

Bakterielle Plasmid-DNA in der Gel-Elektrophorese mit der blueGel™ Elektrophoresekammer



In diesem Versuch wird Plasmid-DNA mit den Restriktionsenzymen geschnitten. Anschließend werden die entstandenen DNA-Fragmente mithilfe der Elektrophorese aufgetrennt. Durch den Vergleich von Einzel- und Doppelverdau lassen sich Schnittstellen identifizieren und die Fragmentgrößen mit einer DNA-Leiter abschätzen.

Biologie

Mikrobiologie & Genetik

Molekulare Genetik



Schwierigkeitsgrad

mittel



Gruppengröße

2



Vorbereitungszeit

20 Minuten



Durchführungszeit

40 Minuten

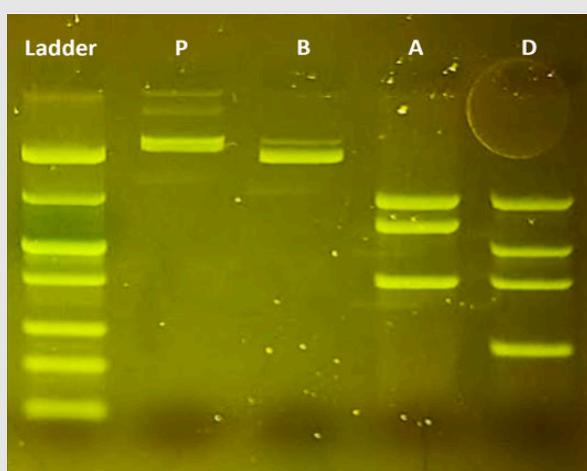
Diese Inhalte finden Sie auch online unter:

<https://www.curriculab.de/c/6867935a85548b0002cd3d72>



Lehrerinformationen

Anwendung



Gelelektrophorese von Plasmid-DNA mit dem blueGel™ System

Um DNA- und RNA-Fragmente analysieren zu können, trennt man sie standardmäßig ihrer Größe nach auf und macht sie durch Anfärben sichtbar. Zur Größenauf trennung nutzt man die Elektrophorese. Nukleinsäuren sind negativ geladen und bewegen sich daher im elektrischen Feld in Richtung des Pluspols (Anode).

Untersucht wird die elektrophoretische Trennung von DNA-Fragmenten des pXYZ-Plasmids.

Durch den Einfluss eines elektrischen Feldes werden unterschiedlich große DNA-Stücke getrennt, nachdem das Plasmid mit Restriktionsenzymen geschnitten wurde.

Sonstige Lehrerinformationen (1/4)

PHYWE

Vorwissen



Die Schülerinnen und Schüler sollten bereits die Zusammensetzung und die Eigenschaften der DNA kennen. Weiterhin sollte die Funktionsweise vom Restriktionsenzymen bekannt sein, sowie das Verhalten geladener Moleküle in einem elektrischen Feld.

Prinzip



Das DNA-Plasmid wird geschnitten und ungeschnitten auf einem Agarosegel aufgetragen und der Größe nach aufgetrennt. Verwendet man die SeeGreen™ 3-in-1 Agarosetabletten, interkaliert der in den Tabletten enthaltene SYBR-Green Fluoreszenzfarbstoff mit der DNA. Der Farbstoff wird durch das spezielle Licht der blueGel™ Gelkammer angeregt und macht so die DNA-Banden sichtbar.

Sonstige Lehrerinformationen (2/4)

PHYWE

Lernziel



Die Schülerinnen und Schüler sollen durch diesen Versuch die Funktionsweise der Gelelektrophorese kennen und verstehen lernen. Nebenbei lernen Sie, wie sich Restriktionsenzyme zur Analyse eines DNA-Moleküls nutzen lassen und wie Plasmide aufgebaut sind.

