

Arbeitsblatt 1



Analyse von DNA

1-A: Schneiden des Plasmids pGEM®-5Zf (+) mit den Restriktionsenzymen *Pvu* I und *Eco* R V

Bevor Sie anfangen:

Alle Reagenzien müssen vor Gebrauch vollständig aufgetaut sein und durchmischt werden. Dazu schnippen Sie die Gefäße leicht an.

Sollten noch Kristalle in der Lösung sein, so wärmen Sie die Lösung mit den Fingern weiter an und mischen mehrmals durch „Anschnippen“.

Anschließend stellen Sie die Reagenzien sofort auf Eis.

Das Restriktionsenzym muss nicht aufgetaut werden, da die Lösung Glycerin enthält.

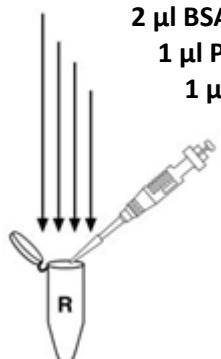
Enzyme und Nukleinsäuren müssen immer auf Eis stehen!

Bevor Sie mit dem Pipettieren beginnen, muss jeweils die gesamte Reagenzienmenge (Enzyme, DNA) in der Spitze des Eppendorfgefäßes gesammelt werden, was durch kurzes Zentrifugieren bzw. Herunterschütteln erreicht werden kann.

Ihr Restriktionsansatz (R):

Beschriften Sie ein Eppendorfgefäß für Ihren Restriktionsansatz.

13 µl nukleasefreies Wasser
2 µl Puffer D (10x)
1 µl pGEM®-5Zf(+) Vector
2 µl BSA
1 µl *Pvu* I
1 µl *Eco* R V



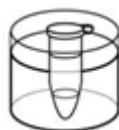
Pipettieren Sie die Reagenzien entsprechend der angegebenen Mengen und Reihenfolge in das vorbereitete Eppendorfgefäß.

Verwenden Sie für jeden Pipettierschritt eine neue Spitze!

Achten Sie darauf, dass keine Tröpfchen an der Gefäßwand hängenbleiben, sondern in der Spalte des Eppendorfgefäßes gesammelt werden.

Mischen Sie den Restriktionsansatz durch Auf- und Abpipettieren mit der Mikropipette.

Sammeln Sie alle gebrauchten Pipettenspitzen im dafür vorgesehenen Abfallbeutel.



37 °C

Inkubieren Sie Ihren Restriktionsansatz bei 37 °C für 30 Minuten.



Eis

Danach bewahren Sie Ihre Probe bis zur weiteren Verwendung auf Eis auf bzw. frieren sie ein (-20 °C).

Arbeitsblatt 2



Analyse von DNA

1-B: Vorbereitung des Agarose-Gels

Herstellung des Elektroresepuffers:

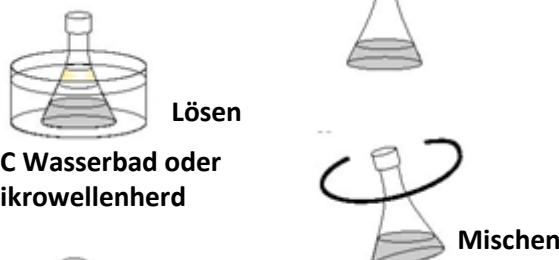
30 ml Elektrophoresepuffer
TBE (10-fach konzentriert) 270 ml destilliertes Wasser



Messen Sie 30 ml des 10-fach konzentrierten TBE-Puffers ab und verdünnen Sie ihn mit 270 ml destilliertem Wasser.

Lösen der Agarose:

30 ml verdünnter TBE-Puffer 300 mg Agarose



Wiegen Sie 300 mg Agarose ab und geben Sie 30 ml des einfach konzentrierten Elektrophoresepuffers hinzu.

Lösen Sie die Agarose durch Kochen in einem Wasserbad oder in einem Mikrowellenherd (**Vorsicht: Sieleverzug!**).

Schwenken Sie das Gefäß mehrmals zum Durchmischen der Lösung.

Kühlen Sie die Lösung auf ca. 50 °C ab.

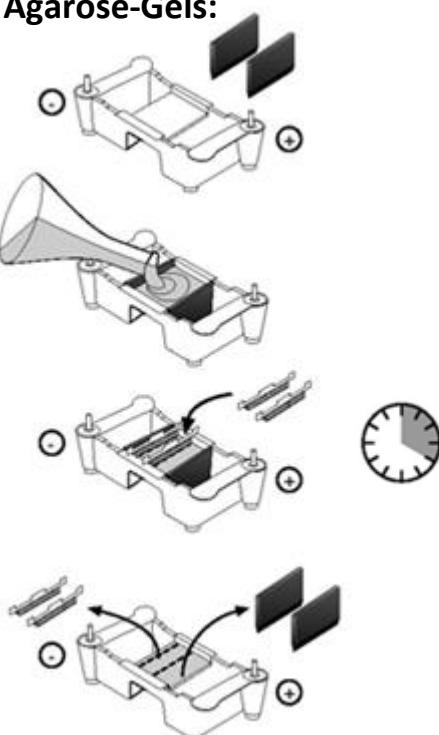
Stellen Sie die Elektrophoresekammer eben auf die Arbeitsfläche. Legen Sie den Gelträger in vorgesehener Richtung in die Kammer, so dass die Kämme später korrekt eingesetzt werden können. Dichten Sie die Enden des Gelträgers durch Einsetzen der Trennkeile ab.

Füllen Sie so viel Agaroselösung auf den Gelträger, dass dieser ca. 7 – 8 mm hoch mit der Lösung bedeckt ist.

Setzen Sie die Probenkämme an den dafür vorgesehenen Stellen ein. Lassen Sie das Agarose-Gel bei Raumtemperatur erstehen (ca. 20 Minuten). Kammer in dieser Zeit nicht bewegen!

Nach dem Erstehen des Gels entfernen Sie die Keile sowie die Kämme vorsichtig.

Das Gel kann in Frischhaltefolie einige Tage im Kühlschrank aufbewahrt werden.



Arbeitsblatt 3



Analyse von DNA

1-B: Vorbereitung der Proben für die Elektrophorese

Beschriften Sie drei Eppendorfgefäße in der angegebenen Weise:

DNA-Marker (1)



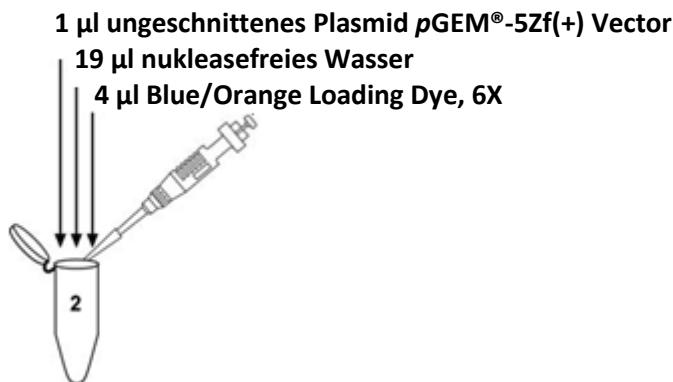
Pipettieren Sie die Reagenzien entsprechend der angegebenen Mengen und Reihenfolge in die vorbereiteten Eppendorfgefäße.

Verwenden Sie für jeden Pipettierschritt eine neue Spitzel!

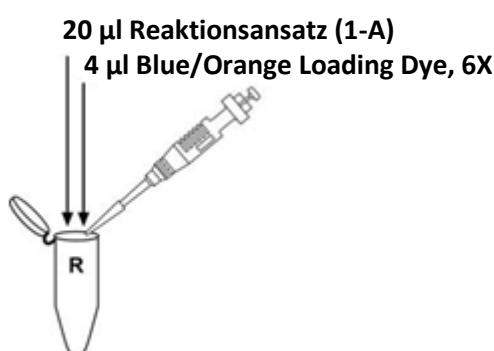
Sammeln Sie alle gebrauchten Pipettenspitzen im dafür vorgesehenen Abfallbeutel!

Achten Sie darauf, dass keine Tröpfchen an der Gefäßwand hängenbleiben, sondern in der Spalte des Eppendorfgefäßes gesammelt werden.

Kontrolle (2)



Ihr Restriktionsansatz (R)



Bewahren Sie alle Proben bis zur weiteren Verwendung auf Eis auf.

Arbeitsblatt 4



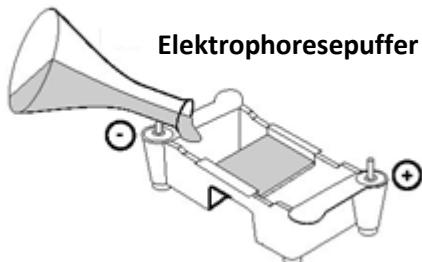
Analyse von DNA

1-B: Elektrophorese

Bevor Sie beginnen:

Legen Sie dunkles Papier unter die Elektrophoresekammer. Dies hilft, die Geltaschen besser zu erkennen.

