

Analyse rekombinanter Plasmid-DNA durch Restriktionskartierung und Kolonie-PCR

Versuch 8

Grundpraktikum Biowissenschaften, Studiengang Bioinformatik WS 2008/2009

Sascha Tierling, Christina Lo Porto und Jörn Walter

FR. 8.2 Biowissenschaften • Universität des Saarlandes

Tel 302 3295

„Biologie“ der Plasmide

Alle Bakterien besitzen ein zirkuläres Chromosom; daneben können sie noch ein oder mehrere DNA-Moleküle enthalten, die Plasmide (künstlich hergestellt) oder Episome (natürlich vorkommend) genannt werden. Episome/Plasmide können sich autonom, d.h. unabhängig vom Chromosom des Wirtes replizieren. Sie haben eine Größe von 3-50 Kilobasenpaare (kBp) und sind für das Überleben der Bakterienzelle nicht essentiell (ausser es handelt sich um besondere selektive Bedingungen, s.u.). Plasmide haben in der Gen- und Biotechnologie eine große Bedeutung als Träger (Vektoren) für fremdes genetisches Material. Alle künstlich hergestellten und im Labor benutzten Plasmide leiten sich von natürlichen Episomen ab und haben durch molekularbiologische Manipulationen eine Reihe von gewünschten Eigenschaften erhalten (s.u.). Im Labor werden Plasmide in Bakterien oder eukaryotische Zellen über eine künstlich induzierte Aufnahme eingebracht (Transformation/Transfektion). In Bakterien wird dabei in eine Zelle in der Regel nur ein Plasmid aufgenommen, da sich bei mehrfacher Aufnahme Plasmide mit gleichen Replikationsursprüngen (origins) aufgrund von Inkompatibilitäten gegenseitig ausschließen. Zwei Plasmide sind dann inkompatibel (und gehören dann zur gleichen Inkompatibilitätsklasse), wenn sie ohne selektiven Druck nicht in einer Bakterienzelle koexistieren können. Das ist immer dann der Fall, wenn beide Plasmide denselben *oriR* (Origin of Replication) enthalten.

Plasmide sind in der Regel wirtsspezifisch, d.h. eine Vermehrung ist nur in einem engen Bereich von Wirtsorganismen möglich. Im Labor eingesetzte bakterielle Plasmide haben folgende Eigenschaften. Sie besitzen:

- Einen Origin (ori) für Replikation und damit die Fähigkeit zur autonomen Replikation
- Zur Selektion geeignete Marker-Gene, oft auch mehrere (z.B. Resistenzgen gegen bestimmte Antibiotika (Bakterien), oder Gene mit dem bestimmte Stoffwechseldefizienzen des Wirtes komplementiert werden können (Hefe).
- Geeignete Erkennungssequenzen für Restriktionsendonukleasen („Schnittstellen“) für die Verknüpfung mit fremder DNA. bzw. zur Plasmidanalyse (s.u.)
- Promotoren und andere regulatorische Elemente für die Expression (Transkription) der fremden Gene

Mit Hilfe gentechnischer Methoden kann man beliebige DNA-Fragmente mit Plasmiden verknüpfen (in die Plasmide „einbauen“) und vermehren. Bei der Teilung der Zellen (Bakterien, Hefe) werden solche **rekombinanten Plasmide** repliziert und auf die beiden Tochterzellen verteilt. Somit wird die eingeschleute Fremd-DNA vermehrt. Durch Selektion einzelner Zellen (Kolonien auf Agar-Platten) werden identische Kopien (Klone) eines Plasmid erzeugt. Im Laborjargon spricht man daher von der Klonierung von DNA Fragmenten in Plasmiden. Plasmide werden in nahezu allen molekularbiologisch arbeitenden Laboren nicht nur zur Vermehrung der DNA benutzt, sondern auch um die „klonierte“ DNA zu exprimieren, d.h. die eingebrachte DNA wird transkribiert und ggf. in ein Protein translatiert (Beispiel: Herstellung von rekombinanten Insulin in einer Bakterienzelle). Plasmide sind somit Hilfsmittel, um Genbanken herzustellen und Proteine in ausreichenden Mengen zu produzieren.

