

EINFÜHRUNG
IN DIE
GRUNDARBEITSTECHNIKEN
DER
MOLEKULARBIOLOGIE



Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	2
Sicherheitsvorschriften	4
Allgemeine Regeln zu Hygiene und Verhalten	4
Entsorgungsrichtlinien	4
Die wichtigsten Laborgeräte	5
Die Laborwaage	5
Der Labormixer oder Vortexer.....	5
Übung zur Benutzung des Vortexers.....	5
Die Mikrozentrifuge	6
Die automatische Pipette	7
Die Auswahl der richtigen Pipette.....	7
Die korrekte Benutzung einer Pipette	8
Übung zur Benutzung der Pipette	9
Übung zur Genauigkeit der Pipette	9
Übung zur Benutzung von Pipette und Zentrifuge	10
Der Autoklav	10
Regeln zum Umgang mit dem Autoklaven	12
Arbeitstechniken mit Bakterien	13
Nährmedien	13
Kulturformen	13
Flüssigkultur	13
Agarplatte	13
Herstellung von LB-Agarplatten.....	14
Methoden zur Anzucht und Isolation einzelner Bakterien	14
Anlegen einer Übernacht-Kultur	14
Verdünnungsreihe	15
Ausplattieren der Verdünnungsreihe	15
Vereinzeln von Bakterien.....	16
Keimzahlbestimmung aus Milchprodukten	17
Die Arbeit mit Plasmid-DNA.....	18
Die Isolation von Plasmiden mit Hilfe eines kommerziellen Kits	18
Funktionsweise des Quiaprep-Kits	18
Verlaufsschema der Plasmid-Isolation	19
Original-Protokoll des Quiaprep-Kits	21
Agarose-Gelelektrophorese der isolierten Plasmide.....	22
Benötigte Komponenten	22
Agarosegel	22
Elektrophoresepuffer	22
Gelladungspuffer	22
Gelkammer.....	23
Größenstandard	23
Färbelösung und UV-Tisch.....	24
Durchführung der Gelelektrophorese	24
Gießen des Gels	24
Beladen und Lauf des Gels	25
Färbung und Auswertung des Gels	25
Quantifizierung der isolierten Plasmid-DNA	26
Anlegen einer Verdünnungsreihe von Plasmid-DNA-Lösung	26

Bestimmung der Konzentration:	27
Restriktionsanalyse	27
Durchführung des Restriktionsverdau	27
Ansetzen des Restriktionsverdau	27
Auswertung des Restriktionsverdau	28

Sicherheitsvorschriften

Bei der Arbeit im Labor ist die Einhaltung einiger Sicherheitsvorschriften unabdingbar, um Infektionen und Gefahren für die Umwelt auszuschließen (verändert nach „Richtlinie zur Sicherheit im Unterricht“):

Allgemeine Regeln zu Hygiene und Verhalten

- Auf hygienisches Verhalten, Sauberkeit und Ordnung am Arbeitsplatz achten.
- Im Arbeitsraum nicht essen, trinken, schminken, rauchen oder schnupfen. Nahrungsmittel, auch verpackt, nicht auf den Arbeitstisch legen.
- Bei allen Tätigkeiten im Labor Kittel und Schutzbrille tragen.
- Vor Eintritt in die Pause Hände mit Seife waschen und ggf. desinfizieren, z. B. mit Sterilium.
- Schleimhäute von Mund, Augen und Nase nicht mit Gegenständen (z. B. Impföse) oder Händen berühren, die durch die Arbeit mit Mikroorganismen kontaminiert sein können.
- Arbeitsgeräte, die mit Mikroorganismen in Berührung gekommen sind, nach Gebrauch sterilisieren (z. B. Impfösen in der Flamme ausglühen).
- Pipettieren mit dem Mund ist untersagt. Pipettierhilfe benutzen.
- Aerosolbildung vermeiden (z. B. Pipette nicht ausblasen, auch nicht mit Pipettierhilfe).
- Nach Beendigung der Tätigkeit mit Mikroorganismen den Arbeitsplatz mit geeigneter Desinfektionslösung (z. B. Isopropanol, 70 %) desinfizieren. Danach Hände mit Seife waschen und desinfizieren (z.B. mit Sterilium).

Entsorgungsrichtlinien

- Bakterien und Pilzkulturen nach Gebrauch durch Autoklavieren wie folgt vernichten: Petrischalen oder Behälter mit Altkulturen in einem Autoklaven bei 121 °C mindestens 20 Minuten lang oder im Schnellkochtopf bei 116 °C (Stufe 2) mindestens 30 Minuten lang sterilisieren.
- Einwegpetrischalen zum Sterilisieren in einen autoklavierbaren Vernichtungsbeutel (ggf. hoch erhitzbaren Bratenbeutel) legen.
- Die Funktionstüchtigkeit der Autoklaviergeräte (Autoklav oder Schnellkochtopf) anhand der Bedienungsanleitung überprüfen.
- Das inaktivierte Material nach dem Abkühlen sofort in den Ausguss (Flüssigkeiten) oder in den Müll (Einwegpetrischalen) geben.
- Zur Entsorgung von Kulturen mit Mikroorganismen, die in Ausnahmefällen nicht selbst inaktiviert werden können, Abgabe an Krankenhäuser oder Hygieneinstitute vereinbaren.

