

Schülerversuch

- 1. Isolierung von Plasmid-DNA aus Bakterien**
- 2. Charakterisierung isolierter Plasmid-DNA mittels Restriktionsspaltung und gelelektrophoretischer Auftrennung der erhaltenen DNA-Fragmente**
- 3. Nachweis der kodierenden Sequenz der CK2 α mit Hilfe der Polymerase-Kettenreaktion**

1. Isolierung von Plasmid-DNA aus Bakterien

1.1. Theorie

In diesem Versuch sollen Grundkenntnisse über den Aufbau von Nucleinsäuren und die Isolierung von Plasmid-DNA vermittelt werden. Nucleinsäuren dienen der Informationserhaltung (DNA, RNA) und dem Informationsfluss (RNA). DNA und RNA sind aus Nucleotiden aufgebaut, die ihrerseits aus jeweils einer Desoxyribose (DNA) bzw. Ribose (RNA), einer Base (Pyrimidin- und Purinbasen) und einem Phosphorsäurerest zusammengesetzt sind. DNA besteht aus zwei langen, um eine Achse gewundenen Polynucleotidsträngen. Jeder Polynucleotidstrang trägt das Zucker-Phosphat-Rückgrat nach außen gerichtet, während die Pyrimidin- und Purinbasen im Innern der Doppel-Helix vorliegen. Jeweils zwei gegenüberliegende Basen bilden über Wasserstoffbrückenbindungen Basenpaare aus, die die beiden Polynucleotidstränge zusammenhalten. Diese Bindungen können nur zwischen den komplementären Basen Adenin (A) und Thymin (T) bzw. Guanin (G) und Cytosin (C) ausgebildet werden. Somit ist durch die Basensequenz des einen Stranges automatisch auch die Sequenz des anderen bestimmt. Der Informationsgehalt der DNA liegt in der Basensequenz begründet. Die DNA wird zuerst in eine RNA überschrieben (Transkription) und von der RNA in eine Aminosäuresequenz übersetzt (Translation), wobei 3 Basen (Codon) eine Aminosäure kodieren. Andererseits dienen charakteristische Basensequenzen als Signal zur Regulation der eigenen Replikation oder der Transkription.

In vielen prokaryontischen Zellen gibt es sogenannte extrachromosomale DNA-Moleküle, die Plasmide genannt werden und sich durch folgende besondere Eigenschaften auszeichnen: Plasmide sind zirkuläre, superhelikale DNA-Moleküle mit einer Länge von etwa 2.000 bis mehreren 100.000 Basenpaaren. Plasmide können zwischen Zellen ausgetauscht werden und sind meist nicht unbedingt für die Existenz der Zelle notwendig. Plasmide tragen u.a. Gene für die Inaktivierung von Antibiotika sowie die Synthese von Toxinen, wodurch die plasmidhaltigen Bakterien einen Selektionsvorteil erlangen. Plasmide replizieren unabhängig vom zellulären Chromosom meist zu sehr hoher Kopienzahl pro Zelle. Die hohe Kopienzahl und die Selektionsmöglichkeit sind die Hauptgründe dafür, dass einige dieser Plasmide in der Gentechnologie benutzt werden. Gewünschte Gene oder DNA-Fragmente mit

regulatorischen Eigenschaften können in derartige Plasmide eingebaut und in Bakterien vermehrt werden.

1.2. Aufgabenstellung

Isolierung von Plasmid-DNA aus den Bakterienkulturen *Escherichia coli* (*E. coli*) Stamm HB101 (Proben A und B). Jede Arbeitsgruppe isoliert die Plasmid-DNA aus beiden Proben. Dabei wird jedes Bakteriensediment mit Natriumdodecylsulfat (SDS) in alkalischem Medium lysiert. SDS dient als starkes ionisches Detergenz zur Auflösung der Zellmembranen. Der alkalische pH-Wert führt zu einer Denaturierung der DNA in Einzelstränge. Anschließend wird mit einer Acetat-Lösung der pH-Wert so eingestellt, dass die denaturierte chromosomale DNA ungeordnet wieder renaturiert, so dass sie als ein unlösliches Netzwerk ausfällt. Die Plasmid-DNA renaturiert dagegen aufgrund ihrer geringeren Größe geordnet und bleibt gelöst. Gleichzeitig führt die hohe Salzkonzentration zu einer Präzipitation von Protein-SDS-Komplexen und hochmolekularer RNA. Dann werden Proteine durch Zugabe von Phenol denaturiert. Durch Zentrifugation wird der Niederschlag abgetrennt, so dass die Plasmid-DNA aus dem Überstand weiter gereinigt und konzentriert werden kann.