Die Verknüpfung/Ligation von Plasmid-DNA und Fremd-DNA (Fragment) erfolgt *in vitro* im Reagenzglas. Nach der Ligation werden die rekombinanten Plasmide mittels **Transformation** in Wirtorganismen (Bakterien, Hefen, Eukaryotische Zellen) zur Vermehrung eingeschleust. Über nahezu alle künstlich hergestellten Plasmide gibt es Sequenzinformationen, die wichtig für die Herstellung, Analyse und Bearbeitung der rekombinanten Plasmide sind. Mit Hilfe dieser Sequenzdaten kann man Karten dieser Plasmide erstellen (siehe Anhang). Die am häufigsten im Labor benutzten bakteriellen Plasmide sind pCR2. 1, pGEM, pBlueSkriptII, die alle eine hohe Kopienzahl von ungefähr 200 Kopien/Zelle aufweisen und Resistenzen gegen die Antibiotika Ampicillin und Kanamycin vermitteln. In diesem Praktikum analysieren wir 2 rekombinante pCR2. 1 Plasmide.

Wird in ein Bakterium durch Transformation ein Plasmid eingeschleust, vermittelt dies eine Antibiotika—Resistenz, die zur Selektion von Transformanden verwandt wird. Die transformierten werden dazu auf einem antibiotikahaltigen Nährboden ausplattiert. Es vermehren sich auf dem Nährboden nur solche Bakterien, die ein Plasmid aufgenommen

haben, nicht transformierte Bakterien sterben oder werden im Wachstum gehemmt. Als Folge der Vermehrung bilden sich auf den Nährböden (Platten) aus einzelnen, resistenten Bakterien Kolonien von 10^6 Bakterien mit identischem genetischen Material = **Klone**. Die im Praktikum untersuchten Plasmide pCR2.1 Derivate kodieren für ein β -Lactamase-Enzym, das das vorhandene Ampicillin abbaut und damit Resistenz gegen das Penicillin vermittelt. In die Plasmide A und B wurde kurze DNA Fragmente genomischer DNA der Maus inseriert, die zuvor mittels PCR hergestellt wurden (siehe beiliegende Karten). Die rekombinanten Plasmide wurden aus einzelnen transformierten *E.coli* Zellen, die in flüssigem Selektions-Medium angezogen wurden, isoliert. Bei der Isolierung („Plamid-Präparation“) trennt man die Plasmid-DNA von der chromosomalen DNA des Bakteriums und den Proteinen der Zelle durch verschiedene Fällungs- und Zentrifugationschritte ab. Die nach einer solchen Isolierung erhaltenen Plasmide liegen vornehmlich in einer zirkulären, überspiralisierten (ccc = closed covalent circular) - oft auch als „supercoiled“ bezeichneten-Form vor. Einige Moleküle sind durch Scherkräfte, die im Verlauf des Aufschlusses einwirken und Einzelstrangbrüche verursachen, in eine relaxierte „open-circular“ (oc) Form überführt worden. Die Analyse beider nativer Formen läßt keine Aussage über ihre Größe zu, da sie in einer Gelelektrophorese (s.u.) nicht nur größenabhängiges sondern auch konformationsabhängiges Laufverhalten aufweisen. Durch Zerschneiden mit Restriktionsendonukleasen werden beide Formen in lineare Moleküle überführt, deren Größe man aufgrund ihrer Wanderung im Gel eindeutig bestimmen kann. Mit Hilfe einer solchen Restriktionsanalyse läßt sich daher bestimmen, ob die Plasmide tatsächlich das gewünschte Stück fremder DNA enthalten. Als alternative Methode zum Nachweis der „Insertion“ fremder DNA in dem Plasmid kann man eine Polymerase-Ketten-Reaktion durchführen. Man benutzt dazu die Plasmid DNA als Matritze, um ein PCR Fragment der Insertion herzustellen.

