

Protokoll zu Versuch 3
Nukleinsäuren
Vom 14.04.05

Das Ziel dieses Praktikumsversuchs ist, das Gen für das humane Interferon mittels PCR zu amplifizieren und ein geeignetes Bakterienplasmid als Vektor zu isolieren (mit Restriktionsenzymen/ Auftragen auf Agarosegel). Der Grund dafür ist, dass man Bakterien so verändert, dass diese humanes Interferon produzieren. Das gleiche Prinzip wird beispielsweise benutzt, um menschliches Insulin herzustellen.

Isolierung des Bakterienplasmids

Die Fragestellung bestand darin, wie man ein Bakterienplasmid aus E.coli isolieren kann. Es wurden hierzu drei verschiedene Bakterienstämme benutzt, bei denen man nicht wusste, ob sie ein Plasmid bzw. ein geeignetes Plasmid besitzen.

Hierzu wurden die Bakterienstämme mit mehreren Lösungen behandelt.

Als erstes gab man Tris-hydroxymethyl-aminomethan – HCl hinzu, um das Bakterienpellet in Suspension zu bringen. Daraufhin gab man SDS (Na-dodecylsulfat) hinzu. Diese Detergenz lysiert die Bakterienmembran. Als nächstes wurde eine natronlaugenhaltige Lösung benutzt, um den pH-Wert zu erhöhen, wodurch Proteine und das Bakterienchromosom denaturiert werden.

Nach Zugabe von Kaliumacetat bilden die denaturierten Proteine und das Bakterienchromosom einen weißen Niederschlag, welcher abzentrifugiert wurde.

Der Überstand, der das Bakterienplasmid und geladene Ionen enthält, wurde zunächst mit Isopropanol behandelt, woraufhin die Ionen und das Plasmid ausgefällt werden.

Nach einer weiteren Zentrifugation wird der Überstand entfernt und die verbleibenden Salze im Eppendorf-Gefäße durch Ethanol ausgewaschen. Nochmaliges zentrifugieren und das Verwerfen des Überstandes führt zu einer gereinigten Lösung, in der sich mit hoher Wahrscheinlichkeit und hoher Konzentration die gesuchten Bakterienplasmide befinden. Diese Lösung wurde nun mittels einem Heizblock eingetrocknet, d.h. die überschüssige Flüssigkeit wurde entfernt.

Die gerade beschriebenen Schritte dienten nur der Isolation des vielleicht vorhandenen Plasmids. In den nachfolgenden Schritten wird nun versucht ein geeignetes Plasmid zu finden. Hierzu gibt man in die getrocknete Plasmidpellet Wasser und den Restriktionspuffer/ -Enzym.

Restriktionsenzyme sind bakterielle Werkzeuge, mit der sich Bakterien vor fremder DNA schützen. Diese Enzyme schneiden spezifische Sequenzen (Palindrome), um die fremde DNA zu zerstören.

Schließlich tragen wir die Lösungen mit den geschnittenen und ungeschnittenen Plasmiden auf das Agarosegel auf.

Die PCR

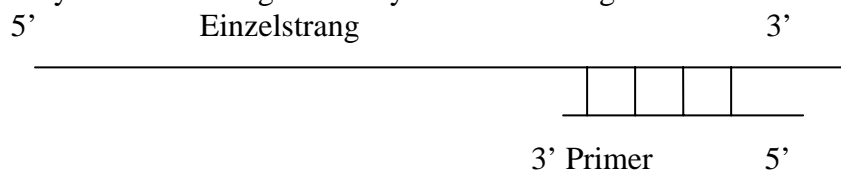
Um das humane Interferongen in einen geeigneten Vektor einbauen zu können, muss es amplifiziert werden (vervielfältigt). In diesem konkreten Fall war das Gen bereits in einem Plasmid eingebaut (Template DNA). So musste es nicht aus dem humanen Genom isoliert werden.

Dazu muss man eine geeignete Lösung für die PCR herstellen. Die Grundlage bilden 25µl Wasser, in die außerdem 5µl Reaktionspuffer hinzugegeben werden. Dieser wird benötigt, um

eine stabilen pH-Wert zu schaffen (wichtig für die Polymerase). Zugabe von 5µl 5mM Magnesiumchlorid, damit die Polymerase arbeitet. Nun gibt man die dNTPs hinzu (Bausteine für die DNA-Synthese). Außerdem gibt man einen Primermix hinzu. Die Polymerase benötigt einen Primer, um mit der Synthese zu beginnen. Des Weiteren überschichtet man die Lösung mit Paraffinöl, damit kein Wasser verdampft. Nun wird die Template-DNA hinzugegeben und die thermostabile Taq-Polymerase.

Funktionsprinzip

Um das gewünschte DNA-Fragment amplifizieren zu können, muss ein kurzer Teil der angrenzenden Sequenzen bekannt sein. Aus dieser Sequenz lässt sich der passende komplementäre Primer ableiten und herstellen. Der Primer wird benötigt, um der DNA-Polymerase den Beginn der Synthese zu ermöglichen.



Der Primer stellt das benötigte 3' Ende für die Polymerase zu Verfügung.

1. Der DNA-Doppelstrang wird bei 94 Grad in zwei Einzelstränge aufgeschmolzen.
2. Abkühlen auf 55 Grad, damit sich die Primer anlagern können.
3. DNA-Polymerisation bei 72 Grad (Temperaturoptimum der Taq-Polymerase).
Synthetisierung des gewünschten Genabschnitts.

Diese drei Schritte wurden in 25 Zyklen wiederholt → exponentielle Vermehrung des Gens.

Ergebnis und Interpretation

Das amplifizierte Gen, sowie die isolierten Plasmide wurden nun mittels Gelelektrophorese aufgetrennt.

Mittels der Gelelektrophorese wurde festgestellt, dass das Plasmid des Bakterium A:

- zwei Banden enthält, wenn kein Restriktionsenzym hinzugegeben wurde → entspannte Form (1. Bande) und eine 2. Bande (coiled coil → verdrehte Form)
- + Restriktionsenzym einmal geschnitten wurde, weil nur eine Bande entsteht.

Plasmid des Bakteriums B:

- ungeschnitten: Die Gelelektrophorese zeigt, dass ein Plasmid vorhanden ist
- geschnitten: 2 Banden → das Plasmid wurde zweimal geschnitten

Plasmid des Bakteriums C:

- ungeschnitten: keine Bande → kein Plasmid
- geschnitten: dünne Bande → (Verunreinigung?) dürfte nicht vorhanden sein

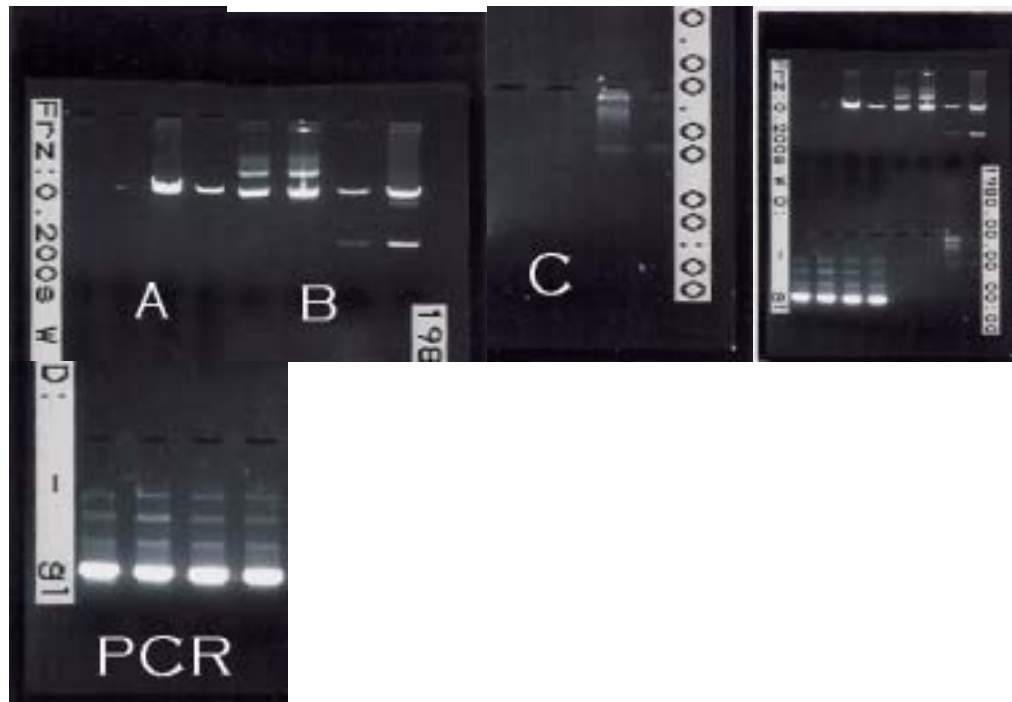
Interpretation: (vgl. Abbildung 1-5)

Bakterium A enthält das passende Plasmid, da es nur einmal geschnitten wurde und somit der Einbau des isolierten Gens leichter von der Hand geht. Außerdem ist die Wahrscheinlichkeit, dass der Promotor des Plasmids zerstört wurde, geringer. Dies ist wichtig, damit das eingebaute Gen auch transkribiert wird.

