

# Elektrophorese von Lambda-DNA mit der blueGel™ Elektrophoresekammer



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

Biologie

Mikrobiologie &amp; Genetik

Molekulare Genetik



Schwierigkeitsgrad

mittel



Gruppengröße

2



Vorbereitungszeit

10 Minuten



Durchführungszeit

30 Minuten

Diese Inhalte finden Sie auch online unter:

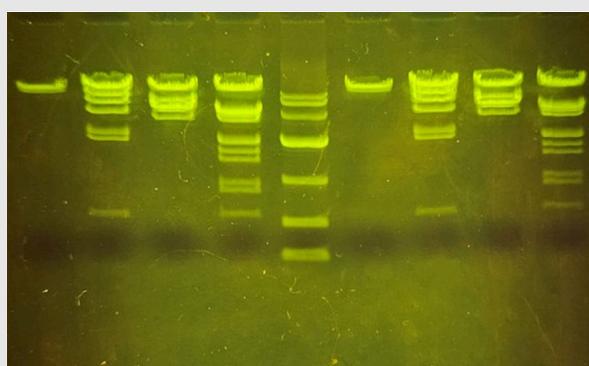


<https://www.curriculab.de/c/682c3c12778fa80002daa650>



## Lehrerinformationen

### Anwendung



Gelelektrophorese von Lambda-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. Hierzu nutzt man die Gelelektrophorese. Nukleinsäuren sind negativ geladen und bewegen sich daher im elektrischen Feld in Richtung des Pluspols (Anode).

Untersucht wird hier das Erbgut des Lambda-Phagen, eines Bakterienvirus, das *Escherichia coli* befällt. Lambda wurde bereits 1950 entdeckt und gehört zu den am besten erforschten Viren. Sein Genom umfasst 48.502 Basenpaare und ist seit 1982 vollständig sequenziert. Dadurch weiß man, welche Restriktionsenzyme an welchen Stellen schneiden, um Fragmente definierter Größe zu erzeugen.

## 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. Auch sollten die Schülerinnen und Schüler bereits ein Grundverständnis von Viren besitzen.

### Prinzip



Das Erbgut des Phagen Lambdas 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. DNA wird mit Hilfe dieser Methode der Größe nach aufgetrennt und sichtbar gemacht.

### 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 kleinsten Volumina nicht einfach ist, wird empfohlen diese Prozedur vorab mit den Lernenden zu üben.
- Die DNA-Fragmente von Lambda-DNA haben "sticky ends" und es kann während der Gelektrophorese 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 Eismantel vorgekühlten Probenständer) verhindert eine erneute Formation dieser Strukturen.

## Sicherheitshinweise

PHYWE



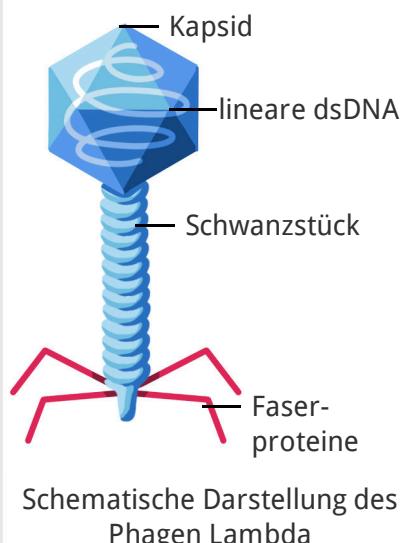
- Für diesen Versuch gelten die allgemeinen Hinweise für das sichere Experimentieren im naturwissenschaftlichen Unterricht.
- Für H- und P-Sätze bitte das Sicherheitsdatenblatt der jeweiligen Chemikalie hinzuziehen.
- Das in den GelGreen-Tabletten verwendete SYBR-Green stellt eine sichere Alternative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

