



Elektrophorese von Plasmid-DNA



Inhalt

Erste Schritte

Überblick über den Versuch
Benötigte Materialien
Vorbereitung der Lehrkraft
Einrichtung eines Arbeitsplatzes

Leitfaden für Lernende

Hintergrundinformationen
Aktivität vor dem Versuch
Der Versuch
Protokoll
Fragen vor dem Versuch
Fragen nach dem Versuch

Leitfaden für Lehrkräfte

Erwartete Ergebnisse
Troubleshooting

Überblick über den Versuch

Führen Sie die Schüler in die Verwendung von Restriktionsenzymen zum Zweck der Plasmid-kartierung (Plasmid-Mapping) ein. Durch die Verwendung von vorverdauten Plasmid-DNA-Proben, die für die Gelelektrophorese-Analyse bereit sind, kann diese Aktivität in einer einzigen Unterrichtsstunde durchgeführt werden (siehe detaillierte Zeitvorgaben unten).

Anforderungen an die Unterrichtszeit

Schritte	Erforderliche Zeit
Davor Gele herstellen	Wir empfehlen, dass die Lehrkraft die Gele außerhalb des Unterrichts vorbereitet (s.u.). Planen Sie 30 Minuten Unterrichtszeit ein, wenn Sie die Gele von den Schülern vorbereiten lassen möchten.
1 Gel laden	10 Minuten
2 Gel laufen lassen	30-45 Minuten Das Gel muss während dieser Zeit nicht aktiv überwacht werden.
3 Ergebnisse auswerten	5 Minuten

Benötigte Materialien

Wird im Kit mitgeliefert

- Das Kit enthält genügend Reagenzien für mindestens 8 Laborgruppen.
- Bei Aufbewahrung im Gefrierschrank sind die Reagenzien nach Erhalt 12 Monate lang haltbar.
- Reagenzien zur Herstellung von Gelen, Plastikröhren zur Aliquotierung von Reagenzien und Pipettenspitzen sind separat erhältlich. Siehe unten für weitere Informationen.

Reagenzien und Zubehör	Zur Verfügung gestellt	Erforderlich	Lagerung
Plasmid-DNA	150 µl	15 µl pro Gruppe	Gefrierschrank
BamHI-verdautes Plasmid	150 µl	15 µl pro Gruppe	Gefrierschrank
ApaLI-verdautes Plasmid	150 µl	15 µl pro Gruppe	Gefrierschrank
Doppelt verdautes Plasmid	150 µl	15 µl pro Gruppe	Gefrierschrank
3K-DNA-Leiter	120 µl	10 µl pro Gruppe	Gefrierschrank

Elektrophorese-Reagenzien und Kunststoffe sind 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 Einzelgefäß oder 0,2 ml Einzelgefäß (Röhrchen)
- TBE-Elektrophoresepuffer (z.B. TBE-Elektrophoresepuffer, 1000 ml, 10-fach konz. Lösung, Art-Nr. 35018-73)

Erforderliche Ausrüstung

- 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 besten das blueGel-Gelelektrophoresegerät (35017-99), denn es enthält neben der Elektrophoreseeinheit, dem Gelgießstand und dem Stromversorgungsgerät auch den Transilluminator, alles in einem Gerät.
- Am einfachsten ist es, wenn Sie den TESS-Set Genetik (15312-88) vorliegen haben, denn darin ist jegliche Hardware enthalten, damit die Lernenden alle Schritte dieses Versuchs, von der Herstellung des Gels bis zum fertigen Gel, durchführen können.
- Mikroliterpipetten und Spitzen

Andere vom Benutzer bereitgestellte Materialien

- Destilliertes Wasser
- Mikrowelle oder Heizplatte
- Einweg-Laborhandschuhe
- Schutzbrille
- Permanentmarker mit feiner Spitze
- TBE-Puffer (z.B. TBE-Elektrophoresepuffer, 1000 ml, 10-fach konz. Lösung (Art.-Nr.: 35018-73)

Vorbereitung der Lehrkraft

Übersicht

Die nachstehende Tabelle gibt einen Überblick über die Vorbereitungen der Lehrkräfte. Auf den folgenden Seiten finden Sie detaillierte Anweisungen.

Vorbereitung	Erforderliche Zeit	Zeitplan
Reagenzien dosieren	10 Minuten	Kann bis zu einer Woche vor der Verwendung abgeschlossen werden.
Elektrophorese-Puffer und Agarose-Gele vorbereiten	20 Minuten	Bis zu 5 Tage vor der Verwendung

Reagenzien dosieren

- Die DNA-Proben können bis zu einer Woche im Voraus entnommen und im Kühlschrank aufbewahrt werden.
- Dieses Kit enthält genügend Reagenzien für mindestens 8 Laborgruppen.

Benötigte Materialien

Aus dem Laborkit (im Gefrierschrank aufbewahrt):

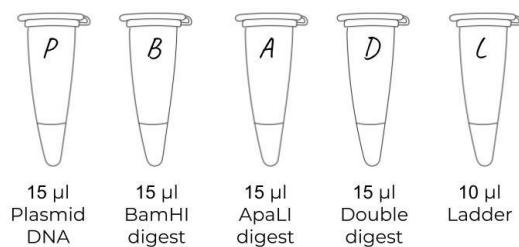
- Plasmid-DNA
- BamHI-verdautes Plasmid
- ApaLI-verdautes Plasmid
- Doppelt verdautes Plasmid
- 3K-DNA-Leiter

Wird vom Benutzer geliefert:

- Plastikrörchen für die Reagenzien (1,5 ml oder 0,2 ml Rörchen)
- 2-20 µl Mikropipette und Spitzen
- Permanentmarker mit feiner Spitze

1. Tauen Sie die Reagenzien auf, indem Sie die Rörchen auf Raumtemperatur bringen.
2. Sammeln Sie die Flüssigkeit am Boden jedes Rörchens. 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 Rörchens, ob Flüssigkeit im Deckel festsitzt. Falls nötig, setzen Sie den Deckel wieder auf und wiederholen Sie Schritt 2.
4. Geben Sie für jede Laborgruppe die folgenden Reagenzien in Kunststoffrörchen (1,5 ml oder 0,2 ml Inhalt).
5. Beschriften Sie die obere Seitenwand eines jeden Rörchens mit der entsprechenden Proben-ID.