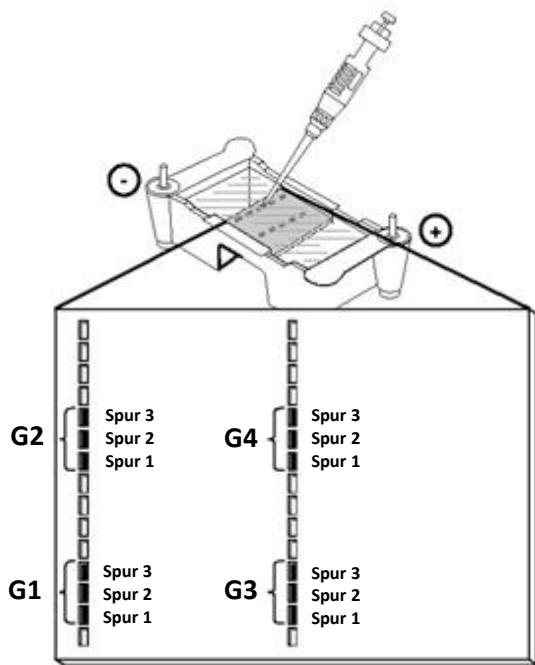
Vorbereitung der Elektrophoresekammer:



Stellen Sie die Elektrophoresekammer so vor sich auf, dass links der negative Pol (schwarz) und rechts der positive Pol (rot) zu finden ist.

Füllen Sie so viel Elektrophoresepuffer in die Gelkammer, dass das Gel ca. 1 mm damit überschichtet ist.

Auftragen der Proben auf das Agarose-Gel:



Das Pipettieren der Proben in die Geltaschen erfolgt, nachdem das Gel mit Puffer überschichtet wurde. Stützen Sie beim Pipettieren der Proben in die Geltaschen Ihre Hand ab. Tragen Sie je 10 µl der Proben in angegebener Reihenfolge auf das Gel auf.

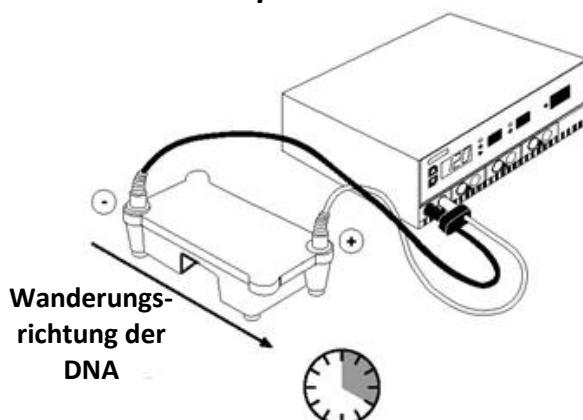
Pipettieren Sie die Probenlösung sehr vorsichtig und langsam aus der Pipettenspitze, um Wirbelbildung zu vermeiden. Die Proben müssen langsam auf den Boden der Geltaschen absinken.

Halten Sie nach dem Auspipettieren den Knopf der Pipette gedrückt, bis Sie die Spitze aus der Geltasche herausgezogen haben. Notieren Sie sich die Positionen Ihrer Proben im Gel.

Pro Gruppe (G):

- Spur 1: 10 µl DNA-Marker (1)
- Spur 2: 10 µl Kontrolle (2)
- Spur 3: 10 µl Restriktionsansatz (R)

Start der Elektrophorese:



Schließen Sie den Deckel der Elektrophoresekammer. Verbinden Sie die Kabel der Elektrophoresekammer mit dem Spannungsgeber. Beachten Sie dabei die Polung!

Schalten Sie den Spannungsgeber ein, und stellen Sie ihn auf 100 V ein.

Die Elektrophorese muss beendet werden, bevor der orangefarbene Farbstoff die zweite Geltaschenreihe erreicht.

Dies sollte mindestens 20 Minuten dauern.

Arbeitsblatt 5



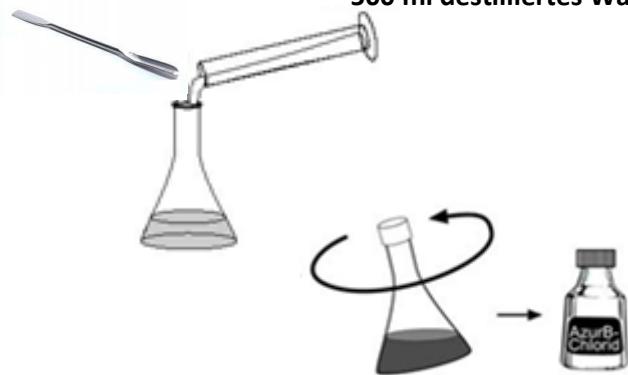
Analyse von DNA

1-B: Färben der DNA im Agarose-Gel

Verdünnen der Färbelösung (AzurB-Chlorid):

100 mg AzurB-Chlorid

500 ml destilliertes Wasser

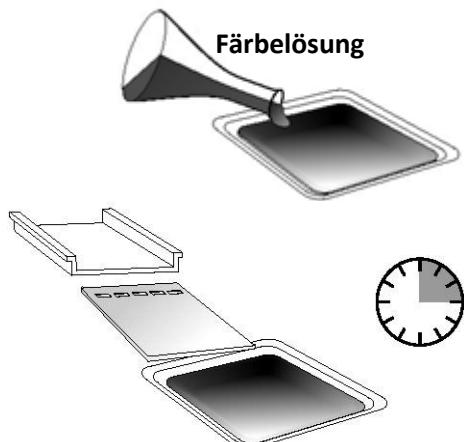


Wiegen Sie 100 mg Azur B-Chlorid in ein Gefäß ab, geben Sie 500 ml destilliertes Wasser dazu und lösen Sie den Farbstoff durch Schwenken des Kolbens.

Überführen Sie den Überstand ohne ungelösten Farbstoff in ein neues Gefäß.

Bewahren Sie die Färbelösung in einer dunklen Flasche bei Raumtemperatur auf. Sie kann mehrfach verwendet werden.

Färben des Agarose-Gels:



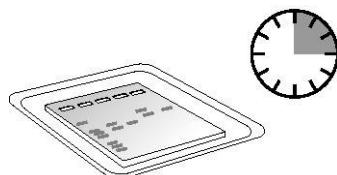
Füllen Sie die Färbelösung in eine Glas- oder Plastikschale.

Lassen Sie das Agarose-Gel vorsichtig in das Färbebad gleiten.

Lassen Sie das Gel 15 Minuten in der Färbelösung.

Schütten Sie dann die Färbelösung in die Flasche zurück.

Entfärben des Agarose-Gels:



Spülen Sie das Gel in der Schale viermal für 5 Minuten mit destilliertem Wasser.

Auf diese Weise ist das Bandenmuster gut erkennbar.

Versuchsauswertung: Arbeitsblatt 6

Arbeitsblatt 6



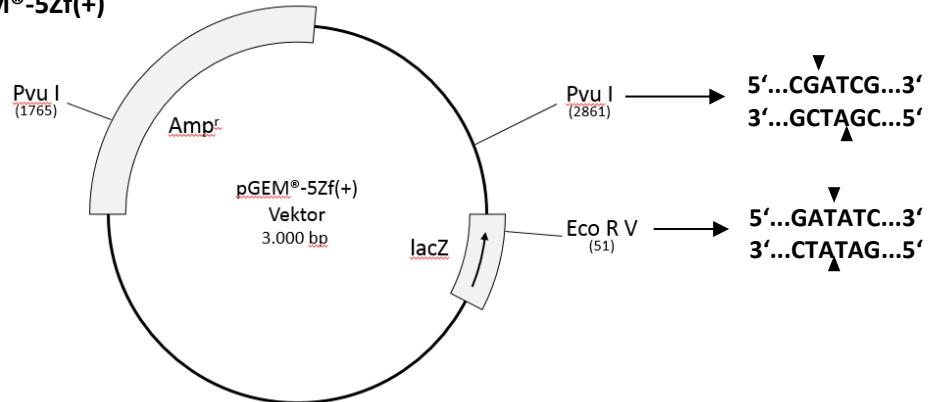
Analyse von DNA

1-A, 1-B: Versuchsauswertung: Schneiden des Plasmids pGEM®-5Zf(+) mit den Restriktionsenzymen *Pvu I* und *Eco R V*

Schematische Karte des Plasmids pGEM®-5Zf(+)

Amp^r: Ampicillinresistenz-Gen

ori: Replikationsursprung



Die zurückgelegte Wanderungsstrecke der DNA-Fragmente im Agarose-Gel ist umgekehrt proportional zum Logarithmus (log) des Molekulargewichts (M) der Fragmente.

Das Molekulargewicht eines bestimmten DNA-Fragments ist proportional zur Anzahl der Basenpaare (bp):

$$\text{Wanderungsstrecke} \sim \frac{1}{\log(M)} \sim \frac{1}{\log(\text{Anzahl der bp})}$$

Ermittlung der DNA-Fragmentgrößen mit Hilfe einer Eichkurve:

DNA-Molekulargewichtsmarker (1kb DNA Ladder)	Fragmentgröße in bp	Log der Fragmentgröße	Wanderungsstrecke in mm
	10.000		
	8.000		
	6.000		
	5.000		
	4.000		
	3.000		
	2.500		
	2.000		
	1.500		
	1.000		
	750		
	500		
Restriktionsansatz mit <i>Pvu I</i> und <i>Eco R V</i>	250, 253		

Messen Sie die Wanderungsstrecke der einzelnen DNA-Fragmente, nachdem Sie das Gel auf den Overhead-Projektor gelegt und das Bandenmuster an die Wand projiziert haben.