Die wichtigsten Laborgeräte

Die Laborwaage

Mit einer elektronischen Laborwaage können sehr kleine Substanzmengen höchst genau abgewogen werden. Damit die Waage ihre Genauigkeit beibehält und für lange Zeit funktioniert, sind einige Dinge beim Wiegen zu beachten:

- Die Waage muss mit allen Füßen fest auf dem Untergrund aufstehen und genau ausgerichtet sein (Kontrolle per eingebauter Wasserwaage).
- Beim Ablesen sollten die Schiebetüren der Waage (falls vorhanden) geschlossen sein, um Einflüsse durch Luftbewegungen zu vermeiden.
- Beim Wiegen sind Verschmutzungen der Waage zu vermeiden. Sollte die Waage dennoch einmal verschmutzt werden, ist sie sofort zu reinigen (Lehrkraft zu Hilfe holen).
- Die maximale Tragkraft, die auf jeder Waage angegeben ist, darf nicht überschritten werden.



Abbildung 1: Laborwaage

Der Labormixer oder Vortexer

Der Vortexer ist ein Gerät, mit dem Substanzen in Reagenzgläsern oder Mikroreaktionsgefäßen schnell und einfach durchmischt werden können. Normalerweise gibt es einen Automatik-Modus, der dafür sorgt, dass das Gerät beim Aufdrücken eines Gefäßes auf den Mischeraufsatz automatisch zu oszillieren beginnt. Zwei Dinge sind beim Umgang mit dem Vortexer sehr wichtig:

- Es dürfen nur geschlossene Gefäße zum Mixen verwendet werden.
- Die Gefäße müssen sehr gut festgehalten werden.

Übung zur Benutzung des Vortexers

Nimm ein mit Wasser gefülltes Mikroreaktionsgefäß und mixe es auf dem Vortexer!



Abbildung 2: Vortexer

Die Mikrozentrifuge

Im Labor verwendet man eine Mikrozentrifuge, um Feststoffe (z. B. Bakterien) zu sedimentieren, d. h. sie von einer Flüssigkeit zu trennen, oder um Flüssigkeiten am Boden eines Mikroreaktionsgefäßes zu sammeln (z. B. nach dem Mixen mit dem Vortexer). Eine Mikrozentrifuge kann Drehzahlen von bis zu 14000 min^{-1} erreichen, wobei immense Beschleunigungskräfte auf das zentrifugierte Material einwirken.

Oft wird die benötigte Zentrifugalkraft in Vielfachen der Erdbeschleunigung angegeben (z. B. $1000 \text{ G} = 1000 \times 9,81 \text{ m/s}^2$).

Diese Beschleunigungswerte lassen sich mit folgender Formel leicht in die jeweils benötigte Drehzahl umrechnen:

$$\text{Drehzahl} = \sqrt{\frac{\text{RZK}}{11,17 \cdot r}} \cdot 1000$$

Umgekehrt kann man natürlich auch die relative Zentrifugalkraft (RZK) berechnen:

$$\text{RZK} = 11,17 \cdot r \cdot \left(\frac{\text{Drehzahl}}{1000} \right)^2$$

RZK: relative Zentrifugalkraft in Vielfachen der Erdbeschleunigung
r: Radius des Zentrifugenrotors (12,5 cm für unsere Zentrifugen)

Auch bei der Benutzung der Zentrifuge sind einige Sicherheitsregeln zu beachten:

- Reaktionsgefäße in der Zentrifuge müssen immer verschlossen sein.
- Vor dem Einschalten der Zentrifuge ist immer der Deckel auf den Rotor zu setzen.
- Die Zentrifuge muss **immer austariert** sein, d. h. es müssen immer zwei Gefäße mit gleichem Gewicht genau gegenüber liegend eingesetzt werden (siehe Abb. 4).

- Will man nur eine Probe zentrifugieren, so ist als Gegengewicht ein Gefäß mit der entsprechenden Menge Wasser zu verwenden.



Abbildung 3: Mikrozentrifuge

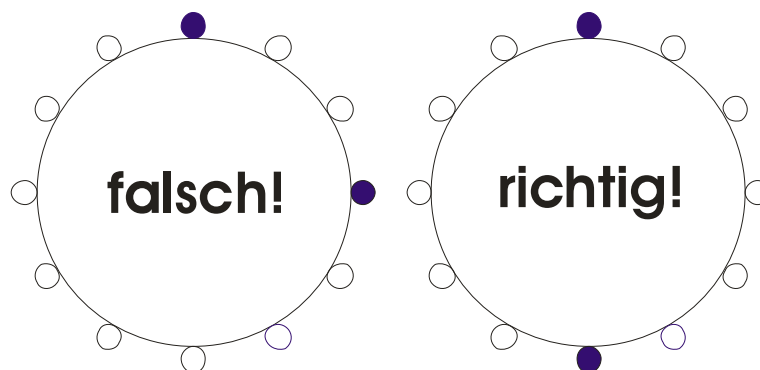


Abbildung 4: Korrekte Rotorbeladung

Die automatische Pipette

Die Pipette ist wohl das wichtigste Werkzeug bei der Laborarbeit. Ständig müssen kleine bzw. kleinste Flüssigkeitsvolumina im ml- bzw. μl -Bereich dosiert werden. Dabei sind die verstellbaren Automatikpipetten ein geniales Hilfsmittel.