- | | | |
|--------------------|-----|-------|
| – Plasmid-DNA | (P) | 15 µl |
| – BamHI-Verdau | (B) | 15 µl |
| – ApaLI-Verdau | (A) | 15 µl |
| – Doppelter Verdau | (D) | 15 µl |
| – 3K-DNA-Leiter | (L) | 10 µl |



6. Wiederholen Sie die Schritte 4 und 5 für so viele Laborgruppen, wie Ihre Klasse benötigt. Dieser Kit enthält genügend Reagenzien für mindestens 8 Gruppen.
7. Wenn Sie die DNA-Proben mehr als 24 Stunden vor dem Unterricht vorbereiten, bewahren Sie die Rörchen bis zur Verwendung im Kühlschrank auf. Dispensierte DNA-Proben können bis zu einer Woche im Kühlschrank aufbewahrt werden.

Gelelektrophorese-Puffer und Agarose-Gele vorbereiten

1. Bereiten Sie den Elektrophoresepuffer vor.
 - Befolgen Sie die Anweisungen des Herstellers zur Herstellung der Pufferlösung.
 - Das benötigte Puffervolumen variiert je nach Gelelektrophorese-System.
 - Bei den Elektrophorese-Systemen blueGel reichen 600 ml TBE-Puffer für mindestens acht Gelläufe aus.
 - Für andere Systeme beachten Sie bitte die Anweisungen des Herstellers:
 - (1) Das für die Herstellung von Agarosegelen benötigte Puffervolumen.
 - (2) Das für die Verwendung als Laupuffer benötigte Puffervolumen.
2. Bereiten Sie 2%ige Agarosegele mit fluoreszierender DNA-Färbung vor.
 - Jede Gruppe benötigt vier Spuren plus eine Spur für die Leiter. Wenn Gruppen sich die Gele teilen, reicht eine einzige Spur für die Leiter pro Gel aus.
 - Dieses Kit ist mit jeder Agarose molekularer Qualität und jedem fluoreszierenden DNA-Farbstoff (z. B. SeeGreen™) kompatibel.
 - Das benötigte Gelvolumen hängt von dem von Ihnen verwendeten Gelelektrophorese-System ab. Beachten Sie die Anweisungen des Herstellers.
 - Die mit SeeGreen™ zubereiteten Gele können bis zu fünf Tage im Voraus vorbereitet werden. Bewahren Sie die vorbereiteten Gele bei Raumtemperatur in einem luftdichten, lichtgeschützten Behälter auf. Weichen Sie die Gele NICHT in Puffer ein und wickeln Sie sie NICHT in Papiertücher ein.

Einrichtung eines Arbeitsplatzes

Zu Beginn dieses Experiments sollte jede Laborgruppe über Folgendes verfügen

DNA-Proben:	je 15 µl
• Plasmid-DNA (Röhrchen P)	
• BamHI-Verdau (Röhrchen B)	
• ApaLI-Verdau (Röhrchen A)	
• Doppelverdau (Röhrchen D)	
3K-DNA-Leiter (Röhrchen L)	10 µl
2-20 µl Mikropipette und Spitzen	1
Elektrophorese-Puffer	30 ml TBE bei
*Volumen hängt von Ihrem Elektrophoresesystem ab	Verwendung eines blueGel
5 Vertiefungen* in einem 2%igen Agarosegel mit fluoreszierender DNA-Färbung	

*** Hinweis:** Wenn sich Gruppen ein Gel teilen, können sie sich auch die DNA-Leiter teilen (d. h. es werden nur 9 Vertiefungen für jeweils zwei Gruppen benötigt, die sich ein Gel teilen).

Leitfaden für Lernende

Hintergrundinformationen
Aktivität vor dem Versuch
Der Versuch
Protokoll
Fragen vor dem Versuch
Fragen nach dem Versuch

Hintergrundinformationen

Plasmide sind leistungsstarke Laborwerkzeuge

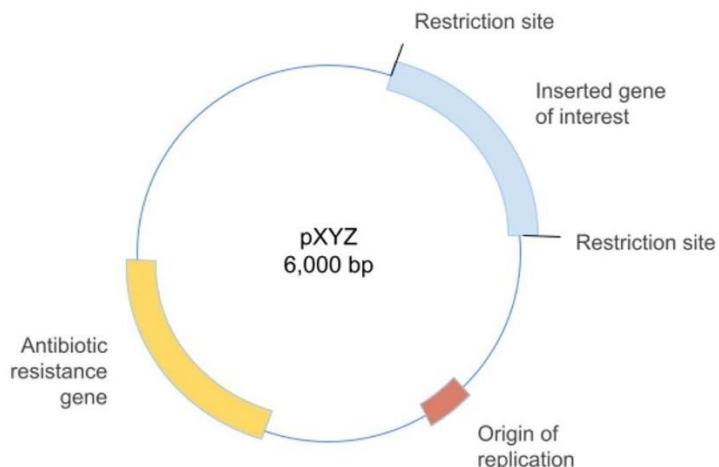
Plasmide sind kleine, kreisförmige DNA-Stücke, die in Bakterien vorkommen. Sie sind unabhängig vom bakteriellen Chromosom, aber normalerweise werden Plasmide während der Zellteilung an beide Tochterzellen weitergegeben. Plasmide sind nicht immer überlebenswichtig, aber sie können Bakterien in der richtigen Situation einen Vorteil verschaffen. Einige Plasmide tragen zum Beispiel Gene, die den Bakterien helfen, Antibiotika zu widerstehen oder ungewöhnliche Nahrungsquellen abzubauen, die andere Bakterien nicht verdauen können.

Wissenschaftler haben diese natürlichen DNA-Träger in leistungsfähige Laborgeräte verwandelt. 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 andere Zellen eingesetzt werden, um sich zu vermehren. Die in den Plasmiden kodierten Informationen können diese Zellen dann in die Lage versetzen, wertvolle Funktionen zu erfüllen, wie z. B. die Produktion von Humaninsulin für Diabetiker oder von Enzymen für die Verwendung in Waschmittel.