Charakterisierung der Plasmide A und B

Versuchsdurchführung:

Im Praktikum werden zwei rekombinante Plasmide A und B analysiert, in die zwei verschiedene fremde DNA Fragmente in das Plasmid pCR2.1 inseriert wurden. Mit Hilfe mehrerer Restriktionsendonuklease-„Verdaus“ sowie einer PCR und anschließender Gelelektrophorese sollen Sie überprüfen, ob in der Tat fremde DNA in das Plasmid inseriert wurde. Zudem sollen Sie die Größe und die Orientierung der Insertion in den Plasmiden bestimmen. Für die Restriktionsanalyse erhalten Sie von uns die bereits zuvor aus Bakterien

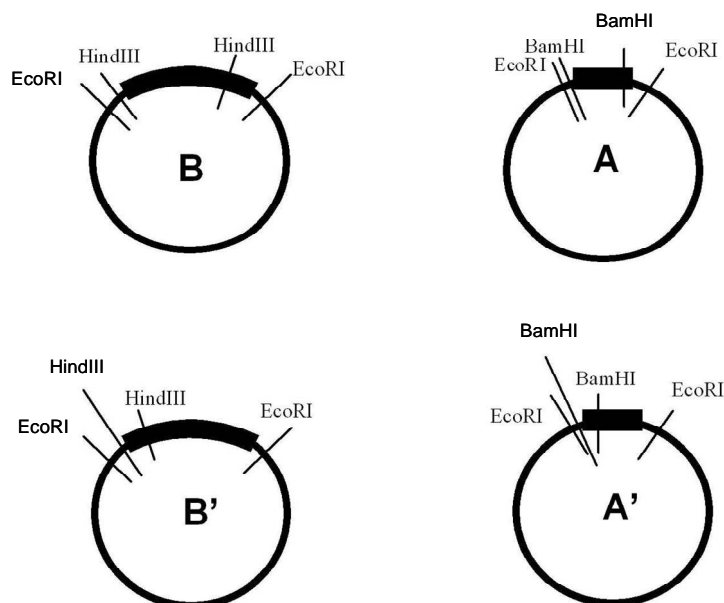
isolierte Plasmid-DNA. Im Einzelnen werden folgende Experimente mit dem Material durchgeführt:

1. Restriktionsverdau der Plasmide A und B mit Restriktionsendonukleasen

Theorie: Restriktions-Endonukleasen

Restriktionsendonukleasen (REs) spalten doppelsträngige DNA an bestimmten (in der Regel) symmetrischen 4-8 Basen langen Erkennungssequenzen (Basenabfolgen in der DNA) indem sie die Zucker-Phosphatrückgratbindung in beiden Strängen zwischen bestimmten Basen spalten. Sie benötigen dazu bestimmte Pufferbedingungen (Salze, pH) und Magnesium-Ionen. Ringförmige Plasmid-DNA-Moleküle werden durch Einwirkung der REs in lineare Moleküle (DNA-Fragmente) zerlegt. Einige dieser Enzyme erzeugen Fragmente mit stumpfen Enden (blunt ends), bei anderen steht ein Einzelstrang am Ende des Fragments etwas über (sticky ends). Je nach verwendetem Enzym ist die DNA-Sequenz des Überhanges unterschiedlich. Das R-Enzym *EcoRI* spaltet an der Sequenz 5'GAATTC3' (zwischen G und A) und hinterläßt sticky ends.

In den vorliegenden Plasmiden A und B sind je zwei Erkennungsstellen für das Enzym *EcoRI* bzw. *HindIII* (A) oder *BamHI* (B) vorhanden. Sie haben je nach Orientierung der eingebrachten DNA zwei Möglichkeiten A oder A', bzw. B oder B'. Im Praktikum sollen Sie herausfinden welche Orientierung vorlag. Machen Sie sich bitte vor Beginn des Praktikums eine kurze Skizze in welche Stücke die DNA nach Restriktion (s.u.) jeweils zerlegt werden.



Die Figur zeigt schematisch die beiden Plasmide (Linie) in die die Fremd-DNA (Balken) mit jeweils 2 Orientierungen inseriert vorliegen kann. Die Querstriche markieren die relative Position der Restriktionsschnittstellen.