Jede dieser Pipetten ist ein Präzisionsinstrument. Der Preis einer Pipette beträgt über 100,- €. Im Umgang mit den Pipetten ist also Sorgfalt oberstes Gebot!

Die Auswahl der richtigen Pipette

Je nach dem Volumen, das pipettiert werden soll, muss die Auswahl der passenden Pipette erfolgen. Für große Volumina nimmt man eine größere Pipette, für kleinere Volumina eine kleinere. Es wäre theoretisch möglich, mit einer 1000 μl -Pipette ein Volumen von 50 μl zu transferieren. Das macht aber keinen Sinn, weil großvolumige Pipetten bei sehr kleinen Volumina ungenau sind.

Der Volumenbereich, für den eine Pipette geeignet ist, steht oben auf der Pipette aufgedruckt.

Die korrekte Benutzung einer Pipette

Flüssigkeitsaufnahme

- Vor dem Pipettieren je nach Volumen die richtige Pipette auswählen.
- Durch Drehen des Einstellringes wird das gewünschte Volumen eingestellt – dabei werden die Ziffern der Anzeige von oben nach unten abgelesen.
- Passende Pipettenspitze (blau oder gelb → Farbcode der Pipette beachten) aufstecken.
- Bedienknopf bis zum ersten Anschlag drücken (Messhub).
- Pipettenspitze senkrecht ca. 3-5 mm in die Flüssigkeit eintauchen.
- Bedienknopf **langsam** zurück gleiten lassen.
- Spitze langsam aus der Flüssigkeit ziehen.

Flüssigkeitsabgabe

- Spitze schräg an die Gefäßwandung anlegen.
- Bedienknopf langsam bis zum ersten Anschlag drücken.
- Bedienknopf zur vollständigen Entleerung der Spitze bis zum zweiten Anschlag durchdrücken.
- Bedienknopf gedrückt halten und Spitze an der Gefäßwand hochziehen.
- Bedienknopf langsam zurück gleiten lassen.

Achtung!

Pipetten dürfen NIEMALS mit gefüllter Spitze abgelegt werden, weil sonst Flüssigkeit in den Kolben hineinlaufen kann. Deshalb Pipetten grundsätzlich in den Ständer stellen und nie auf den Tisch legen!!!

Um Verschleiß und Korrosion zu verhindern, dürfen mit Automatikpipetten niemals konzentrierte oder leicht flüchtige Lösungen pipettiert werden!!!

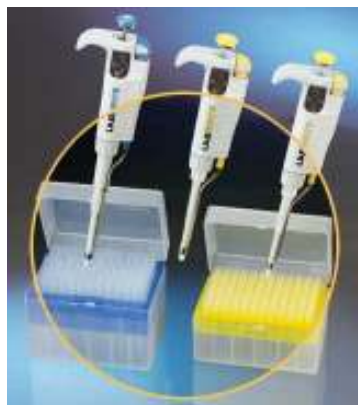


Abbildung 5: Verschiedene Automatikpipetten und passende Spitzen

Übung zur Benutzung der Pipette

Benötigtes Material:

- 20 leere, nicht sterile Eppendorf-Mikroreaktionsgefäße (ab jetzt: Eppi)
- gefärbtes Wasser
- 1000 µl und 200 µl Pipette mit passender Spitze

Durchführung:

- Markiere ein leeres Eppi, wiege es auf der Analysenwaage und notiere dir das Gewicht!
- Stelle bei der 1000 µl-Pipette ein Volumen von 500 µl ein und setze eine passende Spitze auf die Pipette!
- Ziehe 500 µl gefärbtes Wasser auf und überführe es in eines der leeren Eppis!
- Überführe die 500 µl Wasser noch acht Mal in ein neues Eppi!
- Pipettiere zum Schluss das Wasser in das Eppi, das du zuvor gewogen hast!
- Wiege das Eppi mit dem Wasser und berechne die Masse des enthaltenen Wassers; $\sigma(H_2O) = 1 \frac{g}{cm^3}$!
- Berechne den Verlust an Wasser, der beim zehnmaligen Überführen entstanden ist, in Massenprozent!

Verfahre anschließend genauso mit 10 neuen Eppis, einer 200 µl-Pipette und einem Wasservolumen von 25 µl!

Überlege dir Möglichkeiten, wie du den eventuell aufgetretenen Flüssigkeitsverlust beim Pipettieren minimieren könntest!

Übung zur Genauigkeit der Pipette

Benötigtes Material:

- 1000 µl Pipette, 200 µl Pipette und entsprechende Spitzen
- Wasser
- Analysenwaage
- Kunststoffbecherglas

Durchführung:

- Wiege das leere Kunststoffbecherglas auf der Analysenwaage und notiere dir das Gewicht!
- Stelle die 1 ml Pipette auf 1 ml (=1000 µl) Volumen ein und stecke eine blaue Pipettenspitze auf die Pipette!
- Pipettiere zehnmal 1 ml Wasser in das Becherglas! (Du kannst immer die gleiche Spitze verwenden)
- Wiege anschließend das Becherglas inklusive Wasser und berechne deinen Verlust in Massenprozent!
- Wiederhole diese Messreihe, indem du insgesamt 700 µl Wasser in ein Eppi pipettierst. Wähle dazu die gelbe Pipette (20-200µl)!

