

## Analyse von DNA

### 1-A: Schneiden des Plasmids *pUCD-lacZ* mit dem Restriktionsenzym *Ban II*

#### 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.

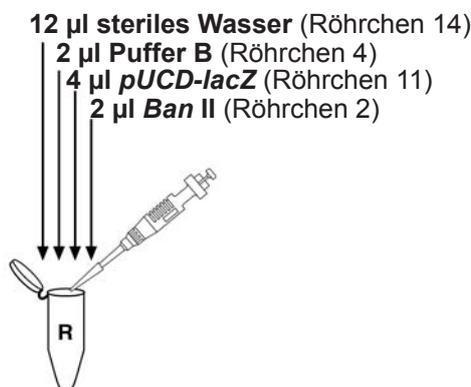
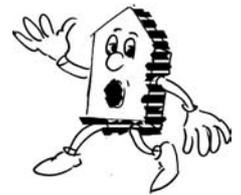
Das Restriktionsenzym muss nicht aufgetaut werden, da die Lösung Glycerin enthält.

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.



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

**Verwenden Sie für jeden Pipettierschritt eine neue Spitze!**

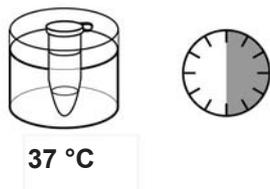
**Achten Sie darauf, dass keine Tröpfchen an der Gefäßwand hängen bleiben, sondern in der Spitze des Eppendorfgefäßes gesammelt werden.**

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 30 Minuten.

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



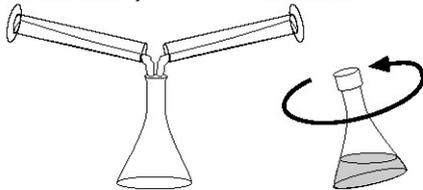
## Analyse von DNA

### 1-B: Vorbereitung des Agarose-Gels

#### Herstellung des Elektrophoresepuffers:

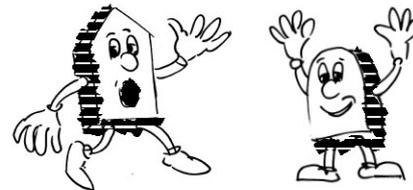
30 ml Elektrophoresepuffer TBE (10fach konzentriert)    270 ml destilliertes Wasser

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

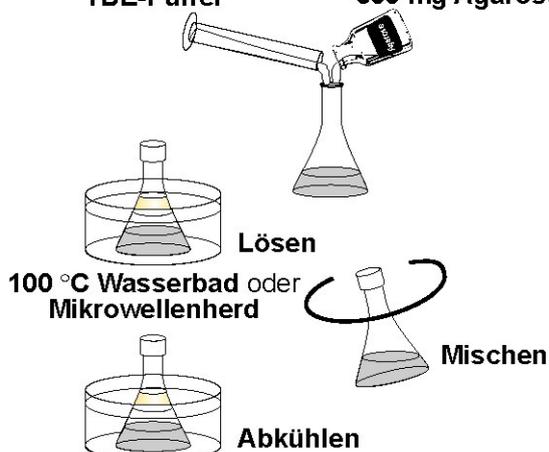


#### Lösen der Agarose:

30 ml verdünnter TBE-Puffer    300 mg Agarose



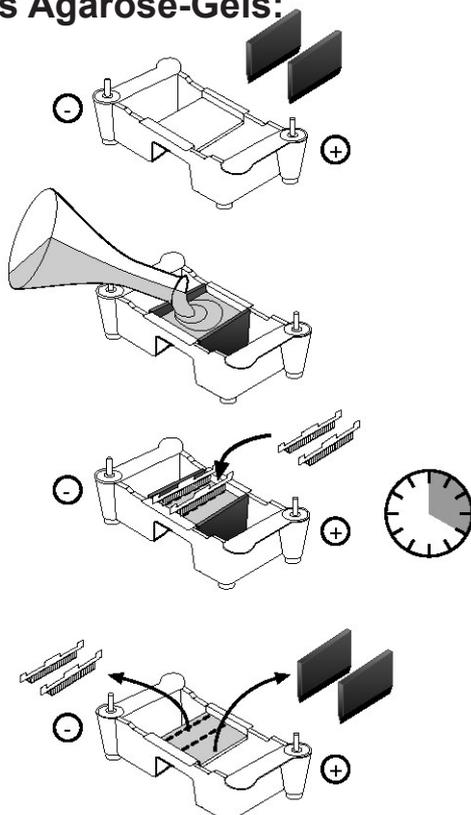
Wiegen Sie 300 mg Agarose ab, und geben Sie 30 ml des einfach konzentrierten Elektrophoresepuffers hinzu.



Lösen Sie die Agarose durch Kochen in einem Wasserbad oder in einem Mikrowellenherd (**Vorsicht: Siedeverzug**). Schwenken Sie das Gefäß mehrmals zum Durchmischen der Lösung.

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

#### Gießen des Agarose-Gels:



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 erstarren (ca. 20 Minuten). Kammer in dieser Zeit nicht bewegen!

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

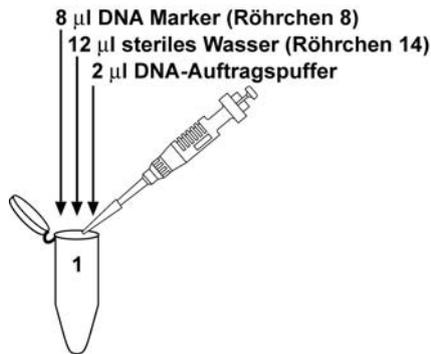
Das Gel kann in Frischhaltefolie einige Tage im Kühlschrank aufbewahrt werden.

## Analyse von DNA

### 1-B: Vorbereitung der Proben für die Elektrophorese

**Beschriften Sie drei Eppendorfgefäße in der angegebenen Weise:**

#### DNA Marker (1)



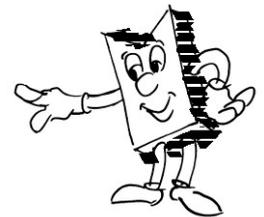
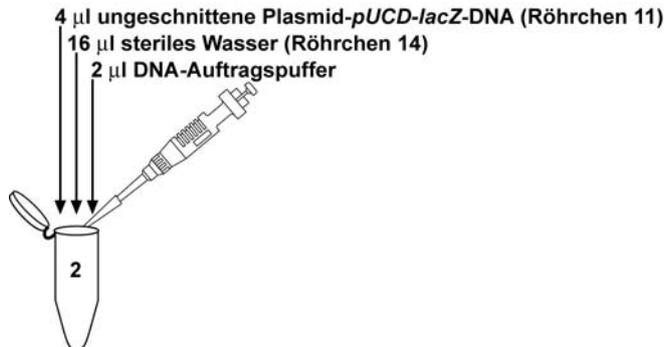
Pipettieren Sie die Reagenzien entsprechend der angegebenen Mengen und Reihenfolge in die vorbereiteten Eppendorfgefäße.