Sie werden beide Plasmide mit *EcoRI* inkubieren und die durch *EcoRI* entstandenen DNA Fragmente mittels gelelektrophoretischer Auftrennung analysieren. Zusätzlich werden Sie das Plasmid A in einem separaten Ansatz A3 mit *BamHI* inkubieren, bzw. das Plasmid B im Ansatz B3 mit der Restriktionsendonuklease *HindIII* ebenfalls gelelektrophoretisch analysieren. (Wieviele DNA-Fragmente und welche relativen Größen erwarten Sie? Machen sie sich eine kurze Skizze).

In sechs 1,5 ml vorher beschriftete Reaktionsgefäßen werden mit Hilfe einer Pipette (0-20µl) und aufgesteckter Spitze (gelb) folgende Volumen aus den bereits gestellten Reaktionsgefäßen (stocks) (Plasmid A, Plasmid B, Restriktionsenzym (*HindIII*, *EcoRI*, oder *BamHI* (je 10U/ µl), 10x Puffer, H₂O bidest) pipettiert (Achtung für jeden Schritt die Spitze wechseln !!!). Die Mengen sind so klein, daß sie diese am besten als Tropfen am Innenrand des Gefäßes nebeneinander getrennt absetzen und dann durch abzentrifugieren mischen. Die Reaktionen und die stocks bitte soweit als möglich auf Eis belassen (ausser beim unmittelbaren Pipettieren). Bevor Sie anfangen, die Reaktionen zusammenzupipettieren, werden die Reaktionsgefäße mit Edding beschriftet, d.h. Gruppe und Inhalt (A1, A2, A3, B1, B2, B3).

A1: Negativkontrolle

2 µl DNA (1 µg) **Plasmid A**
 2 µl 10 x Puffer (Fermentas)
16 µl mit H₂O bidest

A2: Plasmid A/ Eco-Verdau

2 µl DNA (1 µg) **Plasmid A**
 2 µl 10xPuffer (Fermentas)
 1 µl *EcoRI* (10U/µl)
15 µl H₂O bidest

A3: Plasmid A/ Bam-Verdau

2 µl DNA (1 µg) **Plasmid A**
 2 µl 10xPuffer (Fermentas)
 1 µl *BamHI* (10U/µl)
15 µl H₂O bidest

B1: Negativkontrolle

2 µl DNA (1 µg) **Plasmid B**
 2 µl 10 x Puffer (Fermentas)
16 µl mit H₂O bidest

B2: Plasmid B/ Eco-Verdau

2 µl DNA (1 µg) **Plasmid B**
 2 µl 10 x Puffer (Fermentas)
 1 µl *EcoRI* (10U/µl)
15 µl H₂O bidest

B3: Plasmid B/ Hind-Verdau

2 µl DNA (1 µg) **Plasmid B**
 2 µl 10 x Puffer R (Fermentas)
 1 µl *HindIII* (10U/µl)
15 µl H₂O bidest

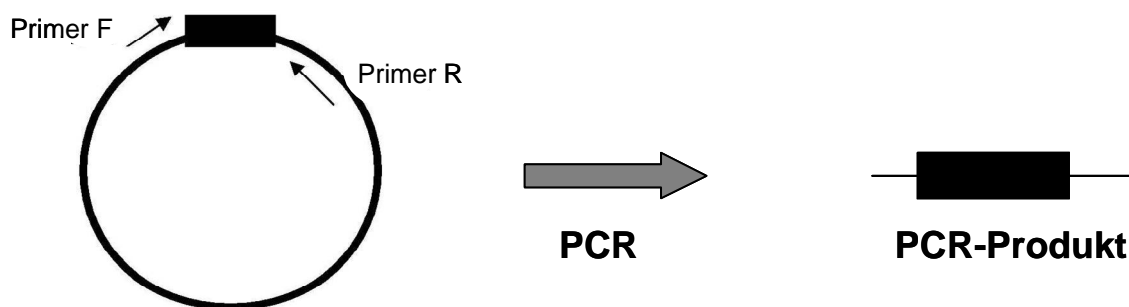
Die Ansätze werden in einer Tischzentrifuge kurz abzentrifugiert, durchmischt und für 1-2 h bei 37°C (Wasserbad) inkubiert und danach auf Eis gestellt. Zur Elektrophorese wird anschließend jede der 20 µl Reaktionen mit 4 µl Probenpuffer versetzt, gemischt, kurz abzentrifugiert und separat in acht aufeinander folgende Geltaschen des Agarosegels, s.u., gefüllt. Der Probenpuffer enthält die zwei Farbstoffe Xylencyanol (Grünblau) und Bromphenoblau, die Aufschluss über die Wanderstrecke der DNA im Gel geben.

