

## Gentechnologie: Isolierung und Charakterisierung von DNA

**Lerninhalte:** Klonierung, Plasmid, Polylinker („multiple cloning site“), Restriktionsendonuklease, Restriktionsanalyse, Gelelektrophorese

Bei molekulargenetischen Arbeiten folgt auf die Klonierung eines DNA-Fragmentes in einen Plasmidvektor die Charakterisierung der in der Transformation gewonnenen Klone. Folgende Schritte müssen hierfür durchgeführt werden:

- Isolierung der Plasmid-DNA
- Schneiden der Plasmid-DNA mit geeigneten Restriktionsenzymen
- Auftrennung der DNA-Fragmente im Agarosegel

### Isolierung der Plasmid-DNA

Für die Analyse der Plasmid-DNA muss diese zuerst aus den Bakterien isoliert werden. Hierfür werden die Klone verwendet, die Sie am 2. Versuchstag angesetzt haben. Wir wenden eine Methode an, die in kurzer Zeit Plasmid-DNA in großer Menge liefert. Der Vorteil dieser Methode liegt darin, dass keine Alkoholfällung der DNA (wie Sie sie bei der Isolierung der genomischen DNA aus Ihren Mundschleimhautzellen kennen gelernt haben) durchgeführt wird. Allerdings lässt sich diese Methode nur für bestimmte Bakterienstämme verwenden, denen eine bestimmte Endonukleaseaktivität fehlt (*endA*<sup>-</sup>). Die für Klonierungsexperimente, bei denen der Blau-Weiß-Test eingesetzt wird, üblicherweise benutzten Stämme, wie z.B. DH5 $\alpha$ , XL1blue etc., eignen sich jedoch für diese Methode.

### Restriktionsanalyse der Plasmid-DNA

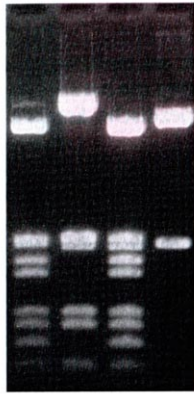
Mit Hilfe einer Restriktionsanalyse lässt sich die DNA auf die Anwesenheit bestimmter Schnittstellen untersuchen. **Restriktionsenzyme** erkennen im Allgemeinen kurze **palindromische Sequenzen** mit

einer Länge von 4 - 8 bp und schneiden diese in beiden Strängen. Dabei können je nach Enzym glatte oder überhängende Enden entstehen.

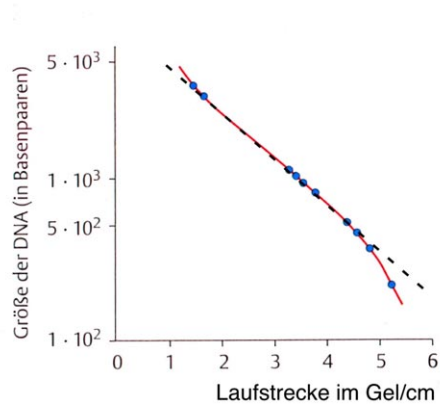
Enzym	Erkennungssequenz	Produkt	
<i>Pst</i> I	$\begin{array}{c} \blacktriangledown \\ -CTGCAG- \\ -GACGTC- \\ \blacktriangle \end{array}$	$\begin{array}{c} -CTGCA^{3'} \\ -G^{5'} \end{array}$	3'-Überhang
<i>Sma</i> I	$\begin{array}{c} \blacktriangledown \\ -CCCGGG- \\ -GGGCCC- \\ \blacktriangle \end{array}$	$\begin{array}{c} -CCC^{3'} \\ -GGG^{5'} \end{array}$	glatte Enden
<i>Xma</i> I	$\begin{array}{c} \blacktriangledown \\ -CCCGGG- \\ -GGGCCC- \\ \blacktriangle \end{array}$	$\begin{array}{c} -C^{3'} \\ -GGGCC^{5'} \end{array}$	
<i>Bam</i> HI	$\begin{array}{c} \blacktriangledown \\ -GGATCC- \\ -CCTAGG- \\ \blacktriangle \end{array}$	$\begin{array}{c} -G^{3'} \\ -CCTAG^{5'} \end{array}$	5'-Überhang
<i>Eco</i> RI	$\begin{array}{c} \blacktriangledown \\ -GAATTC- \\ -CTTAAG- \\ \blacktriangle \end{array}$	$\begin{array}{c} -G^{3'} \\ -CTTAA^{5'} \end{array}$	

## Auftrennung der DNA-Fragmente im Agarosegel

Nukleinsäuren lassen sich durch **Elektrophorese** in einem Agarosegel auftrennen, wobei die Wanderungsgeschwindigkeit der DNA im Gel einerseits von der Größe der DNA und andererseits von ihrer Konformation abhängt. Lineare DNA-Fragmente werden in einem Agarosegel ausschließlich nach ihrer Größe aufgetrennt. Dabei zeigt die Wanderungsgeschwindigkeit der Fragmente im Gel über einen bestimmten Bereich eine logarithmische Abhängigkeit von ihrer Größe.