Plasmidkarten skizzieren die wichtigsten DNA-Elemente

Um ein Plasmid zu entwickeln, benötigen die Forscher zunächst ein klares Bild von der darin enthaltenen DNA und der Lage seiner wichtigsten Elemente. Eine **Plasmidkarte** ist ein visueller Leitfaden, der die wichtigsten Merkmale eines Plasmids zeigt:

- Die **Gesamtlänge** eines Plasmids **in Basenpaaren** (bp)
- **Mehrere Klonierungsstellen**, spezielle Regionen, in die Wissenschaftler DNA einfügen können
- Der **Replikationsursprung**, der notwendig ist, damit das Plasmid in einer Zelle kopiert werden kann
- **Antibiotikaresistenzgene** oder andere Gene, die helfen, Zellen zu identifizieren, die das Plasmid tragen (allgemein als **selektierbare Marker** bezeichnet)



Plasmidkarten helfen Wissenschaftlern bei der Planung von gentechnischen Experimenten, z. B. beim Einfügen von DNA in ein Plasmid. Die Informationen in der Karte werden dann verwendet, um zu überprüfen, ob die neu eingefügten DNA-Stücke korrekt gebaut wurden. Um zu verstehen, wie das geht, müssen Sie sich zunächst mit Restriktionsenzymen vertraut machen.

Restriktionsenzyme schneiden DNA an präzisen Stellen

Restriktionsenzyme haben sich in Bakterien als Abwehrsystem gegen eindringende Viren entwickelt, aber Wissenschaftler haben sie zu DNA-Schneidewerkzeugen umfunktioniert, die im Labor eingesetzt werden. Jedes Restriktionsenzym schneidet die DNA an einer bestimmten Sequenz, die normalerweise 4-8 Basenpaare (bp) lang ist. Diese Zielsequenzen werden als **Erkennungsstellen (recognition sites)** bezeichnet.

Hier sind einige gängige Restriktionsenzyme und ihre Erkennungsstellen:

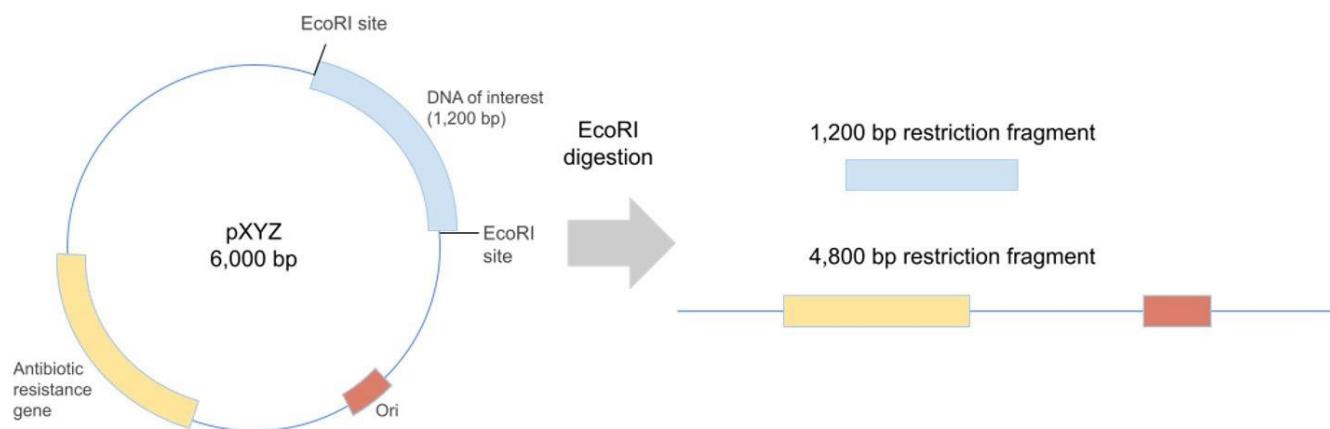
- Das Restriktionsenzym **EcoRI** schneidet an der Erkennungsstelle **GAATTC**
- **BamHI** schneidet innerhalb von **GGATCC**
- **PvuII** schneidet in der Mitte von **CAGCTG**

Wenn Sie ein Plasmid einem Restriktionsenzym aussetzen, schneidet das Enzym die DNA dort, wo es seine Erkennungsstelle(n) findet. Dadurch verwandelt sich das Plasmid von einem kreisförmigen DNA-Molekül in lineare Fragmente, die Wissenschaftler trennen und messen können. Die Wissenschaftler nutzen dieses Verfahren, um ihre Ergebnisse bei der Arbeit mit Plasmiden zu überprüfen.

Gentechniker verwenden Restriktionskartierung zur Überprüfung der Ergebnisse

Stellen Sie sich vor, Sie bereiten sich darauf vor, das Plasmid pXYZ zum ersten Mal zu verwenden. Sie haben ein Röhrchen mit der Bezeichnung pXYZ, aber bevor Sie die DNA verwenden, müssen Sie ihre Identität überprüfen. Die Plasmidkarte zeigt zwei EcoRI-Erkennungsstellen, die 1.200 bp voneinander entfernt sind. Das bedeutet, dass beim Schneiden des kreisförmigen pXYZ mit EcoRI zwei lineare DNA-Fragmente entstehen sollten:

- ein 1.200 bp Fragment - die "DNA von Interesse"
- ein 4.800 bp Fragment - der Rest des Plasmids



Zusammenfassend lässt sich sagen, dass das Schneiden der Plasmid-DNA mit Restriktionsenzymen und das Überprüfen der resultierenden DNA-Fragmentgrößen eine schnelle Möglichkeit ist, die Identität der DNA zu überprüfen.

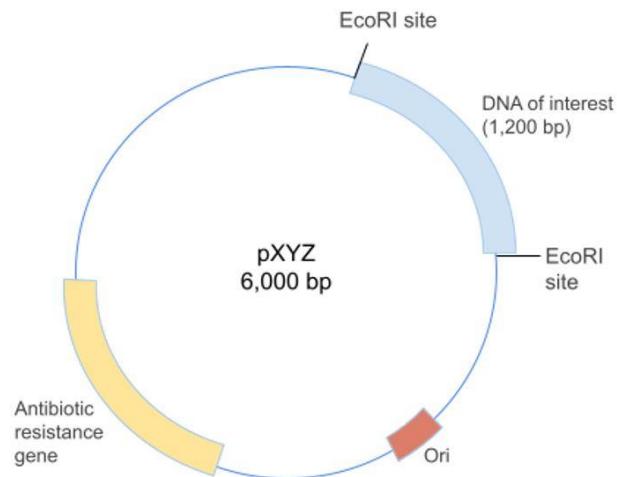
Aktivität vor dem Versuch: Erstellen von Plasmidkarten mithilfe der Gelelektrophoreseanalyse von Restriktionsverdauungen

Erinnern Sie sich an die wichtigsten Merkmale des pXYZ-Plasmids, die in den *Hintergrundinformationen* vorgestellt wurden:

- Kreisförmiges DNA-Molekül
- 6.000 bp groß
- Zwei EcoRI-Restriktionsstellen im Abstand von 1.200 bp

