATTC-3' 3'-CTTAAG-5'	5'-G AATTC- 3' 3'-CTTAA G- 5'	5'-overhang with four Nucleobases, „sticky ends“
HindIII	Haemophilus influenzae	5'-AAGCTT-3' 3'-TTCGAA-5'	5'-A AGCTT- 3' 3'-TTCGA A- 5'	5'-overhang with four Nucleobases, „sticky ends“

A: Adenin T: Thymin G: Guanin C: Cytosin N: variable nucleobase

Erarbeitung des Grundlagenwissens

Informiere Dich vor der Versuchsdurchführung über den Aufbau eines Virus, einer Phage und der DNA und der Funktion und Herkunft von Restriktionsenzymen.

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	Elektrophorese von Lambda-DNA	KLA-530-110	1

Aufbau und Durchführung

Aufbau

Im Versuch werden 4 DNA-Proben der Phage Lambda getestet.

In einer Probe liegt die DNA der Phage in ungeschnittener Form vor. In zwei anderen Proben wurde es mit Restriktionsenzymen behandelt, die jeweils aus einem anderen Bakterium gewonnen wurden und die DNA an einer anderen Stelle schneiden. In der vierten Probe wurde die DNA der Phage Lambda mit beiden Enzymen behandelt.

Im Versuch untersuchst Du 4 DNA-Proben aus der Bakteriophage Lambda: eine unbehandelte und 3, von denen 2 mit jeweils mit einem anderen Restriktionsenzym aus jeweils einem anderen Bakterium behandelt wurden, und eine, die mit beiden Restriktionsenzymen behandelt wurde.

Die DNA-Proben sind gebrauchsfertig und können direkt in der Gelelektrophorese eingesetzt werden.

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

Inhalt des Verbrauchsmittelkits:

- Lambda DNA 120 µl
- Lambda DNA, Eco RI geschnitten 120 µl
- Lambda DNA, Hind III geschnitten 120 µl
- Lambda DNA, Eco RI / Hind III geschnitten 120 µl
- Agarose 6 g
- TAE-Elektrophoresepuffer, 50-fach konz. 50 ml
- DNA-Färbelösung, 200-fach konz. 1,5 ml

Hinweis: Die DNA-Proben sind gebrauchsfertig und können direkt in der Gelelektrophorese eingesetzt werden. Für eine längere Lagerung der DNA-Proben sollten diese bei -18°C eingefroren aufbewahrt werden. Die DNA-Proben beinhalten den Farbstoff Bromphenolblau (BPB). Dieser Farbstoff dient dazu, den Fortgang der Gelelektrophorese verfolgen zu können. Die Anfärbung der DNA-Fragmente geschieht im Anschluß an die Gelelektrophorese mit Hilfe der beiliegenden DNA-Färbelösung.

Vorbereitung des Experiments

Elektrophoresepuffer

Der 50-fach konz. Elektrophoresepuffer (oder ein Teil davon) wird mit dest. Wasser auf die 1-fache Konzentration verdünnt. Dieser 1-fach konzentrierte Elektrophoresepuffer wird dann im Experiment eingesetzt und kann mehrfach verwendet werden.

Agarosegel gießen

Für die Elektrophorese der DNA-Fragmente wird ein 1,2%iges Agarosegel empfohlen. Je nach verwendeter Elektrophoresekammer werden unterschiedliche Gelvolumina benötigt. Die Mengen müssen daher der Beschreibung der jeweiligen Elektrophoresekammer entnommen werden.

Gleiches gilt generell für den Umgang mit der Elektrophoresekammer. Viele Elektrophoresekammern erlauben auch das Gießen des Gels 1-2 Tage vor dem eigentlichen Experiment. Dies kann aus zeitlichen und organisatorischen Gründen sehr günstig sein.

Tipp: Für die Herstellung des Agarosegels wird eine entsprechende Menge Agarose abgewogen und in einen Erlenmeyerkolben gegeben und ein entsprechendes Volumen an Elektrophoresepuffer hinzu gegeben und mit einem Wattestopfen leicht verschlossen. Vor dem Erhitzen in der Mikrowelle sollte das Gesamtgewicht des Erlenmeyerkolbens (Kolben inkl. Inhalt) notiert werden, damit nach dem Auflösen der Agaroselösung der Siedeverlust mit dest. Wasser entsprechend ausgeglichen werden kann. So wird sichergestellt, dass die gewünschte Prozentigkeit des Agarosegels erreicht wird. Das Gel sollte möglichst nicht zu dick gegossen werden, da sich dies ungünstig auf die Anfärbung der DNA-Fragmente nach Abschluß der Gelelektrophorese auswirkt. Ein 3-4 mm dickes Gel ist ideal für diesen Versuch.

DNA-Färbelösung vorbereiten

Die 200-fach konz. Färbelösung wird mit dest. Wasser verdünnt, so dass eine 1-fach konz. Färbelösung entsteht. Das heißt, 1 Vol. 200-fach konz. Färbelösung wird zu 199 Vol. dest. Wasser gegeben, um die gebrauchsfertige Färbelösung herzustellen. Die Aufbewahrung erfolgt lichtgeschützt bei 4°C im Kühlschrank. Die DNA-Färbelösung kann mehrfach benutzt werden.