**Verwenden Sie für jeden Pipettierschritt eine neue Spitze!**

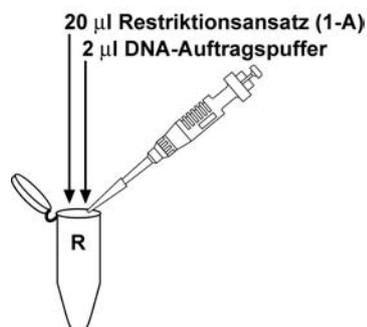
Sammeln Sie alle gebrauchten Pipettenspitzen in dem dafür vorgesehenen Abfallbeutel!

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

#### Kontrolle (2)



#### Ihr Restriktionsansatz (R)



Eis

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

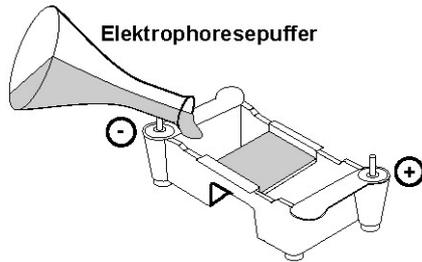
## Analyse von DNA

### 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.

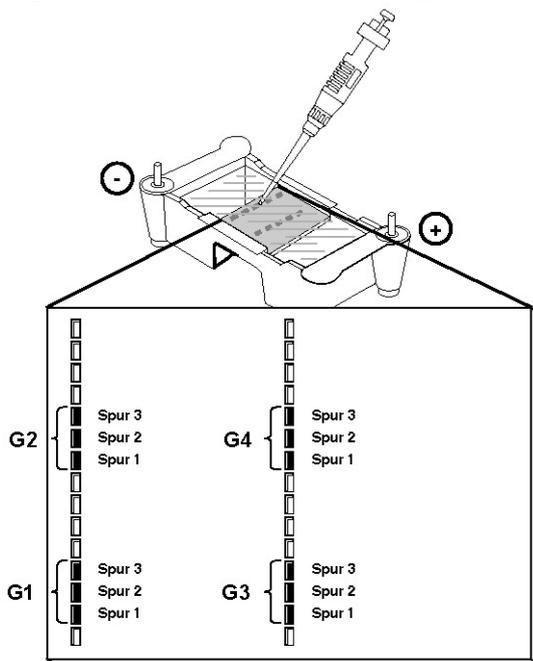
Füllen Sie so viel Elektrophoresepuffer in die Gelkammer, dass das Gel ca. 1 mm damit überschichtet ist.

#### 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.

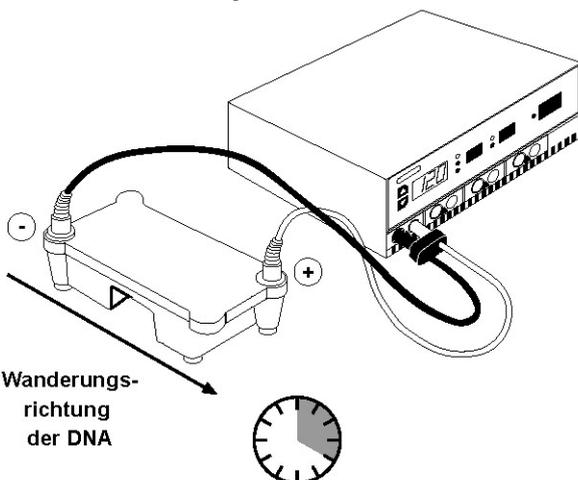
Pro Gruppe (G):

Spur 1: 10 µl DNA-Marker (1)

Spur 2: 10 µl Kontrolle (2)

Spur 3: 10 µl Restriktionsansatz *Ban II* (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.

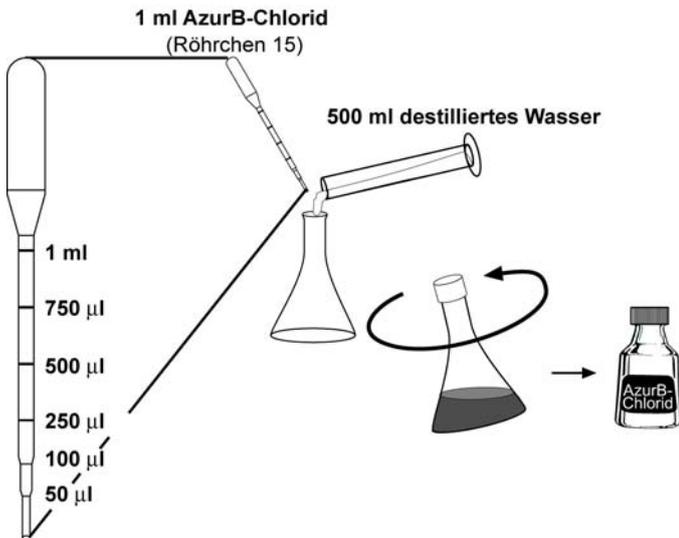
Die Elektrophorese muss beendet werden, bevor der blaue Farbstoff die zweite Geltaschenreihe erreicht.

Dauer der Elektrophorese mindestens 20, aber besser 30 Minuten.

## Analyse von DNA

### 1-B: Färben der DNA im Agarose-Gel

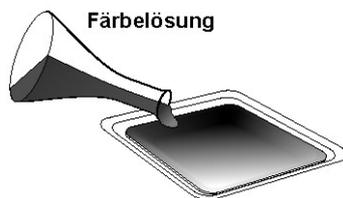
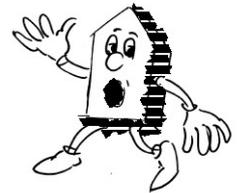
#### Verdünnen der Färbelösung (AzurB-Chlorid):



Füllen Sie 500 ml destilliertes Wasser in ein Gefäß, und geben Sie mit einer Einmalpipette 1 ml AzurB-Chlorid hinzu (gesamter Inhalt des Röhrchens 15). Mischen Sie die Lösung.

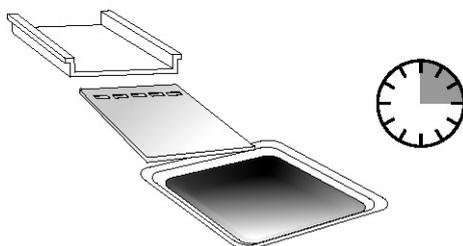
Bewahren Sie die Färbelösung in einer dunklen Flasche bei Raumtemperatur auf. Sie kann mehrfach verwendet werden.

#### Färben des Agarose-Gels:



Färbelösung

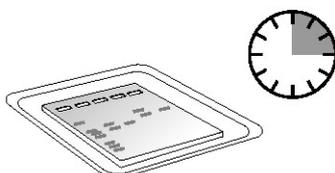
Füllen Sie die Färbelösung in eine Glas- oder Plastikschaale.