Als Größenstandard wird eine 1 kb Leiter von der Firma Fermentas verwendet (siehe beiliegende Beschreibung). Von diesem schon mit Probenpuffer versetztem Größenstandard werden **10 µl** (nicht mehr !!!!!) in die separate Tasche des Gels rechts neben die Proben 1-6 aufgetragen.

Die im folgenden Teil 2 hergestellten PCR-Proben werden ebenfalls mit auf dieses Agarosegel in die rechts neben dem Standard liegenden Spuren nebeneinander aufgetragen („geladen“).

2. Direkter Nachweis der Insertion des Plasmids mittels PCR aus transformierten Bakterien (colony PCR)

In dem zweiten Versuch werden Sie die Präsenz und Größe einer Insertion in den Plasmiden mit Hilfe einer Polymerase-Ketten Reaktion (PCR) nachweisen.



Die Figur zeigt ganz schematisch die relative Lage der Forward und Reverse Primer im Bereich der Plasmidsequenzen sowie das zu erwartende Produkt, das aus Teilen des Plasmids (einfache Linie) und des Inserts (Balken) besteht. Bitte informieren Sie sich über den Mechanismus der PCR aus den Vorlesungsfolien.

Die Analyse der mit Hilfe der PCR generierten DNA-Fragmente erfolgt ebenfalls mit Hilfe einer anschließenden Gelelektrophorese. Als Ausgangsmaterial für die PCR erhalten Sie von

uns Bakterienplatten, auf denen Bakterien gewachsen sind, die das Plasmid pCR2. 1 enthalten sollten, da die Bakterien auf ampicillinhaltigen Medium wachsen können (selektioniert wurden). Auf den Platten finden sie zwei Arten von Kolonien (weisse und blaue). Nur die weissen Kolonien sollten ein Stück Fremd-DNA enthalten. Ziel des Versuches ist es, nachzuweisen, daß 1. in der Tat nur in weissen Kolonien Fremd-DNA“ kloniert“ vorliegt und 2. welche Größe diese DNA-Insertion hat.

Zum Versuch:

Sie setzen einen sogenannten Master Mix an, d.h. ein Gemisch der Reagenzien, die für eine PCR-Reaktion gebraucht werden. Dieser Mix wird auf 7 PCR-Gefäße eines Streifens von 8 aneinanderhängenden PCR-Gefäßen verteilt: 30 µl in jedes der 7 PCR-Gefäße, ein Gefäß bleibt leer. Der verbleibende Rest des Master-Mixes wird verworfen. Mit einem Zahnstocher stechen Sie kurz in eine Bakterienkolonie und überführen den Zahnstocher dann in ein PCR-Reaktionsgefäß (0,2 ml), in das Sie zuvor 30 µl des PCR-Master Mixes pipettiert haben. Sie rotieren den Zahnstocher kurz in der Flüssigkeit und nehmen ihn dann wieder heraus. Insgesamt wiederholen sie den Vorgang für je 2 weisse und eine blaue Kolonie jeder Platte (Plasmid A und B), sodass Sie insgesamt 6 Gefäße animpfen. In ein weiteres Gefäß (=7) haben Sie auch PCR-Mix pipettiert, in dieses Gefäß werden allerdings keine Bakterien eingebracht (Negativkontrolle). Die Gefäße werden dann mit einem Deckelstreifen verschlossen (Achtung: auf guten Sitz der Deckel achten!!!), in eine PCR-Maschine gestellt und das CyclyerProgramm gestartet.

