



Elektrophorese von Lambda-DNA



Inhalt

Erste Schritte

Hintergrundinformationen
Arbeitsablauf
Benötigte Materialien

Versuchsprotokoll

Vorbereitung der Proben durch die Lehrkraft
Gelelektrophorese

- A. Gel-Elektrophorese-Puffer und Agarose-Gele vorbereiten
- B. Elektrophorese
- C. Erwartete Ergebnisse
- D. Troubleshooting

Fragen zum Versuch

Beobachtungen
Auswertung der Daten

Hintergrundinformationen

Kurze Einführung in das Thema Restriktionsenzyme

Restriktionsenzyme, auch Restriktionsendonukleasen genannt, sind Proteine, die wie molekulare Scheren wirken. Sie erkennen bestimmte DNA-Sequenzen - in der Regel 4 bis 8 Basenpaare lang - und schneiden die DNA an oder in der Nähe dieser Stellen. Diese Enzyme wurden ursprünglich in Bakterien entdeckt, wo sie durch das Zerschneiden fremder DNA als Abwehrmechanismus gegen eindringende Viren dienen.

Jedes Restriktionsenzym erkennt eine bestimmte Sequenz. So schneidet EcoRI die DNA an der Sequenz GAATTC, während HindIII an AAGCTT schneidet. Wenn die DNA mit diesen Enzymen geschnitten wird, entstehen Fragmente unterschiedlicher Länge, je nachdem, wo die Erkennungsstellen liegen.

Wissenschaftler verwenden Restriktionsenzyme in der Molekularbiologie, um Genome zu kartieren, DNA-Proben zu analysieren und DNA für das Klonen oder Sequenzieren vorzubereiten. In diesem Labor werden Sie Lambda-Phagen-DNA analysieren, die mit Restriktionsenzymen vorbehandelt wurde, und die resultierenden Fragmente mithilfe der Gelelektrophorese untersuchen.

1978 erhielten Werner Arber, Daniel Nathans und Hamilton O. Smith für die Entdeckung und Anwendung der Restriktionsenzyme den Nobelpreis für Physiologie oder Medizin.

Einige Restriktionsenzyme können kohäsive (klebrige) Enden erzeugen

Wenn Restriktionsenzyme die DNA schneiden, machen sie nicht immer einen sauberen, geraden Schnitt durch beide Stränge. Viele Enzyme, darunter EcoRI und HindIII, hinterlassen "klebrige Enden" (sticky ends) - kurze, einzelsträngige Überhänge an den Enden der DNA-Fragmente.

Diese Überhänge werden als kohäsive Enden bezeichnet, weil sie leicht Basenpaare mit komplementären Sequenzen auf anderen DNA-Fragmenten bilden können, die mit demselben Enzym geschnitten wurden. Zum Beispiel:

- EcoRI schneidet zwischen G und A in der Sequenz GAATTC, wodurch ein Überhang entsteht:

5'-G AATTC-3'
3'-CTTAA G-5'

- Die entstehenden AATT-Überhänge können durch Basenpaarung an andere, mit EcoRI geschnittene DNA-Fragmente "kleben".

Klebrige Enden können in der Molekularbiologie nützlich sein, weil sie das Zusammenfügen von DNA-Fragmenten erleichtern. In diesem Labor könnten klebrige Enden jedoch die Bandenmuster, die wir auf dem Gel sehen, verzerren. Da die Wasserstoffbrücken, die die klebrigen Enden

zusammenhalten, nicht sehr stark sind, kann thermische Energie dazu führen, dass sich die klebrigen Enden trennen. (Dies ist das gleiche Prinzip wie bei der Denaturierung der DNA während der PCR.) Im heutigen Versuch werden wir Wärme einsetzen, um sicherzustellen, dass die klebrigen Enden nicht aneinander haften.

Lambda-DNA und Restriktionsverdau

Lambda-DNA stammt vom Bakteriophagen Lambda, einem Virus, das *E. coli*-Bakterien infiziert. Sein Genom ist 48.502 Basenpaare lang und wird häufig in der Molekularbiologie verwendet, da es einfach zu handhaben ist und in Experimenten gut beschriebene Ergebnisse liefert.

Wenn Lambda-DNA mit Restriktionsenzymen wie EcoRI und HindIII behandelt wird, schneidet jedes Enzym nach einem bestimmten Muster, so dass eine vorhersehbare Menge von DNA-Fragmenten entsteht.