PHYWE



## Schülerinformationen

## Motivation (1/4)

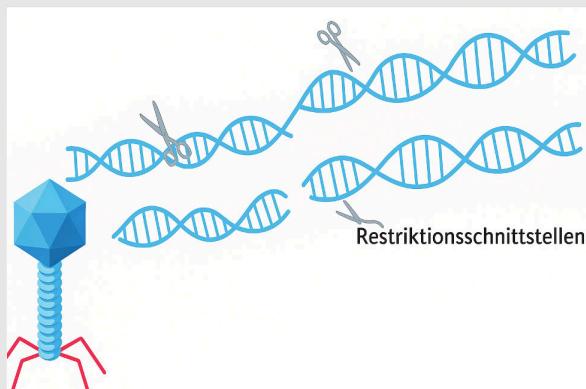


Viren sind spannende und besondere Strukturen. Sie enthalten zwar alle das genetische Material, um sich fortpflanzen zu können, sind dazu aber ohne einen Wirt nicht in der Lage. Sie betreiben auch keinen eigenen Stoffwechsel. Daher zählen sie nicht zu den Lebewesen, sondern werden als „dem Leben nahestehend“ betrachtet.

Bislang wurden etwa 11.300 Virenarten wissenschaftlich beschrieben. Schätzungen zufolge existieren jedoch weltweit mehrere hunderttausend weitere Virenarten. Allein in Säugetieren könnten über 320.000 unentdeckte Arten vorkommen.

Der hier analysierte Bakteriophage Lambda ist auf das Bakterium *E.coli* spezialisiert, also für den Menschen ungefährlich. Lambda wurde bereits 1950 entdeckt und seitdem intensiv erforscht.

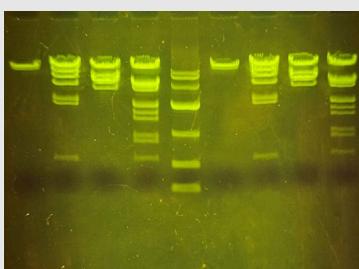
## Motivation (2/4)



**Restriktionsenzyme** sind molekulare Scheren, die bestimmte DNA-Sequenzen erkennen und an diesen Stellen schneiden. Jedes Enzym hat eine spezifische Erkennungssequenz, z. B. EcoRI (GAATTC) oder HindIII (AAGCTT). Beim Schneiden entstehen DNA-Fragmente verschiedener Länge. Manche Enzyme erzeugen sogenannte **klebrige Enden** – kurze, überstehende Einzelstränge, die sich leicht mit passenden Sequenzen verbinden. Diese sind nützlich für das Zusammenfügen von DNA, können aber beim Experiment das Gelmuster verfälschen. Deshalb wird die DNA erhitzt, um instabile Verbindungen zu lösen und klare Ergebnisse zu erhalten.

## Motivation (3/4)

Einschränkung Enzym(e)	Nr. der Fragmente
Keine	1
HindIII	8
EcoRI	6
EcoRI + HindIII	~14

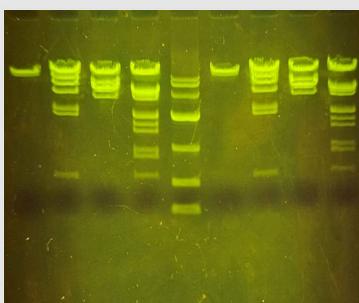


**Restriktionsenzyme** wie **EcoRI** und **HindIII** schneiden die Lambda-DNA mit ihren 48.502 Basenpaaren an spezifischen Sequenzen und erzeugen charakteristische Fragmentmuster:

- HindIII schneidet Lambda-DNA in 8 Fragmente, die zwischen einigen Hundert und über 20.000 Basenpaaren lang sind.
- EcoRI erzeugt 6 Fragmente unterschiedlicher Größe. Einige davon sind sehr ähnlich lang und im Gel schwer zu unterscheiden.
- EcoRI + HindIII gemeinsam erzeugen ein komplexeres Fragmentmuster, da sich ihre Erkennungsstellen überschneiden können. Dadurch entstehen noch mehr Fragmente unterschiedlicher Länge.

Mittels Agarose-Gelelektrophorese lassen sich diese Fragmente trennen und vergleichen.

## Motivation (4/4)



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 Lambda-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

PHYWE

1. Gieße ein 0,8%ige Agarosegel: beachte, dass die Agarose-Tablette bereits Agarose, den Fluoreszenzfarbstoff und TBE-Salz beinhaltet, es also nur deionisiertes Wasser zugegeben werden muss.
2. Lade die DNA-Proben in die Geltaschen und starte die Elektrophorese.
3. Vergleiche die ungeschnittene Phagen-DNA mit den verdauten Fragmenten.