Das Ergebnis der PCR wurde auch in der Gelelektrophorese kontrolliert. Es zeigt, dass sich drei dünne Banden und eine extrem dicke Bande entwickelten. Die dicke Bande, die am weitesten gewandert ist, repräsentiert unseren gesuchten Genabschnitt → gewünschtes Gen ist

vervielfältigt worden. Die drei anderen Banden entstanden durch längere und nicht brauchbare Genabschnitte, die bei der PCR angefallen sind. (Gen + Schwanz)

Das Plasmid aus Bakterium A ist als Vektor für das humane Interferon geeignet. Damit sollten Bakterien mit diesem Plasmid in der Lage sein, humanes Interferon zu produzieren.



(Abb. 1-5)

Man erkennt hier das Ergebnis der Elektrophorese. Die Interpretation hierzu ist im Text darüber geschrieben.

Christoph Axenfeld, Andrea Schöner, Stefan Lang, Matthias Ponfick

Protokoll zum Praktikum Biochemie

Versuch 3

*Nukleinsäuren: Isolierung von Plasmid DNA aus Bakterien und
Charakterisierung durch Restriktionsspaltung
PCR*

am 14.05.05

Melanie Dietrich, Valérié Huber, Severin Welter, Stefan Kühn

Das Insulinangebot für Diabetiker hat sich in den letzten Jahrzehnten durch einen entscheidend Schritt in der Biotechnologie gewandelt. Wofür früher tausende von Schweinen getötet werden mussten, um ihre Bauchspeicheldrüsen und damit das Insulin zu gewinnen, kann man heutzutage Bakterien dazu anregen synthetisches Insulin herzustellen. Dazu wird in das Erbgut des Einzellers menschliche DNA, auf der die gewünschte genetische Information liegt, mit Hilfe eines Plasmids implantiert. Genau diesen Vorgang machten wir uns bei dem Versuch im Biochemiepraktikum zu nutze. Jedoch sollten unsere Bakterien „humanes Interferon“ produzieren. Um den zeitlichen Rahmen des Praktikums einzuhalten, beschränkten wir uns darauf ein geeignetes Plasmid für diesen Transport aus drei unterschiedlichen Bakterienkulturen auszuwählen.

Im ersten Schritt des Versuchablaufs isolierten wir wie folgt aus den Bakterien die Plasmid DNA. Durch Zugabe von Lösung 1: 25mM Tris (pH 8,0) resuspendierten wir die in Pallets vorliegenden Bakterien auf, um dann deren Bakterienwände durch Zugaben von Lösung 2 200mM NaOH (1% SDS) in einem stark ionischem Milieu aufzulösen. Zudem veranlasste der stark alkalische pH-Wert zu einer Denaturierung der Proteine und Nukleinsäuren. Erst beim Mischen mit Lösung 3 3M Kaliumacetat (pH 4,8) führten wir den pH-Wert wieder in den neutralen Bereich. Dadurch renaturierten die Proteine und die bakterielle DNA in ungeordneter Weise und fällten zusammen mit Kalium-SDS-Komplexen als weißer Niederschlag aus. Da die Plasmid DNA im Cytosol vorliegt und keinerlei Verbindungen zu anderen Zellorganellen ausbildet, fällt sie nicht aus und bleibt in der Lösung bestehen. Der Praktikumsgruppe blieb aber auch im Seminar unklar, warum nun genau nur die Plasmid DNA in Lösung verbleibt und nicht genauso wie die Bakterien DNA ungeordnet renaturiert und ausfällt. Danach konnten alle geladenen Teilchen durch Zugabe von Isopropanol und 70% Ethanol ausgefällt oder herausgewaschen werden, wodurch nun die Plasmid DNA in gereinigter Form übrig blieb.

Teile der Plasmid-Proben wurden nun mit dem Restriktionsenzym BAM HI versetzt und bei 37°C 60 min inkubiert. Das Enzym konnte in dieser Zeit an einer ganz bestimmten Stelle im Plasmid („insert“-region) sowie bei bestimmten Basenpaarabfolgen angreifen und die DNA aufschneiden.

(PCR PROTOKOLL)

Alle Proben wurden zum Auftragen ins Agarose-Gel für die Elektrophorese vorbereitet, indem sie mit einem Auftragspuffer (0,25% Bromphenolblau, 40% Saccharose) versehen worden sind. Das Bromphenolblau diente dabei der Anfärbung der Lösung, um das Pipettieren in die Gel-Taschen zu erleichtern und zur Überwachung der Lauflänge im Gel. Das Gel selber wurde mit Ethidiumbromid versetzt, das positiv geladen ist, somit eine entgegengesetzte Laufrichtung wie DNA besitzt und sich selektiv in die DNA interkaliert, so dass nach Beendigung der Gelelektrophorese anhand der Fluoreszenz unter UV-Licht die genauen Positionen der Proben ermittelt werden konnten.

(Gel-Elektrophoresebild)

Auf dem Elektrophoresebild entsprechen jeweils 4 Spalten einer Bakterienkultur. So dass zum Beispiel die Spalten 1,2,3 und 4 der Bakterienkultur A angehören. In den Spalten 1 und 2 können keinerlei Banden, in 3 und 4 jeweils eine Bande identifiziert werden. Bei Bakterienkultur B, sind in allen Spalten jeweils zwei Banden klar zu erkennen, wobei die Lauflänge der Proben 5 und 6 deutlich kürzer sind wie die von 7 und 8. Des Weiteren sieht man in der Bakterienkultur C in den ersten Spalten(13,14, 15) gar keine und in der letzten (16) zwei eng bei einander liegende Banden. Die 4 PCR-Produkte(9, 10, 11, 12) liegen deutlich auf einer Linie.

Nachdem wir dieses Ergebnis nun eingehend diskutiert hatten, kamen wir zu dem Schluss dass die Plasmide aus Kultur C unbrauchbar für das weitere Vorgehen waren. Dabei konnten wir die zwei Banden in der letzten Spalte(16) als Bakteriengenom identifizieren. Wir resultierten aus dem Nicht-Vorhanden-Sein von Banden, dass in dieser Bakterienkultur keinerlei Plasmide vorhanden waren. Beim genaueren Betrachten von Bakterienkultur B erkannten wir, dass in den Spalten ein Plasmid zwar vorlag, aber in 5 und 6 ungeschnitten in zwei unterschiedlichen Konformationen, nämlich der zirkulären und „supercoiled“ und in 7 und 8 geschnitten. Da dieses Plasmid aber vom Restriktionsenzym BAM HI an zwei Stellen geschnitten wurde und sich deswegen zwei Banden ausbildeten, erwies sich auch diese Bakterienkultur als unbrauchbar. Bei der Analyse von Kultur A erkannten wir, dass uns hier ein Fehler in Spalte 1 und 2 unterlaufen war, denn hier hätte wie in Kultur B(5,6) sich zwei Banden ausbilden müssen, die mit den unterschiedlichen Konformationen des Plasmids assoziiert werden konnten. Weil aber in den Spalten 3 und 4 jeweils nur eine Bande aufleuchtete und daher BAM HI nur an einer Stelle des Plasmids angegriffen hatte, kristallisierte sich die Bakterienkultur A als die Gesuchte heraus.