- **HindIII zerschneidet die Lambda-DNA in 8 Fragmente**, deren Größe von einigen hundert bis zu über 20.000 Basenpaaren reicht.
- **EcoRI erzeugt 6 Fragmente** unterschiedlicher Größe, wobei einige der Fragmente in ihrer Größe sehr nahe beieinander liegen.
- Wenn beide Enzyme zusammen verwendet werden, erzeugen EcoRI und HindIII ein komplexeres Muster mit noch mehr Fragmenten, je nachdem, wo sich ihre Erkennungsstellen überschneiden.

Wenn Sie restriktionsverdaute DNA-Proben auf ein Agarosegel auftragen, können Sie die resultierenden Fragmente sichtbar machen und die mit verschiedenen Enzymen erhaltenen Muster vergleichen. Auf diese Weise lässt sich veranschaulichen, wie Restriktionsenzyme funktionieren und wie sie zur Kartierung von DNA oder zur Analyse genetischer Unterschiede verwendet werden können.

Erwartete DNA-Fragmentmuster

Einschränkung Enzym(e)	Nr. der Fragmente	Ungefähr Fragmentgrößen (bp)
Keine	1	48.502 bp (vollständiges Lambda-Genom)
HindIII	8	23,130; 9,416; 6,557; 4,361; 2,322; 2,027; 564; 125*
EcoRI	6	21,226; 7,421; 5,804**; 5,643**; 4,878; 3,530
EcoRI + HindIII	~14	Kombination der oben genannten Punkte

* Kleinere Fragmente, wie z. B. das 125 bp-Fragment, sind in der Gelelektrophorese möglicherweise schwer zu erkennen.

** Fragmente mit ähnlichem Molekulargewicht können als eine einzige Bande auf dem Gel erscheinen.

Arbeitsablauf

Dieses Experiment besteht aus mehreren Schritten, die sich über mehrere Tage erstrecken können. Beachten Sie die unten stehenden Informationen zum Zeitbedarf.

Schritte	Erforderliche Zeit
I. Vorbereitung der Probe	
A. Reagenzien dosieren	10 Minuten (kann Tage vor dem Unterricht erfolgen)
B. Proben denaturieren	5-10 Minuten (muss unmittelbar vor dem Unterricht erledigt werden)
II. Gelelektrophorese	
C. Gel-Elektrophorese-Puffer vorbereiten und Agarose-Gele	20 Minuten (kann vor dem Unterricht gemacht werden)
D. Gel laufen lassen	30-45 Minuten

Benötigte Materialien

Wird im Kit geliefert (15312-02)

- Das Kit enthält genügend Reagenzien für 12 Gelelektrophorese-Läufe.
- Im Gefrierschrank aufbewahrt, können die Reagenzien bis zu 12 Monate nach Erhalt aufbewahrt werden.
- Reagenzien, Glasware und Verbrauchsmittel zur Herstellung von Gelen und zur Durchführung der Gelelektrophorese sind separat erhältlich. Am einfachsten ist es, wenn Sie diesen Kit mit dem Set Schülerversuche Genetik (Artikel-Nr. 15312-88) zusammen verwenden, denn dieser Set enthält alle benötigten

Reagenzien und Zubehör	Im Kit enthalten	Erforderlich	Lagerung
Lambda-DNA	120 µl	10 µl pro Spur	Gefrierschrank
HindIII Lambda-DNA	120 µl	10 µl pro Spur	Gefrierschrank

EcoRI Lambda-DNA	120 µl	10 µl pro Spur	Gefrierschrank
Doppelter Lambda-DNA-Verdau	120 µl	10 µl pro Spur	Gefrierschrank
10K DNA-Leiter	120 µl	10 µl pro Spur	Gefrierschrank

Elektrophorese-Reagenzien und Kunststoffe separat erhältlich

- Für diesen Versuch werden 2%ige Agarosegele mit einem fluoreszierenden DNA-Farbstoff (z.B. SeeGreen™, Art.-Nr. 35018-71 oder 35018-72) benötigt.
- 1,5 ml Einzelgefäße oder 0,2 ml Einzelgefäße (Röhrchen)
- TBE-Elektrophoresepuffer (z.B. TBE-Elektrophoresepuffer, 1000 ml, 10-fach konz. Lösung, Art.-Nr. 35018-73)