Aufgaben



Die Schülerinnen und Schüler stellen ein Agarosegel der vorgegebenen Konzentration her und tragen die verschiedenen DNA-Proben auf. Die Auftrennung kann live beobachtet und mit Hilfe der Kamera eines Smartphones selbständig dokumentiert werden.

Sonstige Lehrerinformationen (3/4)

PHYWE



Das blueGel-Elektrophoresesystem mit integriertem Leuchtschirm und Dunkelkammer

Hinweise zur Vorbereitung und Durchführung

- Das Video links zeigt die Herstellung eines Gels, den Zusammenbau des Systems und ein Beispiel einer DNA-Auf trennung.
- Bei Verwendung der GelGreen™ -Tabletten bitte beachten, dass in der Tablette bereits TBE-Salz enthalten ist. Pro Tablette muss lediglich 40 ml deionisiertes Wasser zugegeben werden, was ausreicht für das Gießen von 2 Gelen.
- Für den Laupuffer 1x TBE-Puffer verwenden.
- Zum Aufkochen des Gels wird eine Mikrowelle empfohlen, es kann aber auch eine Heizplatte verwendet werden. 60°C nicht überschreiten.

Sonstige Lehrerinformationen (4/4)

PHYWE

Anmerkungen



- Da Pipettieren kleinster Volumina nicht einfach ist, wird empfohlen diese Prozedur vorab mit den Lernenden zu üben.
- Plasmid-DNA liegt natürlicherweise in einer zirkulären, superhelikalen Form vor. Wird sie mit einem oder mehreren Restriktionsenzymen geschnitten, entstehen lineare DNA-Fragmente mit sogenannten "sticky ends" (überhängenden Enden), sofern die Enzyme solche erzeugen. Diese "sticky ends" kann während der Gelelektrophorese zu Artefakten kommen: aneinanderklebende Ketten oder auch zirkuläre Strukturen, die sich spontan aus Fragmenten bilden. Diese können sehr einfach durch Erhitzen aller DNA-Proben auf 70°C für 5 Minuten aufgeschmolzen werden. Das sofortiges Abkühlen durch Eis (oder im Eisfach vorgekühlten Probenständer) verhindert eine erneute Formation dieser Strukturen.
- Studieren Sie auch die Bedienungsanleitung des Kits: [Hier klicken](#)

Sicherheitshinweise

PHYWE



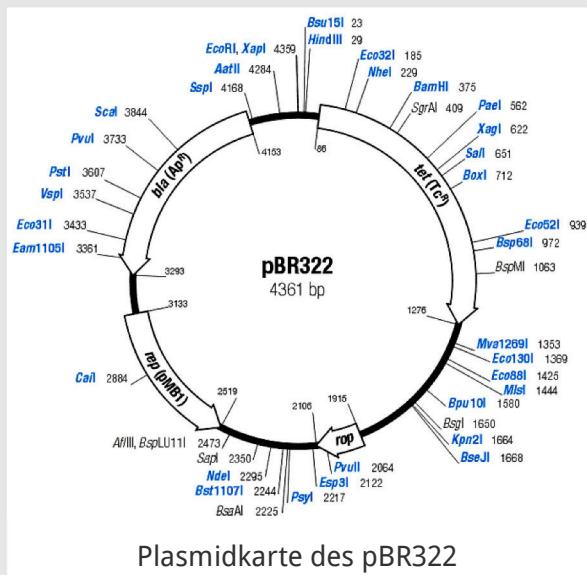
- Für diesen Versuch gelten die allgemeinen Hinweise für das sichere Experimentieren im naturwissenschaftlichen Unterricht.
- Für H- und P-Sätze bitte das Sicherheitsdatenblatt der jeweiligen Chemikalie hinzuziehen.
- Das in den SeeGreen™ Tabletten verwendete SYBR-Green stellt eine sichere Alternative zum herkömmlichen Ethidiumbromid dar. Es kann nicht in die Haut, aber durch offene Wunden ins Gewebe eindringen. Daher wird zum Gebrauch von Nitril-Handschuhen geraten.
- Agarosegele hergestellt aus den GelGeen™ -Tabletten können im regulären Hausmüll entsorgt werden.