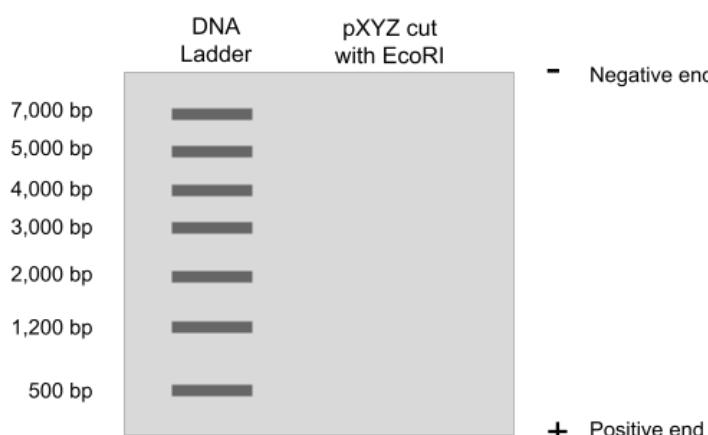
Die Plasmidkarte zeigt, dass beim Schneiden des kreisförmigen pXYZ mit dem Enzym EcoRI zwei DNA-Stücke entstehen sollten: 4.800 Basenpaare und 1.200 Basenpaare lang. Um dies zu bestätigen, können wir eine Gelelektrophorese durchführen.

Bei der Gelelektrophorese werden die DNA-Fragmente nach ihrer Größe getrennt. Am Ende eines Gelelektrophorese-Experiments sind kleinere DNA-Stücke weiter durch ein Agarosegel gewandert als größere DNA-Stücke.



Fragen

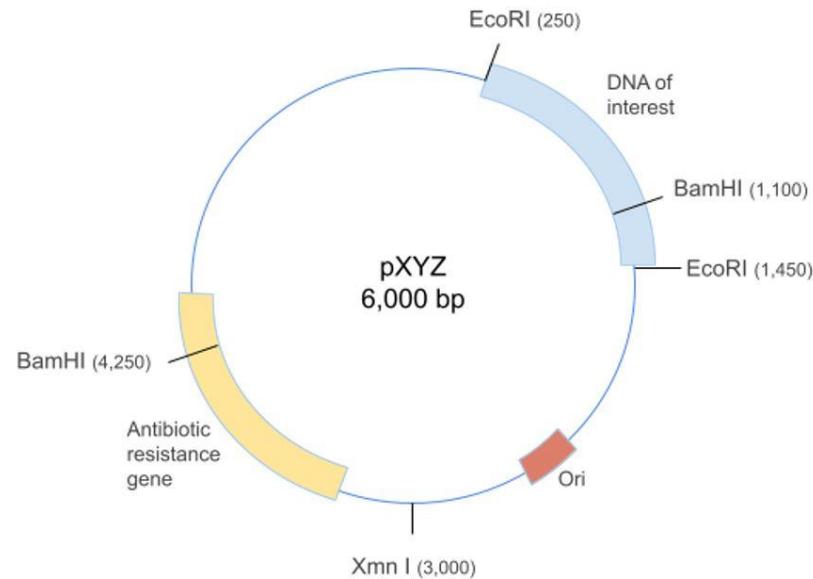
1. Sie haben pXYZ mit EcoRI geschnitten. Zeichnen Sie im folgenden Diagramm die DNA-Banden ein, die den entstandenen Restriktionsfragmenten entsprechen. Verwenden Sie die mitgelieferte DNA-Leiter als Referenz.



2. Eine vollständigere Plasmidkarte zeigt, dass pXYZ zusätzliche Restriktionsstellen für die Enzyme BamHI und XmnI sowie deren Positionen innerhalb des Plasmids aufweist.

Die Position (in bp) jeder Schnittstelle ist in Klammern hinter dem Namen des Restriktionsenzyms angegeben. Die Karte zeigt zum Beispiel, dass sich eine EcoRI-Stelle an Position 250 und eine andere an 1.450 befindet.

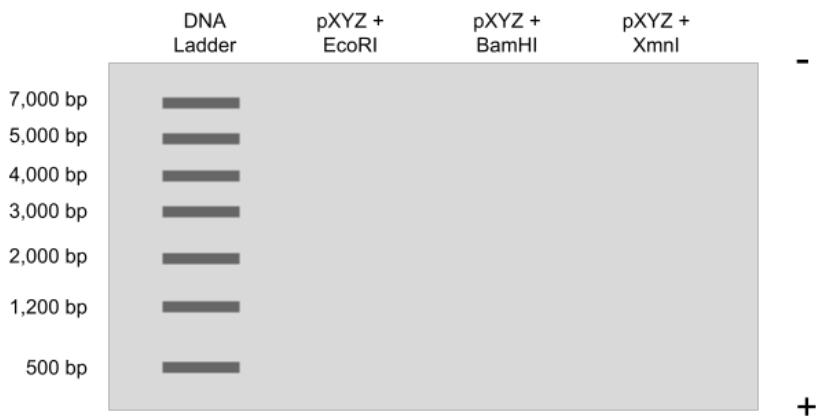
Um den Abstand zwischen diesen Stellen zu berechnen, können Sie einfach ihre Positionen subtrahieren: 1.450 minus 250 ist gleich 1.200 (wobei die Einheiten natürlich bp sind).



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		

3. Zeichnen Sie in das Gel-Diagramm unten die DNA-Banden für die resultierenden Restriktionsfragmente ein:



4. Um vollständige Plasmidkarten zu erstellen, führen Wissenschaftler in der Regel **Doppelverdauungen** durch, bei denen mit zwei verschiedenen Restriktionsenzymen gleichzeitig geschnitten wird.

Vervollständigen Sie die nachstehende Tabelle und geben Sie die Größe der Restriktionsfragmente an, die bei den folgenden Doppelverdauungen entstehen. Beziehen Sie sich auf Abb. 4, um die notwendigen Informationen zu erhalten.

Restriktion Enzym(e)	# DNA Fragmente	Größe der Restriktionsfragmente (bp)
Keine	1 (zirkulär)	6,000
EcoRI XmnI +	3	1,200, 1,550 und 3,250
EcoRI + BamHI		
XmnI + BamHI		

5. Bei diesen Vorhersagen ist Ihnen vielleicht eine nützliche Eigenschaft von Doppelverdauungen aufgefallen: Sie können zeigen, wo verschiedene Erkennungsstellen zueinander stehen. Vergleicht man den einfachen Verdau des Restriktionsenzyms A mit dem doppelten Verdauungsmuster der Enzyme A und B, so kann man feststellen, wie nahe oder weit entfernt ihre Erkennungsstellen auf dem Plasmid liegen.