Erforderliche Ausrüstung

- Für diesen Versuch wird eine Wärmequelle mit einer Temperatur von 70 °C benötigt (z. B. ein Wasserbad oder ein Heizblock).
- Dieser Versuch kann mit jedem horizontalen Gelelektrophorese-System in Kombination mit einem fluoreszierenden DNA-Farbstoff (z. B. SeeGreen™) und einem Transilluminator, der mit dem verwendeten DNA-Farbstoff kompatibel ist, durchgeführt werden.
- Fluoreszierende DNA-Färbungen erfordern in der Regel eine Beleuchtung mit blauem Licht (~470 nm) oder UV-Licht (~260 nm).
- Dafür eignet sich am einfachsten das blueGel-Gelelektrophoresegerät (35017-99), denn es enthält neben der Elektrophoreseeinheit, dem Gelgießstand und dem Stromversorgungsgerät auch den Transilluminator, alles in einem Gerät.

Andere vom Benutzer bereitgestellte Materialien

- Destilliertes Wasser
- Mikrowelle oder Kochplatte
- Einweg-Laborhandschuhe
- Schutzbrillen
- Permanentmarker mit feiner Spitze
- Eis

Vorbereitung der Proben durch die Lehrkraft

Reagenzien dosieren

- DNA-Proben können bis zu einer Woche im Voraus entnommen und im Kühlschrank aufbewahrt werden.
- Dieses Kit enthält ausreichend Reagenzien für 12 Gelläufe.

Benötigte Materialien

Aus dem Kit (im Gefrierschrank aufbewahrt):

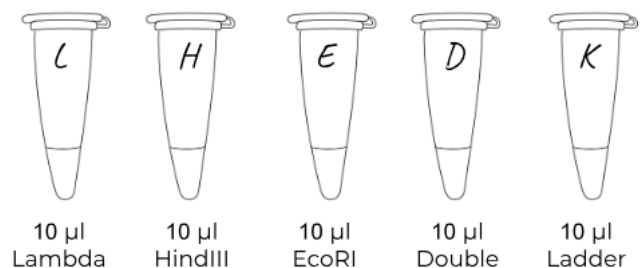
- Lambda-DNA
- HindIII-Verdau
- EcoRI-Verdau
- Doppelter Verdau
- 10K DNA-Leiter

Vom Benutzer zur Verfügung gestellt:

- Kunststoffröhrchen für die Abgabe von Reagenzien (1,5 ml oder 0,2 ml Röhrchen)
- 2-20 µl-Mikropipette und Spitzen
- Permanentmarker mit feiner Spitze

1. Tauen Sie die Reagenzien auf, indem Sie die Röhrchen auf Raumtemperatur bringen.
2. Fangen Sie die Flüssigkeit am Boden jedes Röhrchens auf. Schleudern Sie die Flüssigkeit entweder kurz in einer Mikrozentrifuge oder schütteln Sie sie mit einer Bewegung aus dem Handgelenk.
3. Prüfen Sie beim Öffnen jedes Röhrchens, ob Flüssigkeit in der Kappe steckt. Falls nötig, setzen Sie die Kappe wieder auf und wiederholen Sie Schritt 2.
4. Geben Sie die folgenden Reagenzien in Kunststoffgefäße, die in Ihre 70 °C Wärmequelle passen. Wenn Sie einen miniPCR-Thermocycler für die Denaturierung verwenden, benutzen Sie 0,2 ml PCR-Gefäße.
5. Beschriften Sie die obere Seitenwand eines jeden Röhrchens mit der entsprechenden Proben-ID

- Lambda-DNA (L) 10 µl
- HindIII-Verdau (H) 10 µl
- EcoRI-Verdau (E) 10 µl
- Doppelveidau (D) 10 µl
- 10K DNA-Leiter (K) 10 µl



6. Wiederholen Sie die Schritte 4 und 5 für so viele Laborgruppen, wie Sie für Ihre Klasse benötigen. Dieses Kit enthält genügend Reagenzien für bis zu 12 Gelläufe.
7. Wenn Sie die DNA-Proben mehr als 24 Stunden vor dem Unterricht vorbereiten, bewahren Sie die Röhrchen bis zur Verwendung im Kühlschrank auf. Dispensierte DNA-Proben können bis zu einer Woche im Kühlschrank aufbewahrt werden.