Aufschmelzen der kohäsiven Enden

Der Phage Lambda hat Enden, die aus einzelsträngiger DNA bestehen. Da diese zueinander komplementär sind, können sie entweder zirkuläre Strukturen ausbilden oder mehrere Lambda-DNA-Moleküle bilden eine Art Kette (Konkatemere). Um Artefakte bei der Gelelektrophorese zu verhindern, sollten die kohäsiven Enden der Lambda-DNA (alle 4 Proben) vor der Gelelektrophorese „aufgeschmolzen“ werden. Dazu werden die DNA-Proben 5 Min. bei 65°C erhitzt und dann sofort auf Eis abgekühlt (auf Crasheis oder ins Eisfach gestellt in **vorgekühlte** Gefäßständer mit guter Kontaktfläche zu den Gefäßen).

Durchführung

Tip: Erfahrungsgemäß macht das Pipettieren mit der Mikroliterpipette zu Anfang etwas Schwierigkeiten. Das Pipettieren und Auftragen von Proben in die Geltaschen eines Agarosegels sollte daher vor dem Experiment geübt werden. Als Übungslösung eignet sich eine Lösung aus blauer Tinte (2 Volumen) und Glycerin (1 Volumen). Diese Übungslösung hat in etwa die Viskosität der beiliegenden DNA-Proben und lässt sich für Übungszwecke hervorragend einsetzen.

Häufig auftretende Fehler: Die Geltaschen werden zu Anfang schlecht getroffen und überfüllt. Es kommt auch vor, dass die Pipettenspitze zu tief in die Geltasche eingeführt und so der Boden der Geltasche beschädigt wird. Das Herausziehen der Pipettenspitze aus der Geltasche erfolgt zu schnell und die gerade eingefüllte Probe wird teilweise herausgewirbelt. Der Druckknopf der Mikropipette bleibt beim Herausziehen der Pipettenspitze nicht gedrückt und saugt so die Probe wieder an.

Elektrophorese der DNA-Proben

Von den DNA-Proben werden in folgender Reihenfolge mit einer Mikroliterpipette je 12 µl DNA in die Geltaschen des Agarosegels pipettiert:

Lambda-DNA, ungeschnitten

Lambda-DNA, EcoRI

Lambda-DNA, HindIII

Lambda-DNA, EcoRI / HindIII

Es ist darauf zu achten, dass der Boden der Geltaschen nicht beschädigt wird, indem beim Pipettieren die Pipettenspitze zu tief in die Geltasche eingetaucht wird.

Die Elektrophorese wird sofort nach dem Auftragen der DNA-Proben gestartet. Die einzustellende Gleichspannung ist abhängig von der verwendeten Elektrophoresekammer. Als Faustregel gilt eine Spannung von 5 Volt/ cm Elektrodenabstand.

Die Elektrophorese wird beendet, wenn der Farbstoff Bromphenolblau in den DNA-Proben den unteren Rand des Agarosegels erreicht hat.

Färbung der DNA-Banden

Nach der Elektrophorese wird das Agarosegel vorsichtig in eine passende Färbeschale überführt. Als Färbeschale kann eine Kunststoff- oder Glasschale zum Einsatz kommen. Das Überführen des Gels in diese Schale kann z.B. mit einem haushaltsüblichen Pfannenwender oder einem breiten Spatel erfolgen.

Das Gel wird mit der Färbelösung überschichtet und für ca. 10-15 Min. gefärbt. Die Schale dabei etwas schwenken, damit eine gleichmäßige Färbung erzielt wird. Anschließend wird die Färbelösung zurück in die Aufbewahrungsflasche gegossen und das Gel mit Leitungswasser solange entfärbt bis der Hintergrund ausreichend entfärbt ist und die DNA-Banden sichtbar sind.

Idealerweise fotografiert man das Gel bei Durchlicht auf einem Leuchtkasten.

Das Gel kann in Haushaltsfolie eingewickelt für ein paar Tage im Kühlschrank aufbewahrt werden. Die DNA-Banden zeigen sich nach Lagerung über Nacht im Kühlschrank häufig sogar noch deutlicher und schärfer als am Vortag.

Auswertung

Bei der Auftrennung der DNA-Proben zeigen sich unter optimalen Elektrophoresebedingungen und optimaler Färbung der DNA verschiedene Fragmentlängen (in Basenpaaren, bp), die in diesem Versuch quantifiziert werden können, wenn ein Molekulargewichtsmarker zusätzlich eingesetzt wird.

Das qualitative Ziel dieses Versuchs ist die Dokumentation des Gels (z.B. Foto).

Bitte beachten: Die kleinen DNA-Fragmente sind häufig nicht zu sehen, da die Anfärbung mit dem beiliegenden Farbstoff nicht die hohe Empfindlichkeit aufweist, um relativ kurze DNA-Stücke darzustellen. Bei zu kurzen Trennwegen können DNA-Fragmente mit ähnlichen Längen unter Umständen nicht voneinander getrennt werden und es treten Doppelbanden auf.