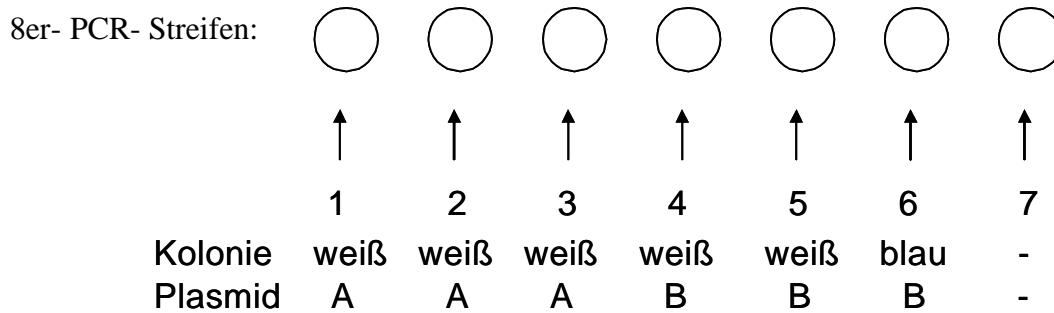
Durchführung:

KOLONIE-PCR-ANSÄTZE:

HANDSCHUHE TRAGEN, um Verunreinigungen der PCR mit Fremd-DNA zu vermeiden, AUF EIS PIPETTIEREN (Spitze bei jeden Schritt wechseln) UND PCR-REAGENZIIEN AUF EIS HALTEN. Der Master- Mix wird in einem 1,5 ml- Reaktionsgefäß wie folgt angesetzt:

- 30 µl 10xPuffer
- 222 µl H₂O bidest
- 30 µl dNTP-Mix (Nukleotid-Mix, 2,5 mM each)
- 6 µl 6 µM Primer forward
- 6 µl 6 µM Primer reverse
- 6 µl Taq Polymerase (5U/µl)

- o Master Mix kurz mischen und abzentrifugieren.
 - o Der Mix wird verteilt: je 30 µl in 7 PCR- Gefäße (am besten je 2 x 15 µl mit der 20 µl Pipette einfüllen)
 - o Zahnstocher mit Kolonieanteil in das Gefäß stellen und kurz rotieren, wieder herausnehmen und Zahnstocher in den Abfall werfen.
- Die 7 PCR- Gefäße werden nach folgendem Schema beschickt:



- o Die 0,2 ml Reaktionsgefäße sorgfältig schließen und zentrifugieren
- o auf Eis stehen lassen bis alle Gruppen fertig sind.
- o Den 8er- PCR- Streifen in die PCR Maschine stellen und das bereits einprogrammierte Programm starten:

Programm:

5 min 95°C
 20s 94°C }
 20s 52°C } 32 Zyklen
 20s 70°C }
 5 min 70°C
 4°C unendlich

Durch das erste Erhitzen der Reaktionsgemische (5 min bei 95°C) werden die Bakterien aufgelöst, die DNA freigesetzt und denaturiert (d.h einzelsträngig). In den nachfolgenden sich 32 x wiederholenden Zyklen werden bei 94°C die DNA Stränge denaturiert, bei 52°C die Primer an die Zielsequenz annealt (angelagert), bei 72°C arbeitet dann die Polymerase und verlängert die Primer. Im abschließenden 70°C Schritt werden die letzten Polymerisationen vervollständigt.

Das PCR- Programm läuft ungefähr zwei Stunden.

Anschliessend werden zu den 30 µl PCR-Reaktion 6 µl Probenpuffer zupipettiert und vor dem Auftragen auf das Gel gemischt. 20 µl dieses Gemisches wird auf das Gel, wie oben beschrieben, aufgetragen., d.h. die Proben werden neben den Proben des Versuchs-Teils 1 (Restriktionsverdau) und der 1kb- Leiter von Fermentas aufgetragen.