PHYWE



Schülerinformationen

Motivation



Das Wissen über Plasmide ist wichtig, um die Evolution und Anpassung von Mikroorganismen zu verstehen, Antibiotikaresistenzen zu bekämpfen und moderne biotechnologische Anwendungen zu ermöglichen. Ohne Plasmide wäre die heutige Medizin und Biotechnologie kaum denkbar. Neben dem Lambda-Phagen ist das Plasmid pBR322 das meistuntersuchte und meistgenutzte DNA-Molekül.

Die kommerziell bislang erfolgreichste Anwendung von Plasmiden ist die industrielle Insulinproduktion. Das Gen für Insulin wird in das Plasmid eingebaut. Das Plasmid dient als Vektor und wird in Bakterienzellen eingeschleust. Die Bakterien nehmen das Plasmid auf, vermehren sich und produzieren mit dem eingeschleusten Gen menschliches Insulin in großen Mengen.

Theorie (1/6)



Plasmide – leistungsstarke Werkzeuge in der Gentechnik

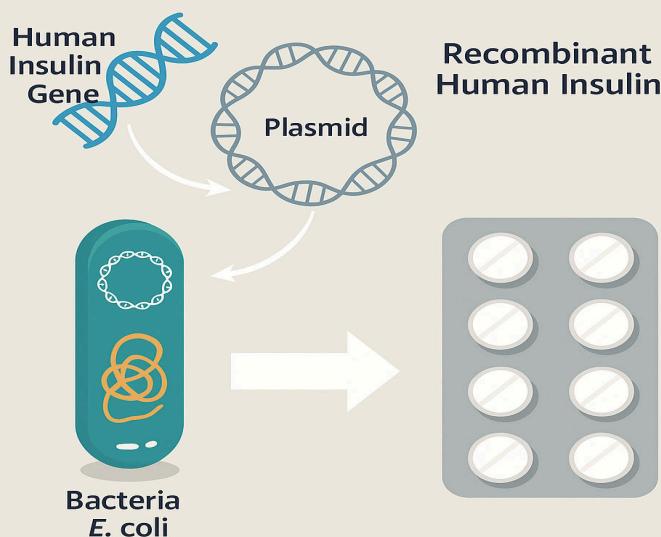
Was sind Plasmide?

Plasmide sind kleine, ringförmige DNA-Moleküle in Bakterien, die unabhängig vom Chromosom repliziert werden. Sie sind oft nicht lebenswichtig, können Bakterien aber Vorteile verschaffen.

Plasmide im Labor

Im Labor verwenden wir Plasmide, um wichtige genetische Informationen zu speichern und zu vervielfältigen. Mit gängigen gentechnischen Verfahren können wir nützliche DNA direkt in Plasmide einfügen. Diese veränderten Plasmide können dann in Bakterien oder anderen Zellen eingesetzt werden, um sich zu vermehren.

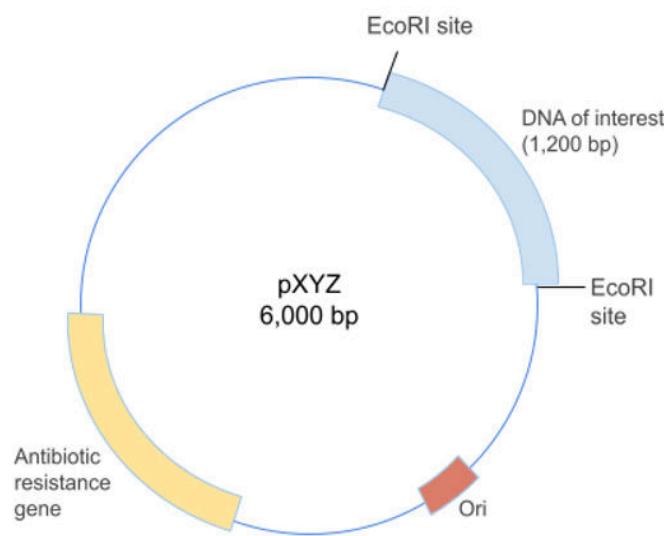
Theorie (2/6)