1.3. Praktische Durchführung

- Jedes Bakteriensediment (A und B, wird zur Verfügung gestellt) (aus 3 ml Kultur) in je 300 µl Lösung 1 sorgfältig durch Auf- und Abpipettieren resuspendieren.
- je 300 µl der Lösung 2 zugeben; durch 8-10-maliges Umdrehen des geschlossenen Reaktionsgefäßes vorsichtig mischen. 5 min bei Raumtemperatur stehen lassen (nicht länger!). In diesem Schritt werden die Zellen lysiert.
- je 300 µl der Lösung 3 zugeben; durch 8-10-maliges Umdrehen des geschlossenen Reaktionsgefäßes mischen. 5 min auf Eis stehen lassen. In diesem Schritt wird die Lösung neutralisiert. Es kommt zur geordneten Renaturierung der Plasmid-DNA; Proteine, genomische DNA und Membranen bleiben unlöslich.
- 10 min in einer Eppendorffzentrifuge zentrifugieren (13.000 rpm)
- Die Überstände (je 0.9 ml; enthalten die Plasmid-DNA!) werden in je ein neues Reaktionsgefäß überführt. Durch Zugabe von je 0.6 ml Isopropanol wird die Plasmid-DNA gefällt. Durch mehrmaliges Umdrehen des geschlossenen Reaktionsgefäßes gut mischen.
- 10 min mit 13.000 rpm zentrifugieren. Überstand vollständig entfernen, das Sediment enthält die Plasmid-DNA.
- Trockenes Sediment in 25 µl TE/RNase lösen; 5 min bei Raumtemperatur stehen lassen.

2. Charakterisierung isolierter Plasmid-DNA mittels Restriktionsspaltung und gelelektrophoretischer Auftrennung der erhaltenen DNA-Fragmente

2.1 Theorie

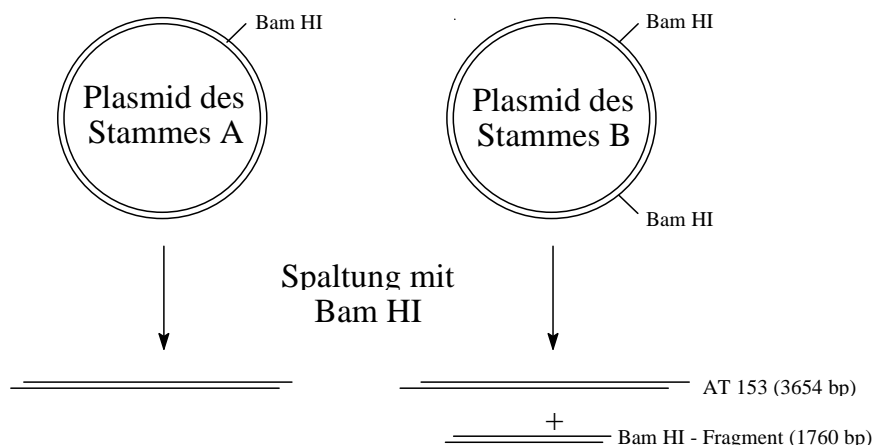
Plasmide sind wichtige Werkzeuge in der Gentechnologie. Das gerichtete Arbeiten mit Genen, z.B. der Einbau von Genen in Plasmide, ist nur mit Hilfe von sogenannten

Restriktionsendonukleasen möglich. Bakterien benutzen Restriktionsendonukleasen als Enzyme, die fremde DNA-Moleküle, z.B. Phagen-DNA, spalten können. Restriktionsendonukleasen spalten DNA nur an genau definierten Positionen. Zum Schutz der eigenen DNA gegen die eigenen Restriktionsendonukleasen methylieren Bakterien ihre DNA in genau derjenigen Basensequenz, die von der Restriktionsendonuklease erkannt wird. Diese Methylierung verhindert die Spaltung der entsprechenden Sequenz der eigenen DNA, so dass nur fremde, unmethylierte DNA abgebaut wird. Restriktionsendonukleasen dienen experimentell als präzise Werkzeuge für die Basensequenzbestimmung von DNA, der Isolierung von Genen sowie der gentechnologischen Konstruktion neuer DNA-Moleküle. Restriktionsendonukleasen erkennen spezifische Sequenzen von vier bis acht Basenpaaren und spalten je eine Phosphodiesterbindung in beiden Strängen. Diese Erkennungssequenzen sind immer rotationsspiegelsymmetrisch angeordnet (Palindrom). Spaltstellen in beiden Strängen sind entweder um einige Nukleotide versetzt, so dass einzelsträngige, überhängende Enden entstehen („sticky ends“), oder sie liegen einander genau gegenüber, so dass sogenannte glatte Enden („blunt ends“) gebildet werden. Ein weiterer Enzymtyp schneidet außerhalb der Erkennungssequenz.

