



Schülerversuch „Restriktionsverdau“

Theorie

Restriktionsenzyme, genauer Restriktionsendonukleasen, sind Enzyme, welche DNA innerhalb einer Sequenz schneiden können.

Mit der Entdeckung der Restriktionsenzyme begann die Entwicklung der Molekularbiologie. Sie ermöglichen die gezielte Herstellung von DNA-Fragmenten, die dann isoliert und zu neuen Konstrukten zusammengesetzt werden können. Enzyme, die klebrige Enden erzeugen, sind dabei besonders hilfreich, da sich die überlappenden Enden leicht miteinander verbinden lassen. Für ihre grundlegenden Arbeiten zur „Entdeckung der Restriktionsenzyme und ihre Anwendung in der Molekulargenetik“ bekamen Werner Arber, Daniel Nathans und Hamilton Othanel Smith 1978 den Nobelpreis für Physiologie oder Medizin.

Der Name „Restriktionsenzym“ stammt von dem bakteriellen Restriktions-Modifikationssystem, das der Abwehr fremder (viraler) DNA dient. Viele Bakterien besitzen stammspezifische Restriktionsendonukleasen. In der eigenen DNA sind die entsprechenden Erkennungssequenzen modifiziert (methyliert) und werden daher nicht geschnitten. Wenn Viren, die sich in den Bakterien vermehren (Bakteriophagen) ihre DNA injizieren, ist diese nicht methyliert und wird daher abgebaut. Nur Viren, die aus Bakterien desselben Stammes kommen, besitzen das richtige Methylierungsmuster und können sich weiter vermehren. Die Vermehrung der Viren ist damit auf diesen Stamm „beschränkt“ (Restriktion = Beschränkung)

Die Positionen der Schnittstellen einzelner Restriktionsenzyme werden oft in Restriktionskarten dargestellt. Solche Karten gibt es beispielsweise für Genome und Plasmide. Über die Länge der DNA-Fragmente, die beim Schneiden der DNA durch Restriktionsenzyme entstehen, können DNA-Abschnitte im Vergleich mit einer Restriktionskarte identifiziert werden.

Jede Restriktionsendonuklease erkennt eine spezifische DNA-Basensequenz. Nach ihren Eigenschaften unterscheidet man drei Typen:

Typ I Schneidet die DNA an einer zufälligen Stelle weit von der Erkennungssequenz entfernt; benötigt ATP und transferiert eine Methylgruppe.

Typ II Schneidet die DNA innerhalb der Erkennungssequenz; benötigt kein ATP und hat keine Methyltransferase-Aktivität.

Typ III Schneidet die DNA etwa 20 bis 25 Basenpaare von der Erkennungssequenz entfernt; benötigt ATP und transferiert eine Methylgruppe

(Quelle: <http://de.wikipedia.org/wiki/Restriktionsenzyme>)

In diesem Versuch soll ein bestimmtes Fragment, das zuvor in ein Plasmid kloniert wurde, mit Restriktionsenzymen ausgeschnitten werden, um den Erfolg der Klonierung zu kontrollieren. Bei dem Fragment handelt es sich um cDNA, die für ein Protein namens Sec62 codiert. Dieses Protein spielt eine Rolle beim Prostatakarzinom, einer häufigen Erkrankung des Menschen, die am Uniklinikum in Homburg erforscht wird. Der Restriktionsverdau wird mittels Gelelektrophorese überprüft.

Versuchsdurchführung

Die Teilnehmer erhalten 2 Plasmide, von denen eines die für Sec62 kodierende cDNA enthält, das andere nicht. Beide Plasmide werden mit Restriktionsendonukleasen verdaut. Diese "zerschneiden" dabei als molekulare Scheren den DNA Strang, wobei jede Restriktionsendonuklease genau eine spezifische Sequenz auf der DNA als Schnittstelle erkennt. Enthält das Plasmid die für Sec62 kodierende cDNA, so wird dieses Stück ausgeschnitten und kann in der nachfolgenden Agarose-Gelelektrophorese vom Rest des Plasmides aufgrund seiner geringeren Größe getrennt werden. Ist keine cDNA in dem Plasmid enthalten, so wird das Plasmid nur linearisiert und das Bild der Agarose-Gelelektrophorese liefert nur eine Bande.

Pipettierschema:

	Ansatz 1	Ansatz 2
Plasmid 1	1 μ l	-
Plasmid 2	-	1 μ l
10-fach Puffer	1 μ l	1 μ l
Wasser	7 μ l	7 μ l
Enzym 1	0,5 μ l	0,5 μ l
Enzym 2	0,5 μ l	0,5 μ l

Die Ansätze werden für 45 min bei 37°C inkubiert, anschließend werden jedem Ansatz 2 μ l DNA-Probenpuffer zugesetzt. Diese Proben werden dann auf einem Agarosegel aufgetrennt und die DNA angefärbt. Die Teilnehmer erhalten ein Foto von dem Gel, auf dem die Fragmente zu sehen sind.

Kompetenzzentrum Molekulare Medizin



Dr. Gabriele Amoroso
Fachrichtung 2.3 - Medizinische Biochemie und Molekularbiologie
Universität des Saarlandes
Universitätskliniken Geb. 44
D-66424 Homburg/Saar
Phone: +49(0)6841-16-26541
Fax: +49(0)6841-16-26288
Email: amoroso@mx.uni-saarland.de
<http://www.uni-saarland.de/komm>