Protokoll Versuch 3, Gruppe 9

Thema: Nucleinsäuren

Einleitung

Dieser Praktikumsversuch beschäftigt sich mit der Herstellung von humanem Interferon mithilfe von Bakterienplasmiden. Plasmide kommen in Bakterien zusätzlich zum eigenen Chromosom vor und bestehen aus einem Ring doppelsträngiger DNA. Sie können sich selbstständig replizieren und zwischen Bakterien ausgetauscht werden. Das Bakterium ist in der Lage die vom Plasmid kodierten Informationen zu exprimieren und die entsprechenden Proteine zu erzeugen. Diesen Mechanismus nutzt man aus, um ein gewünschtes Protein in großen Mengen von Bakterien herstellen zu lassen, wie z.B. bei der künstlichen Produktion von Insulin oder vielmehr der Vorstufe von Insulin. Dazu wird ein geeignetes Plasmid bzw. der Ring mit einer sogenannten Restriktionsendonuclease geschnitten, die DNA an ganz bestimmten Palindrom-Sequenzen auftrennt. Anschließend wird ein DNA-Abschnitt eingefügt, der das gewünschte Protein kodiert (hier: humanes Interferon) und zuvor mittels der Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR) amplifiziert wurde. Das Plasmid mit dem eingefügten Gen wird dann durch Transformation in ein Bakterium eingeschleust (Methode: „heat shock“ oder hohe Salzkonzentration), worauf die Produktion des Proteins starten kann. In unserem Versuch führen wir nicht den gesamten Prozess durch, sondern wählen nur ein geeignetes und zuvor isoliertes Plasmid aus drei verschiedenen Bakterienproben aus und amplifizieren das einzuschleusende DNA-Stück mittels PCR.

Durchführung

Teilversuch: Isolierung des Bakterienplasmids

Wie oben beschrieben benötigt man für die Herstellung des humanen Interferons ein geeignetes Plasmid, das aus Bakterien isoliert werden muss. Als Ausgang dienen die Pellets dreier bereits zentrifugierter Bakterien-Proben, die jeweils durch einen Tris-Puffer in Lösung gebracht werden. Im nächsten Schritt gibt man SDS (Natriumdodecylsulfat) und NaOH hinzu, um die Zellmembranen der Bakterien aufzulösen und die Proteine bzw. Nucleinsäuren zu denaturieren. Der pH-Wert wird nun durch Zugabe von Kaliumacetat (schwach sauer) neutralisiert, was zur Renaturierung von Proteinen und Nucleinsäuren führt – allerdings nicht mehr in dem geordneten Zustand wie bei den intakten Bakterien. Da sie untereinander verklumpen, fallen die meisten Proteine als weißer Niederschlag aus, darunter auch die chromosomale DNA, die in Verbindung mit Zellmembranproteinen steht und „mitgerissen“ wird. In Lösung bleiben dagegen die Plasmid-DNA und eine große Anzahl an Ionen. Diese beiden Anteile trennt man durch Zentrifugation und behält den Überstand (Plasmid-DNA und Ionen). Die gelösten Ionen fällt man mittels Isopropanol aus und zentrifugiert erneut, um sie als Pellet abzutrennen. Als letzten Schritt werden noch verbleibende Salze durch 70%ige Ethanollösung herausgewaschen und man erhält die gereinigte Plasmid-DNA.

Die gerade beschriebenen Schritte dienen nur der Isolierung der möglicherweise vorhandenen Bakterien-Plasmids. Erst jetzt gibt man zu den Proben die Restriktionsenzyme (Bam HI) und

lässt diese eine Stunde lang wirken. Falls eine Bakterien-Probe ein geeignetes Plasmid enthält, wird dieses durch das Enzym gespalten.

Nach der „Verdauung“ der Plasmid-DNA durch die Restriktionsendonucleasen führt man eine Gelelektrophorese mit drei verdauten und drei unverdauten Proben durch. Die Elektrophorese dient der Charakterisierung der jeweiligen Probe, d.h. um zu bestimmen, ob ein Plasmid vorhanden ist und, falls ja, wie oft es geschnitten wurde. Um das Auftragen der Proben zu erleichtern und den Fortschritt beobachten zu können, verwendet man Bromphenolblau (geht keine Verbindung mit der Plasmid-DNA ein und verhält sich wie ein DNA-Fragment der Länge 300 bp). Die Banden werden mit Hilfe von Ethidiumbromid unter ultraviolettem Licht sichtbar gemacht. Der Farbstoff ist positiv geladen, wandert deshalb der DNA entgegen und interkaliert mit dieser.

Teilversuch: PCR

Ziel dieses Teilversuchs ist es, ein definiertes DNA-Stück, das das Interferon kodiert, innerhalb einer längeren Sequenz zu vervielfältigen. Dazu dient der zyklische Prozess der Polymerase-Ketten-Reaktion, bei dem der gegebene DNA-Strang zunächst durch starkes Erhitzen getrennt wird, bei niedrigerer Temperatur mit Start-Markern (Oligonukleotid-Primer) versehen wird und schließlich von einem thermostabilen Enzym bei etwas höherer Temperatur kopiert wird. Diesen Zyklus wiederholt man 25-mal und erhält nach jedem Durchgang etwa die doppelte Anzahl des gewünschten DNA-Stücks (exponentielles Wachstum).

Für die PCR setzt man zunächst eine Lösung mit folgenden Komponenten an: 25 µl H₂O und 5 µl 10x verdünnter Reaktionspuffer (damit der pH-Wert stabil bleibt). Dazu gibt man 5 µl 1 mM dNTPs (die Desoxyribonucleosidtriphosphate dATP, dTTP, dGTP und dCTP), die als Bausteine für die zu vervielfältigende DNA nötig sind, und 5 µl 5 pM Primer-Mix, die oben erwähnten Start-Marker. Schließlich folgen 5 µl 5 mM Magnesiumchlorid als Cofaktor für die DNA-Polymerase und Paraffinöl, das die Verdunstung des Wassers beim Erhitzen verhindern soll. Als letztes gibt man 5 µl der Template-DNA (DNA-Vorlage, die das gewünschte DNA-Fragment enthält) und 0,5 µl thermostabile Taq-Polymerase hinzu.

Wie oben bereits beschrieben, wird die Lösung erhitzt (15 s bei 94°C), was zur Trennung der komplementären DNA-Stränge führt. Anschließend folgt eine Abkühlung auf 55°C, damit die Oligonukleotid-Primer, die der DNA-Polymerase das benötigte 3'-OH-Ende zur Verfügung stellen und in Überzahl vorliegen, an den jeweiligen DNA-Einzelstrang anheften können (Annealing). Diese Temperatur wird für 15 Sekunden gehalten. Nun wird die Lösung auf 72°C erhitzt (und für 45 Sekunden gehalten), da dies dem Temperatur-Optimum der verwendeten DNA-Polymerase entspricht. Diese synthetisiert ausgehend von einem der beiden Primer einen komplementären Doppelstrang, wodurch man eine Kopie des gewünschten DNA-Abschnitts erhält.

Der beschriebene Zyklus wird 25-mal wiederholt. Die vervielfältigte DNA wird anschließend auf ein Agarose-Gel aufgetragen und einer Gelelektrophorese unterzogen, um das Ergebnis zu kontrollieren.

Ergebnisse

Der Anhang zeigt eine Kopie (der Fotografie) und ein Schema der Ergebnisse der Gelelektrophorese. Die Abbildungen zeigen vier Bereiche: drei für die Bakterienplasmide und einen für die durch die PCR vervielfältigte DNA. Die Spalten 1, 2, 5, 6, 13 und 14 stammen von Proben, die nicht mit der Restriktionsendonuclease behandelt wurden.

Auswertung der Bakterien-Plasmid-Gelelektrophorese

Die Spalten 2, 5, 6 und 7 lassen einen Rest von chromosomaler DNA erkennen, die aufgrund ihrer Größe nur minimal gewandert ist.

Bakterium A (Spalten 1-4):

- Spalte 2 zeigt zwei Banden, da das Plasmid in unterschiedlicher Konformation vorliegen kann (entspannte Form und „super coil“).
- Spalte 3 und 4 zeigt eine stärkere Bande, die einfach geschnittenes Plasmid enthält. Durch das Aufschneiden liegt nur noch eine Form vor, ein entspannter Strang. Zusätzlich sieht man noch eine schwache Bande, die noch unverdautes Plasmid enthält.

Bakterium B (Spalten 5-8):

- Spalte 5 und 6 zeigt drei Banden, die drei unterschiedliche Konformationen des Plasmids andeuten (die entspannte Form, einen „super coil“ und eine „nicked form“).
- Spalte 7 und 8 zeigt zwei stärkere Banden, wobei eine Bande relativ weit gewandert ist und auf ein kürzeres DNA-Fragment hinweist. Dies lässt darauf schließen, dass das Plasmid zweimal geschnitten wurde und das herausgeschnittene Fragment weiter gewandert ist.