Denaturierung der Probe

1. Legen Sie die Röhrchen H, E und D in Ihre 70 °C Wärmequelle. Die Röhrchen L und K müssen nicht denaturiert werden.
2. Diese 3 Röhrchen 5 Minuten lang erhitzen.
3. Kühlen Sie die Röhrchen mindestens 3 Minuten lang mit fein zerstoßenem Eis.
4. Fahren Sie mit dem Kapitel Gelelektrophorese fort.

Gelelektrophorese

A. Gel-Elektrophorese-Puffer und Agarose-Gele vorbereiten

1. Bereiten Sie den Elektrophoresepuffer vor.
 - Für die blueGel-Elektrophorese-System: 30 ml TBE-Puffer pro Gel.
 - Bei anderen Systemen entnehmen Sie die benötigte Menge bitte den Anweisungen des Herstellers.
2. Bereiten Sie 0,8% Agarosegel(e) mit fluoreszierender DNA-Färbung vor.
 - Dieser Kit ist mit jeder Agarose von molekularer Qualität und jedem fluoreszierenden DNA-Farbstoff (z. B. SeeGreen™) kompatibel.
 - Die benötigte Gelmenge hängt von dem von Ihnen verwendeten Gelelektrophorese-System ab.
 - Die Gele können bis zu fünf Tage im Voraus vorbereiten. Lagern Sie die vorbereiteten Gele bei Raumtemperatur in einem luftdichten, lichtgeschützten Behälter. Weichen Sie die Gele NICHT in Puffer ein und wickeln Sie sie nicht in Papiertücher ein.

B. Elektrophorese

Dieses Kit ist mit jedem horizontalen Gelelektrophorese-System kompatibel. Beachten Sie die Anweisungen des Herstellers für den Betrieb Ihres spezifischen Gelelektrophorese-Systems.

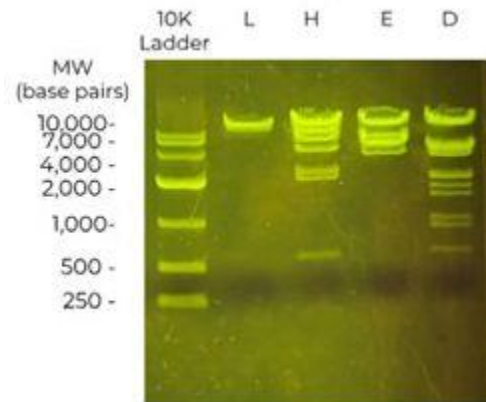
1. Legen Sie das vorbereitete Gel in die Elektrophoresekammer.
2. Geben Sie genügend Elektrophoresepuffer hinzu, um die Kammer zu füllen und das Gel gerade zu bedecken.
 - Sie benötigen 30 ml TBE-Puffer für ein blueGel™-Elektrophorese-System. Füllen Sie die Kammer nicht zu voll, da sonst die Elektrophorese länger dauert.
 - Wenn Sie ein anderes Elektrophorese-System verwenden, entnehmen Sie den empfohlenen Puffertyp und das empfohlene Volumen den Anweisungen des Herstellers.
3. Verwenden Sie eine Mikropipette, um 10 µl der 10K-DNA-Leiter in die erste Vertiefung zu geben.
4. Wechseln Sie jedes Mal die Pipettenspitzen und geben Sie 10 µl jeder DNA-Probe in eine eigene Vertiefung
 - Lambda-DNA (Röhrchen L)
 - HindIII-Verdau (Röhrchen H)
 - EcoRI-Verdau (Röhrchen E)
 - Doppelverdau (Röhrchen D)
5. Lassen Sie das Gel 30-45 Minuten lang laufen
 - Das blueGel-Elektrophorese-System arbeitet mit einer festen Spannung. Der Transilluminator ist bereits eingebaut.
 - Wenn Sie ein anderes Gelelektrophorese-System verwenden, stellen Sie die Spannung im Bereich von 70-90 V ein. Visualisieren Sie die DNA-Proben mit einem Transilluminator.
6. Um die DNA-Proben sichtbar zu machen, schalten Sie das blaue Licht in Ihrem Elektrophorese-System ein oder platzieren Sie das Gel auf einen Transilluminator.
7. Falls erforderlich, lassen Sie das Gel so lange laufen, bis eine ausreichende Trennung für die Auswertung der Ergebnisse erreicht ist.

10K DNA Ladder



C. Erwartete Ergebnisse

Vergleichen Sie die Banden in der 10K-DNA-Leiter mit Ihren Lambda-DNA-Proben, um Größenschätzungen zu erhalten.