Übertragen Sie das entstandene Bandenmuster auf Millimeterpapier. Messen Sie sorgfältig die Wanderungsstrecke eines jeden DNA-Fragments ausgehend vom Startpunkt, d. h. von der Geltasche, ab und tragen Sie die Werte in die Tabelle ein.

Erstellen Sie anhand der vorgegebenen Größen des DNA-Molekulargewichtsmarkers eine Eichkurve auf Millimeterpapier ($x = \text{Wanderungsstrecke in mm}$; $y = \log(\text{Fragmentgröße der DNA in bp})$).

Ermitteln Sie mit Hilfe der Eichkurve die Größe der DNA-Fragmente Ihres Restriktionsansatzes, und tragen Sie die Werte in die Tabelle ein

Fragen:

- Welche Reaktionen katalysieren die Restriktionsenzyme *Pvu I* und *Eco R V*?
- Stimmen Ihre ermittelten Werte mit den oben angegebenen Größen aus der Plasmidkarte überein?
- Warum kann die Größe des ungeschnittenen Plasmids in Ihrem Agarose-Gel nicht bestimmt werden?

Arbeitsblatt 7



Klonierung von DNA

2-A: Schneiden des Plasmids pGEM®-5Zf(+) mit dem Restriktionsenzym Eco R V

Bevor Sie anfangen:

Alle Reagenzien müssen vor Gebrauch vollständig aufgetaut sein und durchmischt werden. Dazu schnippen Sie die Gefäße leicht an. Sollten noch Kristalle in der Lösung sein, so wärmen Sie die Lösung mit den Fingern weiter an und mischen mehrmals durch „Anschnippen“. Anschließend stellen Sie die Reagenzien sofort auf Eis.

Das Restriktionsenzym muss nicht aufgetaut werden, da die Lösung Glycerin enthält. Enzyme und Nukleinsäuren müssen immer auf Eis stehen!

Bevor Sie mit dem Pipettieren beginnen, muss jeweils die gesamte Reagenzienmenge (Enzyme, DNA) in der Spalte des Eppendorfgefäßes gesammelt werden, was durch kurzes Zentrifugieren bzw. Herunterschütteln erreicht werden kann.

Mengen zwischen 20 und 200 µl lassen sich am besten mit einer Mikropipette entsprechenden Formats pipettieren.

Ihr Restriktionsansatz (R):

Beschriften Sie ein Eppendorfgefäß für Ihren Restriktionsansatz.

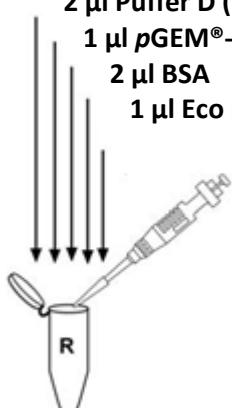
14 µl nukleasefreies Wasser

2 µl Puffer D (10x)

1 µl pGEM®-5Zf(+)

2 µl BSA

1 µl Eco R V



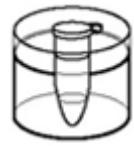
Pipettieren Sie die Reagenzien entsprechend der angegebenen Mengen und Reihenfolge in das vorbereitete Eppendorfgefäß.

Verwenden Sie für jeden Pipettierschritt eine neue Spitze!

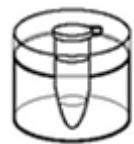
Achten Sie darauf, dass keine Tröpfchen an der Gefäßwand hängenbleiben, sondern in der Spalte des Eppendorfgefäßes gesammelt werden.

Mischen Sie den Restriktionsansatz durch Auf- und Abpipettieren mit der Mikropipette.

Sammeln Sie alle gebrauchten Pipettenspitzen in dem dafür vorgesehenen Abfallbeutel.



Inkubieren Sie Ihren Restriktionsansatz bei 37 °C für 15 Minuten.



Stoppen Sie die Reaktion, indem Sie das Restriktionsenzym durch 5-minütiges Erhitzen bei 65 °C inaktivieren.



Danach bewahren Sie Ihre Probe bis zur weiteren Verwendung auf Eis auf bzw. frieren sie ein (-20 °C).

Vorbereitung des Agarose-Gels für die Elektrophorese, siehe Arbeitsblatt 2

Arbeitsblatt 8

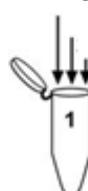


Klonierung von DNA

2-B: Vorbereitung der Proben für die Elektrophorese

Beschriften Sie je Gruppe drei Eppendorfgefäße in der angegebenen Weise:

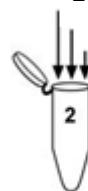
DNA-Marker (1)



5 µl DNA-Marker (1kb DNA Ladder)
5 µl nukleasefreies Wasser
2 µl Blue/Orange Loading Dye, 6X

G
r
u
p
p
e
n
1
u
n
d
2

Kontrolle: ungeschnittene pGEM®-5Zf(+) DNA (2)



1 µl ungeschnittenes pGEM®-5Zf(+) Plasmid
19 µl nukleasefreies Wasser
4 µl Blue/Orange Loading Dye, 6X

Restriktionsansatz (3)



10 µl Restriktionsansatz (2-A)
2 µl Blue/Orange Loading Dye, 6X

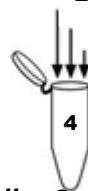
Pipettieren Sie die Reagenzien entsprechend der angegebenen Mengen und Reihenfolge in die vorbereiteten Eppendorfgefäße.

Verwenden Sie für jeden Pipettierschritt eine neue Spitze!

Sammeln Sie alle gebrauchten Pipettenspitzen im dafür vorgesehenen Abfallbeutel!

Achten Sie darauf, dass keine Tröpfchen an der Gefäßwand hängenbleiben, sondern in der Spitze des Eppendorfgefäßes gesammelt werden.

Kontrolle: pGEM®-T Vector (4)



2 µl pGEM®-T Vector
8 µl nukleasefreies Wasser
2 µl Blue/Orange Loading Dye, 6X

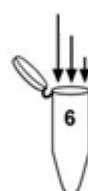
G
r
u
p
p
e
n
3
u
n
d
4

Kontrolle: Control Insert DNA (5)

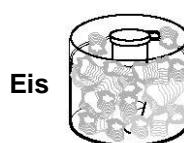


15 µl Control Insert DNA
3 µl Blue/Orange Loading Dye, 6X

DNA-Marker (6)



5 µl DNA-Marker (1kb DNA Ladder)
5 µl nukleasefreies Wasser
2 ml Blue/Orange Loading Dye, 6X



Bewahren Sie alle Proben bis zur weiteren Verwendung auf Eis auf.

Arbeitsblatt 9



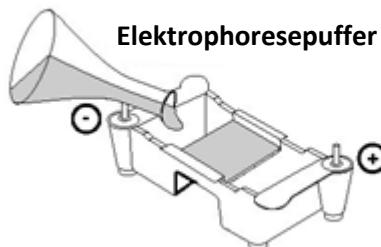
Klonierung von DNA

2-B: Elektrophorese

Bevor Sie beginnen:

Legen Sie dunkles Papier unter die Elektrophoresekammer. Dies hilft, die Geltaschen besser zu erkennen.

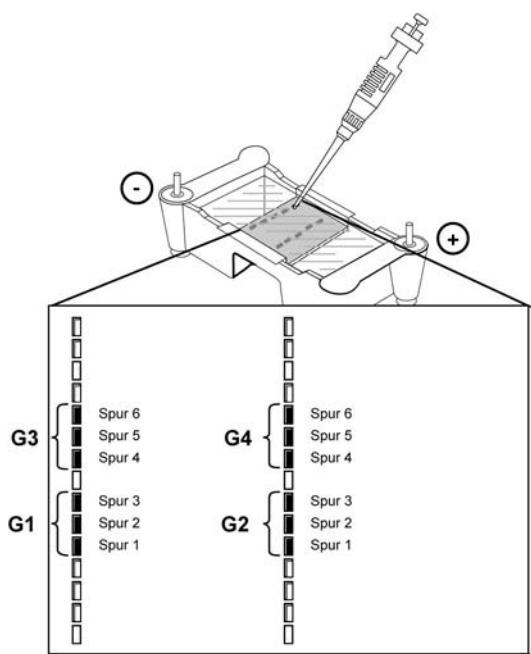
Vorbereitung der Elektrophoresekammer:



Stellen Sie die Elektrophoresekammer so vor sich auf, dass links der negative Pol (schwarz) und rechts der positive Pol (rot) zu finden ist.

Füllen Sie so viel Elektrophoresepuffer in die Gelkammer, bis das Gel ca. 1 mm damit überschichtet ist.

Auftragen der Proben auf das Agarose-Gel:



Das Pipettieren der Proben in die Geltaschen erfolgt, nachdem das Gel mit Puffer überschichtet wurde. Stützen Sie beim Pipettieren der Proben in die Geltaschen Ihre Hand ab. Tragen Sie die angegebenen Mengen der Proben in angegebener Reihenfolge auf das Gel auf.