2.2 Aufgabenstellung

Die unter 1.3. aus *E. coli* HB101 isolierten Plasmid-DNAs A und B sollen mittels einer Restriktionsspaltung und gelelektrophoretischem Nachweis der entstehenden DNA-Fragmente charakterisiert werden. Bei dem Plasmid A handelt es sich um das Plasmid pAT153, einen Vektor der Größe von 3654 Basenpaaren (bp). Das Plasmid B enthält ebenfalls pAT153, jedoch mit einem zusätzlichen DNA-Fragment, das in die Spaltstelle des Restriktionsenzym BamHI eingefügt worden war. Dieses zusätzliche BamHI-Fragment ist 1760 bp groß. Im Versuch sollten nach der Restriktionsspaltung der Plasmide A und B mit BamHI und anschließender Gelelektrophorese also im Fall des Plasmids A lediglich das linearisierte gesamte Plasmidmolekül (3654 bp) zu sehen sein, im Fall des Plasmids B zusätzlich das BamHI-Fragment mit einer Größe von 1760 bp. Unter den hier gegebenen Bedingungen wandern große Fragmente langsamer, also weniger weit in das Gel hinein als kleinere Fragmente.

Abb.1: Kartierung der Plasmide



2.3 Praktische Durchführung

Die Ansätze für Plasmide A und B werden in neue 1.5 ml-Reaktionsgefäße pipettiert:

<u>Ansatz A</u>	<u>Ansatz B</u>
6 µl Plasmid-DNA A	6 µl Plasmid-DNA B
11 µl TE/RNase	11 µl TE/RNase
2 µl Restriktionspuffer	2 µl Restriktionspuffer
1 µl Bam HI	1 µl Bam HI

Ansatz 1 dient als Kontrolle der Plasmid-DNA ohne Restriktionsenzym. Die Ansätze werden für 30 – 60 min bei 37°C inkubiert. Nach der Inkubation werden zu allen Ansätzen je 5 µl Stoppuffer pipettiert und gemischt, die Proben werden dann für 2 sec zentrifugiert. Anschließend werden die Proben auf das vorbereitete Agarose-Gel (1%ig) aufgetragen (Hinweis: mit 20 µl-Pipette je Ansatz 20µl langsam und luftblasenfrei in eine Vertiefung des Gels pipettieren!). In die Mitte des Gels wird ein DNA-Marker aufgetragen. Nach etwa 30 min Elektrophorese bei 200 Volt wird das Gel unter ultraviolettem Licht betrachtet (**Unbedingt eine Schutzbrille tragen; das Gel nur mit Handschuhen berühren !!!!!**)

3. Nachweis der kodierenden Sequenz der CK2 α mit Hilfe der Polymerase-Kettenreaktion

3.1 Einführung

Die Polymerase-Kettenreaktion (engl. Polymerase Chain Reaction; PCR) ist eine Methode zur Amplifikation beliebiger Nucleinsäuren und zählt zu den wichtigsten wissenschaftlichen Entwicklungen in den vergangenen Jahren. Sie hat die Molekularbiologie schlechthin revolutioniert. Täglich wächst die Zahl der Artikel in wissenschaftlichen Fachzeitschriften über Verbesserungen, neue Anwendungen und erzielte Durchbrüche auf den Gebieten der Grundlagen- und angewandten Forschung, aber auch der Medizin, der Diagnostik und anderen Bereichen.

Der Wert der PCR wird am besten bei der Betrachtung üblicher Nucleinsäure-Analyseverfahren deutlich. So besitzt die Gelelektrophorese eine untere Nachweisgrenze von etwa 5 ng DNA. Errechnet man die Menge der darin vorhandenen Teilchen, so ergibt sich im Falle eines Fragments von 500 Basenpaaren eine Anzahl von 10^{10} Molekülen. Zur Steigerung der Empfindlichkeit kann die DNA in solchen Gelen anschließend auf andere Trägermaterialien übertragen werden, um dann z.B. radioaktiv nachgewiesen zu werden. Hierdurch läßt sich die Empfindlichkeit auf den Nachweis von etwa 10^8 Molekülen steigern, jedoch ist dies für zahlreiche diagnostische Fragestellungen immer noch bei weitem nicht ausreichend. In der viralen Diagnostik trifft man z.B. häufig auf Titer von unter 1000 Partikeln pro ml Blut. Auch die derzeit empfindlichsten routinemäßig einsetzbaren Analyseverfahren erreichen bei weitem nicht die Sensitivität der PCR: Diese ist in der Lage, aus einem einzelnen (!) Nucleinsäureabschnitt unter optimalen Bedingungen binnen weniger Stunden

bis zu 10^{12} identische Moleküle zu erzeugen, die dann z.B. einem diagnostischen Nachweis zur Verfügung stehen.

