

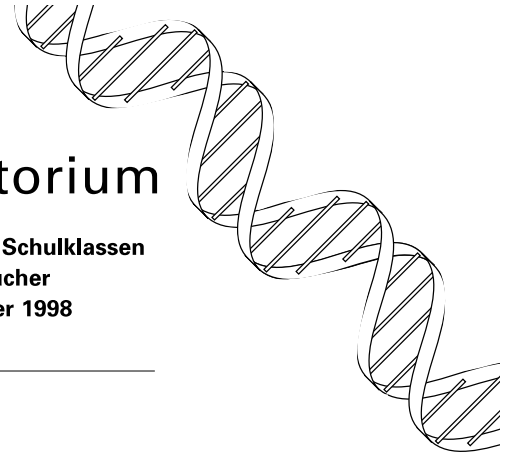
Gen - Welten

Prometheus im Labor?

Laboratorium

Experiment 3
Restriktionsanalyse von Lambda DNA

Experimente für Schulklassen
Internet für Besucher
Mai bis Dezember 1998



Vorbereitung

1) am Vortag o.ä.: (wie Versuch 4)

- 1.1 Arbeitsblätter kopieren / bereitlegen.
fertiges (Ergebnis-)Gel überprüfen
Vorratslösungen überprüfen: Elektrophorese-Puffer, Aqua dest., Färbelösung
- 1.2 ggfs. Elektrophoresepuffer neu ansetzen:
TBE-Puffer verdünnen: 2940 ml Aqua dest + 60 ml Puffer
- 1.3 ggfs. Agarosegele gießen:
2 g Agarose in 250 ml 1x TBE-Puffer lösen
ergibt 0,8% und eine Geldicke von ca 0,75 cm
Agarosepulver in 500 ml Erlenmeyerkolben geben, 250 ml TBE-Puffer dazugeben, rühren.
Kappe aus Alufolie lose auflegen, in der Mikrowelle schmelzen:
ca. 6 x 30 sec auf Stufe 3 (ausprobieren), zwischendurch rühren.
HANDSCHUHE, SCHUTZBRILLE und KITTEL tragen! Gefahr von SIEDEVERZUG!

2) Gerätschaften bereitstellen: (wie Versuch 4)

- Eisbehälter füllen,
3 Enzyme, Restriktionspuffer, λ -DNA aus Gefrierschrank holen.
je Gruppe: 8 Edding-Stifte oder Folienschreiber,
5 farbige Epps in Styroporständern
Färbeschale, Elektrophoresegerät,
1 Abimed-Pipette mit Pipettierspitzen,
Einmalhandschuhe,
1 Schutzbrille, Kittel? für Laborant zum Agarose-Kochen
Kochplatte, 500 ml Erlenmeyer, Alufolie, Rührstab
1 - 3 Wasserbäder auf **37°** vorheizen.

3) Lösungen / Proben vorbereiten: (etwas anders als Versuch 4)

- 3.1 je Gruppe: **5** μ l jedes Enzyms in ein klares Epp pipettieren (3 x 8 Epps), beschriften;
- 3.2 je Gruppe: **60** μ l des 10 x Restriktionspuffers in ein klares Epp pipettieren, beschriften;
- 3.3 je Gruppe: **25** μ l der Lambda-DNA in ein klares Epp pipettieren, beschriften;
- 3.4 je Gruppe: **30** μ l des Farbmekers in ein klares Epp pipettieren, beschriften,
Alles auf Eis an die Gruppen austeilen (6 / Gr.)

4) Durchführungshinweise:

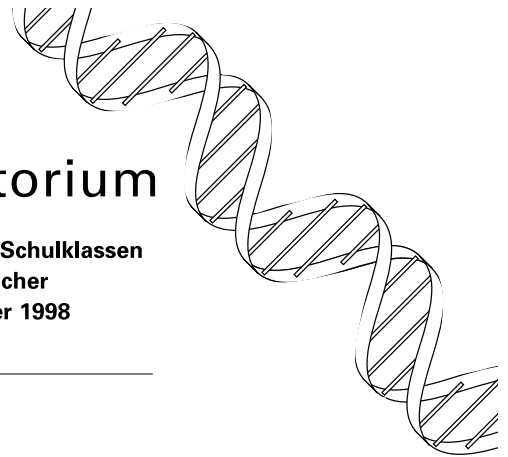
- 4.1 Prinzip erklären: Ablauf mit Zeitplanung und Gerätschaften
- 4.2 Pipettieren üben mit Aqua dest.!