Pipettieren Sie die Probenlösung sehr vorsichtig und langsam aus der Pipettenspitze, um Wirbelbildung zu vermeiden. Die Proben müssen langsam auf den Boden der Geltaschen absinken.

Halten Sie nach dem Auspipettieren den Knopf der Pipette gedrückt, bis Sie die Spitze aus der Geltasche herausgezogen haben.

Notieren Sie sich die Positionen Ihrer Proben im Gel.

Gruppe 1 und 2:

Spur 1: 12 µl DNA-Marker

Spur 2: 12 µl Kontrolle 2 (ungeschnittenes pGEM®-5Zf(+) Plasmid)

Spur 3: 12 µl Restriktionsansatz pGEM®-5Zf(+) Plasmid mit Eco R V verdaut

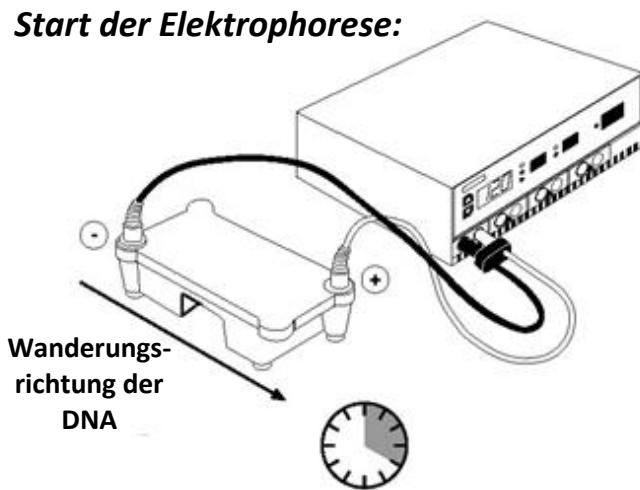
Gruppe 3 und 4:

Spur 4: 12 µl Kontrolle 4 (pGEM®-T Vector)

Spur 5: 18 µl Kontrolle 5 (Control Insert DNA)

Spur 6: 12 µl DNA-Marker

Start der Elektrophorese:



Schließen Sie den Deckel der Elektrophoresekammer. Verbinden Sie die Kabel der Elektrophoresekammer mit dem Spannungsgeber. Beachten Sie dabei die Polung. Schalten Sie den Spannungsgeber ein, und stellen Sie ihn auf 100 V ein. Die Elektrophorese muss beendet werden, bevor der orangefarbene Farbstoff die zweite Gel-taschenreihe erreicht.

Dies sollte mindestens 20 Minuten dauern.



Arbeitsblatt 10

Klonierung von DNA

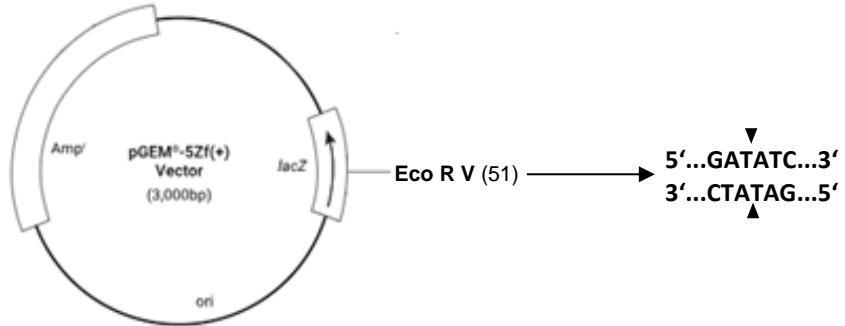
2-A, 2-B: Versuchsauswertung:

Schneiden des Plasmids pGEM®-5Zf(+) mit dem Restriktionsenzym Eco R V

Schematische Karte des Plasmids pGEM®-5Zf(+)

Amp^r: Ampicillinresistenz-Gen

ori: Replikationsursprung



Die zurückgelegte Wanderungsstrecke der DNA-Fragmente im Agarose-Gel ist umgekehrt proportional zum Logarithmus (log) des Molekulargewichts (M) der Fragmente.

Das Molekulargewicht eines bestimmten DNA-Fragmentes ist proportional zur Anzahl der Basenpaare (bp):

$$\text{Wanderungsstrecke} \sim \frac{1}{\log(M)} \sim \frac{1}{\log(\text{Anzahl der bp})}$$

Ermittlung der DNA-Fragmentgrößen mit Hilfe einer Eichkurve:

DNA-Molekulargewichtsmarker
(1kb DNA Ladder)

Restriktionsansatz
mit Eco R V/pGEM®-T
Control Insert DNA

Fragmentgröße in bp	Log der Fragmentgröße	Wanderungsstrecke in mm
10.000		
8.000		
6.000		
5.000		
4.000		
3.000		
2.500		
2.000		
1.500		
1.000		
750		
500		
250, 253		

Messen Sie die Wanderungsstrecke der einzelnen DNA-Fragmente, nachdem Sie das Gel auf den Overhead-Projektor gelegt und das Bandenmuster an die Wand projiziert haben.

Übertragen Sie das entstandene Bandenmuster auf Millimeterpapier. Messen Sie sorgfältig die Wanderungsstrecke eines jeden DNA-Fragmentes ausgehend vom Startpunkt, d. h. von der Geltasche, ab und tragen Sie die Werte in die Tabelle ein.

Erstellen Sie anhand der vorgegebenen Größen des DNA-Molekulargewichtsmarkers eine Eichkurve auf Millimeterpapier ($x = \text{Wanderungsstrecke in mm}$; $y = \log(\text{Fragmentgröße der DNA in bp})$).

Ermitteln Sie mit Hilfe der Eichkurve die Größe der DNA-Fragmente Ihres Restriktionsansatzes und tragen Sie die Werte in die Tabelle ein

Fragen:

- Welche Reaktion katalysiert das Restriktionsenzym Eco R V?
- Stimmen Ihre ermittelten Werte mit der oben angegebenen Größe aus der Plasmidkarte bzw. mit der Größe der Control Insert DNA (542 bp) überein?
- Ist Ihr Restriktionsansatz erfolgreich gewesen? Sind alle Plasmidringe linearisiert?

Arbeitsblatt 11



Klonierung von DNA

2-C: Ligation des pGEM®-T Vectors mit der Control Insert DNA

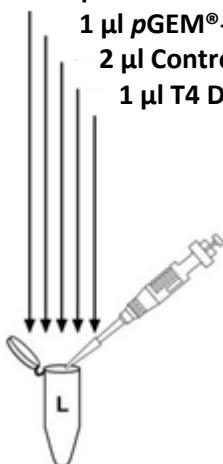
Beim pGEM®-T Vector handelt es sich um das Plasmid pGEM®-5Zf(+), welches analog zum Versuch 2-A mit Eco R V linearisiert und dann an den 3'-Enden mit einer Thymidinbase versehen wurde. Diese sogenannten T-Überhänge dienen der einfachen Klonierung von PCR-Produkten, welche von der Taq-Polymerase am 3'-Ende jeweils um ein Adenin verlängert werden.

Alle Reagenzien sollten schnell und schonend aufgetaut werden (bei Raumtemperatur bzw. mit der Hand angewärmt) und dann sofort wieder ins Eis gestellt werden.

Ihr Ligationsansatz (L):

Beschriften Sie ein Eppendorfgefäß für Ihren Ligationsansatz.

5 µl 2X Rapid Ligation Buffer
1 µl nukleasefreies Wasser
1 µl pGEM®-T Vector
2 µl Control Insert DNA
1 µl T4 DNA Ligase



Pipettieren Sie die Reagenzien entsprechend der angegebenen Mengen und Reihenfolge in das vorbereitete Eppendorfgefäß.

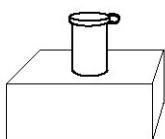
Verwenden Sie für jeden Pipettierschritt eine neue Spitze!

Achten Sie darauf, dass keine Tröpfchen an der Gefäßwand hängenbleiben, sondern in der Spitze des Eppendorfgefäßes gesammelt werden.

Mischen Sie den Ligationsansatz durch Auf- und Abpipettieren mit der Mikropipette.

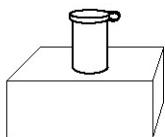
Sammeln Sie alle gebrauchten Pipettenspitzen im dafür vorgesehenen Abfallbeutel.

Ligationsreaktion:



1 Stunde bei Raumtemperatur

Inkubieren Sie Ihren Ligationsansatz 1 Stunde bei Raumtemperatur oder alternativ bei 16 °C über Nacht.



Einfrieren oder sofort weiterverwenden

Nach der Reaktionszeit bewahren Sie Ihre Probe bis zur weiteren Verwendung bei 4 °C auf. Zum längeren Aufbewahren (bis max. 2 Wochen) frieren Sie den Ansatz ein.

