

Stephanie [REDACTED]
BTA-OH
Gruppe A, Arbeitsplatz 7
Partner: Martin [REDACTED]

Protokoll
über den Versuch vom
12./13.12.02

„Restriktionsverdau und Gelelektrophorese“

(Restriktionsverdau von ?-DNA)

Molekularbiologisches Praktikum
Berufskolleg Kartäuserwall
Kartäuserwall 30, Köln

Fr. Urmoneit

Restriktionsverdau von ?-DNA aus Bakteriophagen und Auftrennung der Fragmente via Gelelektrophorese

Einleitung / Theorie

In diesem Versuch wollen wir ?-DNA mit Hilfe von Restriktionsenzymen auseinanderschneiden und die Fragmente dann nach ihrer Größe mit Hilfe der Gelelektrophorese auftrennen. **Restriktionsenzyme** = Restriktionsendonukleasen (RE) sind Enzyme, die ursprünglich in Bakterien vorkommen. Sie beschützen den Mikroorganismus davor, dass fremdeingeschleuste DNA in das Genom des Bakteriums eingebaut wird, indem sie diese zerschneiden. Das Bakterium selbst schützt sich vor seinen eigenen RE durch Methylgruppen –CH₃ an der eigenen DNA.

Restriktionsenzyme schneiden DNA, sind also **DNAsen**. Man nennt sie daher auch die „**molekularen Scheren**“ der Biotechnologie. Für die Molekularbiologie sind sie heute ein unerlässliches Werkzeug geworden. Man unterteilt zwei Gruppen von DNAsen:

1. **Endonukleasen** schneiden mitten im DNA-Strang
2. **Exonukleasen** schneiden Stücke vom Ende des Stranges ab

Restriktionsenzyme sind Endonukleasen. Sie greifen die DNA mitten im Strang an. Dabei erkennen sie eine bestimmte Basensequenz, sogenannte **Palindrome**. Palindrome sind Sequenzen, die von vorne und von hinten gelesen das gleiche ergeben, z.B. GATTAG oder ATATA. Diese Sequenzen können vier bis sechs Nukleotide lang sein. Es gibt nun zwei Möglichkeiten, wie das RE den DNA-Strang aufschneiden kann:

- a) beide Stränge werden an der selben Stelle durchtrennt; so entsteht ein glattes, bündiges Ende = **glattes Ende**
- b) die Stränge werden um einige Nukleotide versetzt durchtrennt; es entstehen überhängende Enden = **klebrige Enden**

An diesen klebrigen Enden kann man mit Hilfe anderer Enzyme relativ leicht DNA-Fragmente wieder zusammenfügen, wenn diese komplementäre Enden haben. Bestimmte Enzyme schneiden die DNA sehr spezifisch. So entstehen Fragmente mit genau definierten Schnittstellen, die man dann weiter untersuchen kann.

Die Restriktionsenzyme werden des weiteren in unterschiedliche Typen unterteilt. Der einzige für die Molekularbiologie interessante ist jedoch **Typ II**, denn diese Endonukleasen besitzen eine spezifische Bindungs- sowie Schneidestelle. Die beiden Stellen sind identisch. Und sie erkennen die oben erwähnten Palindrome. Vor allem die spezifischen Bindungs- und Schneidestelle sind jedoch hier von besonderer Wichtigkeit.

Zur **Nomenklatur**: RE werden immer nach einem bestimmten Muster benannt. Grundstock ist der Name des Mikroorganismus, aus dem das Enzym stammt. Es werden immer **der erste Buchstabe der Gattung** und **die ersten zwei Buchstaben der Art** verwendet. Als Zusatz findet man häufig noch weitere Bestandteile des Namens.

Beispiele: Eco R1 Escherichia coli RY 13 I
Hae II Haemophilus aegyptias
Hind III Haemophilus influenza (Serotyp d)

Nach dem Einsatz von Restriktionsenzymen erhält man ein Gemisch aus unterschiedlich langen DNA-Fragmenten. Es ist in der Regel bekannt, wie viel Units

DNA ein Enzym schneiden kann. Um dieses Gemisch aufzutrennen verwendet man ein Gel. Dieses Gel besteht aus Puffer, in dem durch Erhitzen DNA-Agar gelöst wird. Kühlt das Gemisch ab, so entsteht ein feines Netz auf molekularer Ebene.