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

## Material

Position	Material	Art.-Nr.	Menge
1	blueGel™ Gel - Elektrophoresekammer mit Netzteil und eingebauter Belichtungseinheit	35017-99	1
2	Elektrophorese von Lambda-DNA	15312-02	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	Handschuhe, Gummi, Größe M, Paar	39323-00	1
7	Erlenmeyerkolben, Boro, Weithals, 100 ml	46151-00	1
8	Messzylinder, Boro, hohe Form, 100 ml	36629-00	1
9	Wasser, destilliert, 5 l	31246-81	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 Laufpufferkonzentrat mit deionisiertem Wasser auf 1x verdünnen (für ein Gel werden etwa 20 ml Puffer benötigt).
  - Gieße ein 0.8%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 Laufpuffer 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:
  - Lambda-DNA, nativ (Röhrchen L)
  - Lambda-DNA, HindIII geschnitten (Röhrchen H)
  - Lambda-DNA, EcoRI geschnitten (Röhrchen E)
  - Lambda-DNA, EcoRI / HindIII geschnitten (Röhrchen D)
  - 10K DNA-Leiter

## 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 Dunkelkammer 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.



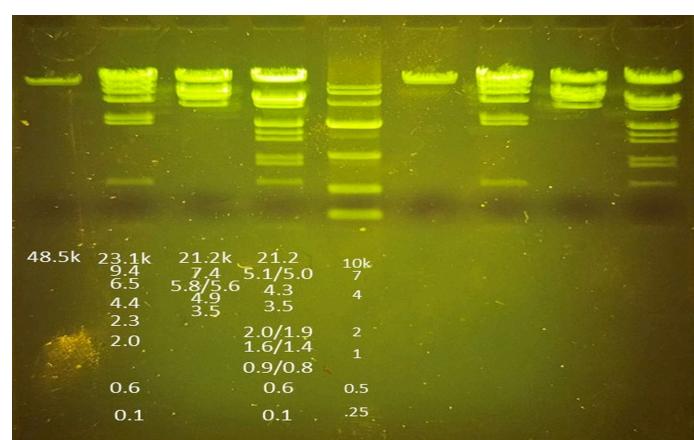
# Protokoll

## Aufgabe 1

Vergleiche deine Ergebnisse mit mit der Tabelle und dem abgebildeten Foto.

Lambda-DNA nativ	Lambda-DNA EcoRI	Lambda-DNA HindIII	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
	1.561	1.001	

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



Auf trennung der Lambda-DNA

## Aufgabe 2

PHYWE

Was geschieht während einer Gelelektrophorese?

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

Überprüfen

## Aufgabe 3

PHYWE  
excellence in science

Wie hilft die Kombination zweier Restriktionsenzyme (z. B. EcoRI und HindIII) dabei, die DNA genauer abzubilden?

- Sie verlängert die DNA, um sie besser sichtbar zu machen.
- Sie reduziert die Anzahl der Fragmente, damit das Gelbild einfacher wird.
- Sie erzeugt mehr Schnittstellen, wodurch kleinere und besser unterscheidbare Fragmente entstehen.
- Sie schützt die DNA vor weiteren enzymatischen Reaktionen.

Überprüfen

## Aufgabe 4

Warum verwendet man unverdaute Lambda-DNA als Kontrolle?

- Um zu sehen, ob die Restriktionsenzyme korrekt geschnitten haben
- Weil unverdaute DNA stabiler ist
- Um zu überprüfen, wie viele Enzyme verwendet wurden
- Um ein Vergleichsmuster zur geschnittenen DNA zu haben

Überprüfen

Folie

Punktzahl / Summe

Folie 21: Prinzip Gelelektrophorese

**0/1**

Folie 22: Unbenannt: Multiple Choice

**0/1**

Folie 23: Unbenannt: Multiple Choice

**0/2**

Gesamtsumme

 **0/4**

 Lösungen

 Wiederholen