A.



B.

**Abb. 3: Auftrennung von DNA-Fragmenten in einem Agarosegel.** A: DNA-Fragmente unterschiedlicher Größe; B: Abhängigkeit der Laufstrecke vom Molekulargewicht.

In diesem Praktikumsteil wollen wir prüfen, ob es gelungen ist, rekombinante Plasmide zu generieren, die das 2140 bp  $\lambda$ -Fragment aufgenommen haben. Der Versuch gliedert sich in drei Teile:

1. Präparation der Plasmid-DNA aus den *E. coli*-Zellen
2. Behandlung der Plasmid-DNA mit Restriktionsenzymen
3. Gelelektrophoretische Auftrennung der DNA-Fragmente und Analyse der Gele

Sie haben am ersten Versuchstag eine Transformation in einen Bakterienstamm durchgeführt, der im Genom eine *lacZ* Deletionsmutation trägt (*lacZ* $\Delta$ M15, es fehlen die Kodons 11-41). Da der Vektor pUC18 das Gen *lacZ*<sup>+</sup> trägt und diese Mutation komplementieren kann, lässt sich mit dem Blau-Weiß-Test erkennen, welche Kolonien ein Plasmid mit Insertion tragen.

Nach der Transformation wurden Ihre Platten über Nacht bei 37 °C inkubiert und dann bei 4 °C gelagert. Von Ihren Platten haben Sie am zweiten Versuchstag ein weiße und eine blaue Kolonie in jeweils 3 ml Flüssigmedium (dYT + 100  $\mu$ g/ml Ampicillin) überführt und über Nacht bei 37 °C schüttelnd inkubiert. Aus diesen Übernacht-Kulturen sollen Sie die Plasmid-DNA isolieren.

## Präparation von Plasmid-DNA

- 1,5 ml einer Bakterienübernachtskultur werden 1 min bei 13.000 rpm in der Eppendorfszentrifuge pelletiert und der Überstand wird in den Flüssigabfall verworfen.

- Das Pellet wird in 50 µl Destroyer-Lysispuffer resuspendiert und 5 min bei Raumtemperatur inkubiert.
- Die Suspension wird noch einmal durchmischt (Vortexer) und anschließend 1 min im kochenden Wasserbad erhitzt. Die heiße Lösung wird danach sofort auf Eis gestellt und dort 5 min abgekühlt.
- Anschließend wird in der Eppendorffzentrifuge 8 min bei 13.000 rpm zentrifugiert (Genomische DNA und Zellreste formen mit dem hitzpräzipitierten BSA ein kompaktes Pellet).
- Ohne weitere Aufreinigung können 5 µl des Überstandes für Restriktionsanalysen in einem Gesamtansatz von 20 µl verwendet werden.

## **Restriktionsanalyse der Plasmid-DNA**

Sie sollen mit jeder Plasmid-DNA zwei verschiedene Restriktionsreaktionen durchführen: Zum einen schneiden Sie die DNA mit dem Enzym *PstI*, das das  $\lambda$  *PstI*-Fragment (falls es in dem von Ihnen isolierten Plasmid kloniert vorliegt) aus dem Vektor ausschneidet. pUC18 wird durch *PstI* lediglich linearisiert. Als zweites Enzym setzen Sie *EcoRI* ein, das Ihnen erlaubt, die Orientierung des Fragments zu bestimmen (vergl. Abb. 2 des 1. Experimentaltails).

Sie setzen in jedem Reaktionsansatz 5 µl DNA ein. Dazu geben Sie 15 µl eines Reaktionsgemisches, das alle für die enzymatischen Reaktionen notwendigen Komponenten enthält (Enzym, geeignete Puffer- und Salzbedingungen).

Die Ansätze werden 30 - 60 min bei 37 °C im Wärmeschrank inkubiert. Während dieser Zeit bereiten Sie die Agarosegele für die Elektrophorese vor.

## **Gelelektrophoretische Auftrennung der DNA-Fragmente**

Zur Charakterisierung eines Plasmids wird die geschnittene Plasmid-DNA in einem Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt. Mit Hilfe des interkalierenden Farbstoffes Ethidiumbromid (EtBr), kann DNA gefärbt werden. Unter UV-Licht lassen sich die DNA-Fragmente durch das hell-orange

fluoreszierende Ethidiumbromid (EtBr) sichtbar machen. Dem Agarosegel wurde daher EtBr zugesetzt.