Gen - Welten Prometheus im Labor?

Laboratorium

Experiment 3
Restriktionsanalyse von Lambda DNA

Experimente für Schulklassen
Internet für Besucher
Mai bis Dezember 1998



5) Ergänzende Information:

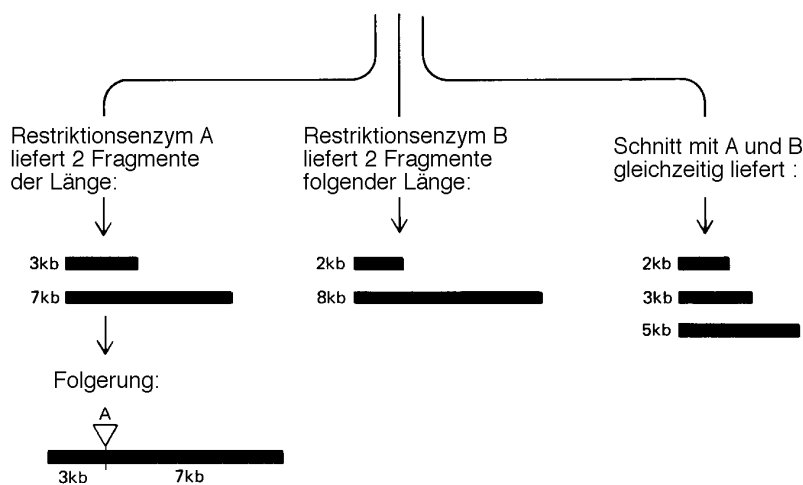
Aus Handbuch von BIO-RAD, Erwartetes Ergebnis:

Data Table Directions: Measure the distance (in millimeters) that each fragment traveled from the well and record it in the table. Estimate its size, in base pairs, by comparing its position to the *Hind* III ladder **Remember: some lanes will have fewer than 6 fragments.**

	L = No restriction enzyme—just Lambda DNA		P = <i>Pst</i> I restriction digest of Lambda DNA		E = <i>Eco</i> RI restriction digest of Lambda DNA		H = <i>Hind</i> III restriction digest of Lambda DNA	
	distance in mm	estimated base-pairs	distance in mm	estimated base-pairs	distance in mm	estimated base-pairs	distance in mm	actual base-pairs
band 1	14	35,000	17.5	9,400	16	23,000	16	23,130 bp
band 2			23.5	4,500	19	7,000	17	9,416 bp
band 3			28	3,000	21	5,500	20	6,557 bp
band 4			29	2,350	22.5	4,500	23.5	4,361 bp
band 5			30.5	2,200	25	3,500	29	2,322 bp
band 6			31	2,000			31	2,027 bp

largest fragment first
↓

10 kb langes DNA-Stück



Wo muß Enzym B schneiden um die Beobachtung zu erklären?

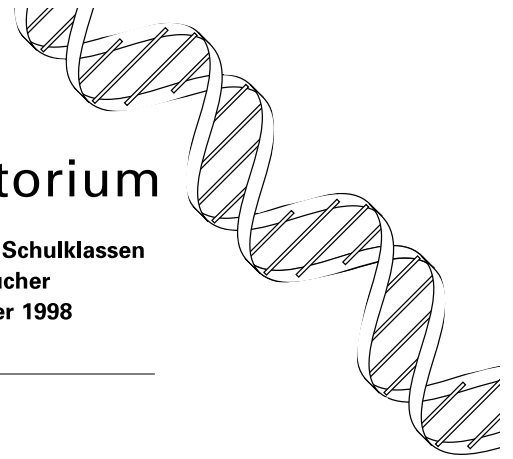
verändert nach Alberts et al.:
Molekularbiologie der Zelle.
VCH 1990,2.Aufl, S.212

Gen - Welten Prometheus im Labor?