Arbeitsblatt 12

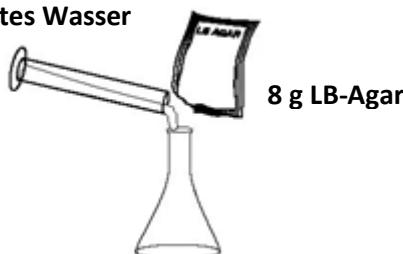


Klonierung von DNA

2-D: Transformation und Selektion

Vorbereitung der Nährböden (Agarplatten)

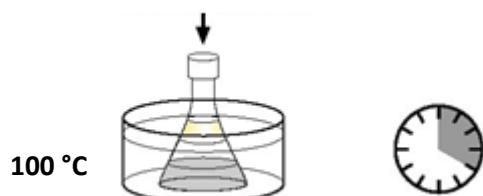
220 ml destilliertes Wasser



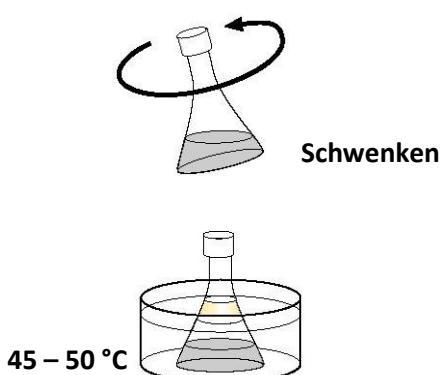
Wiegen Sie 8 g LB-Agar ab und geben Sie diese zusammen mit 220 ml destilliertem Wasser in ein Gefäß, das Sie lose verschließen, z. B. mit einer Kappe aus Alufolie. Wenn auf ein Sterilisieren des Agars im Schnellkochtopf verzichtet wird (siehe unten), sollte steriles destilliertes Wasser (z. B. aus der Apotheke) verwendet werden.

Lösen des LB-Agars:

Alufolie als Verschluss



Aufkochen bzw. Sterilisieren im Schnellkochtopf



Kochen Sie die Agarlösung in einem Wasserbad bzw. in einem Schnellkochtopf, bis sich der Agar gelöst hat. Schnellkochtopf erst nach Abkühlen auf ca. 60 °C öffnen. Siedeverzug!

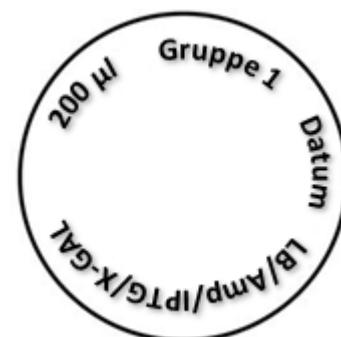
Wird der Agar 20 Minuten im Schnellkochtopf aufgekocht, wird er gleichzeitig sterilisiert, was für den Versuchsablauf von Vorteil (aber nicht zwingend notwendig) ist.

Vorsicht! Schaumbildung.

Schwenken Sie das Gefäß in kurzen Abständen (Topflappen!).

Lassen Sie den Agar auf 50 °C im Wasserbad abkühlen. Achten Sie darauf, dass der Agar nicht unter 45 °C abkühlt, da er sonst vorzeitig erstarrt!

Achten Sie darauf, dass die **sterilen** Petrischalen beim Herausnehmen aus der Packung und beim Beschriften immer **geschlossen** bleiben.



Beispiel:

Beschriften Sie den Boden der Petrischalen nur am äußersten Rand.

1

Gruppe:

Datum:

LB/Amp/IPTG/X-Gal

200 µl

2

Gruppe:

Datum:

LB/Amp/IPTG/X-Gal

100 µl

Für alle Gruppen zusammen werden vier Kontrollplatten nur einmal wie folgt beschriftet:

K1

Datum:

LB

100 µl

E. coli nichttransformiert

K2

Datum:

LB/Amp/IPTG/X-Gal

100 µl

E. coli nichttransformiert

K3

Datum:

LB/Amp/IPTG/X-Gal

100 µl

E. coli mit pGEM®-5Zf(+)

K4

Datum:

LB/Amp/IPTG/X-Gal

100 µl

E. coli mit pGEM®-T Vector

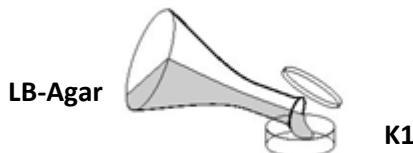
Arbeitsblatt 13



Klonierung von DNA

2-D: Transformation und Selektion Gießen der Agarplatten

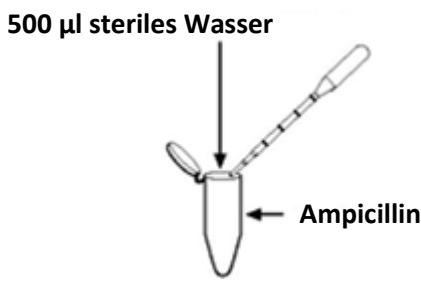
Gießen der LB-Agarplatten:



Zum Gießen von 2 LB-Agarplatten (eine als Reserve) heben Sie den Deckel der Petrischalen nur kurz an. Füllen Sie so viel Agar ein, bis der Boden der Petrischale mit einer 3 – 4 mm hohen Schicht bedeckt ist (ca. 10 ml). Schließen Sie den Deckel danach sofort wieder (Sterilität!). Den restlichen LB-Agar stellen Sie wieder zurück ins 50 °C Wasserbad, damit er flüssig bleibt.

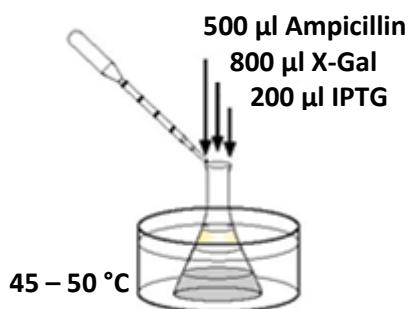
Vorbereiten des LB/Amp/IPTG/X-Gal-Agars:

Lösen des Ampicillins:



Wiegen Sie 20 mg Ampicillin in ein Eppendorfgefäß ab. Pipettieren Sie mit Hilfe einer Einwegpipette 500 µl steriles Wasser dazu. Lösen Sie das Antibiotikum durch „Anschnippen“ vollständig.

Analog lösen Sie 20 mg IPTG in 250 µl Wasser.



Zur Herstellung der LB/Amp/IPTG/X-Gal-Platten pipettieren Sie die Gesamtmenge Ampicillin (500 µl, 40 mg/ml) mit einer Einwegpipette in die Agarlösung, geben Sie 800 µl X-Gal (50 mg/ml) in die Lösung und fügen Sie 200 µl IPTG (80 mg/ml) hinzu.

Mischen Sie den Agar durch Schwenken gründlich. Vermeiden Sie Schaumbildung.

Achtung: Der Agar darf nicht unter 45 °C abkühlen, da er sonst vorzeitig erstarrt. Er kann nicht wieder aufgekocht werden, ohne das Ampicillin zu zerstören.



Gießen der LB/Amp/IPTG/X-Gal-Platten:



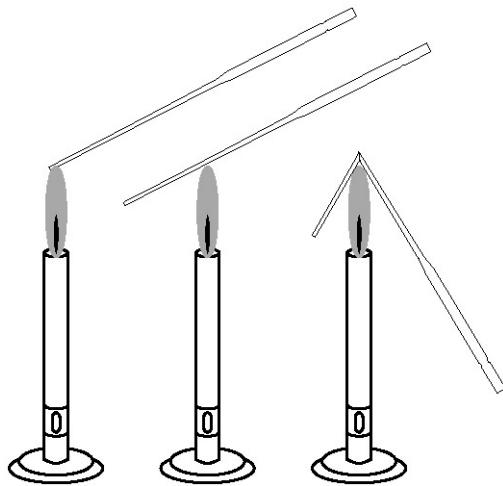
Gießen Sie 11 LB/Amp/IPTG/X-Gal-Platten (plus Reserven) wie zuvor beschrieben. Die Platten sollten nach dem Erstarren des Agars mit dem Deckel nach unten getrocknet und bis zum Ausplattieren der Zellen im Kühlschrank aufbewahrt werden.

Arbeitsblatt 14



Klonierung von DNA

2-D: Transformation und Selektion Herstellung eines Glasspatels



Zum Ausplattieren der Zellen auf dem Agar benötigen Sie einen Glasspatel, den Sie sich aus einer Pasteurpipette herstellen können. Dazu wird die Pasteurpipette über der Sparflamme eines Bunsenbrenners zunächst an der Spitze zugeschmolzen und anschließend wie abgebildet über der Flamme abgeknickt. Sterilisieren Sie den Glasspatel vor jeder neuen Platte, indem Sie ihn kurz in Alkohol tauchen und anschließend am Bunsenbrenner abflammen.

Achtung! Es darf dabei kein Tropfen in das Gefäß mit Alkohol fallen, da dieser sich sonst entzündet.

Arbeitsblatt 15



Klonierung von DNA

2-D: Transformation und Selektion

Transformation der Bakterien mit dem ligierten Plasmid pGEM®-T

Bitte beachten Sie, dass alle Pipettenspitzen, Einwegpipetten und Eppendorfgefäße nach Gebrauch im dafür vorgesehenen Abfallbeutel gesammelt werden.