Gelelektrophoretische Auftrennung der Restriktions- und PCR Ansätze

Gelelektrophorese

Die Gelelektrophorese ermöglicht die physikalische Trennung von geladenen Molekülen, indem ein in einem flüssigen elektrolythaltigen Medium (Puffer, hier Borat-Salze) ein Stromfluß durch eine Gel-Matrix (Agarose) erzeugt wird. DNA-Fragmente (Restriktions- und PCR Fragmente) wandern aufgrund ihrer negativen Ladung während der Elektrophorese durch die Poren des Agarose-Gels in Richtung Anode (positiv). Dabei hängt die Laufgeschwindigkeit von der Größe und Form der Moleküle und der Dichte der Gelmatrix ab. Dieses ermöglicht die Trennung verschieden großer Fragmente. Die Größenbestimmung der linearen Fragmente erfolgt durch Vergleich der Laufstrecken mit einer ebenfalls im Gel aufgetragenen DNA bekannter Größe (im vorliegenden Fall die kb-Leiter). Um die DNA im Gel überhaupt sichtbar zu machen, wird das Gel nach der Elektrophorese in Ethidiumbromid-Lösung für 20 min. inkubiert. Dabei lagert sich das unter UV-Licht fluoreszierende Ethidiumbromid in den DNA-Doppelstrang ein und ermöglicht so die Visualisierung der DNA-Fragmente im UV Licht. Da viele DNA-Moleküle gleicher Größe sich in einem bestimmten Abschnitt eines Gels anreichern, sieht man die Fluoreszenz in diesen Bereichen als Strich — man bezeichnet diese Signale auch als „DNABanden“. Aufgrund seiner interkalierenden Eigenschaft ist Ethidium ein starkes Mutagen, daher müssen beim Umgang mit diesem Farbstoff Nitrilhandschuhe und Schutzbrillen getragen werden, um die Haut vor Aufnahme zu schützen.

Herstellung des Agarose-Gels und Durchführung der Elektrophorese

Aus 100 ml 1%iger Agarose-Lösung in 0,5 x TBE wird ein Agarose-Gel gegossen: 1g Agarose wird in einen Erlenmeyerkolben trocken eingewogen, 100 ml TBE-Puffer und ein Magnetrührstab hinzugegeben. Die Suspension wird in der Mikrowelle mehrmals zum Kochen gebracht, bis sich die Agarose vollständig gelöst hat (Vorsicht, heiß und beim Schütteln ist Siedeverzug möglich - daher Schutzbrille und dicke Handschuhe tragen!!). Die Agarose-Lösung wird auf einem Magnetrührer abgekühlt. Die Agarose ist kalt genug, wenn

sich der Erlenmeyerkolben auf der Arminnenseite nicht mehr schmerzhaft heiss anfühlt (ca. 60-65°C). Dann wird die Agaroselösung in die abgedichtete und mit einem Kamm versehene Gelform gegossen. Das Gel sollte ca. 0,5 cm dick sein, der Schaft des Kammes soll vollständig oberhalb des Gels liegen. Nach Erstarrung des Gels wird dieses mit 0,5xTBE (=Laufpuffer) bedeckt, der Kamm kann nun gezogen werden und nun können die Proben in die entstandenen Vertiefungen im Gel (Geltaschen) geladen werden: beim Aufziehen der Proben in die Pipettenspitze darauf achten, dass keine Luftblasen mitgezogen werden und beim „Herauspipettieren“ der Probe diese LANGSAM in die Tasche sinken lassen! Nicht die Probe mit Druck ausblasen, da sie sonst aus der Tasche wieder herausschwimmt.

Tasche 1-6 : 20 µl Restriktionsverdau mit Probenpuffer

Tasche 7 : 10 µl 1kb-Leiter

Tasche 8-14 : 20 µl Kolonie-PCR-Produkt mit Probenpuffer

Die DNA wird bei einer Spannung von 150 V aufgetrennt bis sich die (untere) Bromphenolblau-Front ca. 2 cm oberhalb des unteren Gelrands befindet. Das Gel wird in einer 2 µg/ml Ethidiumbromid-Lösung in 0,5 x TBE mindestens 20 min angefärbt und auf einem UV-Tisch (Wellenlänge: 254 nm) bildlich erfasst.