Lassen Sie das Agarose-Gel vorsichtig in das Färbepad 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 mehrmals mit destilliertem Wasser.

Entfärben Sie das Gel in destilliertem Wasser; bereits nach 10 Minuten ist das Bandenmuster gut erkennbar.

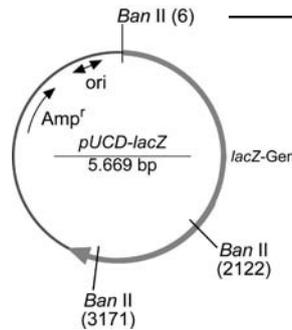
#### Versuchsauswertung: Arbeitsblatt 6

## Analyse von DNA

### 1-A, 1-B: Versuchsauswertung: Schneiden des Plasmids *pUCD-lacZ* mit dem Restriktionsenzym *Ban II*

Schematische Karte des Plasmids *pUCD-lacZ*

*Amp<sup>r</sup>*: Ampicillinresistenz-Gen  
ori: Replikationsursprung



\* Y = C oder T; R = G oder A

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

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

$$\text{Wanderungsstrecke} \approx \frac{1}{\log M} \approx \frac{1}{\log \text{Anzahl der bp}}$$

### Ermittlung der DNA-Fragmentgrößen mit Hilfe einer Eichkurve:

	Fragmentgröße in bp	log der Fragmentgröße	Wanderungsstrecke in mm
DNA-Molekulargewichtsmarker III	21.226		
	5.148		
	4.973		
	4.268		
	3.530		
	2.027		
	1.904		
	1.584		
	1.375		
	947		
	831		
564			
Restriktionsansatz mit <i>Ban II</i>			

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 III eine Eichkurve auf Millimeterpapier ( $x$  = Wanderungsstrecke in mm;  $y$  = log Fragmentgröße der DNA in Basenpaaren).

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

### Fragen:

1. Welche Reaktion katalysiert das Restriktionsenzym *Ban II*?
2. Stimmen Ihre ermittelten Werte mit den oben angegebenen Größen aus der Plasmidkarte überein?
3. Warum kann die Größe des ungeschnittenen Plasmids in Ihrem Agarose-Gel nicht bestimmt werden?

## Klonierung von DNA

### 2-A: Schneiden des Plasmids *pUCD* mit den Restriktionsenzymen *Bam* H I und *Hin* d III

#### 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.

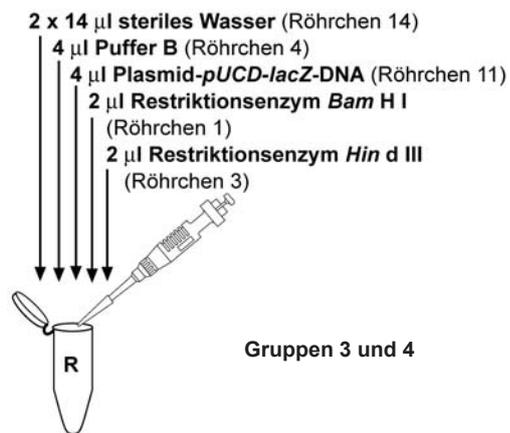
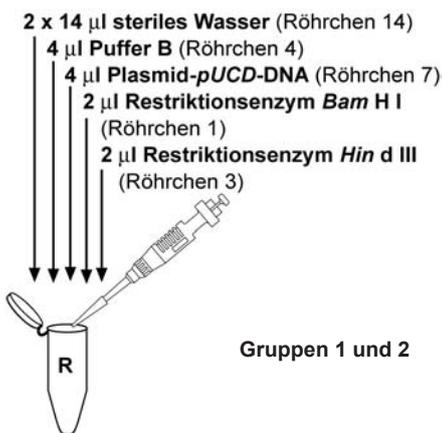
Das Restriktionsenzym muss nicht aufgetaut werden, da die Lösung Glycerin enthält.

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):

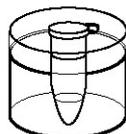
Beschriften Sie ein Eppendorfgefäß für Ihren Restriktionsansatz.



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 hängen bleiben, sondern in der Spitze des Eppendorfgefäßes gesammelt werden.**



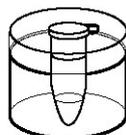
37 °C



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

Sammeln Sie alle gebrauchten Pipettenspitzen in dem dafür vorgesehenen Abfallbeutel.

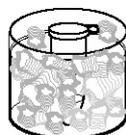
Inkubieren Sie Ihren Restriktionsansatz bei 37 °C für mindestens 45, besser 60, Minuten.



65 °C



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



Eis

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**

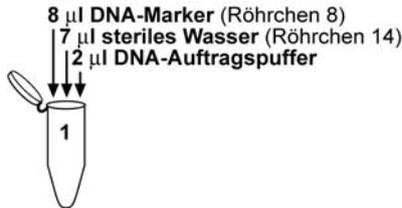
## Klonierung von DNA

### 2-B: Vorbereitung der Proben für die Elektrophorese

Beschriften Sie fünf Eppendorfgefäße in der angegebenen Weise:

Gruppen 1 und 2

#### DNA-Marker (1)



#### Kontrolle: ungeschnittene pUCD-DNA (2)



#### Restriktionsansatz (3)



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 in dem dafür vorgesehenen Abfallbeutel!

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

**Achtung!** Der Rest des Restriktionsansatzes aus Versuch 2-A wird für die Ligation benötigt. Auf Eis aufbewahren oder einfrieren!

Gruppen 3 und 4

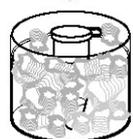
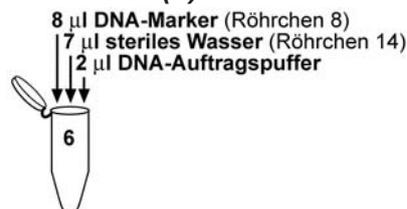
#### Kontrolle: ungeschnittenes pUCD-lacZ (4)



#### Kontrolle: lacZ-Genfragment (5)



#### DNA-Marker (6)

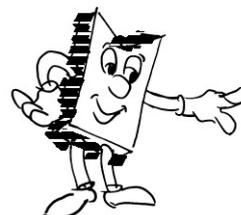


Eis



Das restliche pUCD-lacZ sollte aufbewahrt werden für eine eventuelle Rettung des Versuchs (siehe „Was ist, wenn ...“).