Übung zur Benutzung von Pipette und Zentrifuge

Benötigtes Material:

Pipetten und passende Spitzen, Eppis, gefärbtes Wasser, Waage, Zentrifuge

Durchführung:

Füllt ein Eppi mit einer beliebigen Menge gefärbten Wassers und gebt es eurem Partner! Dieser soll nun mit Wasser und einem weiteren Eppi ein passendes Gegengewicht zum Zentrifugieren herstellen.

Überprüft anschließend jeweils das Gegengewicht eures Partners und beladet zusammen mit den anderen Gruppen eine Zentrifuge mit euren Gefäßen! Kontrolliert gegenseitig die korrekte Beladung der Zentrifuge. Holt vor dem Einschalten der Zentrifuge die Lehrkraft zur Kontrolle! Zentrifugiert anschließend bei maximaler Drehzahl!

Berechnet die relative Zentrifugalkraft in Vielfachen der Erdbeschleunigung G , die auf euer Wasser eingewirkt hat! (Zum Vergleich: Der Pilot eines F-16 Kampffjets wird einer Beschleunigung von maximal 9 G ausgesetzt.)

Der Autoklav

Arbeitet man im Labor mit Biomolekülen (DNA, Enzyme) bzw. Bakterien, so muss man Verunreinigungen der Proben durch die überall in unserer Umgebung vorhandenen Keime (Bakterien, Pilze) und Enzyme (besonders Nucleasen) vermeiden. Bei unsauberer Arbeitsweise züchtet man schnell *irgendwelche* Bakterien (nur nicht die, die man möchte) oder macht sich auf die Suche nach dem isolierten Plasmid, das bereits enzymatisch abgebaut wurde. Außerdem dürfen keine Abfälle mit aktiven Mikroorganismen aus dem Labor in die Umwelt freigesetzt werden. Aus diesen Gründen sind sterile Arbeitsgeräte für viele Arbeitsgänge nötig. Auch der gesamte kontaminierte Abfall ist deshalb zu sterilisieren.

Zum Sterilisieren verwendet man einen Autoklaven. Dieses Gerät erzeugt bei einem leichten Überdruck eine Temperatur von 121 °C oder mehr. Hält man Arbeitsgeräte oder Abfälle 20 Minuten auf dieser Temperatur, so werden nicht nur Keime abgetötet und Enzyme sowie viele andere bioaktive Stoffe (z.B. Antibiotika) inaktiviert, sondern auch Bakteriensporen zerstört, die durchaus Temperaturen von 100 °C überstehen können.

Zur **Kontrolle** des Autoklaviervorganges wird auf die zu sterilisierenden Materialien ein selbstklebendes *Signalband* aufgeklebt, das nach einem ordnungsgemäßen Autoklaviervorgang seine Farbe ändert (*Anzeige durch schwarze Streifen*). Nur wenn dieses Signal positiv ausfällt, kann davon ausgegangen werden, dass die Materialien auch wirklich steril sind.

Achtung: Der Autoklav darf niemals ohne eine Lehrkraft eingeschaltet oder geöffnet werden!



Abbildung 6: Tischaufoklav

Regeln zum Umgang mit dem Autoklaven

1. Sämtliche Abfälle, die mit Bakterien, DNA, RNA, Enzymen etc. in Kontakt waren, müssen vor der Entsorgung autoklaviert werden!

Hierzu zählen auch Tücher, mit denen man verschüttete Bakterien aufgewischt hat, Pipettenspitzen, etc.

2. Alle wieder verwendbaren Gefäße müssen vor dem Autoklavieren auf ihre Temperaturstabilität überprüft werden!

Im Autoklaven können Temperaturen von bis zu 135 °C erreicht werden, die nicht jeder Kunststoff verträgt!

3. Es dürfen niemals dicht verschlossene Gefäße autoklaviert werden!

Bei Schraubflaschen darf der Deckel nur leicht anliegen, bei Kulturröhrchen müssen die Metallkappen locker sitzen.

Durch das Erhitzen kommt es zur Ausdehnung der enthaltenen Luft bzw. zum Sieden der enthaltenen Flüssigkeit. Dies kann im schlimmsten Fall zur Detonation eines Gefäßes führen. Die Reinigung des Autoklaven von Scherben ist eine leicht vermeidbare Fleißarbeit!

4. Kunststoffabfälle wie Petrischalen, Eppendorf-Cups und Säulen etc. müssen unbedingt in speziellen Autoklavierbeuteln autoklaviert werden!

Kunststoffabfälle können schmelzen! Für diese Abfälle steht ein Eimer aus, in dem sich immer ein Autoklavierbeutel befindet (Beschriftung des Eimers: AUTOKLAVIERABFALL). Alle Reaktionsgefäße werden geöffnet (!!) in diesen Eimer geworfen, wöchentlich autoklaviert und anschließend entsorgt.

Sollte der Beutel zu $\frac{3}{4}$ gefüllt sein, bitte nichts mehr hineinwerfen, sondern umgehend der Lehrkraft Bescheid geben.

5. Es dürfen niemals Abfälle zusammen mit sauberen Laborgeräten in einem Korb autoklaviert werden!

Eine Verschmutzung ist nie zu 100% auszuschließen. Abfälle müssen sich beim Autoklavieren immer im unteren Korb befinden, um ein eventuelles Herabtropfen auf die sauberen Geräte zu verhindern.