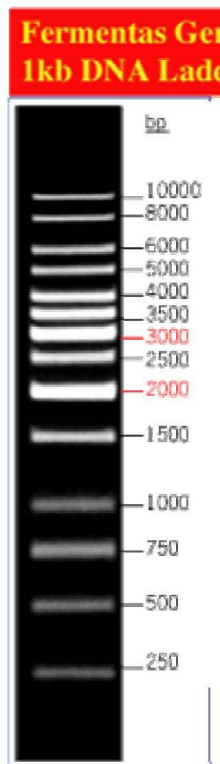
Beim Umgang mit nicht abgeschirmtem UV-Licht bitte Schutzbrille tragen!

Nach dem Versuch haben Sie folgende Aufgaben (kurzes Protokoll, ungefähr eine Seite) zu erfüllen:

1. Sie kleben das Bild des Gels auf eine Seite, die sie mit ihrem Namen und Gruppennummer und Datum beschriftet haben
2. Sie markieren die Spuren des Gels mit den Zahlen 1-14
3. Sie geben an, was in jeder der Spuren „geladen“ wurde !!!! - auch angeben wenn ein Fehler beim Pipettieren gemacht wurde (Spuren verwechselt etc.) !!!
4. Sie vergleichen die Größen der DNA Banden mit dem Größenstandard und schätzen die ungefähre Größe Ihrer DNA-Fragmente aus diesem Vergleich ab.
5. Sie bezeichnen die Spuren mit den Negativ-Kontrollen und diskutieren kurz, welchen Unterschied diese „unverdauten Banden“ im Vergleich zur „verdauten“ DNA aufweisen.
6. Sie vergleichen ihre „Daten“ mit der mitgelieferten Karte und machen eine Aussage, in welcher „Orientierung“ das Stück „Fremd-DNA“ im Plasmid vorliegt.
7. Sie diskutieren kurz warum Sie eventuell keine oder „falsche“ Banden auf ihrem Gel sehen.

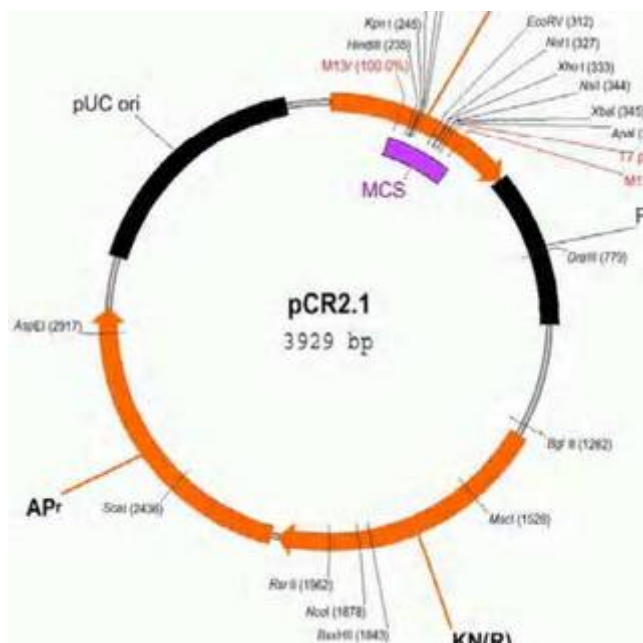
Anhang:

Größenstandard für Agarosegele: **Fermentas GeneRuler 1kb DNA Ladder**



Karte von pCR2.1

LACZ



Legende für pCR2.1:

AP = β -lactamase
KN = Kanamycin-Resistenz-Gen
LACZ = Teil des LacZ-Gens zur α -Komplementation
pUCori = Origin of replication
F1 intergenic region = Region
Notwendig zur Herstellung von
Einzelstrang-DNA