Der Schnitt von pXYZ mit EcoRI ergab zwei Fragmente: 1.200 bp und 4.800 bp. Ein Doppelverdau mit EcoRI und XmnI ergab drei Fragmente: 1.200 bp, 1.550 bp und 3.250 bp. Welche der folgenden Aussagen treffen zu? Wählen Sie alle zutreffenden aus.

- XmnI schneidet einmal in der pXYZ-Sequenz
- XmnI schneidet zwischen zwei EcoRI-Stellen im Abstand von 1.200 bp
- XmnI schneidet 3.250 bp von einer EcoRI-Stelle

D. XmnI schneidet 1.550 bp von einer EcoRI-Stelle aus

Erläutern Sie Ihre Überlegungen anhand eines Diagramms.

Restriktionsfragmente sind wie Puzzlestücke. Mit Hilfe der Restriktionskartierung können Sie herausfinden, wie diese Teile zusammenhängen, so dass Sie eine vollständige kreisförmige Karte zeichnen können, die genau zeigt, wo sich jede Erkennungsstelle befindet.

Der Versuch

Sie sind Molekularbiologe und arbeiten in einem gentechnischen Labor. Sie haben soeben ein DNA-Röhrchen erhalten, das ein Plasmid enthält, das von einem ehemaligen Kollegen hergestellt wurde.

Das Röhrchen ist mit "pMyst" beschriftet (wie geheimnisvoll!). Ziel Ihres Projekts ist es, mit Restriktionsenzymen ein Stück DNA aus pMyst herauszuschneiden - das "Gen von Interesse" - und es durch ein neues Gen zu ersetzen. Aber leider ist die Plasmidkarte für pMyst schon lange aus dem Labor verschwunden.

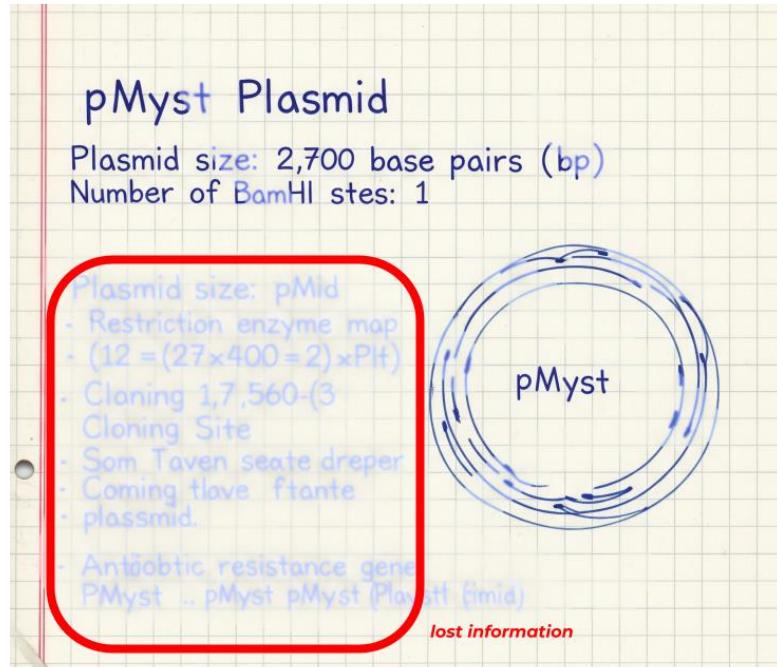
Sie finden das Labornotizbuch Ihres alten Kollegen, und seine Notizen beschreiben einige grundlegende Merkmale von pMyst. Leider sieht es so aus, als hätte jemand etwas auf diese Seite des Labornotizbuchs verschüttet, und nur die Informationen auf der rechten Seite sind lesbar.

Glücklicherweise haben Sie gerade genug Informationen, um zu versuchen, eine neue Plasmidkarte für pMyst zu erstellen. Sie haben bereits Restriktionsverdauungen mit BamHI und ApaLI durchgeführt. Nun werden Sie die Gelelektrophorese verwenden, um die Fragmentlängen für die folgenden Proben zu bestimmen:

1. Ungeschnittene pMyst-Plasmid-DNA
2. pMyst verdaut mit BamHI
3. pMyst verdaut mit ApaLI
4. pMyst verdaut mit BamHI und ApaLI

Mit diesen Informationen werden Sie eine Plasmidkarte für pMyst erstellen.

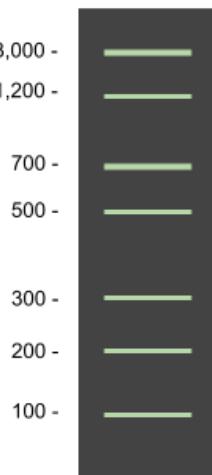
Zeit, das Geheimnis zu lüften!



Protokoll

1. Legen Sie das vorbereitete Gel in die Elektrophoresekammer.
2. Füllen Sie genügend Elektrophoresepuffer in die Kammer, so dass das Gel gerade bedeckt ist. Eine zu hohe Überschichtung reduziert die Wanderungsgeschwindigkeit.
 - Sie benötigen 30 ml TBE-Puffer für ein blueGel™ Elektrophorese-System. Füllen Sie die Kammer nicht zu voll.
 - Wenn Sie ein anderes Elektrophorese-System verwenden, entnehmen Sie den empfohlenen Puffertyp und das Volumen den Anweisungen des Herstellers.
3. Verwenden Sie eine Mikropipette, um 10 µl der 3K-DNA-Leiter (Röhrchen L) 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.
 - Plasmid-DNA (Röhrchen P)
 - BamHI-Verdau (Röhrchen B)
 - ApaLI-Verdau (Röhrchen A)
 - Doppelter Verdau (Röhrchen D)
5. Lassen Sie das Gel für 30-45 Minuten laufen.
 - Das blueGel-Elektrophorese-Systeme arbeitet mit einer festen Spannung.
 - Wenn Sie ein anderes Gelelektrophorese-System verwenden, stellen Sie die Spannung im Bereich von 70-90 V ein. Machen Sie die DNA-Proben mit einem Transilluminator sichtbar.
6. Um die DNA-Proben sichtbar zu machen, schalten Sie das blaue Licht in Ihrem blueGel-Elektrophorese-System ein oder bringen Sie das Gel zu einem Transilluminator.
7. Wenn nötig, lassen Sie das Gel so lange laufen, bis eine ausreichende Trennung vorliegt, um die Ergebnisse zu interpretieren.