6. Beim Öffnen des Autoklaven immer seitlich zum Gerät stehen!

Durch eventuell austretenden Dampf besteht akute Verbrühungsgefahr!

7. Nach dem Autoklavieren können Feststoffe über den Hausmüll und Flüssigkeiten über den Abfluss entsorgt werden.

Arbeitstechniken mit Bakterien

Das Bakterium *E. coli* könnte in der molekularbiologischen Arbeit schon fast als „Haustier“ des Biologen bezeichnet werden. *E. coli* ist sehr einfach zu kultivieren. Es gibt für die Laborarbeit viele Stämme, die nicht human-pathogen sind, d. h. beim Menschen nicht als Krankheitserreger wirken. Die Bakterien werden z. B. genutzt, um Plasmide zu vermehren oder bestimmte Genprodukte zu exprimieren. Nachdem man praktisch auf diese Bakterien als Werkzeug bzw. Hilfsmittel angewiesen ist, muss man einige Grundtechniken im Umgang mit ihnen beherrschen.

Nährmedien

Jedes „Haustier“ muss gefüttert werden, so auch *E. coli*. Es gibt eine Vielzahl verschiedener Medien zur Kultivierung dieser Bakterien. Wir verwenden im Labor ausschließlich das LB - (Luria Broth) - Medium, das in einer Fertigzubereitung von der Firma Merck geliefert wird und nur noch mit demineralisiertem Wasser angerührt werden muss. Das Medium enthält alle Stoffe, die die Bakterien für ihr Wachstum benötigen (z. B. Salze, Aminosäuren, Kohlenhydrate)

Kulturformen

Bakterienkulturen können auf verschiedene Art und Weise gezüchtet werden. Die für uns relevanten Kulturformen sind die Flüssigkultur und die Agarplatte.

Flüssigkultur

In einer Flüssigkultur wird das Nährmedium lediglich mit einigen Bakterien angeimpft und anschließend bei 37 °C im Schüttelinkubator über die gewünschte Zeit, z. B. über Nacht, bebrütet. Diese Kulturmethode ist sehr praktisch, um eine dichte Zellsuspension zu erhalten, aus der dann große Mengen von Plasmiden isoliert werden können.

Agarplatte

Versetzt man das Nährmedium zusätzlich mit 1,5 % Agar-Agar und gießt die heiße Lösung nach dem Autoklavieren in sterile Petrischalen, so erhält man nach dem Abkühlen einen Nährboden von gelatineähnlicher Konsistenz. Diese Nährbodenplatten kann man im Kühlschrank aufbewahren und z. B. dazu verwenden, nach einer Transformation Bakterien anzuziehen und daraus einzelne Klone zu isolieren. Auch zur Bestimmung der Bakteriendichte einer Bakteriensuspension mittels einer Verdünnungsreihe benötigt man Agarplatten.

Herstellung von LB-Agarplatten

Da im Labor keine sterilen Arbeitsplätze zur Verfügung stehen, muss bei der Herstellung der Agarplatten sehr auf Sauberkeit geachtet werden und die Petrischalen müssen möglichst schnell wieder verschlossen werden. So kann man eine unerwünschte Kontaminierung mit Keimen aus der Umgebung verhindern.

Materialien:

- LB-Zubereitung von der Firma Merck
- destilliertes Wasser
- Laborwaage
- 500 ml Glasflasche
- Agar-Agar
- leere, nach Möglichkeit sterile Kunststoffpetrischalen

Durchführung:

- Gemäß Anleitung des Herstellers die benötigte Menge Zubereitung für 500 ml Fertigmedium abwiegen und in die Glasflasche geben.
- Anschließend 7,5 g Agar-Agar (1,5 %) beimengen und 500 ml Wasser hinzugeben.
- Die Mischung in der Mikrowelle kochen und zwischendurch immer wieder mit dem Magnetrührer rühren, bis eine klare Lösung entsteht.
- Autoklavieren. (Warum?)
- Nach dem Autoklavieren Medium auf ca. 60 °C (Agar ist oberhalb von 50 °C noch flüssig) abkühlen lassen.
- Medium vorsichtig bis zu einer Höhe von ca. 2-3 mm in sterile Petrischalen gießen.
- Die Schalen sofort wieder mit dem Deckel verschließen, um eine Kontamination zu vermeiden.
- Die Platten für 1-2 Tage auf der Laborbank stehen lassen, damit überschüssige Feuchtigkeit verdunsten kann.
- Platten auf dem Deckel stehend in einer Kunststofftüte im Kühlschrank aufbewahren.

Methoden zur Anzucht und Isolation einzelner Bakterien

Anlegen einer Übernacht-Kultur

Die einfachste Möglichkeit zur Anzucht von Bakterien ist das Anlegen einer Übernacht-Kultur.

Dazu beimpft man 3 ml des Kulturmediums in einem Kulturröhrchen mittels einer sterilen Pipettenspitze mit den zu züchtenden Bakterien. Die Pipettenspitze wird kurz in die Stammkultur eingetaucht und anschließend mit Hilfe des Abwerfers in das Kulturröhrchen eingeworfen. Dabei ist darauf zu achten, dass man mit keinem Teil der Pipette an den Behälter der Stammkultur und das Röhrchen stößt, um eventuelle Kontaminationen zu vermeiden. Der Deckel des Kulturröhrchens soll nur ganz kurz zum Einwerfen der Spitze geöffnet werden. Die Stammkultur wird auf Eis gelagert und nach der Bakterien-Entnahme wieder eingefroren.