Laboratorium

Experiment 3
Restriktionsanalyse von Lambda DNA

Experimente für Schulklassen
Internet für Besucher
Mai bis Dezember 1998



Theoretischer Hintergrund

Restriktionsenzyme (Restriktions-Endonukleasen)

Restriktionsenzyme können DNA an spezifischen Schnittstellen aus 4 - 8 Basen, meist Palindromen schneiden. Die unterschiedliche Wirkung dreier Standard-Restriktionsenzyme soll in diesem Experiment demonstriert werden.

Hier verwendet:	EcoRI,	Herkunft Escherichia coli ,	Schnittstelle:	$\begin{array}{c} \text{C} \mid \text{AATT} \text{ G} \\ \text{G} \text{ TTAA} \mid \text{C} \end{array}$
	Hind III,	Herkunft Haemophilus influenzae ,	Schnittstelle:	$\begin{array}{c} \text{A} \mid \text{AGCT} \text{ T} \\ \text{T} \text{ TCGA} \mid \text{A} \end{array}$
	PstI,	Herkunft Providencia stuartii ,	Schnittstelle:	$\begin{array}{c} \text{C} \mid \text{TGCA} \text{ G} \\ \text{G} \text{ ACGT} \mid \text{C} \end{array}$

Bei diesen drei Enzymen entstehen sogenannte „sticky ends“ (klebrige Enden), d.h. einzelsträngige Enden mit vier Basen. Derartige Enden sind besonders geeignet, DNA-Bruchstücke verschiedener Herkunft gezielt miteinander renaturieren zu lassen. Viele Restriktionsenzyme bilden glatte Enden ohne Einzelstrangstücke.

Gelelektrophorese

Gelelektrophorese trennt Gemische aus geladenen, hochmolekularen Stoffen in einem elektrischen Feld nach ihrer relativen Größe auf. Kleine Moleküle wandern schneller als große.

Polyacrylamid-Gele für DNA-Fragmente bis 1000BP = 1kilobase (kb) (ca. 0,34µm)

Hier: Agarose-Gel: Trennung von DNA Fragmenten im Bereich von 150 - 20.000 BP

Agarose ist die Reinform eines linearen Polysaccharides aus alternierenden D-Galactose- und 3,6-Anhydro-L-Galactose-Einheiten, wird aus Agar isoliert, der wiederum aus Algen gewonnen wird.;

An einem Ende der Gelschicht sind kleine, rechteckige Taschen. Diese werden durch Zähne eines Kamms geformt, der vor dem Gießen des Gels angebracht wird. Nach dem Erstarren des Gels wird Puffer in die Elektrophoresekammer eingefüllt und das Gel mit Puffer überschichtet. Der Puffer stellt den Kontakt zwischen den Elektroden auf beiden Seiten des Gels her. Die Ionen in der Lösung leiten den elektrischen Strom. Außerdem bewahrt die Lösung das Gel vor dem Austrocknen.

Vor dem Auftrag werden die DNA-Proben mit einer farbigen Markerlösung gemischt. Der Marker bewirkt, daß sich die DNA auf dem Boden der Taschen sammelt und zeigt die Front der wandernden Stoffproben an: Er wandert schneller durch das Gel als alle DNA-Fragmente, die kleiner als 300 Basenpaare sind. Die Elektrophorese wird gestoppt, sobald der Marker durch das Gel gewandert ist.

Durch Anschließen an eine Gleichspannungsquelle wird ein elektrisches Feld aufgebaut. Phosphatgruppen geben der DNA eine negative Ladung, so daß sie vom Minus- zum Pluspol wandert (von der Kathode zur Anode).

Sichtbarmachen der DNA-Restriktions-Fragmente

Die DNA-Fragmente sind farblos, also im Gel unsichtbar.

Das Gel wird in eine Färbelösung gebracht, um die DNA zu färben. Die Farbmoleküle heften sich an die DNA-Moleküle im Gel, so daß diese ebenfalls sichtbar werden. Um besseren Kontrast zu erreichen, wird nach dem Färben das Gel mit Wasser entfärbt, so daß die Banden hervortreten. Dann können die Schüler die Laufweiten der verschiedenen DNA-Fragmente interpretieren, z.B. anhand des „Standards“ Hind III die Größen der anderen Fragmente abschätzen.