**Es muss genügend lacZ-Gen für die spätere Ligation aufbewahrt werden!**



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

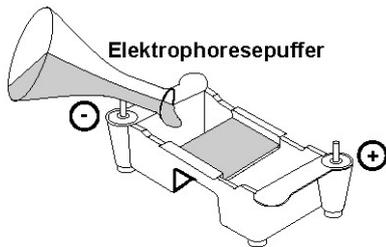
## Klonierung von DNA

### 2-B: Elektrophorese

#### Bevor Sie beginnen:

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

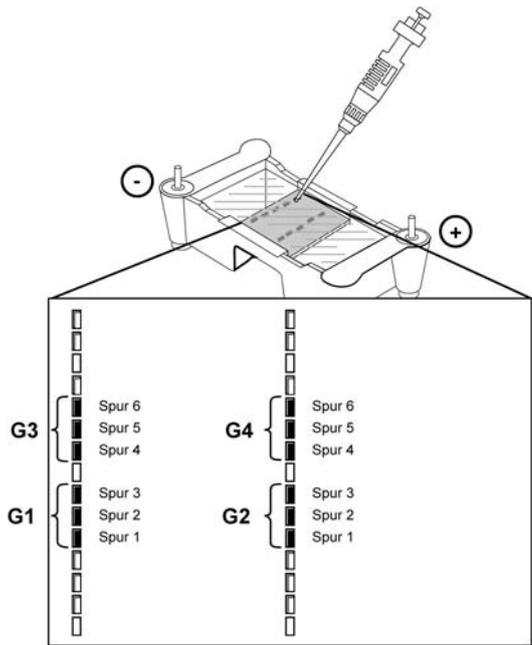
#### Vorbereitung der Elektrophoresekammer:



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 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.

Gruppe 1 und 2:

Spur 1: 10 µl DNA-Marker III

Spur 2: 10 µl Kontrolle 2 (ungeschnittene *pUCD*-DNA)

Spur 3: 10 µl Restriktionsansatz *pUCD* mit *Bam* H I und *Hin* d III (R) verdaut

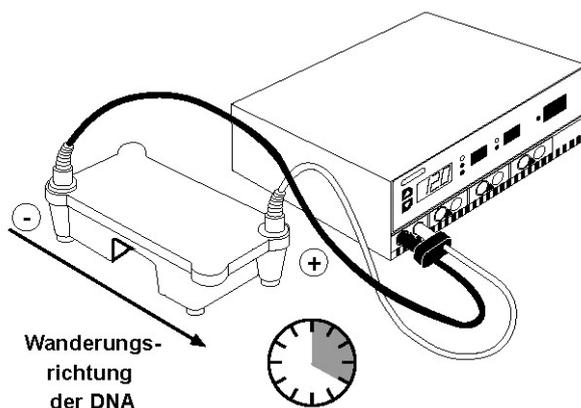
Gruppe 3 und 4:

Spur 4: 10 µl Restriktionsansatz *pUCD-lacZ* mit *Bam* H I und *Hin* d III verdaut

Spur 5: 10 µl Kontrolle 5 (*lacZ*-Gen)

Spur 6: 10 µl DNA-Marker III

#### 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 blaue Farbstoff die zweite Geltaschenreihe erreicht.

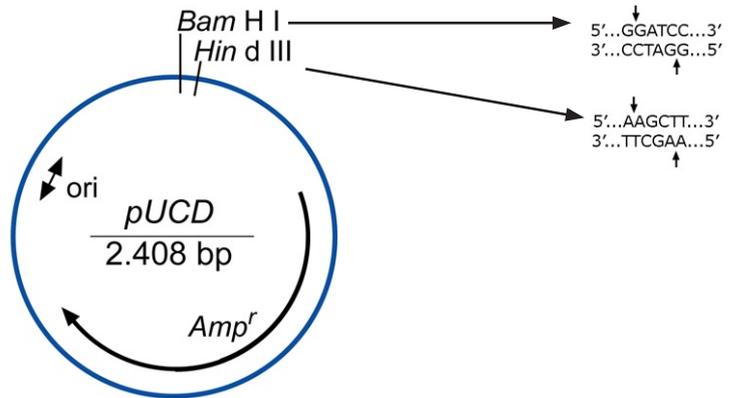
Dauer der Elektrophorese mindestens 20, besser 30 Minuten.

Färben des Gels, siehe Arbeitsblatt 5

## Klonierung von DNA

### 2-A, 2-B: Versuchsauswertung: Schneiden des Plasmids *pUCD* mit den Restriktionsenzymen *Bam* H I und *Hin* d III

Schematische Karte des Plasmids *pUCD*  
*Amp<sup>r</sup>*: Ampicillinresistenz-Gen  
 ori: Replikationsursprung



Die zurückgelegte Wanderungsstrecke der DNA-Fragmente im Agarose-Gel ist umgekehrt proportional zum Logarithmus (log) des Molekulargewichtes (M) der Fragmente.  
 Das Molekulargewicht eines bestimmten DNA-Fragmentes ist proportional zur Anzahl der Basenpaare (bp):

$$\text{Wanderungsstrecke} \approx \frac{1}{\log M} \approx \frac{1}{\log \text{Anzahl der bp}}$$

### Ermittlung der DNA-Fragmentgrößen mit Hilfe einer Eichkurve:

	Fragmentgröße in bp	log der Fragmentgröße	Wanderungsstrecke in mm
DNA-Molekulargewichtsmarker III	21.226		
	5.148		
	4.973		
	4.268		
	3.530		
	2.027		
	1.904		
	1.584		
	1.375		
	947		
Restriktionsansatz mit <i>Bam</i> H I und <i>Hin</i> d III	831		
	564		
	<i>lacZ</i> Genfragment		

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 III eine Eichkurve auf Millimeterpapier

(x = Wanderungsstrecke in mm; y = log Fragmentgröße der DNA in Basenpaaren). Ermitteln Sie mit Hilfe der Eichkurve die Größe der DNA-Fragmente Ihres Restriktionsansatzes, und tragen Sie die Werte in die Tabelle ein.

### Fragen:

1. Welche Reaktionen katalysieren die Restriktionsenzyme *Bam* H I und *Hin* d III?
2. Stimmen Ihre ermittelten Werte mit den oben angegebenen Größen aus der Plasmidkarte bzw. mit der Größenangabe des *lacZ*-Gens (siehe Anhang) überein?
3. Ist Ihr Restriktionsansatz erfolgreich gewesen? Sind alle Plasmidringe linearisiert und damit optimal vorbereitet für die Ligation mit dem *lacZ*-Gen?

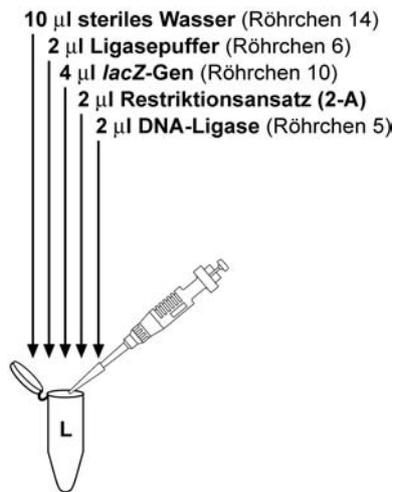
## Klonierung von DNA

### 2-C: Ligation des *lacZ*-Gens mit dem linearisierten Plasmid *pUCD* (aus 2-A)

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.