Verdünnungsreihe

Die Verdünnungsreihe ist eine Methode, mit deren Hilfe die Anzahl der Bakterien pro Volumen Nährmedium bestimmt werden kann. Im Versuch soll die Bakterien suspension einer Übernacht-Kultur in zehn Schritten jeweils 1:10 verdünnt werden. Zur Verdünnung kann man LB-Medium oder 0,9 % NaCl-Lösung verwenden (Warum kein steriles, destilliertes Wasser?).

Material:

- Übernachtkultur
- 10 Röhren mit Deckel mit jeweils 9 ml steriler, 0,9 % NaCl-Lösung
- 1000 µl Pipette und Spitzen

Durchführung:

- Röhren mit den Verdünnungsstufen (10^{-1} , ..., 10^{-10}) beschriften.
- Aus der Übernachtkultur mit einer sterilen Spitze genau 1 ml Suspension in das erste Röhren überführen.
- Das Röhren mit Deckel auf dem Vortexer für 30 Sekunden mixen.
- Mit einer neuen, sterilen Spitze genau 1 ml Suspension aus dem ersten Röhren entnehmen und in das zweite Röhren überführen.
- Das Röhren mit Deckel auf dem Vortexer mixen.
- Die Schritte in der gleichen Abfolge bis zum zehnten Röhren wiederholen, indem jeweils nach dem Mixen 1 ml Suspension in das nächste Röhren überführt wird (siehe Abbildung 7).

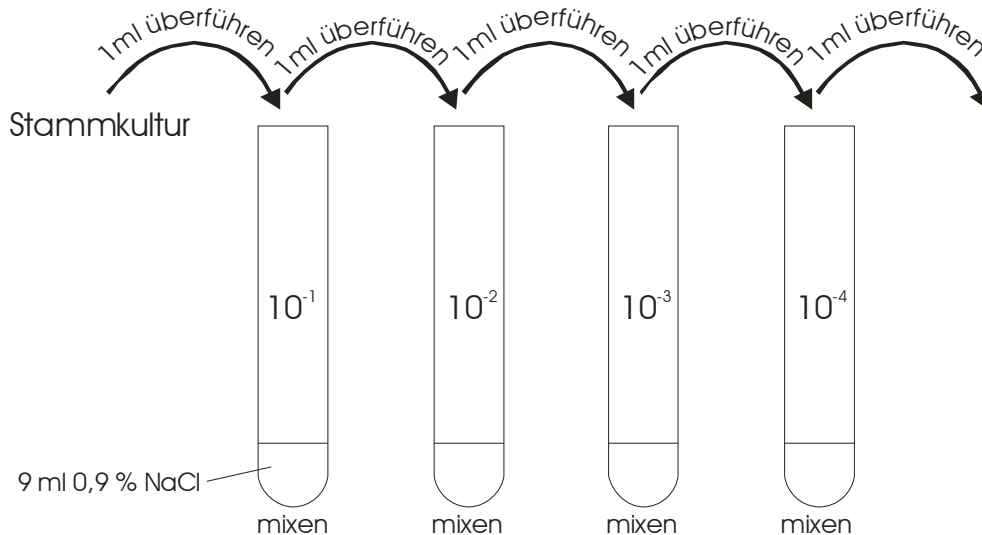


Abbildung 7: Herstellung einer Verdünnungsreihe

Ausplattieren der Verdünnungsreihe

Nach der Erstellung der Verdünnungsreihe werden die Suspensionen auf LB-Platten ausplattiert und bei 37 °C über Nacht bebrütet, bis einzelne Kolonien sichtbar werden. Über die Zählung der Kolonien kann man zurück berechnen, wie viele Bakterien in der Stammkultur bzw. in den einzelnen Verdünnungen pro Milliliter vorhanden waren.

Material:

- LB-Agarplatten
- Drigalski-Spatel im Ständer
- 70 % Ethanol und Bunsenbrenner
- Automatik-Pipette und passende Spitzen
- Parafilm
- Brutschrank

Durchführung:

Hinweis: Zügig vorgehen, damit möglichst wenig Fremdkeime auf die geöffnete Platte gelangen können!

- Arbeitsplatz mit 70 % Ethanol desinfizieren.
- Platten auf der Unterseite am Rand mit Schülernamen, der jeweiligen Verdünnungsstufe und Datum beschriften.
- 50 µl Bakteriensuspension auf die Mitte der Platte pipettieren.
- Drigalski-Spatel in 70 % Ethanol eintauchen und in der Bunsenbrennerflamme entzünden.
- Nach dem Erlöschen der Flamme den Spatel zum Abkühlen auf einer leeren Stelle der Platte mehrmals hin und her wenden.
- Bakteriensuspension unter ständigem Drehen der Platte mit dem Drigalski-Spatel auf der Agaroberfläche verstreichen, bis ein spürbarer Widerstand zu fühlen ist (→ die Flüssigkeit ist dann vom Agar aufgenommen).
- Deckel auf die Platte geben und die Platte mit Parafilm verschließen.
- Platte bei 37 °C über Nacht bebrüten. Um Kondenswasserbildung zu vermeiden, die Platte nach ca. 30 Minuten im Brutschrank auf den Kopf stellen.
- Nach der Bebrütung die Platten bis zur Auswertung im Kühlschrank aufbewahren.