Im Wissenschaftsbetrieb wird i.a. Ethidiumbromid verwendet, das mutagen ist.

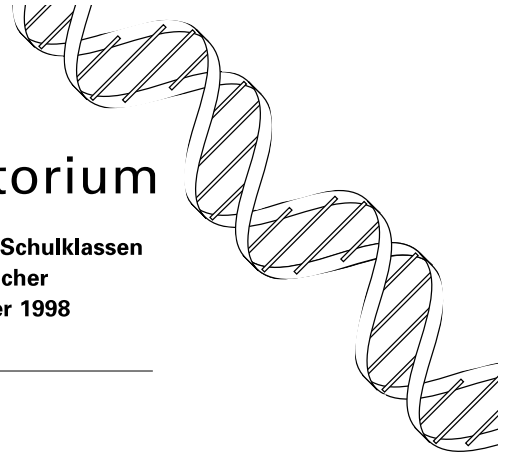
Für Praktika verwendet man Methylblau o.ä., das keine Sicherheitsprobleme aufwirft und über Hausabwässer entsorgt werden kann. (IPN 1997)

Gen - Welten Prometheus im Labor?

Laboratorium

Experiment 3
Restriktionsanalyse von Lambda DNA

Experimente für Schulklassen
Internet für Besucher
Mai bis Dezember 1998



Bedeutung der Restriktionsanalyse:

- 1. Restriktionskarten (Nathans 1971)**
Die Viren-DNA wird nacheinander an immer mehr Stellen geschnitten. Mit wachsenden Verdauungszeiten erhält man immer kürzere DNA-Fragmente. Daraus und aus dem Vergleich der Fragmente bei Verdauung mit verschiedenen Enzymen einzeln und kombiniert (s.AB) läßt sich eine Karte der Schnittstellen erschließen. Durch kurze Zugabe radioaktiver Bausteine und folgende Verdauung stellte man z.B. fest, in welchem Restriktions-Fragment die Replikation des Virus beginnt und wie sie fortschreitet.
- 2. Sequenzierung (Sanger 1975)**
Sequenzierung benötigt „kleine, genau situierbare“ DNA-Stücke, also Restriktionsfragmente mit wenigen hundert Basenpaaren.
- 3. Schneiden und Kleben**
Zum Einbau von Genen in Plasmide müssen beide mit demselben Restriktionsenzym geschnitten werden und die Lage der Schnittstellen zum Gene muß bekannt sein.
- 4. Im Organismus**
Restriktionsenzyme wurden nur in Mikroorganismen gefunden. Mit ihrer Hilfe können Bakterien eingedrungene Fremd-DNA, z.B. von Bakteriophagen, „bekämpfen“. Ihre eigene DNA ist durch Methylierung an den Schnittstellen geschützt - diejenige von Phagen, die sich im gleichen Bakterienstamm haben vermehren lassen, allerdings auch!!

Literatur:

Watson, J.D. et al: Rekombinierte DNA. Spektrum Akademischer Verlag. Heidelberg 1993². S. 38ff
Alberts, B. et al: Molekularbiologie der Zelle. VCH Weinheim 1990². S. 212
Herder-Lexikon der Biologie. Spektrum Akademischer Verlag. Heidelberg 1994 (Taschenbuchausgabe)
Hafner, L; Hoff, P.: Genetik. Schroedel Verlag. Hannover 1995^{3?}
Stryer, L.: Biochemie. Spektrum Akademischer Verlag. Heidelberg 1996⁴
IPN/EIBE: Lambda-Kit. Kiel 1997 (vgl. Internet - Adresse)

Ergänzende Internet - Adressen:

<http://www.yahoo.com/Science/Biology/Genetics/>
Die „Genetics-Site“ der bekanntesten Suchmaschine

<http://eibe.reading.ac.uk:8001>
Etliche ausgearbeitete Unterrichtseinheiten, z.T. mit Experimentiervorschlägen zur Biotechnologie.
z.Z. meist auf Englisch; z.T. französisch, spanisch, dänisch; Übersetzung in Arbeit (IPN-Projekt)
Direkte Bestellmöglichkeiten für Restriktionsanalyse („Lambda-Kit“), ELISA-Test u.a.