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

**Verwenden Sie für jeden Pipettierschritt eine neue Spitze!**

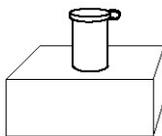
Achten Sie darauf, dass keine Tröpfchen an der Gefäßwand hängen bleiben, sondern in der Spitze des Eppendorfgefäßes gesammelt werden.

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

**RESTRIKTIONSVERDAU der Gruppen 1 und 2 für alle 4 Gruppen verwenden!!!**

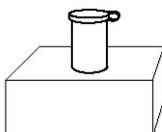
Sammeln Sie alle gebrauchten Pipettenspitzen in dem dafür vorgesehenen Abfallbeutel.

#### Ligationsreaktion:



5 Minuten bei Raumtemperatur

Incubieren Sie Ihren Ligationsansatz 5 Minuten bei Raumtemperatur.

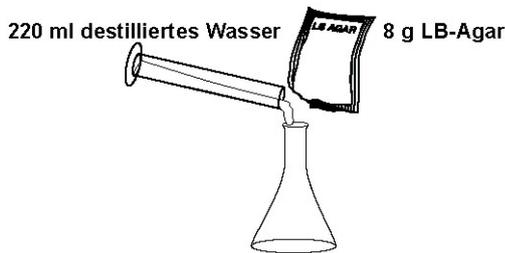


Einfrüieren oder sofort weiterverwenden

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

## Klonierung von DNA

### 2-D: Transformation und Selektion Vorbereitung der Nährböden (Agarplatten)



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:

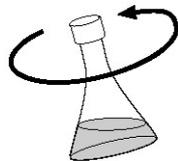


Kochen Sie die Agarlösung in einem Wasserbad bzw. in einem Schnellkochtopf, bis sich der Agar gelöst hat.

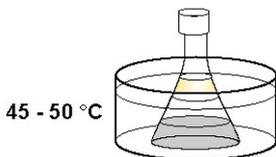
**Schnellkochtopf erst nach Abkühlen auf ca. 60 °C öffnen. Siedeverzug!**

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!).



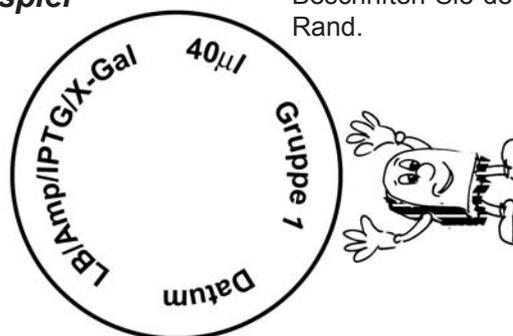
Lassen Sie den Agar auf 50 °C im Wasserbad abkühlen. Achten Sie darauf, dass der Agar nicht unter 45 °C abkühlt, da er sonst vorzeitig erstarrt!

#### Beschriften des Bodens der Petrischalen:

Jede Gruppe beschriftet zwei Petrischalen wie folgt:

**1**  
Gruppe:  
Datum:  
LB/Amp/IPTG/X-Gal  
40 µl

#### Beispiel



Beschriften Sie den Boden der Petrischalen nur am äußeren Rand.

**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  
40 µl  
*E. coli* nichttransformiert

**K2**  
Datum:  
LB/Amp/IPTG/X-Gal  
40 µl  
*E. coli* nichttransformiert

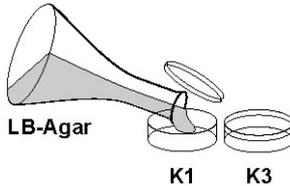
**K3**  
Datum:  
LB  
40 µl  
*E. coli* mit *pUCD-lacZ*

**K4**  
Datum:  
LB/Amp/IPTG/X-Gal  
40 µl  
*E. coli* mit *pUCD-lacZ*

## Klonierung von DNA

### 2-D: Transformation und Selektion Gießen der Agarplatten

#### Gießen der LB-Agarplatten:



Zum Gießen der 2 LB-Agarplatten heben Sie den Deckel der Petrischalen nur kurz an.

Füllen Sie so viel Agar ein, bis der Boden der Petrischalen mit einer 3 – 4 mm hohen Schicht bedeckt ist (ca. 10 ml).

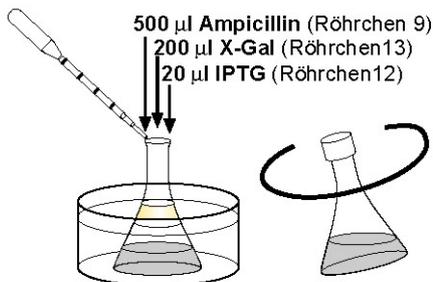
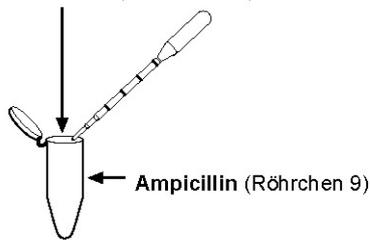
Schließen Sie den Deckel danach sofort wieder (Sterilität!).

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:

500 µl steriles Wasser (Röhrchen 14)



45 - 50 °C

Pipettieren Sie mit Hilfe einer Einwegpipette 500 µl steriles Wasser (Röhrchen 14) in das Eppendorfgefäß, welches 10 mg Ampicillin enthält (Röhrchen 9).

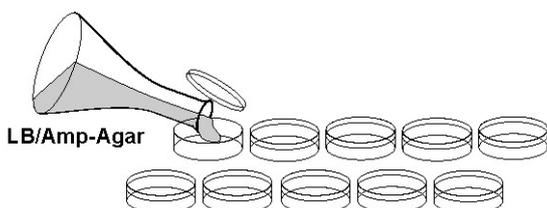
Lösen Sie das Antibiotikum durch „Anschneiden“ vollständig.

Zur Herstellung der LB/Amp/IPTG/X-Gal-Platten pipettieren Sie die Gesamtmenge aus Röhrchen 9 (Ampicillin, 20 mg/ml) mit einer Einwegpipette in die Agarlösung, geben Sie die Gesamtmenge (200 µl) X-Gal (Röhrchen 13, 40 mg/ml) in die Lösung, und fügen Sie mit der Eppendorfpipette 20 µl IPTG (Röhrchen 12, 200 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 aufgeköcht werden, ohne das Ampicillin zu zerstören.

#### Gießen der LB/Amp/IPTG/X-Gal-Platten:

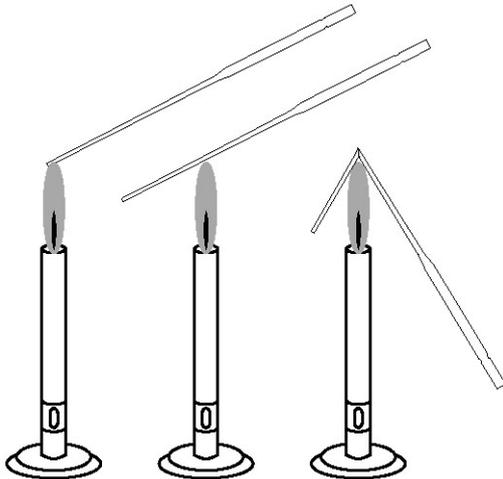


Gießen Sie 10 LB/Amp/IPTG/X-Gal-Platten (plus Reserven) wie zuvor beschrieben.