Diese veränderten Plasmide können anschließend in Bakterien oder andere Zellen eingeschleust werden, wo sie sich selbstständig vermehren. Die Zellen nutzen dann die in den Plasmiden enthaltenen genetischen Informationen. Dadurch sind sie in der Lage, bestimmte gewünschte Stoffe herzustellen. Ein bekanntes Beispiel ist die Produktion von **Humaninsulin**, das für die Behandlung von **Diabetes** eingesetzt wird.

Dank dieses biotechnologischen Verfahrens kann heute humanes Insulin in großen Mengen und hoher Qualität hergestellt werden.

Theorie (3/6)

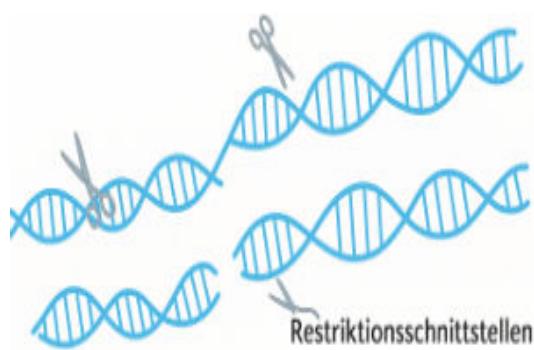


Plasmidkarten skizzieren die wichtigsten DNA-Elemente

Plasmidkarten geben einen Überblick über den Aufbau eines Plasmids. Sie enthalten:

- die Gesamtlänge in Basenpaaren (bp)
- Klonierungsstellen zum Einfügen von DNA
- den Replikationsursprung (Ori)
- Marker-Gene wie Antibiotikaresistenzen zur Selektion

Theorie (4/6)



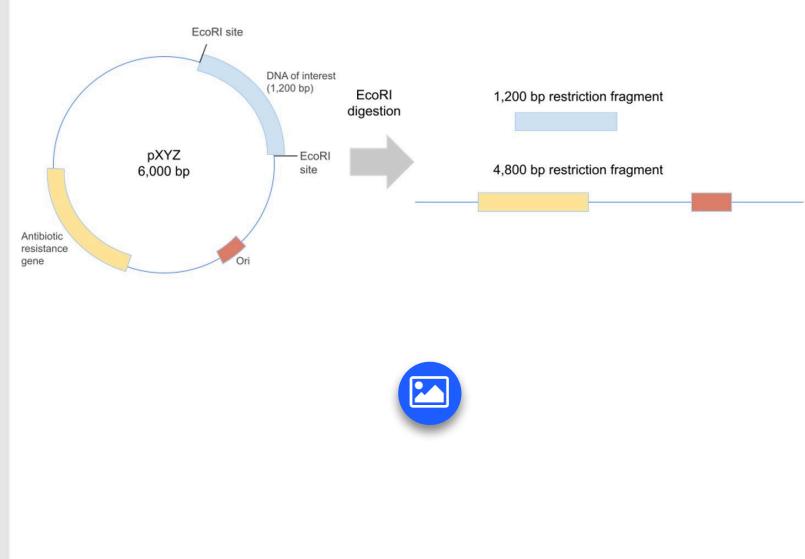
Restriktionsenzyme sind molekulare Scheren, die DNA an ganz bestimmten Stellen schneiden. Sie erkennen dabei eine spezifische Basensequenz, die meist 4 bis 8 Basenpaare lang ist. Jedes dieser Enzyme hat eine spezifische Erkennungssequenz.