<http://134.225.167.114/NCBE/PROTOCOLS/LAMBDA/CSSME/simulate.html>
Lambda - Computer - Simulation von NCBE (Ergänzungen zum Lambda-Kit von EIBE / NCBE / IPN)
3 WORD - Dateien zum Runterladen + Anweisungen und
weitere Links, z.B. mit Hinweisen für die verwendeten Lösungen und Computerbildern von Viren

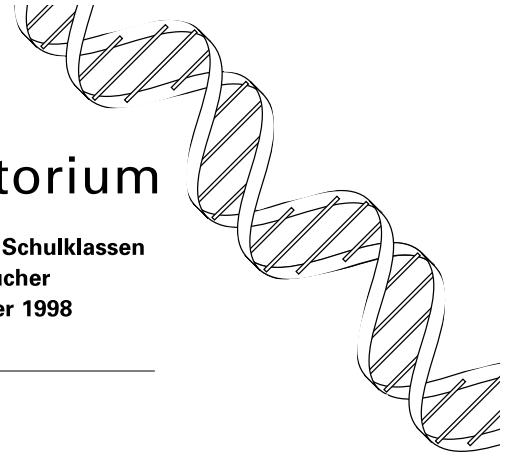
Gen - Welten

Prometheus im Labor?

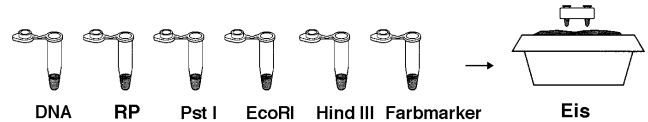
Experiment 3 Restriktionsanalyse von Lambda DNA

Laboratorium

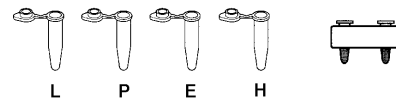
Experimente für Schulklassen
Internet für Besucher
Mai bis Dezember 1998



1. Eppendorf-Gefäße („Epps“)
„DNA“ (Lambda-DNA-Probe),
„RP“ (Restriktionspuffer)
3 Restriktionsenzyme und
Farbmarker
auf Eis bereitstellen

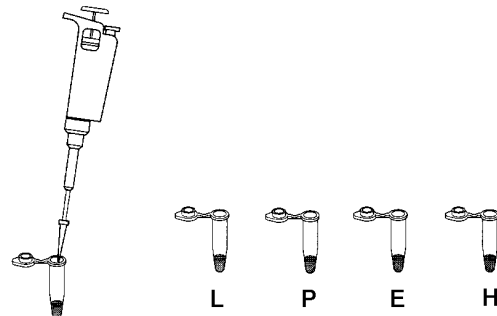


2. Farbige Epps beschriften:
mit Ihrem Namen und Datum sowie
klar: L = Lambda-DNA
violett: P = Pst I
grün: E = Eco RI
orange: H = Hind III



3. Verdauungsansatz:
Pipettieren der DNA und je eines Enzyms gemäß
folgendem Schema in die 4 Epps:

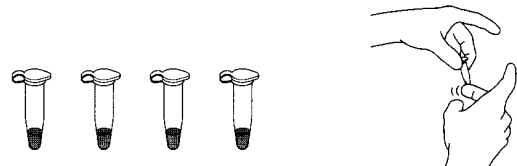
Epp	DNA	Puffer	Pst I	EcoRI	Hind III
L	4 µl	6 µl	----	----	----
P	4 µl	5 µl	1 µl	----	----
E	4 µl	5 µl	----	1 µl	----
H	4 µl	5 µl	----	----	1 µl



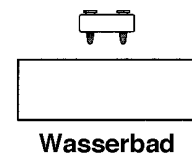
**Für jeden Pipettierschritt
eine neue Spitze verwenden!!**

Gebrauchte Spitzen in ein Becherglas geben.
Achten Sie darauf, daß jede Probe auf den Boden
des Gefäßes gelangt!!