Die Platten sollten nach dem Erstarren des Agars mit dem Deckel nach unten getrocknet und bis zum Ausplattieren der Zellen im Kühlschrank aufbewahrt werden.

## 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.

## Klonierung von DNA

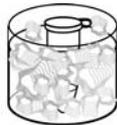
### 2-D: Transformation und Selektion

#### Transformation der Bakterien mit dem ligierten Plasmid *pUCD*

Bitte beachten Sie, dass alle Pipettenspitzen, Einwegpipetten und Eppendorfgefäße nach Gebrauch in dem 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:

20 µl des Ligationsansatzes (2-C)

200 µl kompetente  
*E. coli* K12 (JM109)



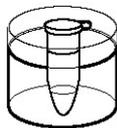
Eis



Pipettieren Sie 20 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.

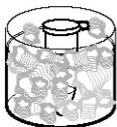
Inkubieren Sie Ihren Transformationsansatz 15 Minuten auf Eis.



37 °C Wasserbad



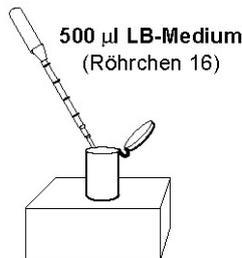
Stellen Sie den Transformationsansatz für **exakt** 5 Minuten in ein 37 °C Wasserbad.



Eis

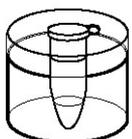


Stellen Sie den Transformationsansatz anschließend sofort wieder für 5 Minuten auf Eis.



Geben Sie 500 µl LB-Medium mit einer Einwegpipette zu Ihrem Transformationsansatz.

Schnippen Sie zum Mischen das Gefäß kurz an.



37 °C Wasserbad

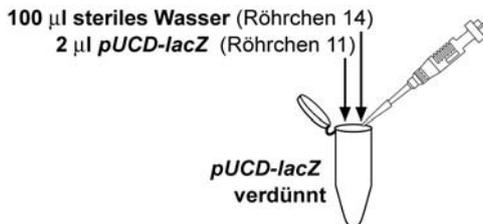


Inkubieren Sie den Ansatz erneut für ca. 15 Minuten in einem 37 °C Wasserbad, so dass sich die Zellen erholen können.

## Klonierung von DNA

### 2-D: Transformation und Selektion Transformations-Kontrollansätze

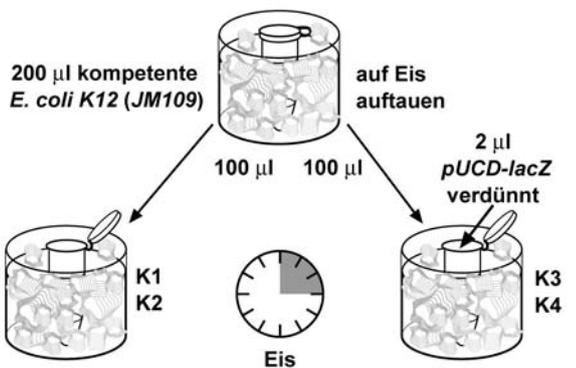
#### Verdünnen der *pUCD-lacZ*-Lösung:



Für die Transformationskontrolle muss die *pUCD-lacZ*-Lösung zuerst verdünnt werden.

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

#### Transformations-Kontrollansätze:



Teilen Sie die aufgetauten kompetenten *E. coli* K12 (JM109) Zellen auf zwei Eppendorfgefäße à 100 µl auf. (Vorher anschnippen!).

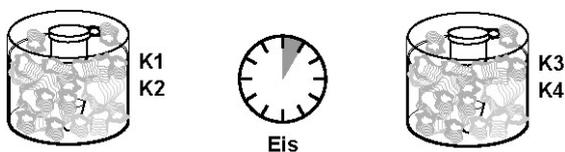
Eines der Gefäße mit 100 µl *E. coli* K12 (JM109) durchläuft den Transformationsversuch, ohne dass die Zellen mit einem Plasmid transformiert werden (K1, K2).

In das andere Gefäß (K3, K4) pipettieren Sie 2 µl *pUCD-lacZ* (verdünnt).

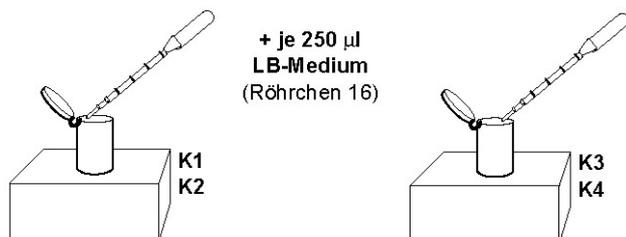
Mischen Sie durch Anschneiden.

Inkubieren Sie **beide Ansätze** 15 Minuten auf Eis.

Transferieren Sie die Ansätze für **exakt** 5 Minuten in ein 37 °C Wasserbad.



Stellen Sie die Röhrchen anschließend sofort wieder für 5 Minuten auf Eis.



Geben Sie je 250 µl LB-Medium mit einer Einwegpipette zu Ihren Ansätzen.

Schnippen Sie zum Mischen die Gefäße kurz an.

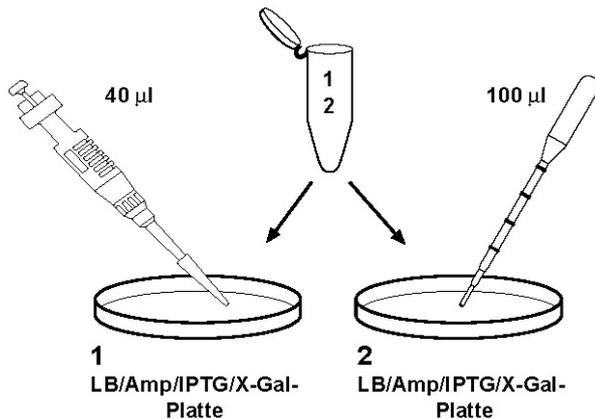


Inkubieren Sie die Ansätze erneut für ca. 15 Minuten in einem 37 °C Wasserbad, so dass sich die Zellen erholen können.