Hier sind einige gängige Restriktionsenzyme und ihre Erkennungsstellen:

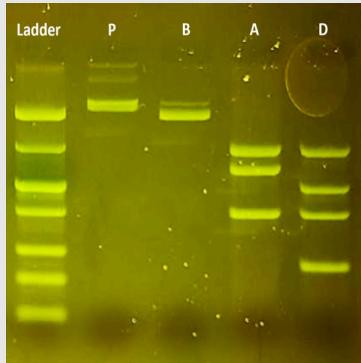
- Das Restriktionsenzym EcoRI schneidet an der Erkennungsstelle GAATTC
- BamHI schneidet innerhalb von GGATCC
- PvuII schneidet in der Mitte von CAGCTG

Theorie (5/6)

Gentechniker nutzen Restriktionsenzyme wie EcoRI, um Plasmid-DNA zu schneiden und dadurch deren Identität zu überprüfen. Beim Plasmid **pXYZ**, das zwei EcoRI-Erkennungsstellen besitzt, entstehen nach dem Schneiden zwei Fragmente: ein **1.200 bp Fragment** (die DNA von Interesse) und ein **4.800 bp Fragment** (der Rest des Plasmids). Diese Fragmente können durch Gelelektrophorese sichtbar gemacht und gemessen werden, um zu bestätigen, dass es sich um das richtige Plasmid handelt.



Theorie (6/6)



DNA-Banden im Agarosegel

Die Gelelektrophorese ermöglicht die Auftrennung und das Sichtbarmachen von DNA und RNA. Man macht sich die negative Ladung der Nukleinsäuren zu Nutze, die im elektrischen Feld zum Pluspol (der Anode) wandern. Als stationäre Phase dient hier das Agarosegel, das wie ein Netz funktioniert: je höher die Agarosekonzentration im Gel, desto enger werden die Maschen des Netzes. Kleine DNA-Fragmente haben es leichter als große, sich durch dieses Netz zur Anode zu bewegen und wandern demnach über die Zeit weiter im Gel.

Nukleinsäuren sind von alleine nicht im Gel sichtbar. Man kann sie entweder nach Abschluss des Laufs mit einer Methylenblau-Lösung anfärben oder man nutzt Stoffe, die zwischen die Basen des Erbguts interkalieren (sich dort einlagern). In unserem Versuch setzen wir einen fluoreszierenden Farbstoff ein, der mit den Plasmid-DNA-Fragmenten interkaliert. Das blaue Licht der Elektrophoresekammer regt den Farbstoff zum Leuchten an und macht so die DNA sichtbar (grüngelbe Banden, wie auf dem Foto links).

Aufgaben

1. Gieße ein 2%ige Agarosegel: beachte, dass die Agarose-Tablette bereits Agarose, den Fluoreszenzfarbstoff und TBE-Salz enthält, es also nur deionisiertes Wasser zugegeben werden muss.
2. Lade die DNA-Proben in die Geltaschen und starte die Elektrophorese.
3. Vergleiche das ungeschnittene Plasmid mit der geschnittenen Plasmid.



Proben aus dem Kit: DNA-Leiter, unverdaute Plasmid-DNA, drei verschiedene Plasmid-DNA-Verdaus

Material

Position	Material	Art.-Nr.	Menge
1	blueGel™ Gel - Elektrophoresekammer mit Netzteil und eingebauter Belichtungseinheit	35017-99	1
2	Bakterielle Plasmid-DNA in der Gel-Elektrophorese	15312-01	1
3	Mikroliterpipette 2-20 µl, autoklavierbar	47141-10	1
4	Spitzen, Kunststoff (PP) 2-200 µl, 1000 Stück	47148-01	1
5	Schutzbrille "classic" - OneSize, Unisex	39316-00	1
6	Erlenmeyerkolben, Boro, Weithals, 100 ml	46151-00	1
7	Messzylinder, Boro, hohe Form, 100 ml	36629-00	1
8	Wasser, destilliert, 5 l	31246-81	1
9	Handschuhe, Gummi, Größe M, Paar	39323-00	1
10	PCR Einzelgefäß, 0,2 ml, 100 Stück, im Beutel	35928-01	1
11	Ständer für 8 x 0,2 ml Einmalreaktionsgefäß	37652-01	1
12	SeeGreen™ Agarose Tabs™, 3-in-1 Agarose Tabletten, für Gel-Elektrophorese, für 16 Gele	35018-71	1
13	TBE-Elektrophoresepuffer, 1000 ml, 10-fach konz. Lösung	35018-73	1
14	Messpipette, 25 ml, Teilung 0,1 ml	36602-00	1
15	Pipettierball, Flip-Modell, Pipetten bis 100 ml	36592-00	1