**Vorsicht, EtBr ist mutagen! Handschuhe tragen!**

Während der Inkubationszeit der Restriktionsansätze werden die Agarosegele für die Gelelektrophorese vorbereitet:

Dazu wird der Schlitten an den offenen Seiten mit Klebeband verschlossen, auf den Arbeitsplatz gelegt und mit Wasser gefüllt, um zu prüfen, ob er dicht ist. Dann wird das Wasser wieder abgegossen und der Kamm in die dafür vorgesehenen Aussparungen eingesetzt.

1,0% Agarose wurde durch Aufkochen in TAE-Puffer gelöst, nach dem Abkühlen EtBr beigemischt und im Wärmeschrank bei 60 °C aufbewahrt. Gießen Sie die Agarose in den Schlitten (**HANDSCHUHE**) und achten Sie darauf, dass die Kämmen richtig sitzen.

Nachdem die Agarose erstarrt ist, werden die Klebebänder entfernt und der Schlitten mit dem Gel in die Kammer gesetzt. Die Kammer wird mit TAE-Puffer gefüllt, bis das Gel ganz bedeckt ist. Dann werden die Kämmen vorsichtig, ohne die Taschen zu verletzen, gezogen.

Vorbereitung der Proben für die Gelelektrophorese:

Nach Ablauf der Inkubationszeit werden zu den Restriktionsansätzen jeweils 4 µl Auftragspuffer gegeben. Um nach der elektrophoretischen Auftrennung die Fragmentgrößen abschätzen zu können, werden noch Längenstandards verwendet. Wir benutzen erstens einen Längenstandard, der Ihnen mit Fragmenten von einprägsamer Länge (Schritte von 100 bp bzw. 500bp) eine leichte Auswertung ihrer Fragmentlängen erlaubt (Marker 1: 10 µl; bereits mit Auftragspuffer versetzt). Als zweiten Längenstandard werden wir DNA des Bakteriophagen  $\lambda$  einsetzen, die mit *Pst*I geschnitten wurde. Dieser Längenstandard sollte Ihnen eine leichte Identifizierung des *Pst*I-Fragments erlauben, das Sie kloniert haben (Marker 2: 10 µl; bereits mit Auftragspuffer versetzt).

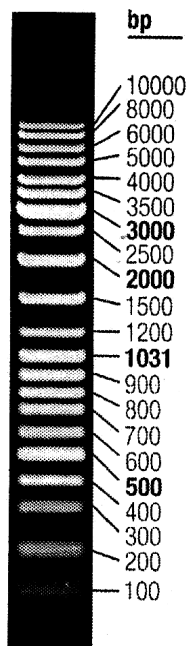
Nach dem Beladen des Gels wird der Deckel geschlossen und die Spannung angelegt (150 V). Nach 2 Minuten wird das Einwandern der orangefarbenen Front (Orange G) kontrolliert. Die Elektrophorese läuft ca. 20-30 min bei 150 V. Nach Beendigung des Laufes werden die DNA-Fragmente im Gel auf einem UV-Schirm sichtbar gemacht (**HANDSCHUHE**) und fotografiert.

## Auswertung:

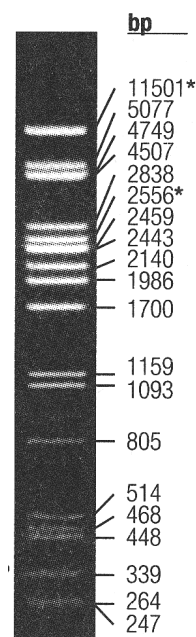
Kleben Sie das Photo Ihres Gels in das Protokoll ein und beschriften Sie die einzelnen Spuren. Schätzen Sie die Länge der verschiedenen DNA-Fragmente in Ihren Proben. Geben Sie an, ob die Plasmide inserierte DNA enthalten und welche Orientierung die Insertionen besitzen.

## DNA-Längenstandard

Marker 1



Marker 2 ( $\lambda$ -DNA/*Pst*I)



## Puffer und Lösungen:

### 1x TAE-Puffer:

40 mM Tris-Acetat pH 7,9  
2 mM EDTA

### TE-Puffer:

10 mM Tris-HCl pH 7,9  
1 mM EDTA

### *E. coli*-Destroyer Lysispuffer

10 mM Tris-HCl pH 8,0  
1 mM EDTA pH 8,0  
15 % (w/v) Saccharose  
2 mg/ml Lysozym  
0,2 mg/ml RNase A  
100 µg/ml BSA

### dYT-Medium:

1,6 % (w/v) Trypton  
1,0 % (w/v) Yeast-Extract  
0,5 % (w/v) NaCl

### Auftragspuffer für DNA-Gele

0,25 % Orange G  
40 % (w/v) Saccharose in H<sub>2</sub>O