4. Epps verschließen und Lösungen mischen:
Schnipsen Sie leicht gegen die Gefäße (s.Bild)



5. Epps im Wasserbad inkubieren „**Verdau**“:
bei 37° für 30 min
dann aus dem Wasserbad nehmen und kalt stel-
len bis zur Weiterbearbeitung.

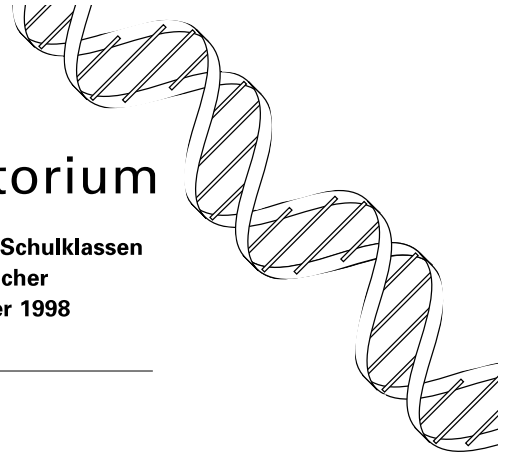


Gen - Welten Prometheus im Labor?

Laboratorium

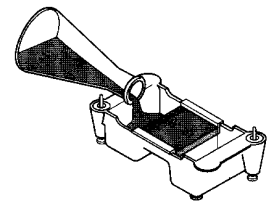
Experiment 3
Restriktionsanalyse von Lambda DNA

Experimente für Schulklassen
Internet für Besucher
Mai bis Dezember 1998



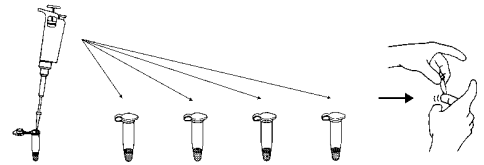
6. Agarose zubereiten:
1,6 mg Agarose-Pulver und 200 ml TBE-Puffer. (0,8%)
in einen Erlenmeyerkolben geben, Alukappe lose auflegen.
Vorsichtig aufkochen, dabei rühren.
Auf 60° ca. abkühlen lassen;

7. Gel gießen:
Gelschale mit Metallkeilen verschließen,
Kamm einlegen (nächst der Kathode „-“, schwarz),
Agarose ca. 0,7 cm dick eingießen.
Stehen lassen, bis das Gel fest ist (wird trüb)
Kamm **vorsichtig** herausziehen



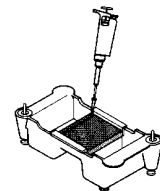
8. Elektrophoresekammer füllen:
TBE - Puffer aus Vorratsbehälter, bis das Gel gerade bedeckt ist

9. Dazupipettieren des Farbmärkers:
2 µl jeweils;
Für jede Probe eine neue Pipettierspitze verwenden!
Durch Fingerschnipsen gut mischen!

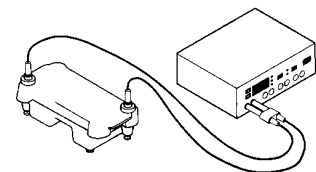


10. Gel beladen:
10 µl von jeder der 5 Proben in eine Geltasche + HindIII DNA-Marker

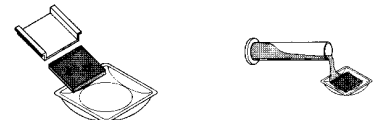
Spur 1	Spur 2	Spur 3	Spur 4
L, klar	P, violett	E, grün	H, orange



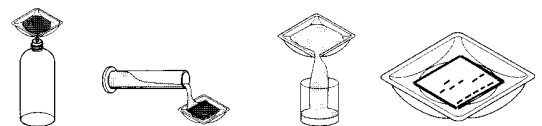
11. Elektrophorese laufen lassen:
Deckel auflegen (nach Farben); Spannung auf 120 V einstellen;
starten (Knopf mit Läufer)
Dauer ca. 30 min;
Abschalten, wenn Farbmärker am Ende des Gels angekommen!