Auftauen der kompetenten Zellen:

200 µl kompetente
E.coli K12 (JM109)



auf Eis auftauen

Jede Gruppe erhält ein Eppendorfgefäß mit 200 µl kompetenten *E. coli* K12 (JM109) Zellen. Beschriften Sie Ihr Gefäß.

Lassen Sie die Zellen etwa 15 Minuten auf Eis auftauen.

Ansetzen der Transformation:

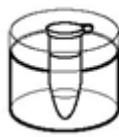
4 µl des Ligationsansatzes (2-C)

200 µl kompetente
E.coli K12 (JM109)



Eis

Pipettieren Sie 4 µl des Ligationsansatzes (2-C) zu den kompetenten *E. coli* K12 (JM109) Zellen. Nach dem Pipettieren schließen Sie das Gefäß und schnippen es zum Durchmischen kurz an. Inkubieren Sie Ihren Transformationsansatz 15 Minuten auf Eis.



37 °C

Stellen Sie den Transformationsansatz für **exakt** 50 Sekunden in ein 37 °C Wasserbad.



Eis

Stellen Sie den Transformationsansatz anschließend **sofort** wieder für 2 Minuten auf Eis.

800 µl LB-Medium



Geben Sie 800 µl LB-Medium mit einer Einwegpipette zu Ihrem Transformationsansatz.

Schnippen Sie zum Mischen das Gefäß kurz an.



37 °C Wasserbad

Inkubieren Sie den Ansatz erneut für ca. 1 Stunde in einem 37 °C Wasserbad, so dass sich die Zellen erholen können.

Hinweis: Verkürzung der Inkubationszeit auf 20 Minuten halbiert in etwa die Anzahl der Kolonien, die später auf der Platte wachsen.

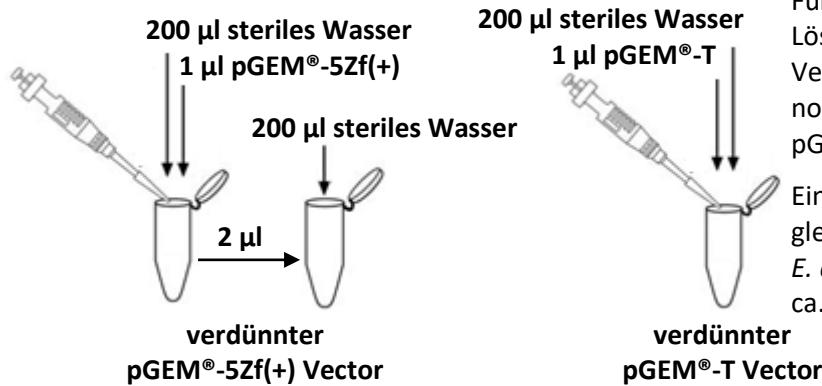
Arbeitsblatt 16



Klonierung von DNA

2-D: Transformation und Selektion Transformations-Kontrollansätze

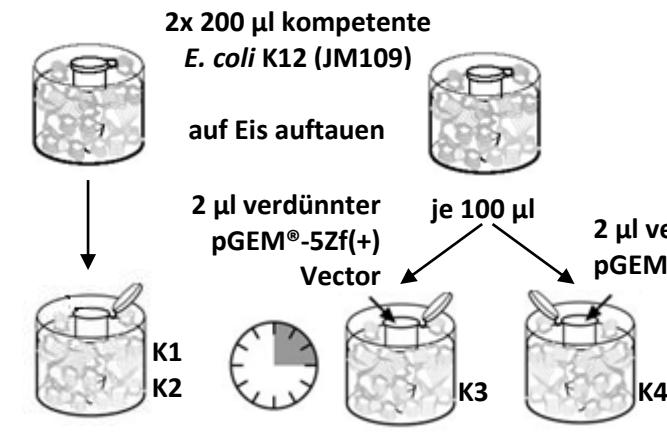
Verdünnen der Vektorlösungen:



Für die Transformationskontrollen müssen die Vektor-Lösungen zuerst verdünnt werden. 1 μl pGEM®-5Zf(+) Vector mit steriles Wasser auf 200 μl auffüllen, dann nochmals 1:100 verdünnen (ergibt 50 pg/μl). 1 μl pGEM®-T Vector 1:200 verdünnen.

Eine weitere Gruppe bzw. die Lehrkraft lässt gleichzeitig zwei Gefäße mit 200 μl kompetenten *E. coli* K12 (JM109) für die Kontrollen K1 bis K4 ca. 15 Minuten auf Eis auftauen.

Transformations-Kontrollansätze



Teilen Sie ein Röhrchen der aufgetauten kompetenten *E. coli* K12 (JM109) Zellen auf zwei Eppendorfgefäß à 100 μl auf (vorher anschnippen!).

Das Gefäß mit 200 μl *E. coli* K12 (JM109) durchläuft den Transformationsversuch, ohne dass die Zellen mit einem Plasmid transformiert werden (K1, K2).

In die beiden Röhrchen mit 100 μl Zellen pipettieren Sie 2 μl verdünnten pGEM®-5Zf(+) Vector (K3) bzw. 2 μl verdünnten pGEM®-T Vector (K4).

Mischen Sie durch Anschnippen. Inkubieren Sie alle Ansätze 15 Minuten auf Eis.

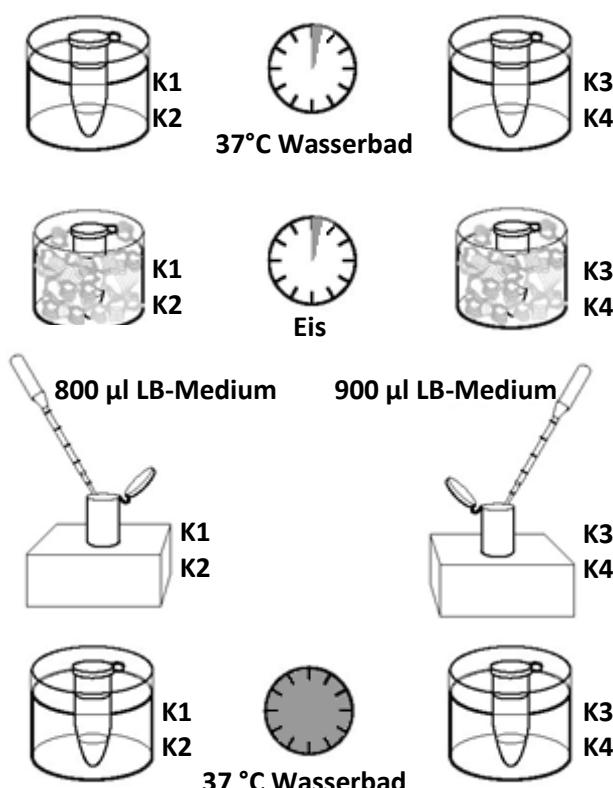
Transferieren Sie die Ansätze für **exakt** 50 Sekunden in ein 37 °C Wasserbad.

Stellen Sie die Röhrchen anschließend sofort wieder für 2 Minuten auf Eis.

Geben Sie LB-Medium mit einer Einwegpipette zu Ihren Ansätzen, 800 μl zu K1, K2, je 900 μl zu K3 und K4.

Schnippen Sie zum Mischen die Gefäße kurz an.

Inkubieren Sie die Ansätze erneut für ca. 1 Stunde in einem 37 °C Wasserbad, so dass sich die Zellen erholen können.



Arbeitsblatt 17

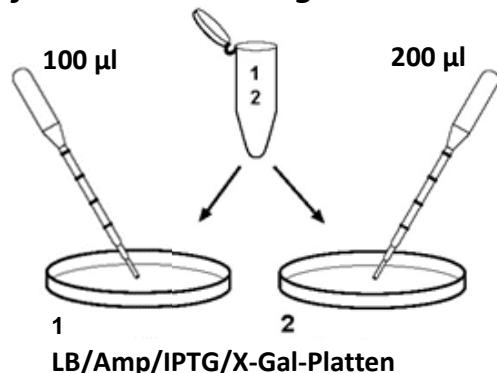


Klonierung von DNA

2-D: Transformation und Selektion

Ausplattieren der Bakterien

Ausplattieren der *E. coli* K12 (JM109) transformiert mit den ligierten Plasmiden:

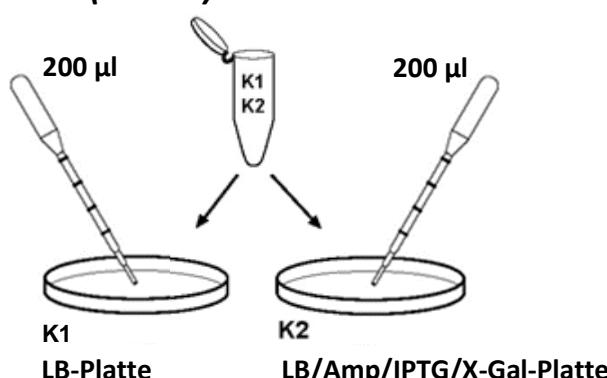


Jede Gruppe gibt auf die dafür vorbereitete Selektionsplatte 1 (LB/Amp/IPTG/X-Gal) mit der Einwegpipette* 100 µl und auf die Selektionsplatte 2 (LB/Amp/IPTG/X-Gal) 200 µl des eigenen Transformationsansatzes, der zuvor gut durchmischt wurde (Bakterien setzen sich schnell ab).