3K DNA Ladder



Fragen vor dem Versuch

Überprüfen Sie

1. Welche Eigenschaften von Plasmiden machen sie zu nützlichen DNA-Trägern im Labor? Wählen Sie alle zutreffenden Antworten aus.
 - A. Sie können sich innerhalb von Bakterienzellen vermehren
 - B. Sie sind mit Restriktionsenzymen leicht zu manipulieren
 - C. Sie enthalten selektierbare Marker
 - D. Sie sind zirkulär
2. Was ist ein Restriktionsenzym?
3. Bei der Restriktionskartierung verwenden Wissenschaftler Restriktionsenzyme, um Plasmidkarten zu erstellen. Ordnen Sie die Schritte des Restriktionsmappings so an, dass sie einer logischen zeitlichen Abfolge folgen:
 - a. DNA auf ein Elektrophoresegel auftragen
 - b. Schneiden der DNA mit Restriktionsenzymen
 - c. Treffen Sie eine Vorhersage auf der Grundlage der Plasmidkarte
 - d. Vergleich der Vorhersage mit den Ergebnissen der Gelelektrophorese
 - e. Messung linearer DNA-Fragmente mit einer DNA-Leiter

Logische Reihenfolge: __, __, __, __, __.

Kritisches Denken

4. Eine Plasmidkarte zeigt einige der wichtigsten DNA-Merkmale, die es Plasmiden ermöglichen, in Bakterienzellen zu gedeihen. Wenn Wissenschaftler ein bestimmtes Plasmid weiterentwickeln oder verändern, achten sie genau auf diese wichtigen Merkmale, damit sie intakt bleiben.

Welche Probleme würden auftreten, wenn man eine DNA-Sequenz in der Mitte eines Plasmids einfügt?

- a. Beim Schnitt durch den Replikationsursprung des Plasmids:
- b. Beim Schnitt durch den selektierbaren Marker des Plasmids:

Mathematisches Denken

Um herauszufinden, wie wahrscheinlich es ist, dass ein Restriktionsenzym die DNA schneidet, werden wir ein paar Berechnungen anstellen. Wir verwenden den Buchstaben **n**, um die Länge der Erkennungsstelle eines Restriktionsenzymes anzugeben. Ein Beispiel:

- EcoRI erkennt eine 6-Basen-Sequenz: GAATTC. Hier ist $n = 6$
- Einige Enzyme erkennen 4-Basen- oder 8-Basen-Stellen. In diesen Fällen ist $n = 4$ bzw. $n = 8$.

Denn es gibt vier mögliche Basen: A, T, G und C, ist die Chance, dass eine Base an einer beliebigen Stelle in einer DNA-Sequenz mit der gewünschten übereinstimmt, 1 zu 4 oder 0,25.

Um also für jedes Restriktionsenzym die Wahrscheinlichkeit zu ermitteln, dass ein bestimmter Abschnitt der DNA mit seiner Erkennungsstelle übereinstimmt, multipliziert man die Wahrscheinlichkeiten miteinander. Das heißt: $(0,25) \times (0,25) \times (0,25) \dots n\text{-mal}$.

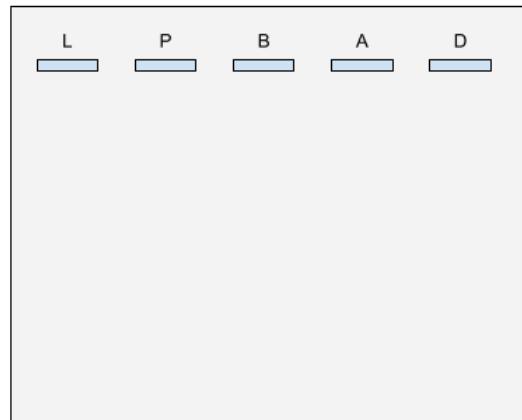
Die Wahrscheinlichkeit, dass alle **n** Basen übereinstimmen, beträgt also $(0,25)^n$. Dies ist eine Viertelpotenz von n .

5. In diesem Labor verwenden wir BamHI. Die BamHI-Erkennungssequenz ist sechs Nukleotide lang. Beantworten Sie die Frage: wie hoch ist die Wahrscheinlichkeit, dass BamHI eine zufällig ausgewählte Gruppe von sechs Nukleotiden schneidet?
6. Das pMyst-Plasmid ist 2.700 Basenpaare lang. Erinnern Sie sich, dass BamHI nur einmal im pMyst-Plasmid schneidet. Ist dies mehr oder weniger, als Sie allein durch Zufall erwarten würden? Begründen Sie Ihre Antwort.
7. Die Erkennungssequenz des Restriktionsenzymes AluI ist AGCT. Wie oft würden Sie erwarten, dass AluI im pMyst-Plasmid schneidet, allein aufgrund der Wahrscheinlichkeit?

Fragen nach dem Versuch

Interpretation der Daten

1. Verwenden Sie das schematische Gel auf der rechten Seite, um zu zeichnen, wie Ihre Ergebnisse aussehen. Zeichnen Sie für jede Probe die Banden ein, die Sie auf Ihrem tatsächlichen Gel sehen.
2. Schreiben Sie neben jede Bande, wie lang (in Basenpaaren) die DNA in dieser Bande ungefähr ist. Nehmen Sie die Abbildung der Leiter, die im Abschnitt "Protokoll" zu sehen ist, zur Hilfe.

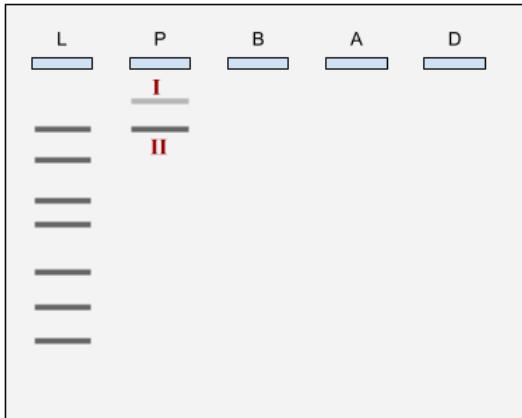


Kritisches Denken

Wir werden zuerst die **Spur P** (ungeschnittenes Plasmid) analysieren.