Bakterium C (Spalten 13-16):

- Wie auf der Abbildung leicht zu erkennen ist, enthielt diese Probe kein Plasmid (keine Bande sichtbar).

Für den Einbau des Gens für humanes Interferon sind die Proben B und C ungeeignet, da Probe C gar kein Plasmid enthält und das Plasmid in Probe B zweimal geschnitten wurde und dadurch eventuell wichtige Steuersequenzen (Promotor) entfernt wurden. Probe A dagegen enthält einfach geschnittenes Plasmid, das sich sehr gut für den Einbau des Gens eignet, da noch alle erforderlichen Plasmid-Abschnitte vorhanden sind (wie z.B. Promotor, ORI, Antibiotikaresistenz).

Auswertung der Gelelektrophorese des amplifizierten DNA-Fragments

Auf der Fotografie der Gelelektrophorese kann man eine breite Bande und eine schwache, schmale Bande (auf der Kopie nicht sichtbar) erkennen. Dabei zeigen breite Banden große Stoffmengen an, d.h. die breite Bande entspricht dem amplifizierten DNA-Stück und die schmale dem DNA-Fragment mit langem 3'-Ende. Dieses Ergebnis entspricht den Erwartungen.

Biochemie-Praktikum SS06

Protokoll zu Versuch 3 von:

Claudia Kretschmer

Carola Rampf

Lena Dietrich

Gregor Uhl

Versuch 3

In diesem Versuch wird zum einen Bakterienplasmid isoliert, zum anderen eine Polymerase-Kettenreaktion durchgeführt.

Teilversuch 1 - Plasmidisolierung

Drei gefroren vorliegende Bakterienstämme A,B und C dienen als Versuchsmaterial. Zuerst werden diese in jeweils einen Eppi verbracht und durch Zugabe von 100µl 25mM Tris-hydroxymethylaminomethan-HCl resuspendiert, d.h. wieder in Lösung gebracht. Anschliessend wird 200µl 200mM NaOH mit 1% SDS zugegeben. Durch das SDS, das als stark ionisches Detergenz die Phospholipidmembran zerstört, wird die Bakterien-DNA frei zugänglich. Durch den alkalischen pH denaturieren gleichzeitig die Nucleinsäuren, die Lösung wird viskös. Nachdem für 2min. bei 37°C inkubiert wurde, führt die Zugabe von 150µl 3M Kaliumacetat mit einem pH von 4,8 dazu, dass der pH sich wieder in einem neutralen Bereich einstellt. Durch diese pH-Erniedrigung findet eine ungeordnete Renaturierung von Proteinen und Bakterien-DNA statt, sodass diese zusammen mit Kalium-SDS-Komplexen einen weissen Niederschlag bilden. Sodann werden die Eppis 5min. auf Eis inkubiert und anschliessend für 5min, zentrifugiert. Der Überstand wird ohne die ausgefällten Flocken in einen neuen Eppi überführt und bekommt 300µl Isopropanol zugesetzt. Dieses fällt sämtliche geladenen Teilchen aus und durch Zentrifugation für 5min. können diese am Boden des Eppi konzentriert werden. Wiederum wird der Überstand entfernt und dem Niederschlag 500µl Ethanol (70%) zugegeben. Nachdem wiederum 2min. zentrifugiert wurde, wird der Überstand abermals entfernt und der Niederschlag bei 37°C 5min. lang getrocknet. Dieser feste Niederschlag wird in 50µl Wasser aufgenommen. Nun hat man das isolierte Plasmid in Wasser gelöst vorliegen.

Gelelektrophorese

Nun werden von den isolierten Plasmid-DNA-Proben 10µl entnommen und in einem neuen Eppi mit 2µl Restriktionspuffer und 1µl Restriktionsenzym Bam-HI versetzt. Dann wird 10 sec. zentrifugiert und anschliessend für 60min. bei 37°C inkubiert.

Von den Proben werden jeweils 10µl mit 5µl Auftragspuffer(0,25% Bromphenolblau (ermöglicht eine Kontrolle des Auftrags, verhält sich wie DNA-Stück von 300 bp Länge), 40% Saccharose in H₂O(beschwert die Auftragslösung)) gemischt und im Gel in die vorbereiteten Taschen aufgetragen. Um die DNA sichtbar zu machen, ist dem Auftragspuffer Ethidiumbromid zugesetzt. Dieses besitzt eine positive Ladung und wandert demzufolge der DNA entgegen durch das Gel. Während des Laufs trifft der Farbstoff auf die DNA und baut sich in diese ein (es interkaliert), sodass schliesslich unter UV-Licht

durch die Anfärbung die DNA-Banden sichtbar gemacht werden können (Ethidiumbromid fluoresziert unter UV-Licht).

Teileversuch 2 - PCR

Für die PCR wird zunächst ein Ansatz vorbereitet. Dazu pipettiert man in einen Eppi:

- 5 μ l 10x Reaktionspuffer
- 5 μ l 1mM dNTP's
- 5 μ l 10 pM Primer-Mix
- 30 μ l H₂O

Dieser Ansatz wird zunächst mit 2 Tropfen Paraffin-Öl überschichtet, welches als "flexibler Deckel" auch beim Erhitzen die Lösung zusammenhält, d.h. keine Flüssigkeitsverluste durch Kondensation. Dann wird kurz abzentrifugiert und schliesslich

- 5 μ l Template-DNA
- 0,5 μ l thermostabile Polymerase

hinzugefügt. Der Reaktionspuffer stellt ein geeignetes Milieu für die Funktion der Polymerase zur Verfügung, die dNTP's sind die Nukleotidbausteine, aus denen die neuen Stränge synthetisiert werden, der Primer stellt Bindungsstellen für die Polymerase zur Verfügung, die Template-DNA ist die "Kopiervorlage", die Polymerase synthetisiert die neuen Stränge und das Wasser bildet den Reaktionsraum.

Die PCR läuft automatisch in einer Maschine ab, die folgenden Heizzyklus 25mal durchläuft:

- 94°C für 20sec.
- 53°C für 20sec.
- 72°C für 30sec.

Bei 94°C denaturiert die DNA, d.h. die Stränge teilen sich voneinander, bei 53°C ist das Arbeitsoptimum für den Primer (Annealingtemperatur) und bei 72°C ist das Arbeitsoptimum für die Polymerase. Eine Erhöhung der Zyklenzahl ist nicht sinnvoll, da die Arbeitsgenauigkeit der Polymerase nachlässt und Fehler weiter amplifiziert werden würden.

Nach der PCR wird dieser Ansatz mit 5 μ l Ladepuffer und von der neuen Lösungsmenge 15 μ l auf ein Agarosegel aufgetragen. Mechanismus im Gel siehe TV1.

Interpretation der Gelelektrophorese

Nebenstehendes Bild zeigt eine Photographie unseres Elektrophoresegels.

Unter PCR ist deutlich zu sehen, dass die PCR erfolgreich war, denn es zeigt sich eine genau definierte Bande, was ja bedeutet dass bis auf einige weniger stark amplifizierte Genabschnitte, die zusätzlich zum gewünschten Bereich Primerreste tragen (schwache Banden) vor allem der gewünschte DNA-Schnipsel amplifiziert wurde. 1-2, 3-4, 5-6 sind die Plasmid-Ansätze, wobei jeweils die geraden Zahlen die geschnittenen Plasmide bezeichnen und die ungeraden die ungeschnittenen. Man sieht:

1 und 2

Hier befinden sich die Bakterien, die kein Plasmid enthalten, d.h. keine Bande. Kein Unterschied zwischen eins und zwei, da ohne Plasmid kein Verdau stattfinden kann.