3.2 Theorie

Die PCR macht sich die Eigenschaft von Polymerasen zunutze, DNA zu duplizieren. Voraussetzung für diesen Prozess ist eine einzelsträngige Matrizen-DNA mit einem kurzen Abschnitt doppelsträngiger DNA mit einem freien 3'-OH-Ende, das dann entsprechend verlängert werden kann. Der Erfinder der PCR-Methode, Kary B. Mullis, erkannte 1983, dass ein solcher kurzer Abschnitt künstlich geschaffen werden kann, indem man dem Reaktionsansatz DNA-Fragmente von ca. 20 Nucleotiden Länge, auch Oligonucleotide oder Primer genannt, hinzufügt. Diese binden an den zu amplifizierenden DNA-Einzelstrang - in der englischen Terminologie als „Annealing“ bezeichnet - und können nun von der DNA-Polymerase verlängert werden. Denaturiert man anschließend die neu synthetisierte doppelsträngige DNA durch eine Temperaturerhöhung in ihre Einzelstränge, so können neue Primermoleküle binden und der Prozess wiederholt sich. Gibt man in jeden PCR-Ansatz zwei solcher Primer, einen der am „sense“-Strang und einen der am „antisense“-Strang bindet, so erhält man mit jedem Zyklus von Neusynthese und Denaturierung eine Verdoppelung des zwischen den Primern befindlichen DNA-Abschnitts (siehe Abb. 2). Die PCR führt also zu einer exponentiellen Amplifikation, da auch die jeweils neu gebildeten Stränge als Matrize zur Verfügung stehen. Und noch etwas erkannte Mullis: Verwendet man eine temperaturstabile DNA-Polymerase, wie man sie aus Organismen kennt, die in heißen Quellen leben, so ist es möglich, viele Zyklen ohne Unterbrechung ablaufen zu lassen.

Ein typischer PCR-Verlauf besteht in der Regel aus ca. 30 Zyklen, wobei während eines jeden Zyklus drei Temperaturstufen durchlaufen werden. Die Reaktion wird zunächst mit einer Temperaturerhöhung auf 90-98° C gestartet. Dieser Schritt dient der Denaturierung der eingesetzten DNA in ihre Einzelstränge. Da die Ausgangs-DNA in einer recht komplexen, hochmolekularen Struktur vorliegt, wählt man hier eine Zeit von ca. 5-10 min, um insbesondere auch GC-reiche Sequenzen zu denaturieren. Zweiter Schritt der Reaktion ist die Anlagerung, das „Annealing“ der Primer. Dazu muss der Reaktionsansatz auf eine durch die Primer festgelegte Temperatur abgekühlt werden. Die Anlagerung der Primer an den Einzelstrang der Zielsequenz bestimmt entscheidend die Spezifität der PCR. Nach dem „Annealing“-Schritt erhöht man die Temperatur auf 72° C. Diese Temperatur stellt ein Aktivitätsoptimum des verwendeten Enzyms, der Taq-DNA-Polymerase dar und gewährleistet die schnelle Verlängerung („Extension“) der Primer. Für die beiden Schritte „Annealing“ und „Extension“ reichen in der Regel Zeiten von jeweils weniger als einer Minute aus. Im nächsten Schritt der Reaktion heizt man dann erneut auf 92-95° C, um die DNA wieder in ihre Einzelstränge zu zerlegen. Da nur die neu entstandenen Abschnitte einzelsträngig gemacht werden sollen, reicht ab jetzt eine wesentlich kürzere Zeitspanne zur vollständigen Denaturierung (10-60 Sekunden). Für die meisten Anwendungen liegt nach 30-35 Zyklen genügend Produkt zur weiteren Analyse vor.