## Klonierung von DNA

### 2-D: Transformation und Selektion Ausplattieren der Bakterien

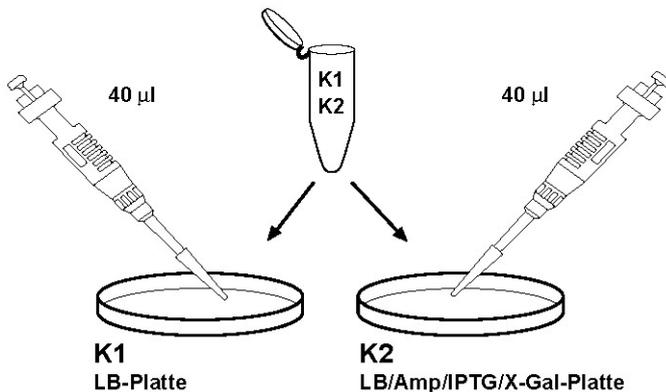
#### Ausplattieren der *E. coli* K12 (JM109) transformiert mit den ligierten Plasmiden:



Jede Gruppe gibt auf die dafür vorbereitete Selektionsplatte 1 (LB/Amp/IPTG/X-Gal) mit der Eppendorfpipette 40 µl (2 x 20 µl) und auf die Selektionsplatte 2 mit der Einwegpipette 100 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.

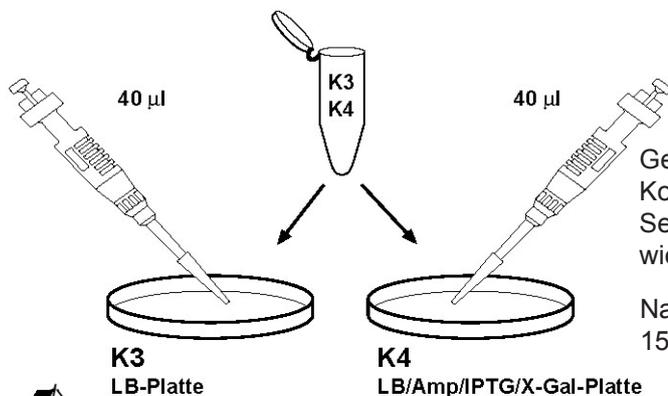
Siehe Arbeitsblatt 14!

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



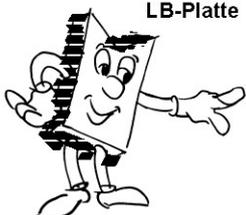
Bringen Sie aus dem Kontrollansatz K1/K2 mit der Eppendorfpipette jeweils 40 µl auf die Kontrollplatte K1 (LB-Agar) und 40 µl auf die Selektionsplatte K2 (LB/Amp/IPTG/X-Gal), und plattieren Sie wie zuvor beschrieben die Zellen aus.

#### Ausplattieren der *E. coli* K12 (JM109) transformiert mit pUCD-lacZ:



Geben Sie 40 µl des Kontrollansatzes K3/K4 auf die Kontrollplatte K3 (LB-Agar) sowie die gleiche Menge auf die Selektionsplatte K4 (LB/Amp/ IPTG/X-Gal), und plattieren Sie wie bereits beschrieben aus.

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



37 °C über Nacht

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.

## 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.

	LB-Agarplatten		LB/Amp/IPTG/X-Gal-Agarplatten	
	Wachstum +/-	Kolonienzahl weiß	Wachstum +/-	Kolonienzahl weiß / blau
<i>E. coli</i> K12 (JM109) transformiert mit ligiertem pUCD-lacZ-Plasmid aus dem Ligationsansatz	X		<input type="text" value="1"/> (40 µl)	
			<input type="text" value="2"/> (100 µl)	
<i>E. coli</i> K12 (JM109) nichttransformiert Kontrolle K1 + K2	<input type="text" value="K1"/> (40 µl)		<input type="text" value="K2"/> (40 µl)	
<i>E. coli</i> K12 (JM109) transformiert mit pUCD-lacZ Kontrolle K3 + K4	<input type="text" value="K3"/> (40 µl)		<input type="text" value="K4"/> (40 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 pUCD?
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.

## Tips 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.



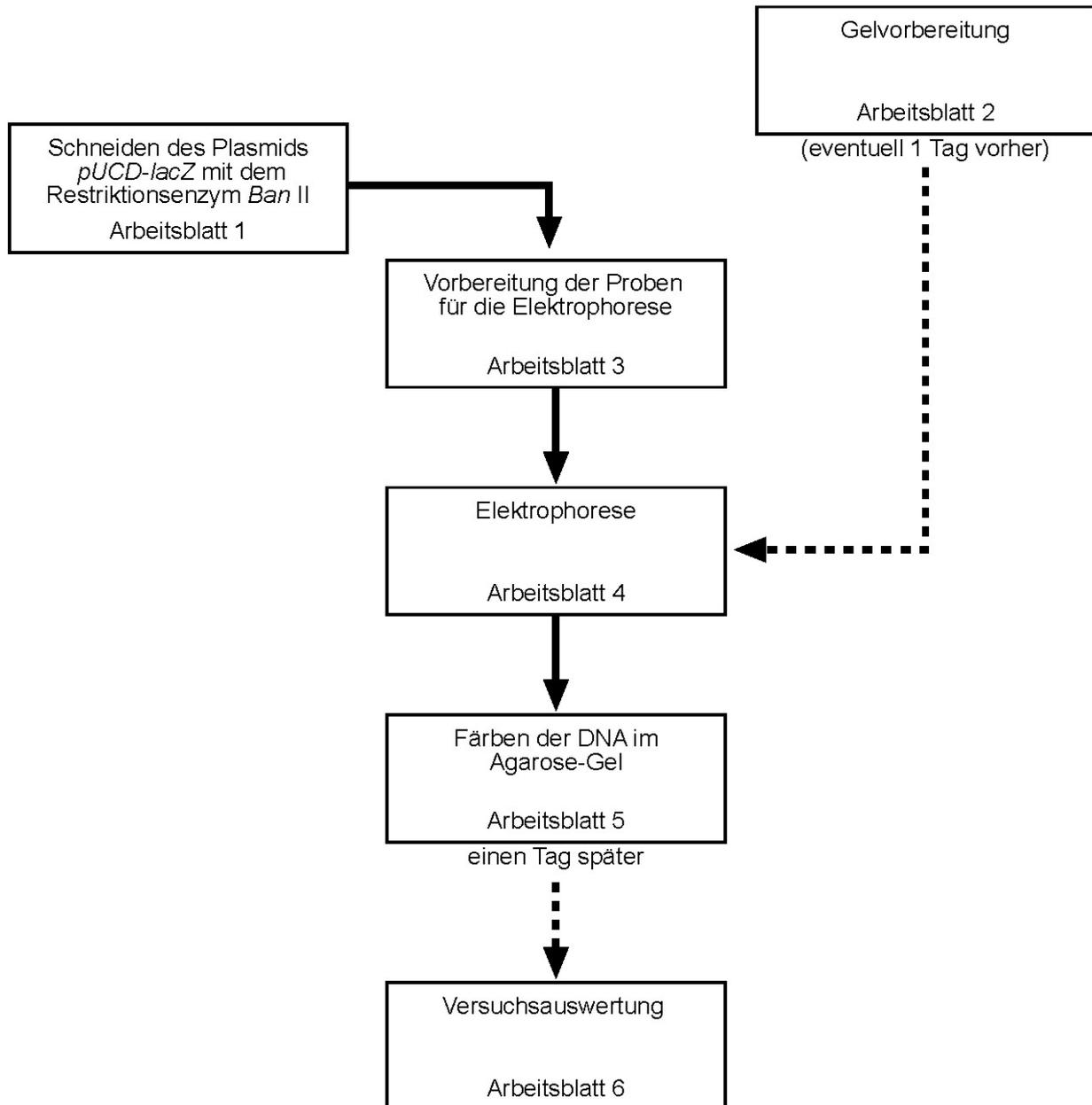
Direkt nach dem Versuch sollten alle verwendeten Materialien, wie z. B. Pipettenspitzen, Reaktionsgefäße, mit Bakterien beimpfte Agarplatten, in die dafür vorgesehenen Plastikbeutel gegeben werden, bevor dieses Material über den normalen Hausmüll entsorgt wird.