Verteilen Sie die Bakteriensuspension gleichmäßig auf den Platten mit Hilfe eines Glasspatels, indem Sie mit einer Hand den Glasspatel leicht auf der Agaroberfläche hin und her bewegen.

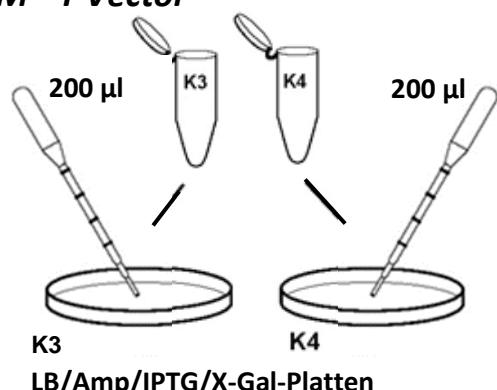
Vor Gebrauch muss der Glasspatel jeweils sterilisiert und abgekühlt werden. Siehe Arbeitsblatt 14!

Ausplattieren der nichttransformierten *E. coli* K12 (JM109):



Bringen Sie aus dem Kontrollansatz K1/K2 mit der Einwegpipette* jeweils 200 µl auf die Kontrollplatte K1 (LB-Agar) und auf die Selektionsplatte K2 (LB/Amp/IPTG/X-Gal) und plattieren Sie wie zuvor beschrieben die Zellen aus.

Ausplattieren der *E. coli* K12 (JM109) transformiert mit pGEM®-5Zf(+) bzw. pGEM®-T Vector



Geben Sie 200 µl des Kontrollansatzes K3 auf die Selektionsplatte K3 sowie die gleiche Menge des Kontrollansatzes K4 auf die Selektionsplatte K4 und plattieren Sie wie bereits beschrieben aus.

Nach dem Ausplattieren der Zellen lassen Sie die Platten ca. 15 Minuten mit geschlossenem Deckel trocknen.



Lassen Sie die Bakterien über Nacht bei 37 °C wachsen. Inkubieren Sie die Platten mit dem Boden nach oben, so dass kein Kondenswasser auf die Agaroberfläche tropfen kann.

*hier kann besser die 20 – 200 µl Pipette verwendet werden

Arbeitsblatt 18



Klonierung von DNA

2-E: Versuchsauswertung von Transformation und Klonierung

Sind Bakterienklone auf Ihren Platten gewachsen? Tragen Sie Ihre Ergebnisse in die Tabelle ein. Zum Abschätzen der Kolonienzahl unterteilen Sie die Platte in 4 Felder, zählen Sie die Kolonien eines Feldes aus, und rechnen Sie sie hoch. Auf Wunsch zählt die Promega Colony Counter App (Google oder AppStore) noch mal für Sie nach (<https://www.promega.de/resources/mobile-apps/>).

	LB-Agarplatten		LB/Amp/IPTG/X-Gal-Agarplatten	
	Wachstum +/-	Kolonienzahl weiß	Wachstum +/-	Kolonienzahl weiß / blau
<i>E. coli</i> K12 (JM109) transformiert mit ligeriertem pGEM®-T Vector mit Control Insert aus dem Ligationsansatz			1 (200 µl)	
<i>E. coli</i> K12 (JM109) nichttransformiert Kontrolle K1 + K2	K1 (200 µl)		K2 (200 µl)	
<i>E. coli</i> K12 (JM109) transformiert mit pGEM®-5Zf(+)			K3 (200 µl)	
<i>E. coli</i> K12 (JM109) transformiert mit pGEM®-T Vector			K4 (200 µl)	

Fragen:

1. Welche DNA-Erkennungssequenzen sind für Restriktionsenzyme charakteristisch?
2. Was verstehen Sie unter überhängenden Enden? Wozu dienen diese in der Gentechnik?
3. Welche Reaktion findet bei der Ligation statt?
4. Wozu dient das Ampicillin in den Agarplatten?
5. Welche Funktion hat der Agar?
6. Wozu dienen IPTG und X-Gal?
7. Was bedeutet transformationskompetent?
8. Können Sie die phäno- bzw. die genotypischen Änderungen beschreiben, die die Bakterien durch das Transformationsexperiment erfahren haben:
solche, die a) einem weißen und b) einem blauen Klon entstammen?
9. Welche Anforderungen hinsichtlich des Genotyps werden an einen Sicherheitsstamm wie z. B. *E. coli* K12 gestellt?
10. Welche Merkmale hat ein Sicherheitsplasmid wie z. B. das hier verwendete pGEM®-5Zf(+)?
11. Wie schützen sich Bakterien davor, ihre eigene DNA enzymatisch zu zerschneiden?
12. Was bedeutet 5'- bzw. 3'-Ende eines DNA-Stranges?
13. Nach längerer Inkubation bei 37 °C wachsen aus den blauen Kolonien auf der Platte weiße Bakterienkolonien an den Rändern nach. Finden Sie eine Erklärung.

Arbeitsblatt 19



Tipps zum sicheren Arbeiten mit „Blue Genes“

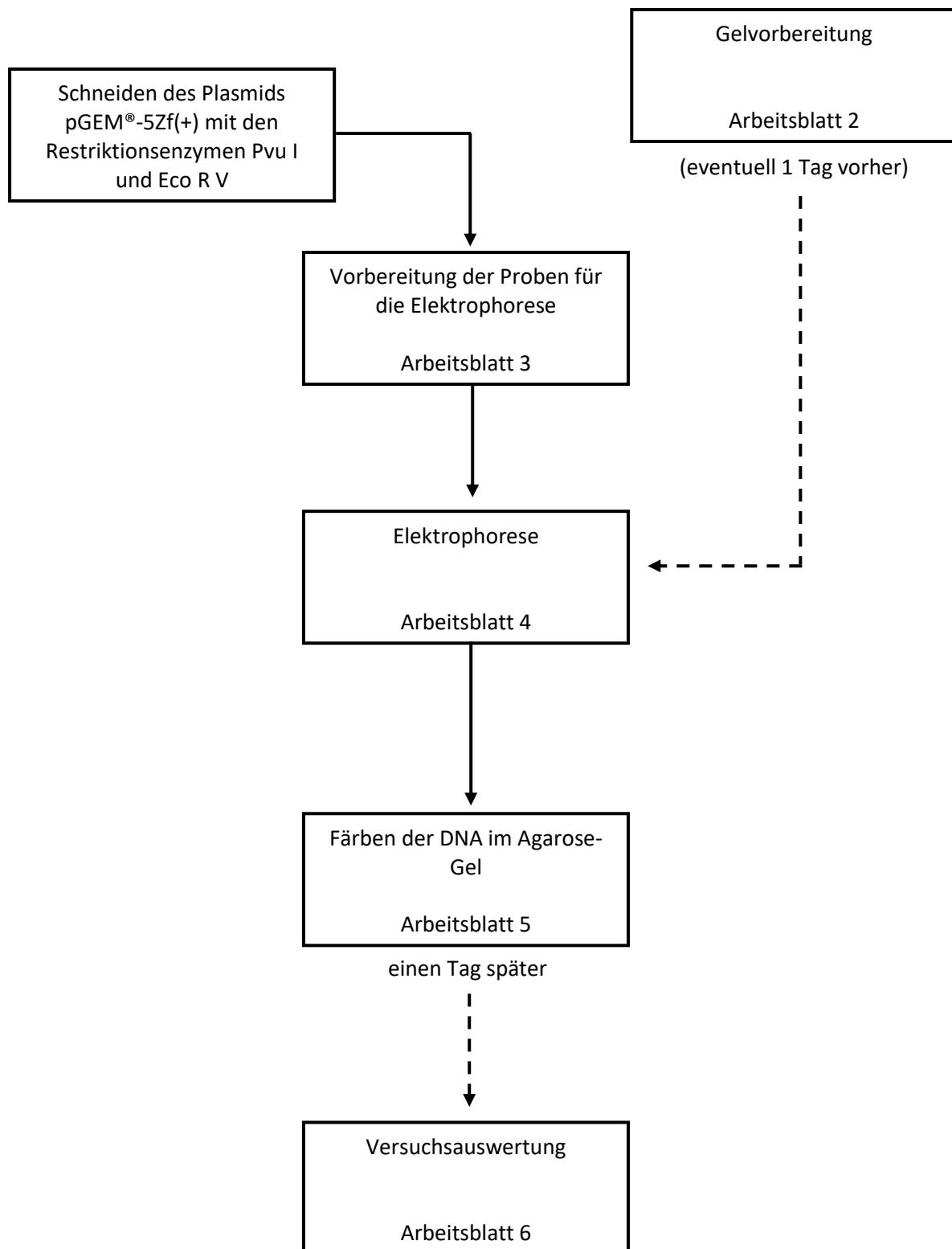
- Bei allen Arbeiten sind stets die üblichen in einem Labor geltenden Sicherheitsvorschriften zu beachten!
- Bei allen Versuchen sollten Einmal-Latex-Untersuchungshandschuhe getragen werden.
- Sollten eventuell Bakterien verschüttet werden, sind diese mit einem Tuch zu entfernen, welches vorher mit einem geeigneten Desinfektionsmittel benetzt wurde.
- Direkt nach dem Versuch sollten alle verwendeten Materialien, wie z.B. Pipettenspitzen, Reaktionsgefäße, mit Bakterien beimpfte Agarplatten, in die dafür vorgesehenen Plastik-beutel gegeben werden, bevor dieses Material über den normalen Hausmüll entsorgt wird.
- Ampicillin und IPTG sollten unter einem Abzug resuspendiert werden, so dass keine Stäube eingeatmet werden können.