3 und 4

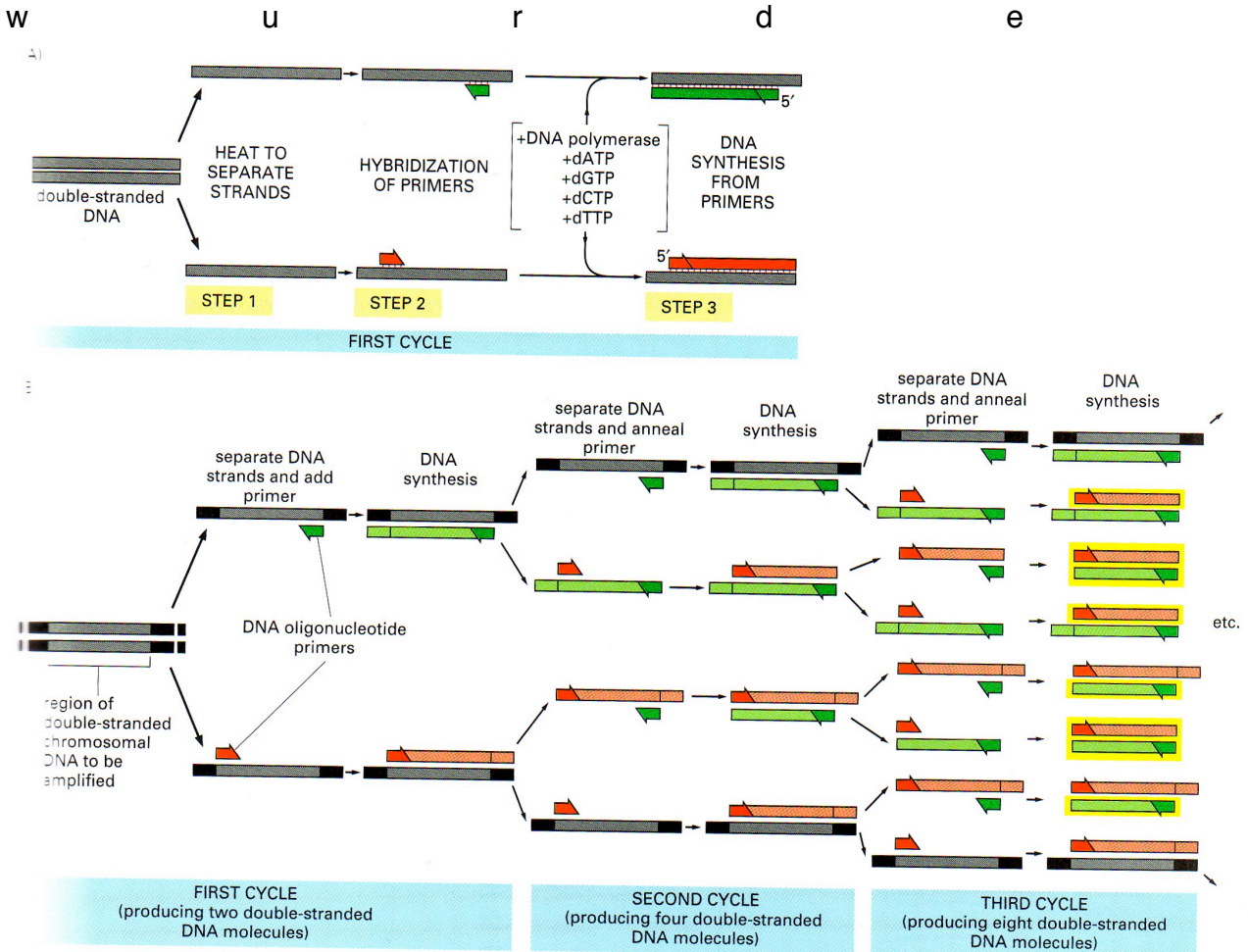
Hier finden sich plasmidhaltige Bakterien, unter 3 die ungeschnittenen mit zwei Banden (zwei Konformationen), unter 4 die geschnittenen (einmal geschnitten = eine Konformation)

5 und 6

Hier entdeckt man ebenfalls plasmidtragende Bakterien mit jeweils zwei Banden, d.h. es wurde zweimal geschnitten, es bestehen zwei Konformationen, von denen eine kleiner ist (supercoiled, läuft schneller) und eine langsamer (relaxed-Form, langsamer).



Desweiteren sind noch die Auftragstaschen sichtbar, da sich dort Verunreinigungen vom Bakterienchromosom befinden, in welches natürlich auch Ethidiumbromid eingebaut



Allgemeine Informationen

Die DNA

Die menschliche DNA als Träger der Erbinformationen teilt sich auf in 46 DNA-Moleküle(Chromosomen), von denen jedes aus zwei zu einer Doppelhelix verdrehten Strängen besteht. Jeder Nukleinsäurestrang besteht wiederum aus Nukleotiden genannten Untereinheiten.

Die Basen

Die Basen im menschlichen Körper lassen sich in zwei Gruppen einteilen: die

- Purinbasen(leiten sich vom Purin ab, z.B. Adenin, Guanin, ferner Hypoxanthin und Koffein)
- Pyrimidinbasen (leiten sich vom Pyrimidin ab, z.B. Cytosin, Thymin und Uracil). Cytosin kommt sowohl in RNA als auch in DNA vor, Thymin nur in der DNA, Uracil nur in der RNA

Die Nukleoside

Die Kombination aus einer Base und einem Zucker wird als Nukleosid bezeichnet. Hier ist zu unterscheiden zwischen

- RNA(Ribonukleinsäure), d.h. die Ribose liegt normal vor
 - DNA/Desoxyribonukleinsäure), d.h. die OH-Gruppe am 2'-C-Atom ist durch ein H ersetzt
- Nomenklatur: Die Zuckeratome werden mit einem ' bezeichnet, die C-Atome der Basen werden nummeriert (2'-C = C-Atom #2 des Zuckers)

Die Nukleoside entstehen durch N-glykosidische Bindung, d.h. das 1'-C-Atom des Zuckers bindet an das N9'-Atom des Purins oder das N1'-Atom des Pyrimidin; die OH-Gruppe des Zuckers wird mit dem Wasserstoff der Base als Wasser abgespalten.

Die Namen der Nukleoside werden von den Basennamen abgeleitet und mit -osin versehen.

Nukleotide

Als Nukleotid schliesslich wird ein Nukleosid bezeichnet, das ein (oder mehrere) Phosphat gebunden hat. Das Phosphat bildet eine Esterbindung an das Nukleosid, die unter Wasserabspaltung eingegangen wird. So entstehen Nukleotidmonophosphate, -diphosphate etc. Für jede Nukleinsäure stehen vier verschiedene Nukleotide zur Verfügung, durch deren Abfolge die genetische Information eindeutig festgelegt ist.

Funktionen der Nukleotide

Neben ihrer Rolle als Bestandteile von DNA/RNA sind sie z.B. als ATP (als Energielieferant), als second messenger(cAMP aus ATP) und als Bestandteile von Coenzymen(NADH, FADH, CoA) wichtig

Nukleinsäuren

Durch das Zusammensetzen mehrerer Nukleotide entstehen die Nukleinsäuren (RNA, DNA)

Die Ribose und das Phosphat sind wichtig für die Kettenbildung, die Basen codieren für die Erbinformation. Zwischen zwei Ribosen(einmal am 5'-C-Atom, einmal am 3'-C-Atom) ist das Phosphat für eine Phosphorsäurediesterbildung verantwortlich.

Sämtliche polymerisierenden Enzyme können ausschliesslich in 5'-3'Richtung arbeiten, d.h. es muss stets eine frei 3'-OH-Gruppe vorhanden sein, die einen 5'-Phosphatteil eines neu eintretenden Nukleotids angreift.

Die Basen

Die Basen codieren für die Erbinformation, wobei jeweils ein Triplet aus Basen für eine Aminosäure codiert. Da es 20 proteinogene Aminosäuren gibt, bieten sich mit Triplets ausreichen Möglichkeiten zu codieren ($4^3=64$ (vier Basen hoch drei Möglichkeiten)).

Es existieren nun bestimmte Start- und Stoppcodons, die Anfang und Ende eines Gens codieren, sowie das "offene Leseraster", das den Bereich zwischen Start- und Stoppcodon beschreibt. Das Startcodon ist immer AUG, das Stoppcodon entweder TAA, TAG oder TGA. Der genetische Code wird als degeneriert bezeichnet, da es für einige Aminosäuren mehr als ein Codon gibt, gewissermaßen redundante Codierungsmöglichkeiten. So können still Mutationen auftreten, d.h. für eine Aminosäure codiert z.B. (Glycin) GGT, GGC, GGA und GGG, wobei zu erkennen ist, dass die dritte Stelle des Codons nicht mehr relevant ist, da auf jeden Fall Glycin herauskommt. Die Basenpaare auf der DNA sind stets komplementär, d.h. die Codierung ist einmal "normal" und einmal spiegelbildlich. Die Basenreihenfolge wird stets in 5'-3'-Richtung angegeben.