Aufbau (1/2)

PHYWE



Video: Gießen eines Gels

- Das 10x konzentrierte TBE Laupufferkonzentrat mit deionisiertem Wasser auf 1x verdünnen (für ein Gel werden etwa 20 ml Puffer benötigt).
 - Gieße ein 2%iges Agarosegel (beachte hierzu auch das Video 1).
1. Entnehme ein GelGreen™ Agarose Tab aus der Packung und gib sie in den Erlenmeyerkolben.
 2. Gib 40 ml deionisiertes Wasser zur Tablette und koch beides auf (Mikrowelle oder Heizplatte). Dabei 60°C nicht überschreiten.
 3. Lege eine Gelschale in die Gießplattform und einen Kamm in die Gelschale (Kamm befindet sich unterhalb der Gießplattform). Nutze hierzu die Seite des Kamms mit den großen Zähnen.

Aufbau (2/2)

PHYWE



Fertiges Gel, bereit zum Beladen

4. Gieße nun 20 ml des flüssigen Gels in die Schale und lasse das Gel aushärten (etwa 10 min.).
5. Nach Erkalten des Gels den Kamm vorsichtig senkrecht aus dem Gel ziehen.
6. Stelle die Gelschale nun in die Pufferkammer der Basiseinheit.
7. Fülle ausreichend 1x TBE Laupuffer in die Pufferkammer, so dass das Gel gerade so überschichtet ist. Nicht zu viel, da ansonsten die Auftrennung länger dauert.

Durchführung (1/2)

PHYWE



Video: Das Gel laden und laufen lassen

Laden und Lauf des Gels (hierzu auch das Video links beachten):

1. Stelle die 2 µl – 20 µl Pipette auf 10 µl und stecke eine gelbe Pipettenspitze auf die Pipette. **Wichtig:** nimm für jede Probe eine neue Pipettenspitze.
2. Lade die DNA-Proben in folgender Reihenfolge auf das Gel:
 - Plasmid-DNA (Röhrchen P)
 - BamHI-Verdau (Röhrchen B)
 - ApaLI-Verdau (Röhrchen A)
 - Doppelverdau (Röhrchen D)
 - 3K-DNA-Leiter (Röhrchen L)

Durchführung

PHYWE



Gelkammer mit Dunkelkammer und Smartphone

3. Gellauf

- Stecke den Deckel auf die Basiseinheit und starte den Lauf durch Drücken der „An/Aus“ Taste.
- Falte die Dunkelhaube auf und setze diese vorsichtig über den Deckel (siehe dazu auch das Foto links).
- Durch Drücken der Lichttaste aktivierst du das blaue Licht und kannst nun die Auftrennung der Proben verfolgen. Mit Hilfe eines Smartphones oder Tablets kannst du die Auftrennung auch filmen oder durch Fotografieren dokumentieren. Nach spätestens 30-45 Minuten ist die Auftrennung abgeschlossen.