Vereinzeln von Bakterien

Will man aus einer Bakterienkultur einen einzigen Klon isolieren, so gibt es eine sehr einfache Möglichkeit, die Bakterien auf einer Agarplatte zu vereinzeln.

Material:

- 70 % Ethanol
- Bakterienkultur (Übernachtskultur in LB-Medium)
- LB-Agarplatte
- Impföse aus Platin
- Bunsenbrenner

Durchführung:

- Arbeitsplatz mit 70 % Ethanol desinfizieren.
- Platte auf der Unterseite eindeutig beschriftet (s.o.).
- Impföse im Bunsenbrenner durchglühen (→ steril!) und abkühlen lassen.
- Impföse in die aufgeschüttelte Bakterienkultur eintauchen.
- Die Bakterien mit dem Eigengewicht der Impföse gemäß dem Muster auf Abbildung 8 ausstreichen, dabei zwischen den sechs Schritten die Öse jeweils in der Bunsenbrennerflamme durchglühen und wieder abkühlen lassen.
- Platte bei 37 °C über Nacht bebrüten. Um Kondenswasserbildung zu vermeiden, die Platte nach ca. 30 Minuten im Brutschrank auf den Kopf stellen.
- Nach der Bebrütung die Platte bis zur Auswertung im Kühlschrank aufbewahren.

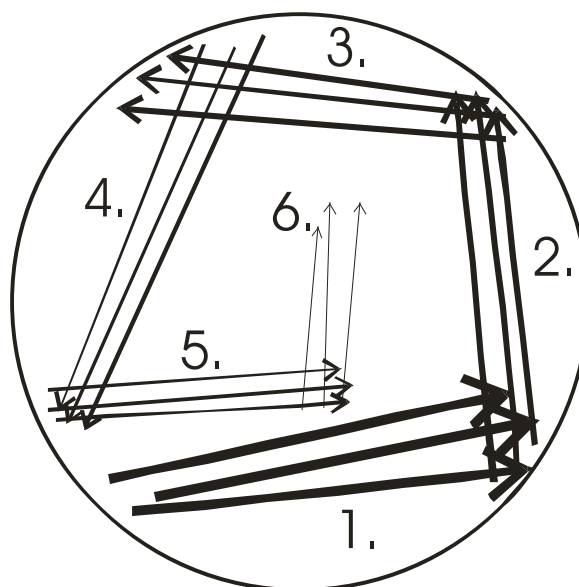


Abbildung 8: Ausstreichschema Vereinzlung

Keimzahlbestimmung aus Milchprodukten

Mit der Methode der Verdünnungsreihe speziellem Nährmedium lassen sich in einem sehr schönen Experiment die Gesamtkeimzahl und das Vorhandensein von Milchsäurebakterien untersuchen. Hierzu werden einfach Verdünnungsreihen (s. o.) von Joghurt, Frischmilch, Quark, etc. hergestellt und anschließend auf Chinablau-Lactose-Agar ausplattiert. Der Agar enthält sowohl die für die Bakterien wichtige Lactose, als auch einen Indikatorfarbstoff (Chinablau), der dazu führt, dass Säure produzierende Kolonien blau eingefärbt erscheinen und somit identifiziert werden können.

Die Arbeit mit Plasmid-DNA

In der Molekulargenetik werden oft Plasmide als Vektoren verwendet, um fremde DNA in Bakterien zu transferieren und zu vermehren. Der Vorteil hierbei ist, dass die Plasmide sich unabhängig von der Bakterienzelle vermehren und in großer Zahl in den Bakterienzellen vorliegen.

Um jedoch fremde DNA in ein Plasmid einbauen zu können, ist es zunächst einmal nötig, ein Plasmid aus einem Bakterium zu isolieren. Hierbei stellen sich einige Probleme:

- Die Membran des Bakteriums muss zerstört werden.
- Zelltrümmer und genomische DNA müssen von den Plasmiden getrennt werden.
- Die Plasmid-Lösung muss im Anschluss an die Isolation möglichst frei von Salzen und anderen Stoffen sein, die weitere Reaktionen, wie z. B. einen Restriktionsverdau, durch ihre Anwesenheit stören könnten.

Die Isolation von Plasmiden mit Hilfe eines kommerziellen Kits

Viele Gentechnologie-Firmen haben komplette Material-Sets, so genannte Kits, entwickelt, die ohne weitere Vorbereitungen und Materialien die Isolierung von Plasmiden ermöglichen. Meist wird bei dieser Isolierung gleich noch ein Reinigungsschritt über eine Ionentauscher-Säule durchgeführt. Hierbei wird die DNA von Verunreinigungen getrennt, indem man die unterschiedlich starke Haftung der verschiedenen Moleküle an einem ionisch geladenen Absorbermaterial ausnutzt.

Funktionsweise des Quiaprep-Kits

Die Plasmid-Isolation des Kits beruht auf einer alkalischen Lyse von Bakterienzellen. SDS (Natriumdodecylsulfat, ein Detergens) im Lysepuffer löst die Phospholipide und Proteine der Zellmembran, während Natriumhydroxid die Plasmid- und Genom-DNA denaturiert und zugesetzte RNase die in großen Mengen vorhandenen RNA-Moleküle hydrolysiert.