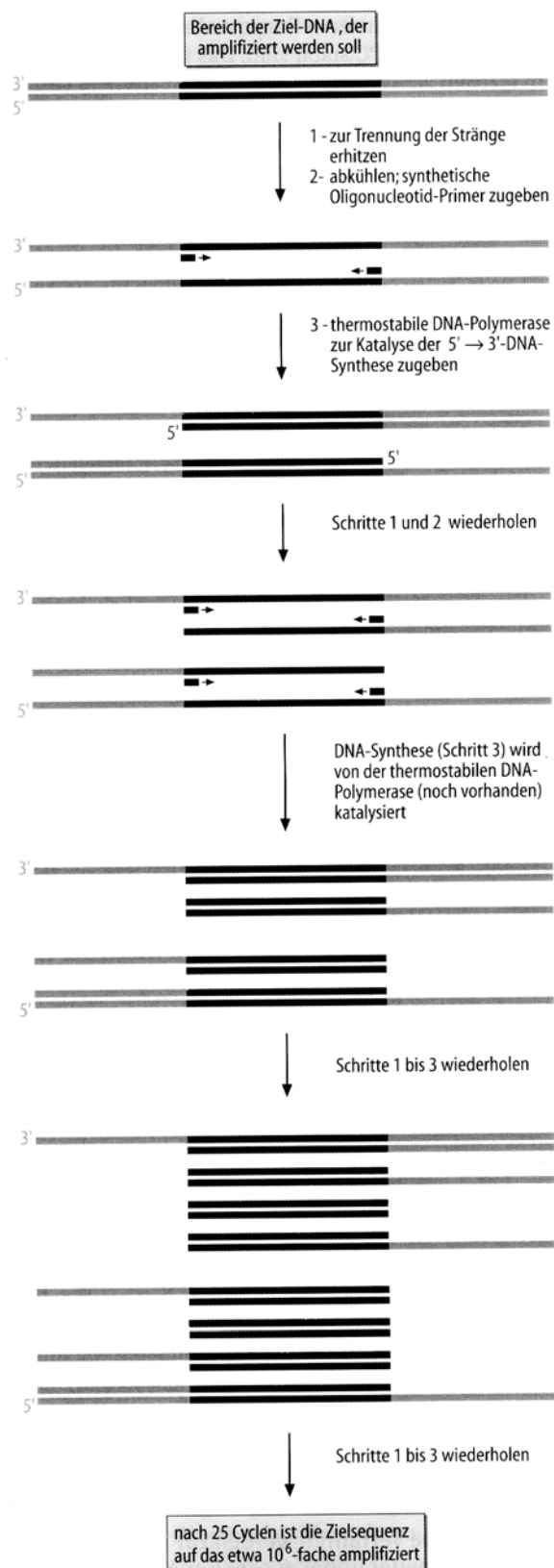


Abb. 2: Schematische Darstellung der PCR. In einem zyklischen Prozess aus Denaturierung, Primer-„Annealing“ und Primer-Extension verdoppelt sich die Zahl der DNA-Abschnitte mit jedem Zyklus. Die Zahl der Kopien wächst exponentiell mit jeder Runde.

3.3 Praktische Durchführung

Es sollen zwei DNA-Proben auf die für die katalytische α -Untereinheit der Proteinkinase CK2 kodierende Sequenz hin untersucht werden. Bei den DNA-Proben handelt es sich um Plasmide, von denen nur eines die kodierende Sequenz enthält. Zum Nachweis der CK2 α -cDNA wird diese mit Hilfe zweier Primer, die am 5'- bzw 3' -Ende binden, mit Hilfe der PCR amplifiziert und das erhaltene PCR-Produkt mit Hilfe der Agarose-Gelelektrophorese analysiert.

Pipettierschema:

Achtung: Kontaminationsgefahr durch Fremd-DNA! Sehr sorgfältig pipettieren!

	1	2
Plasmid +	5 μ l	
Plasmid -		5 μ l
Mastermix +	34 μ l	
Mastermix -		34 μ l
Pfu-Polymerase	1 μ l	1 μ l

PCR:

180 sec 94° C
 20 sec 94° C
 30 sec 54° C
 60 sec 72° C
 7 min 72° C
 4° C
 mit 30 Zyklen

Nach Ablauf der PCR

- ⇒ jedem Ansatz 10 μ l Auftragspuffer(5-fach) zusetzen,
- ⇒ vorsichtig mischen,
- ⇒ 20 μ l zur Analyse auf ein Agarosegel auftragen.
- ⇒ 5 μ l kb- DNA Marker in einer gesonderten Geltasche mit auftragen
- ⇒ Laufrichtung des Gels von Anode (schwarz) zu Kathode (rot)
- ⇒ 80 V bei maximaler Amperezahl
- ⇒ Blaumarker sollte 2 cm weit gelaufen sein
- ⇒ Dauer etwa 30 Minuten

Gel unter UV-Licht (254 nm) analysieren.