12. Färben:
Handschuhe anziehen
Gel **vorsichtig** mit dem Daumen aus der Schale in die Färbeschale drücken. (**Achtung: rutscht leicht weg!!**)
Dauer ca. 1 Tag - u.U. am Nachmittag schon abgeschlossen



13. Entfärben (wird von den LaborantInnen durchgeführt)
14. Auswerten!



ergänzende Internet - Adressen:

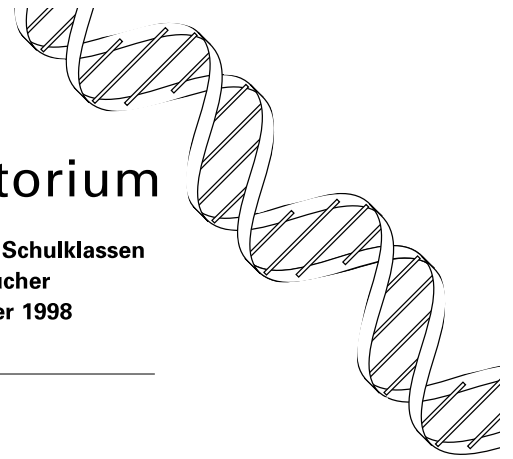
<http://raven.umnh.utah.edu>; <http://eibe.reading.ac.uk:8001>

Gen - Welten Prometheus im Labor?

Laboratorium

Experiment 3
Restriktionsanalyse von Lambda DNA

Experimente für Schulklassen
Internet für Besucher
Mai bis Dezember 1998

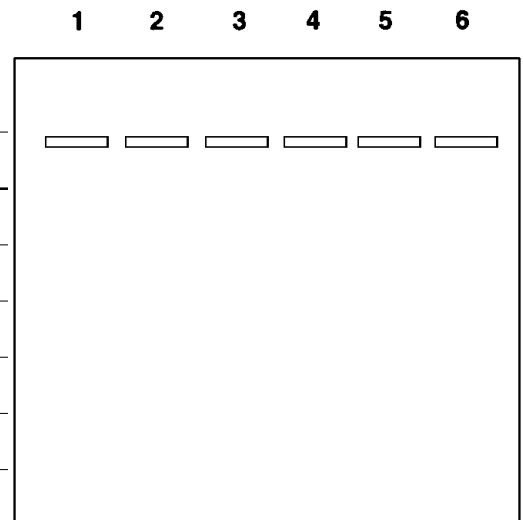


Ergebnisprotokoll:

1) Bemerkungen / besondere Vorkommnisse:

2) Gelabdruck und Analyse

Bande	L λ-DNA, voll		P Pst I-Fragmente		E Eco RI-Fragmente		H Hind III-Fragmente	
	Laufweite (mm)	Größe (BP)	Laufweite (mm)	Größe (BP)	Laufweite (mm)	Größe (BP)	Laufweite (mm)	Größe (BP)
1								23.130
2								9.416
3								6.557
4								4.361
5								2.322
6								2.027



3) Fragen zum qualitativen Ergebnis:

- 3.1 In jede Tasche wurde 1 DNA-Probe gegeben. Zu sehen sind in jeder Spur mehrere DNA-Banden. Woher stammen sie?
- 3.2 Wie viele Schnittstellen hatte die DNA-Probe für die verwendeten Restriktionsenzyme jeweils?
- 3.3 Welches Ergebnis erwarten Sie von einem Ansatz, in dem die DNA mit einer Mischung zweier Restriktionsenzyme verdaut wurde?

4) Fragen zur quantitativen Auswertung:

- 4.1 Messen Sie die Laufweiten:
Gelzugewandte Kante der Tasche bis Mitte einer Bande.
- 4.2 Tragen Sie die Werte in ein lineares und ein halblogarithmisches Diagramm ein!
(x-Achse: Laufweite in mm ; y-Achse: Fragmentgröße in BP)
- 4.3 Sie erhalten aus den gegebenen Werten und den Laufweiten des „Standards“ Standardkurven.
In welchem Diagramm kann man Zwischenwerte besser abschätzen?
Tun Sie dies!

Muster