Das Gel wird nun in einer speziellen Kammer unter Spannung gesetzt. Dadurch laufen die negativ geladenen DNA-Fragmente (aufgrund der negativ geladenen Sauerstoffatome im Rückrad der DNA) zum positiven Pol = Katode der Kammer. Kurze Fragmente wandern dabei schneller durch das Netz als größere.

Da das Gel sowie die DNA-Proben farblos sind, fügt man den Proben einen Ladepuffer bei. Dieser Ladepuffer bewirkt zum einen durch Glycerin oder Succose, dass die DNA beschwert wird und nicht aus den Geltaschen läuft. Zum anderen enthält er zwei Farbstoffe, die parallel mit der DNA durch das Gel wandern:

1. Bromphenolblau
2. Xylencyanol

Die beiden Farbstoffe wandern unterschiedlich schnell und parallel zu einer bestimmten kB-Größe der DNA. So sieht man, wie weit das Gel schon gelaufen ist. Um das Gel dann abschließend auswerten zu können, muss man es anfärben. Man verwendet dazu Ethidiumbromid. Dieser Farbstoff interkaliert in die DNA zwischen die Basenpaare. Daher ist es äußerst karzinogen. Unter UV-Licht fluoresziert der Farbstoff und macht die DNA sichtbar. Um die Fragmente beurteilen zu können, lässt man in einer weiteren Kammer einen Marker mitlaufen. Dieser besteht aus einem Gemisch bekannter Fragmente.

Material

Untersuchungsmaterial: Lambda DNA, 500 µg/ml

Geräte: übliches Glasgerät
Eppendorfhütchen
Eppendorfpipetten in unterschiedlichen Größen
Wärmeschüttelbad
Gelelektrophoresekammer
Powerstation
Färbewanne
Mikrowelle

Chemikalien: DNA-Agar von Serra, Marine BioProducts International Inc.
HIND III (Restriktionsenzym), 18.000 U/h/ml von Pharmacia Biotech
Restriktionspuffer, 10x
Trishydroxymehtylaminomethan (TRIS) $\text{H}_2\text{NC}(\text{CH}_2\text{OH})_3$ von Merck, R36/38, M= 121,14 g/mol
Titriplex III (EDTA), M: 372,24 g/mol von Merck
Eisessig $\text{C}_2\text{H}_4\text{O}_2$, M: 60,05 g/mol, d: 1,05 g/cm³, R10-35, S23.2-45 von Merck
Marker "Lambda mit HIND III"
Ethidiumbromid 1%ig in Wasser, für die Elektrophorese, R68, S36/37 von Merck

Durchführung

1. Ansetzen der Lösungen

0,5M EDTA-Lösung 4,653 g EDTA auf 25 ml auffüllen

TAE Puffer 10x

48,4 g Tris

11,42 ml Eisessig

20 ml 0,5M EDTA

auf 1 Liter auffüllen, pH 8 einstellen

2. Restriktionsverdau

- das Wasserbad auf 37°C vorwärmen
- den Reaktionsansatz wie folgt herstellen:

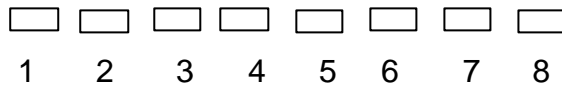
Aqua reinst	6 µl
RE-Puffer	1 µl
? -DNA	2 µl
R-Enzym	1 µl
- den Ansatz 1h bei 37°C im Wasserbad verdauen lassen
- den Verdau durch Zugabe von 4 µl Stopplösung beenden
- der Ansatz besteht nun also aus 14 µl

3. Gelelektrophorese

- während des Verdaus die Gelschale mit Tesafilm umkleben
- geeigneten Kamm heraussuchen
- Volumen der Gelkammer berechnen:
$$V = l \times b \times h$$
$$= 10,5 \text{ cm} \times 7,8 \text{ cm} \times 0,3 \text{ cm}$$
$$= 24,57 \text{ cm}^3$$