3. Welche allgemeine Form hat die ungeschnittene Plasmid-DNA?
 - A. Kreisförmig
 - B. Linear
4. Wie viele Fragmente erwarten Sie auf **Spur P** (ungeschnittenes Plasmid) zu sehen? Wie viele Fragmente sehen Sie tatsächlich auf **Spur P**?
 - A. Erwartet: _____
 - B. Tatsächlich: _____
5. Wenn man zirkuläre Plasmide auf einem Gel laufen lässt, kann man mehr als eine Bande sehen. Die Plasmid-DNA in einer Zelle ist oft dicht gepackt oder **supercoiled** (überdreht). Supercoiled-DNA ist eng gewickelt und lässt sich daher leicht durch ein Agarosegel bewegen. Wenn die DNA aus der Zelle extrahiert wird, kann jedoch manchmal ein Strang der DNA eingekerbt werden. Die eingekerbt Plasmid-DNA bleibt zirkulär, wird aber abgewickelt. Wissenschaftler nennen diese abgewickelte Plasmidform Open-Circle-DNA.

Die Banden wurden mit römischen Ziffern nummeriert. Beschriften Sie neben dem Diagramm jede Bande auf Spur P entweder als supercoiled oder als open circle DNA.



Band I: _____ DNA

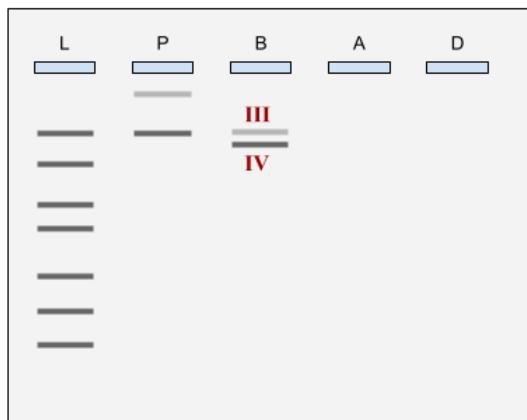
Band II: _____ DNA

Schauen wir uns nun **Spur B** genauer an, die Plasmid-DNA enthält, die mit BamHI verdaut wurde.

6. Erinnern Sie sich, dass BamHI nur einmal im pMyst-Plasmid schneidet. Welche Gesamtform hat die pMyst-Plasmid-DNA nach dem BamHI-Schnitt?
 - A. Kreisförmig
 - B. Linear
7. **Lineare DNA** kann auf einem Gel schneller laufen als zirkuläre DNA derselben Länge, da sie leicht durch Agaroseporen gelangen kann.

Bei jeder Restriktionsverdauungsreaktion mischen die Wissenschaftler eine große Anzahl von Plasmidmolekülen mit dem Restriktionsenzym. Wenn das Restriktionsenzym schneidet, werden die einzelnen Plasmidkopien von zirkulär zu linear. Wenn jedes einzelne Plasmidmolekül geschnitten würde, wäre die gesamte DNA in der Probe linear. Zu einem früheren Zeitpunkt können jedoch einige der Plasmidmoleküle ungeschnitten bleiben. Dieser Zwischenpunkt, bevor jedes Plasmidmolekül geschnitten wurde, wird als **unvollständiger Verda** bezeichnet.

Beschriften Sie neben dem unten stehenden Diagramm jede Bande auf Spur B entweder als geschnittenes oder als ungeschnittenes Plasmid.



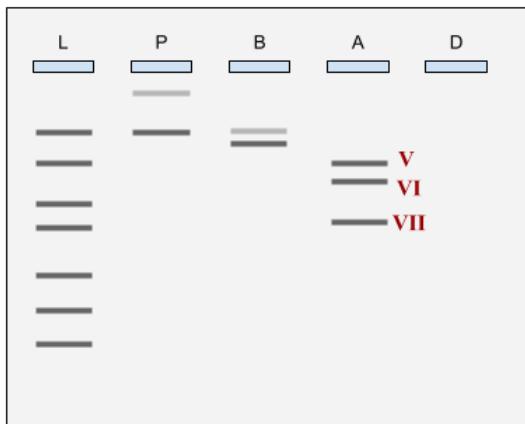
Band III: _____ DNA

Band IV: _____ DNA

8. Welche der folgenden Aussagen trifft auf der Grundlage der Ergebnisse im obigen Diagramm zu?
 - A. Der BamHI-Verda war vollständig
 - B. Der BamHI-Verda war unvollständig
 - C. Das kann ich anhand der vorliegenden Informationen nicht sagen.
9. Wenn Sie ein Wissenschaftler wären, der die Effizienz dieses Restriktionsverdaus erhöhen soll, welche dieser experimentellen Variablen würden Sie ändern? Wählen Sie alle zutreffenden aus.
 - A. Erhöhen Sie die Inkubationstemperatur auf 37 °C
 - B. Erhöhen Sie das Volumen der Reaktion
 - C. Verlängern Sie die Inkubationszeit
 - D. Mehr Restriktionsenzym zugeben

Sehen wir uns nun die ApaLI-Restriktionsfragmente in **Spur A** an.

10. Wie oft hat ApaLI das pMyst-Plasmid geschnitten, wenn man die Anzahl der Restriktionsfragmente in dieser Spur betrachtet?
11. 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
12. Der Vergleich mit der 3K-DNA-Leiter legt ebenfalls nahe, dass das unterste Fragment 500 bp groß ist. Vervollständigen Sie mit diesen und anderen bisher gesammelten Informationen über pMyst das folgende Diagramm:



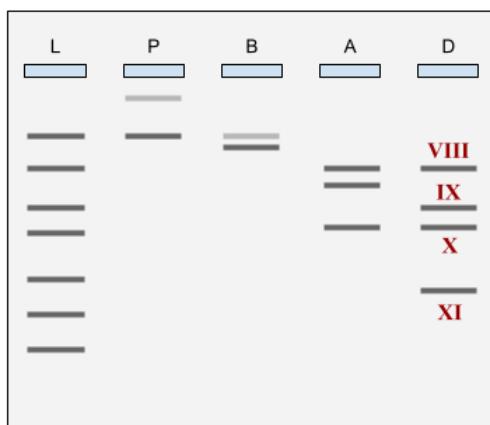
Band V: _____ bp

Band VI: _____ bp

Band VII: _____ bp

Die **Doppelverdauungsspur D** schließlich zeigt das Ergebnis des Verdaus von pMyst mit beiden Restriktionsenzymen: BamHI und ApaLI.