Auf der DNA findet sich ein codogener Strang (dient als Vorlage für mRNA) und ein komplementärer codierender Strang (sieht aus wie die mRNA, nur ist hier Thymin statt Uracil zu finden)

Die Doppelhelix

Die Basen der DNA lagern sich aufgrund ihrer chemischen Struktur in einer stets gleichen ganz bestimmten Weise aneinander: es entsteht stets eine Doppelhelix. Jeweils eine Pyrimidinbase paart sich mit einer Purinbase. Würde sich gleich mit gleich paaren, wäre die regelmässige Struktur nicht möglich, da die Bindungsabstände unterschiedlich sind.

Durch diese Art der Anlagerung ergibt sich zwangsläufig als einzig mögliche Struktur ein Doppelstrang, welcher aus zwei Nukleotidketten besteht, die so angeordnet sind, dass die Basen nach "innen" gerichtet sind und über H-Brücken interagieren. Die Zucker und Phosphatreste liegen nach aussen und bilden sozusagen das Rückgrat der DNA.

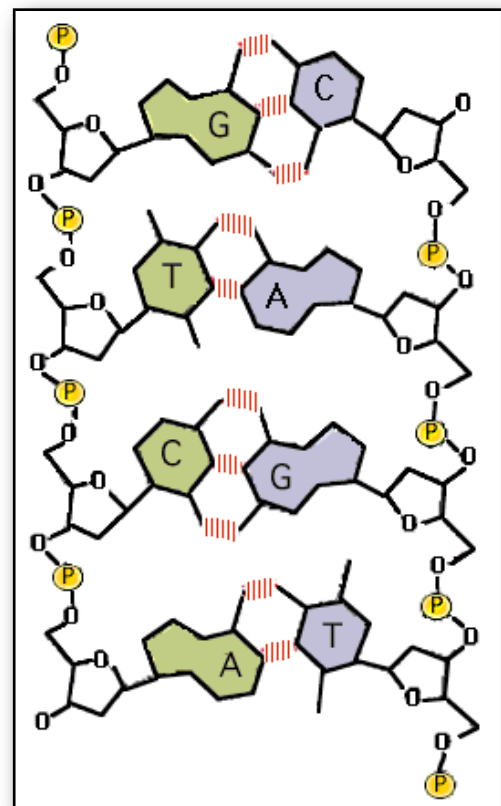
Durch diese Struktur wird die Eigenheit der DNA erst ermöglicht, einen codogenen und einen spiegelbildlichen, codierenden Strang zu besitzen. Es paaren sich stets die gleichen beiden Basen (Guanin mit Cytosin, Adenin mit Thymin), da T und A zwei Wasserstoffbrücken ausbilden, C und G hingegen derer drei.

Aus der Paarung stets zweier zusammengehörender Basen lässt sich folgern, dass die Struktur eines Stranges die Struktur des anderen determiniert: Komplementarität der Basen. Die Stränge laufen kontralateral, das heisst an jenem Ende, an welchem sich bei einem Strang das 5'-Phosphatende befindet, findet sich am anderen Strang die 3'-OH-Struktur.

Normalerweise liegt die DNA in der sogenannten B-Form vor, in der das Molekül rechtsgewunden ist und je Windung 10,5 Basenpaare umfasst. Diese B-Form wird auch häufig als Watson-Crick-Struktur bezeichnet.

DNA-Information

Auf beiden komplementären DNA-Strängen befindet sich die gleiche Information, jedoch eine unterschiedliche (komplementäre) Nukleotidsequenz.



DNA-Replikation

Die Replikation der DNA läuft in der Synthesephase des Zellzyklus ab und startet an Replikationsursprüngen, von denen auf dem gesamten Genom ca. 20000 vorhanden sind, woraus folgt dass die Replikation anstatt ca. 500h nur ca. 7h dauert. Die fünf bekannten menschlichen DNA-Polymerasen sind mit griechischen Buchstaben gekennzeichnet. Am wichtigsten sind alpha und delta, wobei delta für das Genom im Zellkern und alpha für den Beginn der Replikation verantwortlich ist.

Mechanismus der Replikation

Der Mechanismus der Replikation lässt sich unterteilen in Initiation, Elongation und Termination.

Initiation/Primer

Eine Helikase trennt die komplementären Stränge auf (Ausbildung einer Replikationsgabel), wobei eine Topoisomerase Rotationen vorbeugt. Eine Primase, die im Komplex mit der DNA-Polymerase-delta vorliegt, synthetisiert zunächst ein RNA-Startstück an die DNA (Primer), da die DNA-Polymerase-delta nur in der Lage ist, Nukleotide an bereits vorhandene 3'-OH-Gruppen zu synthetisieren. Ein Primer ist ca. zehn Nukleotide lang und stellt das 3'-OH-Ende zur Verfügung.

Elongation

Die DNA-Polymerase-delta liest die Basensequenz eines Stranges ab und beginnt dann am 3'-OH-Ende des Primers die komplementären Nukleotide des wachsenden neuen DNA-Strangs anzuhängen. Die DNA-Polymerase-delta liest den Strang in 3'-5'-Richtung ab, da die Biosynthese in 5'-3'-Richtung läuft.

Am sogenannten Leitstrang läuft die Synthese kontinuierlich ab, am Gegenstrang (Folgestrang) synthetisiert die DNA-Polymerase-alpha jeweils kurze Stücke von ca. 150-200 Nukleotiden in 5'-3'-Richtung (nach ihrem Entdecker Okazaki-Fragmente genannt).

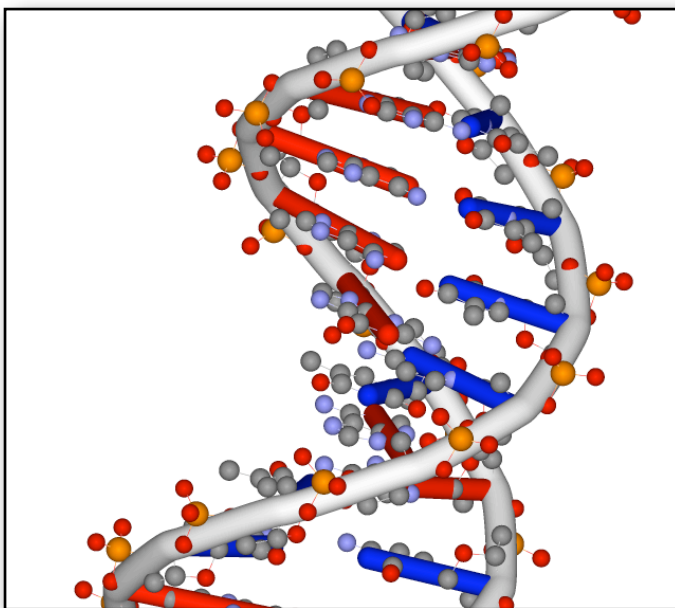
Durch die Aktivität von 3'-5'-Exonuklease werden Fehler in der DNA-Synthese sofort korrigiert, indem falsch eingebaute Basen direkt nach dem Einbau durch die richtigen ersetzt werden.

Termination

Die DNA-Polymerase hört auf zu arbeiten, wenn sie auf eine andere Replikationsgabel trifft. Schließlich wird der Primer durch DNA-Polymerase-delta entfernt und durch die DNA-Ligase die Lücken in den Okazaki-Fragmenten geschlossen.

Alterung

Bei jeder Zellteilung verkürzen sich die Stränge, da nach Entfernung des Primers am Leitstrang keine DNA-Polymerase mehr an Nukleotide angehängt werden kann. Damit nicht nach jeder Zellteilung Teile von Chromosomen zerstört werden hängen am Ende der Chromosomen sog. Telomere, Bereiche die keine Information codieren und hundertfach hintereinander vorkommen, wobei nach ca. 40 Zellteilungen "Schluss" ist. Die Telomerase ist ein Enzym, dass abgebaute Telomere wieder an den Strang anfügt. Somatische Zellen besitzen diese nicht, haben also entsprechend beschränkte



Teilungsmöglichkeiten. Stammzellen hingegen weisen Telomerase-Aktivität auf, und

Keimbahnzellen, die sich unbegrenzt teilen können haben natürlich auch Telomerase-Aktivität.