Arbeitsblatt 20



Übersicht

Analyse von DNA



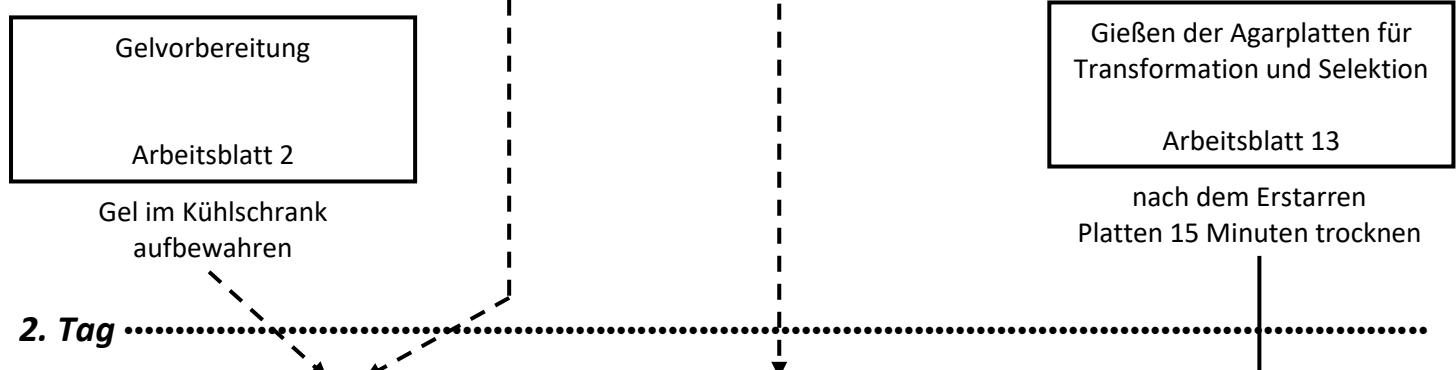
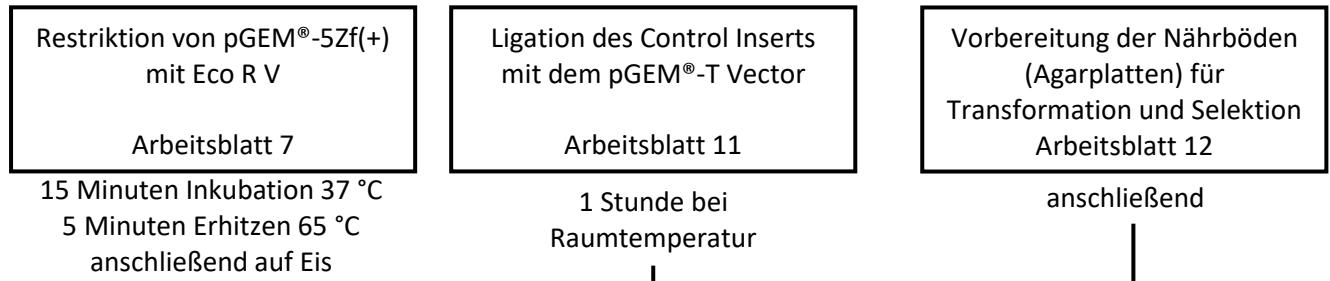
Arbeitsblatt 21



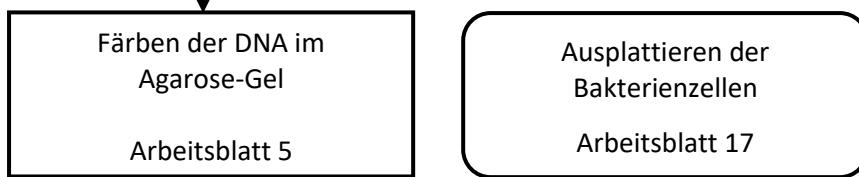
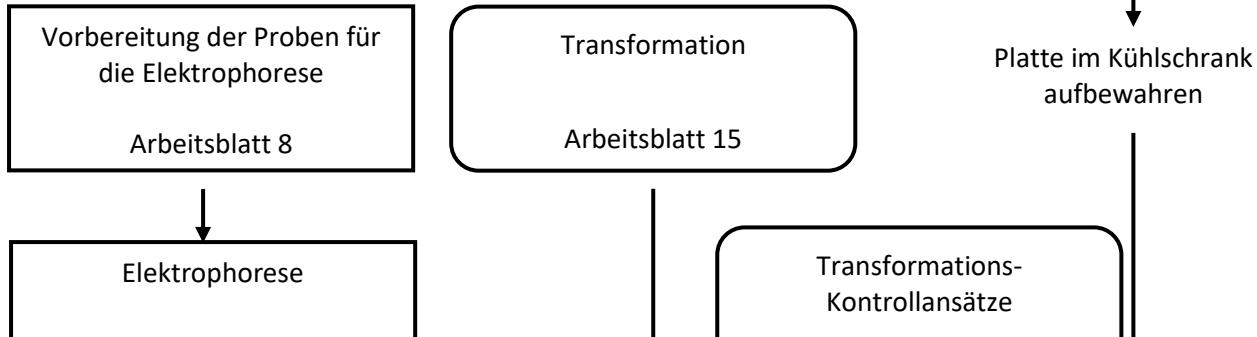
Klonierung von DNA

Übersicht

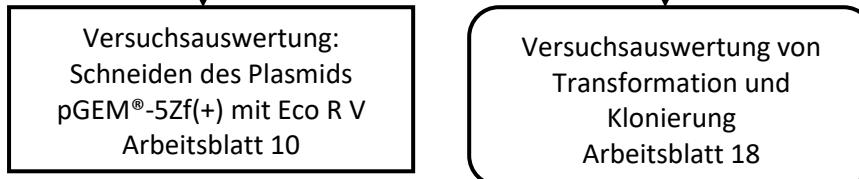
1. Tag.....



2. Tag



3. Tag.....



“... was ist, wenn ...”



... bei der Elektrophorese nach dem Anlegen der Spannung der Farbstoff nicht sichtbar wandert?

Wurde das Netzgerät nach dem Einstellen der Spannung auf „Run“ gestellt?

Wurde das Gel mit verdünntem TBE-Puffer gegossen?

... nach dem Färben des Gels in einzelnen Spuren keine Banden sichtbar werden?

Wurde genug DNA aus den Restriktionsansätzen, aus dem Längenstandard usw. in die Taschen pipettiert?

Wurde das Gel mit der Pipettenspitze durchstochen? Dann kann es nämlich passieren, dass die DNA Lösung nach unten wegfließt.

... beim Klonierungsexperiment nur auf der Kontrollplatte (K1) ein Bakterienrasen bzw. auf K3 blaue Kolonien festzustellen sind?

Die Ligation ist misslungen. Grund kann z.B. sein, dass der Puffer für diese Reaktion zu lange bei Raumtemperatur stand (er enthält ATP!). Mehrmaliges Auftauen und Einfrieren schadet dem Puffer auch!

Die Kompetenz der *E. coli* K12 (JM109) Zellen war nicht ausreichend. Grund dafür kann die nicht angemessene Lagerung der Zellen während des Transportes bzw. während des Versuchs sein. Anhand der Anzahl der Kolonien auf der Platte lässt sich die Kompetenz der Zellen ausrechnen (T-Überhang-Klonierungen erfordern mindestens eine Transformationseffizienz von 10^8 cfu/ μ g DNA):

Transformationseffizienz (cfu/ng) =

$$\frac{\text{cfu (Kolonienzahl) auf der Kontrollplatte}}{\text{ng ausplattierter Vektor (supercoiled)}} \cdot 10^3 \text{ ng}/\mu\text{g} \cdot \text{finaler Verdünnungsfaktor}$$

Beispiel:

Ein 100 μ l Aliquot kompetenter Zellen wird mit 1 ng supercoiled pGEM®-3Z Vektor DNA transformiert. 10 μ l der Transformationsreaktion (0,1 ng Gesamt-DNA) werden zu 990 μ l SOC-Medium gegeben (1:100 Verdünnung). Von diesem Volumen (1000 μ l) werden 100 μ l ausplattiert (1:1000 finale Verdünnung), wobei 100 Kolonien auf der Platte wachsen. Wie viel beträgt die Transformationseffizienz?

$$\text{Transformationseffizienz (cfu/ng)} = \frac{100 \text{ cfu}}{0,1 \text{ ng}} \cdot 10^3 \text{ ng}/\mu\text{g} \cdot 1000 = 1 \cdot 10^9 \text{ cfu/ng}$$