13. Wie viele DNA-Fragmente finden Sie im Doppelverdau?
14. Wie verhält sich dies im Vergleich zu der Anzahl auf Spur A?
15. Welches der folgenden ApaLI-Restriktionsfragmente wurde nach diesen Beobachtungen durch BamHI in zwei Teile geschnitten?
 - A. 2.700 bp
 - B. 1.250 bp
 - C. 950 bp
 - D. 500 bp
16. Vervollständigen Sie das folgende Diagramm für den Doppelverdau:



Band VIII: _____ bp

Band IX: _____ bp

Band X: _____ bp

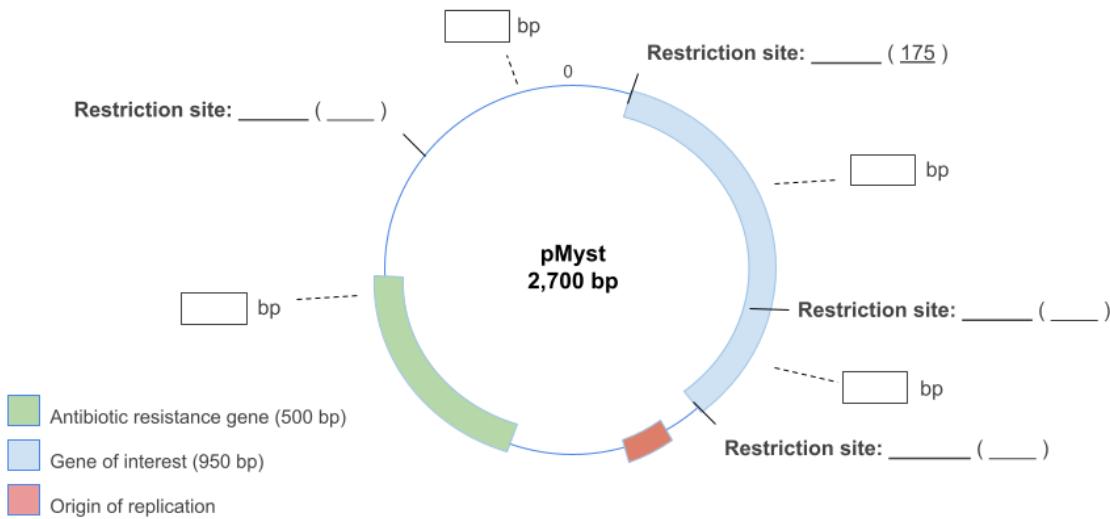
Band XI: _____ bp

Erstellen einer Plasmidkarte

17. Fügen Sie all diese Informationen zusammen, um Ihr Labornotizbuch zu aktualisieren.

Vervollständigen Sie die folgende Plasmidkarte:

- Nennen Sie die Restriktionsenzyme, die den einzelnen Stellen entsprechen.
- Beschriften Sie die Größen der resultierenden Restriktionsfragmente.
- Geben Sie in den Klammern die Position jeder Stelle in bp an (die Position 0 wurde als Referenz markiert).



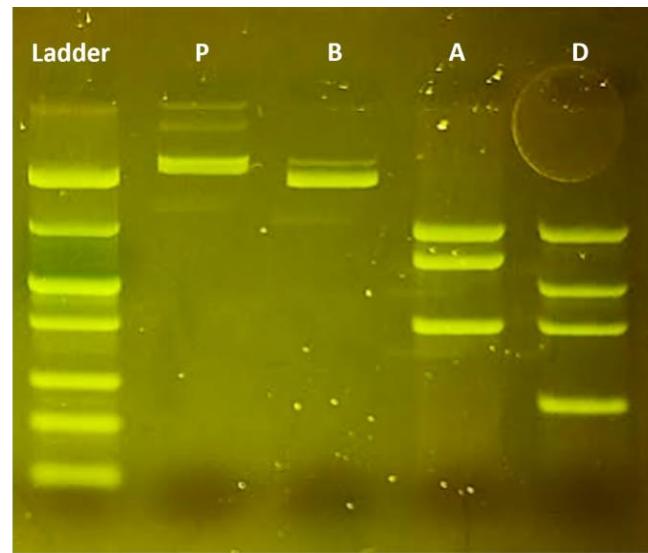
18. Nachdem Sie nun eine vollständige Plasmidkarte erstellt haben (herzlichen Glückwunsch!), bittet Ihr Betreuer Sie, das "Gen von Interesse" aus dem pMyst-Plasmid zu entfernen. Welche(s) Restriktionsenzym(e) würden Sie für diese gentechnische Aufgabe verwenden?

- BamHI
- ApaLI
- Beide Restriktionsenzyme
- Ich würde ein anderes Restriktionsenzym benötigen

Erläutern Sie Ihre Überlegungen:

Erwartete Ergebnisse

- Die ungeschnittene Plasmidspur (P) kann mehrere Banden aufweisen, die verschiedenen Strukturformen entsprechen:
 - Supercoiled: am kompakteren und dichtesten gewickelt (schnelle Migration)
 - Offener Kreis: entspannt, da ein DNA-Strang eingekerbt ist (langsame Migration)
- Die BamHI-geschnittene Plasmidspur (B) kann mindestens zwei Banden aufweisen:
 - Linear: beide Stränge werden durch den Restriktionsverdau geschnitten
 - Supercoiled: ungeschnittene DNA



3000
1200
700
500
300
200
100

2.7 kb (super- coiled)	2.7 kb (linear)	1,250	1,250
		950	
		700	
		500	500
			250

Troubleshooting

Schwache oder fehlende Banden. Dieses Ergebnis kann durch eine unzureichende DNA-Menge oder ein zu langes Gel verursacht werden.

- Stellen Sie sicher, dass Sie die richtige Ladungsmenge pro Vertiefung verwenden.
- Überprüfen Sie das Gel während des Laufs, um den Fortschritt der Migration zu überwachen.

Verschmieren der DNA-Banden. Überladene Vertiefungen oder degradierte DNA können zu einer Verschmierung führen, ebenso wie die Verwendung von altem oder falschem Gelelektrophoresepuffer.

- Reduzieren Sie die DNA-Menge pro Vertiefung.
- Frischen Gelelektrophoresepuffer zubereiten

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 2%iges Agarosegel verwenden.
- Lassen Sie das Gel länger laufen.

Es erscheinen überhaupt keine Banden. Dies kann die Folge einer falschen Gelvorbereitung sein, insbesondere wenn keine fluoreszierende DNA-Färbung hinzugefügt wurde.

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