D. Troubleshooting

Schwache oder fehlende Banden. Eine unzureichende DNA-Menge oder ein zu langer Gellauf können zu diesem Ergebnis führen.

- Stellen Sie sicher, dass Sie die richtige Probenmenge pro Vertiefung verwenden.
- Überprüfen Sie das Gel während des Laufs, um den Wanderungsfortschritt zu überwachen.

Verschmieren von DNA-Banden. Überladene Vertiefungen oder degradierte DNA können zu einer Verschmierung führen, ebenso wie alter oder falscher Gelelektrophoresepuffer.

- Reduzieren Sie die DNA-Menge pro Vertiefung.
- Verwenden Sie frische DNA, die nicht länger als 5 Minuten denaturiert und dann gekühlt wurde.
- Frischen Gelelektrophoresepuffer vorbereiten.

Unzureichende Bandentrennung. Zu dicht beieinander liegende oder schwer zu unterscheidende Banden können auf eine falsche Agarose-Porengröße zurückzuführen sein.

- Stellen Sie sicher, dass Sie ein 0,8%iges Agarosegel verwenden.
- Lassen Sie das Gel länger laufen

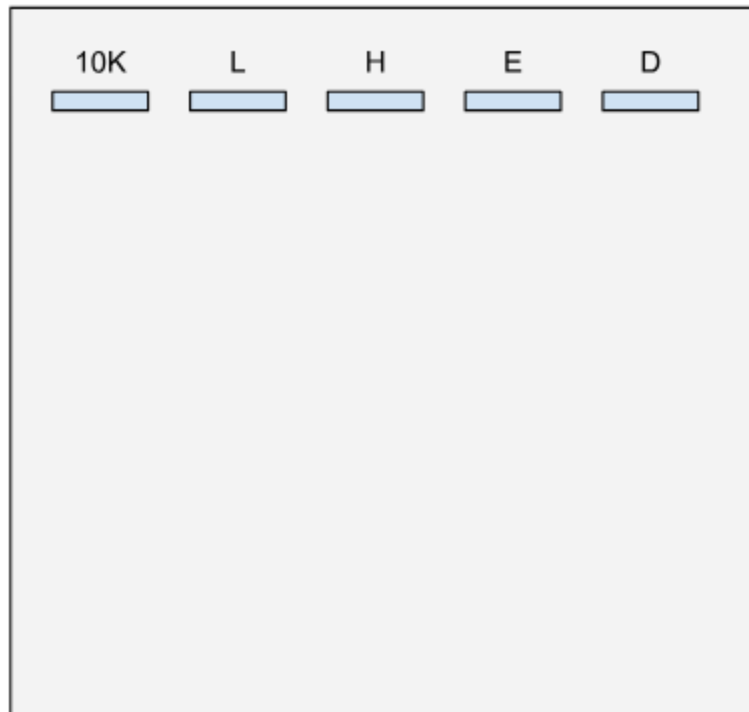
Es erscheinen überhaupt keine Banden. Dies kann die Folge einer falschen Gelpräparation sein, insbesondere wenn kein fluoreszierender DNA-Farbstoff zugegeben wurde.

- Stellen Sie sicher, dass Sie einen fluoreszierenden DNA-Farbstoff verwenden, der mit der Wellenlänge Ihres Beleuchtungssystems kompatibel ist (z. B. 460 nm Anregung wie beim blueGel™).
- Wenn Sie keine All-in-One Agarose Tabs verwenden, überprüfen Sie, ob die richtige Menge an DNA-Färbemittel zu Ihrer Agarosemischung hinzugefügt wurde.

Fragen zum Versuch

Beobachtungen

1. Skizzieren Sie im folgenden Diagramm die Bandenmuster für jede Spur.
2. Schätzen Sie die Fragmentgrößen mit Hilfe der 10K-DNA-Leiter als Referenz.
3. Zählen Sie unter jeder Spur die Anzahl der sichtbaren Fragmente in jedem Verdau.



Auswertung der Daten

1. Bei welchem Verdauungsprozess entstehen die meisten Fragmente? Warum?
 2. Wie hilft die Kombination zweier Enzyme dabei, die DNA genauer abzubilden?
 3. Warum ist es wichtig, unverdaute Lambda-DNA als Kontrolle zu verwenden?
-