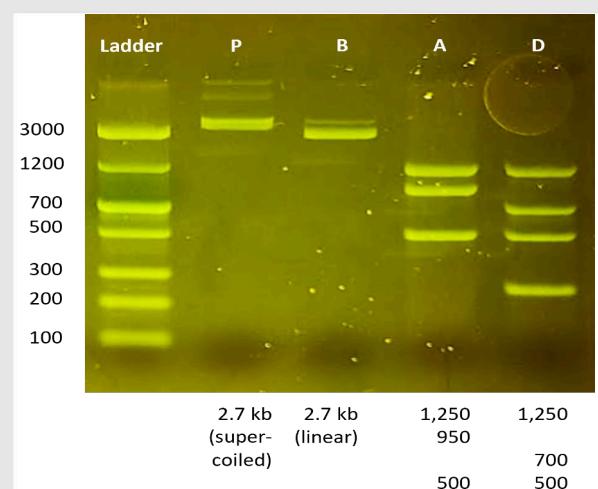
Protokoll

Aufgabe 1

Vergleiche deine Ergebnisse mit dem abgebildeten Foto und füllen Sie die folgende Tabelle mit den resultierenden Restriktionsfragmenten und ihren Größen aus:

Restriktions-enzym(e)	# DNA-Fragmente	Größe der Restriktionsfragmente (bp)
Keine	1 (zirkulär)	6,000
EcoRI	2	4.800 und 1.200
BamHI		
XmnI		

Fragmentgrößen bei optimaler Färbung und Auftrennung (Angabe in Basenpaaren [bp])



Auftrennung der Plamid-DNA

Aufgabe 2

PHYWE

Was geschieht während einer Gelelektrophorese?

- Je höher die Agarosekonzentration, desto schlechter wird der Strom durch die Kammer geleitet.
- Auftrennung der DNA-Fragmente nach ihrer Größe.
- Auftrennung der DNA-Fragmente nach ihrer Ladung.
- Plasmid-DNA-Fragmente werden ohne Farbstoff sichtbar.

Überprüfen

Aufgabe 3

PHYWE

Welche Eigenschaften von Plasmiden machen sie zu nützlichen DNA-Trägern im Labor? Wählen Sie alle zutreffenden Antworten aus.

- D. Sie sind zirkulär
- A. Sie können sich innerhalb von Bakterienzellen vermehren
- B. Sie sind mit Restriktionsenzymen leicht zu manipulieren
- C. Sie enthalten selektierbare Marker

Überprüfen

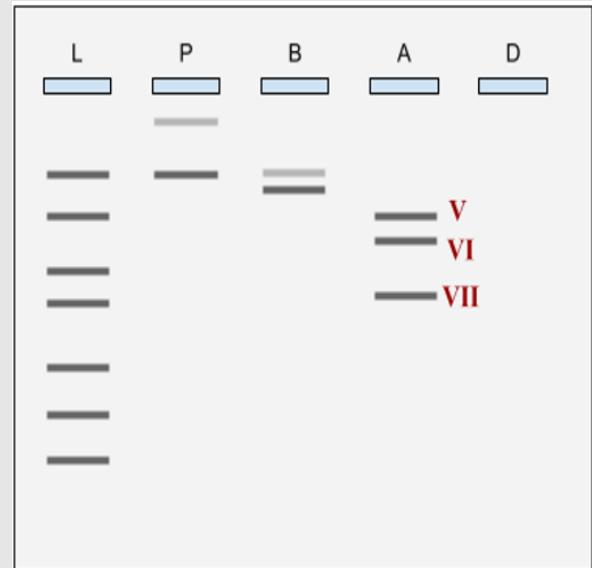
Aufgabe 4

PHYWE

Betrachten Sie das mittlere Fragment auf Spur A und vergleichen Sie es mit dem Muster der 3K-DNA-Leiter (Spur L). Welche Größe hat dieses mittlere Fragment wahrscheinlich?

- A. 1.250 bp
- B. 950 bp
- C. 500 bp

Überprüfen



Folie

Punktzahl / Summe

Folie 24: Prinzip Gelelektrophorese

0/1

Folie 25: Eigenschaften von Plasmiden

0/4

Folie 26: Bestimmung der Fragmentgröße

0/1

Gesamtsumme

0/6

Lösungen

Wiederholen

15/15