Die Polymerase-Kettenreaktion

Um bei gentechnischen Verfahren aus kleinen Mengen DNA die im Labor häufig benötigten grossen Mengen zu erhalten, bzw. einen diagnostischen Nachweis einer bestimmten DNA (z.B. Virus-DNA im Blut)

Prinzip der PCR

Mit der PCR wird ein ganz bestimmter DNA-Abschnitt vervielfältigt(amplifiziert). Eine DNA-Polymerase synthetisiert den komplementären Strang zum gewünschten Abschnitt der DNA. Durch mehrmaliges Wiederholen werden Kopien der Kopien angefertigt usw., eine Art Kettenreaktion hilft bei der vielfachen Vervielfältigung. Die amplifizierte DNA kann in einem DNA-Gel nachgewiesen werden: durch angelegte elektrische Spannung werden verschieden lange Nukleinsäure-Stücke voneinander getrennt und durch einen Farbstoff sichtbar gemacht. In diesem Fall ist die Amplifikation dafür da, um überhaupt genügend DNA zu erzeugen, damit auf dem Gel etwas erkannt werden kann.

Voraussetzungen

Um überhaupt eine PCR durchführen zu können, ist die Kenntnis der Nukleotidsequenz am Anfang und am Ende des gewünschten Bereiches unerlässlich - es werden nämlich spezifische Primer als Startpunkte für die DNA-Polymerase benötigt. Primer stellen ein freies 3'-OH-Ende zur Verfügung, an dem die DNA-Polymerase ihre Arbeit beginnen kann. Zum Beispiel können Primer verwendet werden die nur für ein bestimmtes Virus spezifisch sind (z.B. HIV). Somit entsteht im Gel nur dann eine Spur, wenn auch das entsprechende Virus in der Probe vorhanden ist, ansonsten bleibt die Spur leer.

Reaktionsansatz

Oligonukleotide sind spezifische Primer, die aus kurzen DNA-Einzelstrangstücken mit ca. 20-30 Nukleotiden Länge bestehen und jeweils einen bestimmten Abschnitt amplifizieren. Weiter müssen Nukleotide zur Verfügung gestellt werden, damit überhaupt "Material" für die Polymerisation da ist (i.d.R. in der Desoxyform(dATP,dGTP, dCTP und dTTP)). Als Polymerase wird eine hitzestabile DNA-Polymerase verwendet, die man aus Bakterien gewinnen kann, welche in heissen unterseeischen Quellen leben und somit über eine Polymerase verfügen, die Temperaturen von kurzzeitig 90°C aushält. außerdem ist ein Puffer von Nöten, der den pH konstant beim pH-Optimum der Polymerase hält.

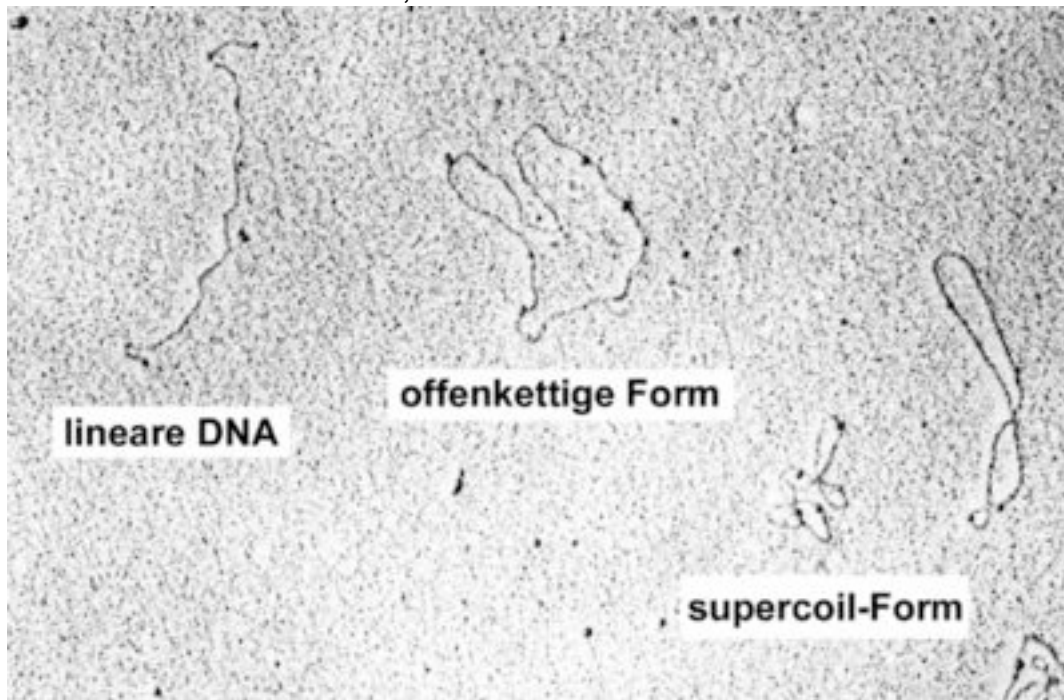
Ablauf eines PCR-Zyklus

Zu Beginn wird der DNA-Strang auf ca. 90°C erhitzt und denaturiert(Änderung der Tertiärstruktur), was eine Trennung der beiden DNA-Stränge zur Folge hat. Es folgt eine Abkühlung auf ca. 50°C, damit der Primer an die DNA binden kann. Jetzt startet die DNA-Polymerase von den Primern aus in 3'-5'-Richtung. Jetzt ist der gewünschte Abschnitt verdoppelt, ein neuer Zyklus kann beginnen. Dies wird sooft wiederholt, bis die gewünschte Menge DNA vorliegt.

Plasmide

Plasmide sind kleine ringförmige DNA-Abschnitte, die nicht für essentielle Informationen codieren, sondern für "Zusatzinfos" wie Resistenzen etc. Sie können unterschiedliche

Konformationen einnehmen, siehe Bild



Biochemisches Praktikum

Gruppe 10

Protokoll vom 10.05.2006, Versuch 3: Nucleinsäuren

Verfasst von: Jens Eberhardt, Janine Haupt, Michael Meß, Sarina Birkenmaier, Alfred Eirich

Praktikumsziel ist die Amplifikation des menschlichen Genes für Interferon mit Hilfe der Polymerase Kettenreaktion (PCR), und die Isolierung bakterieller Plasmid-DNA.

Nach Einbau des humanen Interferongenes in das Plasmid soll das Bakterium dazu befähigt sein humanes Interferon zu synthetisieren.

Isolierung von Plasmid-DNA

Verwendet wurden drei verschiedene Bakterienstämme mit unbekanntem Plasmid-Gehalt.

Nach Resuspendierung der pelletiert vorgelegenen Bakterien mit Tris-Hydroxymethyl aminomethan-HCL(100µl, pH 8,0), wurde ein starkes ionisches Detergenz in Form von 200 mM NaOH + 1% SDS (pH14) hinzugefügt. Das Detergenz bewirkte eine Auflösung der Zellmembran und der alkalische pH-Wert führte zur Denaturierung der nun frei vorgelegenen Proteine und Nucleinsäuren. Nach anschließender Zugabe von Kaliumacetat (150µl, pH 4,8), kam es aufgrund des erniedrigten pH-Wertes zur ungeordneten Renaturierung von Proteinen und bakterieller DNA, welche gemeinsam mit den Kalium-SDS-Komplexen als unlöslicher Niederschlag sich durch Zentrifugation entfernen ließen. Durch die Zugabe von gleicher Menge Isopropanol zum Überstand wurden alle geladenen Teilchen, auch die Plasmide, ausgefällt und durch erneute Zentrifugation konzentriert. Die entstandenen Salze wurden anschließend mit 70% Ethanol ausgewaschen. Nach dem dritten und letzten Zentrifugieren, Verwerfen des Überstandes und der Eintrocknung im Heizblock war die Isolation des vielleicht vorhandenen Plasmids abgeschlossen.

Zur Durchführung der Restriktion wurde die isolierte und konzentrierte Plasmid-DNA erneut in Wasser (50µl H₂O) aufgelöst. Jeweils 10µl jeder

Probe werden in einem Eppi mit dem Restriktionsenzym Bam HI (1µl) und 2µl Restriktionspuffer (zur Erhaltung des pH-abhängigen Funktionsoptimums der Restriktionsendonuclease) versetzt. Es folgte eine Inkubationszeit von 60 min bei 37°C.

Die Proben, mit und ohne Restriktionsenzym, wurden nun auf ein 1%iges Agarosegel aufgetragen. Damit die Proben (10µl) in die vorgesehenen Taschen im Gel einsinken wurden sie zuvor jeweils mit 5µl Auftragspuffer (0,25% Bromphenolblau, 40% Saccharose in H₂O) „beschwert“, was aufgrund der Blaufärbung auch das Auftragen erleichterte.