Das Ampicillin sollte unter einem Abzug resuspendiert werden, so dass keine Stäube eingeatmet werden können.

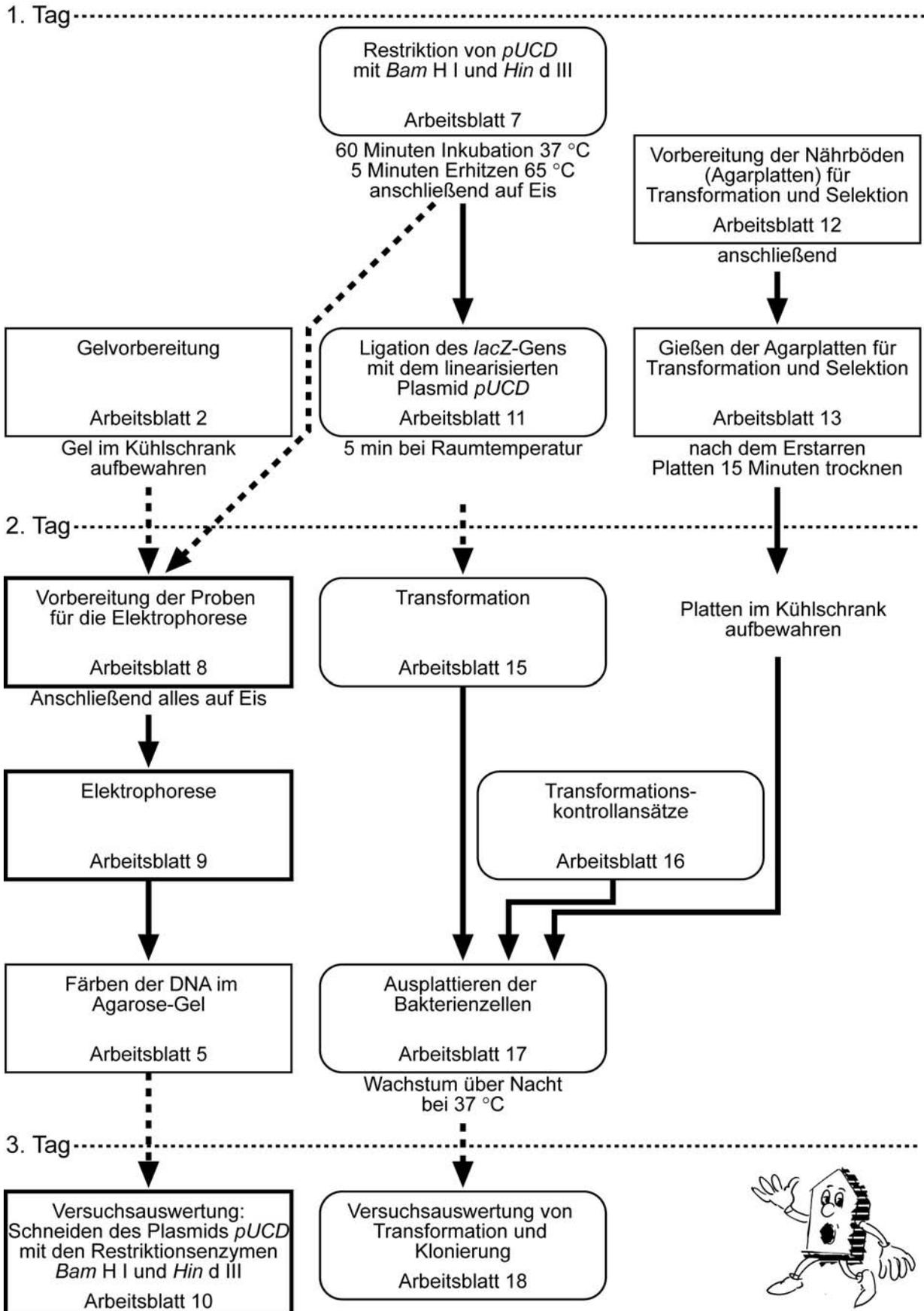
## Übersicht

### Analyse von DNA



## Übersicht

### Klonierung von DNA



**... 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 durchstoßen? Dann kann es nämlich passieren, dass die DNA-Lösung nach unten wegfließt.

**... beim Klonierungsexperiment nur auf den Kontrollplatten (K1, K3) ein Bakterienrasen bzw. auf K4 blaue Kolonien festzustellen sind?**

- Vermutlich ist die Ligation 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!

**... beim Klonierungsexperiment nur auf den Kontrollplatten (K1, K3) ein Bakterienrasen festzustellen ist?**

- Dann war die Kompetenz der *E. coli* K12 (JM109) Zellen nicht ausreichend. Grund dafür kann die nicht angemessene Lagerung der Zellen während des Transportes bzw. während des Versuchs sein.
- Um eine Transformation, die zur Ausbildung blauer Kolonien (K4) führt, dennoch durchführen zu können, können Sie mit dem folgenden Schnellverfahren Zellen, die Sie von der Platte K1 abnehmen, kompetent machen. Dafür nehmen Sie ca. 3 mm<sup>2</sup> des Bakterienrasens mit einer sterilen Impföse oder einer sterilen gelben Spitze ab und transferieren die Zellen in ein Eppendorfgefäß mit 200 µl steriler eiskalter 70-mM-CaCl<sub>2</sub>-Lösung (muss zuvor hergestellt werden!). Die Bakterien werden homogenisiert, indem man mehrmals mit der Pipette auf- und abpipettiert. Pipettieren Sie nun 5 µl der *pUCD-lacZ*-Lösung (Röhrchen 11) dazu, und stellen Sie das Gefäß 15 Minuten auf Eis. Dann wird weiterverfahren, wie in der allgemeinen Transformationsvorschrift angegeben. Parallel dazu kann ein zweites Gefäß als Kontrolle mitgeführt werden, das kein *pUCD-lacZ* erhält.