~ 25 ml Gel ansetzen
- 25 ml eines 1% Gels gemäß den Angaben auf der Packung mit einfach konzentriertem TAE-Puffer ansetzen
- DNA-Agar im Puffer in der Mikrowelle aufkochen, bis er vollständig gelöst ist
- dann auf 50°C herunterkühlen lassen, damit durch die Hitze weder Gelkammer noch Tesafilm um die Kammer zerschmolzen werden
- mit der temperierten Lösung ein etwa 3 mm dickes Gel in der Kammer gießen
- den Kamm an der richtigen Seite der Kammer einstecken (Anode!)
- das Gel erstarren und auskühlen lassen (dauert etwa 30 min)
- die Kammer mit einfach konzentriertem TAE-Puffer fluten, bis das Gel bedeckt ist
- den Kamm vorsichtig entfernen, ohne das Gel zu zerreißen
- in die entstandenen Kammern je das komplette Ansatz-Volumen (14µl) pipettieren
- in eine Kammer sollte ein Marker pipettiert werden: 5 µl ;Markerlösung + 4 µl Stopplösung = 9 µl

Anode \ominus



Katode \oplus

- 1) Marker
- 2) Susanne
- 3) Lilli
- 4) Marker

- 5) Sabrina
- 6) Vera
- 7) Patti
- 8) Stephanie

- das Gel läuft nun etwa 1 ½ Stunden bei 90 Volt (richtige Polung beachten: rot = - und schwarz = +)
- nach dem Drücken der Stopptaste ist das Gel fertig zum Färben

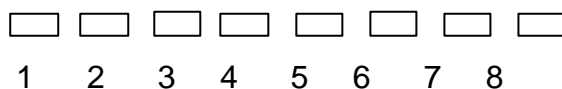
3. Gelfärbung

- hierzu das Gel in eine mit Ethidiumbromidlösung gefüllte Fotoschale geben und 15 min einwirken lassen
- Ethidiumbromid = krebserregend! Vorsicht bei allen Arbeiten damit und spezielle Entsorgung beachten!
- das gefärbte Gel unter eine UV-Lampe legen (Schutzbrille) und auswerten

Ergebnisse

Nach der Färbung sah unser Gel wie folgt aus:

Anode \ominus



Katode \oplus

Der Marker Kammer 1 und 4 ergibt laut Verpackung folgende Fragmente:

23130 Bp
9416 Bp
6557 Bp
4361 Bp
2322 Bp
2027 Bp
564 Bp
125 Bp

Auswertung

Wie man sehen kann, ist außer den Markern nichts durch das Gel gelaufen. Es sind keine Banden entstanden. Die längsten Stücke (23.130 Bp) haben sich lediglich aus den Kammern bewegt. Die kürzesten Stücke (125 Bp) sind schon aus dem Gel herausgelaufen. Das Gel an sich war aber in Ordnung, da der Marker schöne banden erzeugt hat.

Fehlerdiskussion

Woran kann es liegen, dass der Versuch nicht funktioniert hat? Als erste Fehlerquelle fallen mir die Restriktionsenzyme selbst ein. Sie sollen immer auf Eis transportiert werden und nur kurz aus dem Freezer genommen werden. Vielleicht waren sie zu warm und dadurch schon denaturiert.

Eine weitere Fehlerquelle sind die Puffer: es könnte sein, dass der Restriktionspuffer zu alt war. Vielleicht war aber auch das Ultrareinst-Wasser verunreinigt, sodass sich hier Fehler einschleichen konnten.

Der Fehler muss ja auf jeden Fall im Reaktionsansatz stattgefunden haben, da gar keine Schnittstellen entstanden sind, das Enzym also gar nicht gearbeitet hat. Am TAE-Puffer kann es eigentlich nicht liegen, da die Elektrophorese mit dem Marker ja funktioniert hat.

Literaturangaben

- Internet
- Aufzeichnungen aus den Vorbesprechungen

Summary

In this experiment, we wanted to learn more about restriction enzymes and the use of electrophoresis. With the help of restriction enzymes we cutted ?-DNA into small pieces of DNA with e defined number of kBp.

To determine these DNA-pieces, we used the method of electrophoresis with a DNA-agar gel. The DNA-pieces stroll through a gel that is set under voltage, because the DNA owns negative oxygen-atoms that want to reach the positive terminal of the implement.

After the electrophoresis work, you can colour the gel with a very toxically liquid called Ethidiumbromid. (You have to work very carefully with this liquid!) The liquid causes that the DNA-pieces in the gel become visible under a UV-lamp. So you can evaluate your results.