Das im Agarose-Gel enthaltene Ethidiumbromid (0,5µg/ml) ist positiv geladen und wandert entgegen der Probe. Dabei lagert es sich innerhalb der DNA zwischen zwei Basepaaren, es interkaliert. An Hand der Fluoreszenz kann nach Beendigung der Gelelektrophorese die DNA dann unter Uv-Licht lokalisiert werden.

Restriktionsenzyme (Restriktionsendonucleasen) dienen dem Bakterium als Schutz vor fremder, in sie eingedrungener DNA, indem sie diese an genau bestimmten Stellen (Palindrome) spalten können. Zum Schutz der eigenen DNA wird eine der Basen der Erkennungssequenz methyliert.

PCR

Die PCR dient der Amplifikation (Vervielfältigung) des Interferongenes. In unserem Versuch verwendeten wir hierzu eine Template-DNA (5 µl), also ein DNA-Strang welcher bereits das Interferongen enthält.

Die PCR benötigt eine geeignete Lösung in der die Reaktion stattfinden kann.

Verwendet wurden 25 µl Wasser, 5 µl an Reaktionspuffer (10 x Konz.) zur Aufrechterhaltung eines optimalen pH-Wertes, die für die DNA-Synthese benötigten dNTPs (5 µl 1mM) und für die Polymerase die unbedingt notwendigen Primer als Primer-Mix (5 µl 10 pM). Nach Zugabe der Template-DNA und der Polymerase (0,5 µl Taq-Polymerase) und Übersichtung der Oberfläche mit Parafinöl (Verdunstung) konnte die PCR beginnen.

Innerhalb der 25 PCR-Zyklen sollte es nun zu einer exponentiellen Vermehrung des Interferongens kommen. Nach dem Auslaufen der PCR-Reaktion (10 min bei 72°C und anschließendem Abkühlen auf Raumtemperatur) wurde mit dem amplifizierten Gen, zwecks Nachweises, ebenfalls eine Gelelektrophorese durchgeführt.

Die PCR ist eine Methode, um die Erbsubstanz DNA zu vervielfältigen, ohne einen lebenden zu benutzen. Die PCR wird in biologischen und medizinischen Laboratorien unter anderem für die Klonierung eingesetzt.

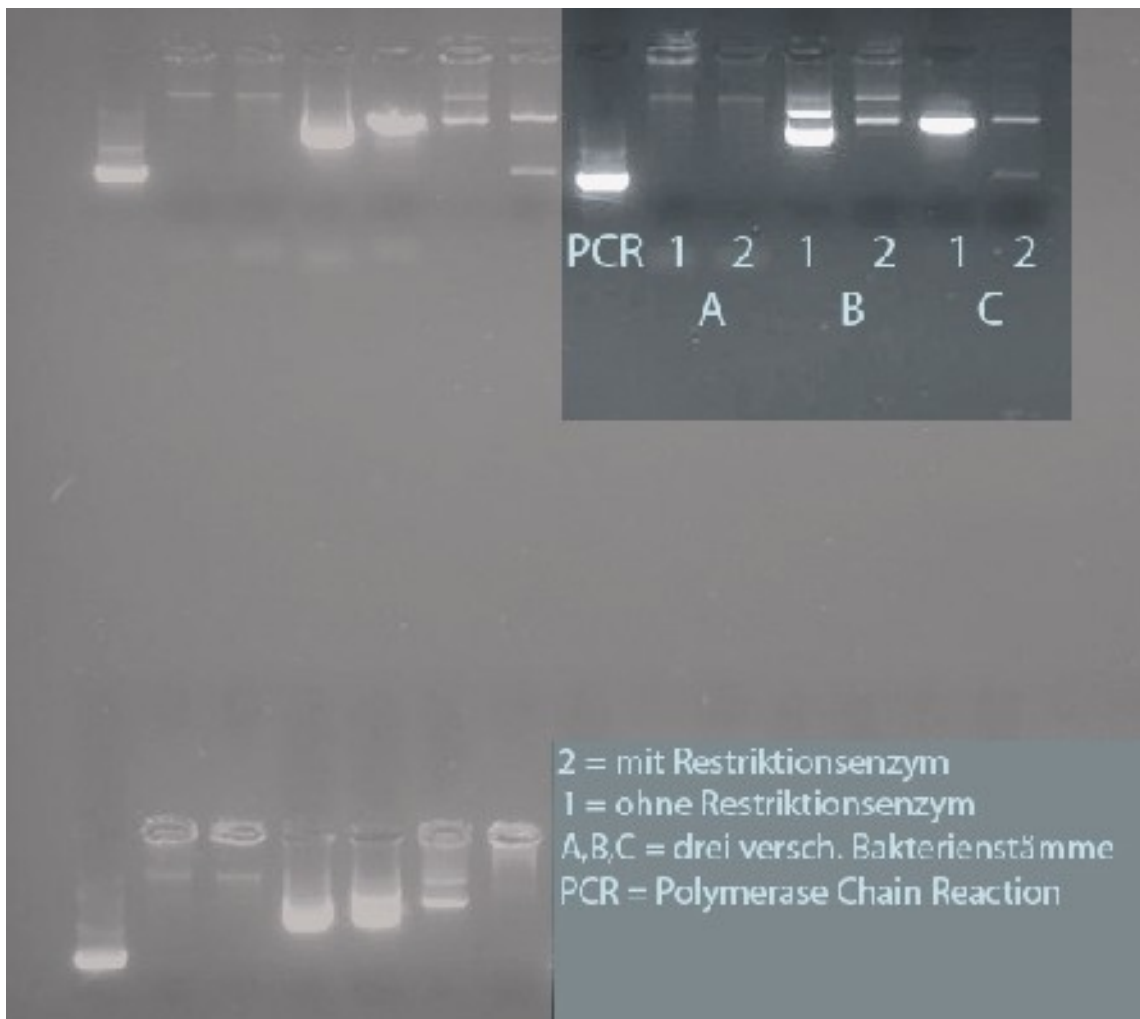
Die Funktion basiert auf der Verwendung einer thermostabilen DNA-polymerase zur DNA-Synthese und sequenzspezifischer Primer, welche den Beginn der Polymerase ermöglichen.

Schritt 1: „Aufschmelzen“ der DNA in zwei Einzelstränge bei 94°C

Schritt 2: Anlagerung der Primer nach abkühlung auf 55°C

Schritt 3: Synthetisierung der DNA durch die Polymerase bei enzymspezifischer Temperatur.

Ergebnis der Gelelektrophorese



eingerahmt = Gruppe 20, Arbeitsplatz 2

Interpretation

PCR

Die Kontrolle der PCR durch die Gelelektrophorese ließ erkennen, dass sich im Wesentlichen eine starke Bande entwickelte. Die hohe Konzentration des am weitesten gewanderten Materials (stark ausgeprägte Bande) enthielt das amplifizierte Gen. Daneben zeichneten sich eine kaum sichtbare weitere Bande ab, welche entweder durch die während der PCR angefallenen langen DNA-Sequenzen mit 3'-Ende entstand oder die Template-DNA beinhaltet.

Plasmid-Gehalt und Wirksamkeit des Restriktionsenzym

An Hand der Gelelektrophorese war zu erkennen, dass Bakterium A über kein Plasmid verfügte, da sich weder bei der Probe mit (A1), noch bei der Probe ohne (A2) Restriktionsenzym Banden abzeichneten.

Bei dem Bakterium B zeichneten sich bei der Probe ohne Enzym (B1) zwei Banden ab. Dies lässt zum einen darauf schließen, dass Plasmide vorhanden waren und in unterschiedlicher Form (entspannt, verdreht) vorlagen. Die Probe mit Enzym (B2) ergab eine Bande, was besagt, dass sämtliches Plasmid einfach geschnitten worden sind.

Die Gelelektrophorese der beiden C-Proben zeigt ebenfalls das Vorhandensein von Plasmid. Die Probe der „geschnittenen“ also enzymatisch behandelten Plasmid-Probe (C2) zeigte zwei Banden. Somit ist das Plasmid des C-Bakteriums durch das restriktionsenzym auch zwei Mal geschnitten worden. Bei der weiter gelaufenen, schwächeren Bande handelt es sich vermutlich um ein kürzeres herausgeschnittenes DNA-Fragment.

Für den Gen-Einbau sind die Kulturen A gar nicht und C nur bedingt geeignet, da wir bei C nicht genau wissen ob das herausgeschnittene Segment funktionsrelevante Teile des Plasmids enthielt. Somit ist Bakterium B der Geeignete Kandidat, da dessen Plasmid alle wichtigen Teile beibehält.