Bakterien werden vom Medium abzentrifugiert, im Lysepuffer resuspendiert und der Puffer nach der Lyse neutralisiert. Bei der Neutralisation in einem Puffer mit hohem Salzgehalt renaturiert als Einziges die Plasmid-DNA, die ja aus relativ kleinen Molekülen besteht. Die genomische DNA wird zusammen mit denaturierten Proteinen, Zellfragmenten und SDS gefällt. Um eine Verunreinigung der Plasmid-DNA mit Bruchstücken genomischer DNA zu verhindern, darf das Lysat-Gemisch

nicht mit dem Vortexer gemischt werden, um hohe Scherkräfte und damit eine Zerstückelung der genomischen DNA, zu vermeiden. Anschließend wird das neutralisierte Lysat zentrifugiert und der Überstand, der dann die gelösten Plasmide enthält, über eine spezielle Membran in einer Säule zentrifugiert. Unter der herrschenden hohen Salzkonzentration bleibt ausschließlich die Plasmid-DNA an der Membran der Säule haften.

Nach einem oder zwei Waschschrritten zur Reinigung der Plasmide werden diese mit einem Puffer sehr geringer Salzkonzentration oder mit sterilem Wasser von der Säule gelöst. Die Plasmid-Lösung kann bei -20 °C aufbewahrt werden.

Verlaufsschema der Plasmid-Isolation

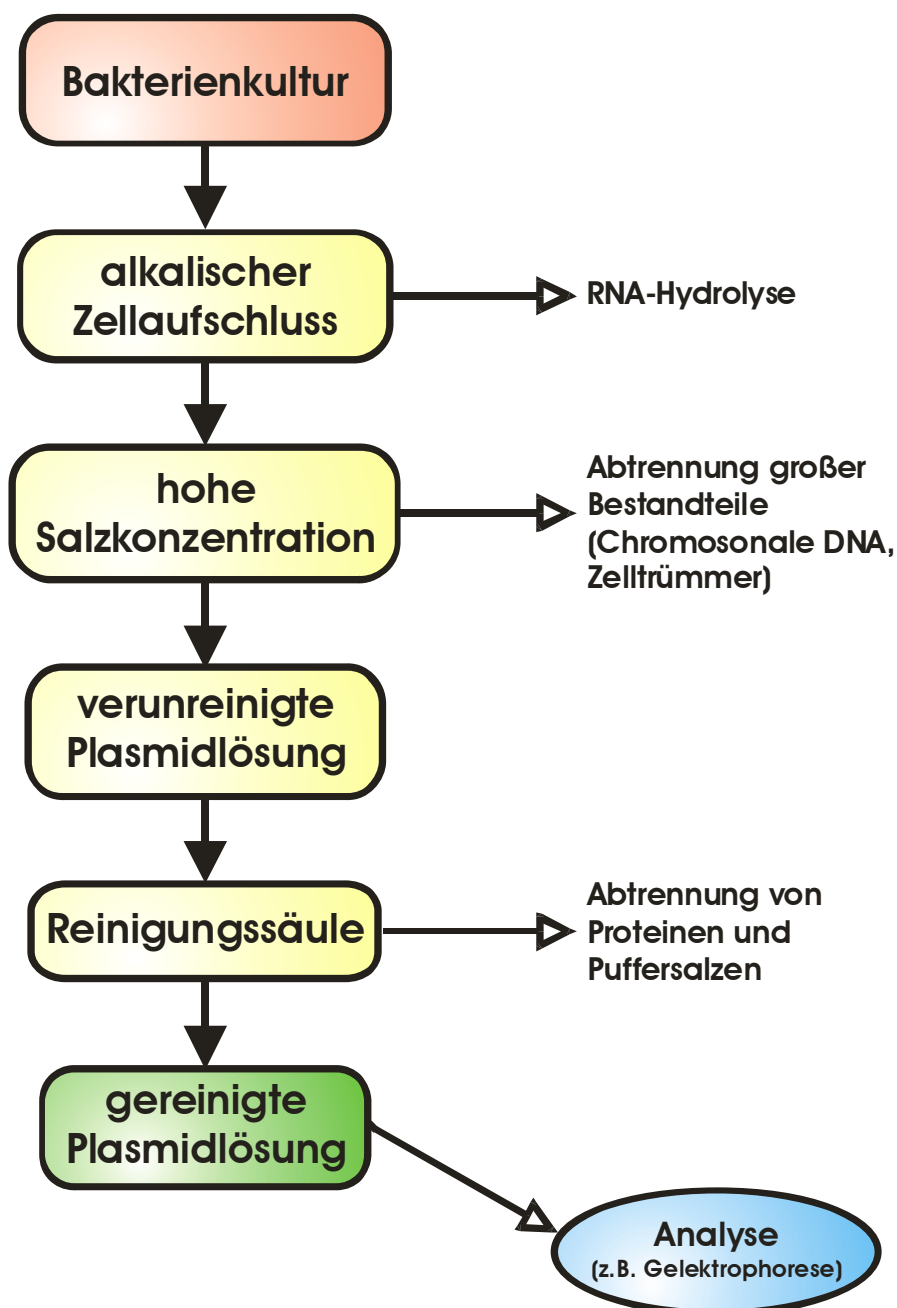


Abbildung 9: Verlaufsschema der Plasmidisolierung

Original-Protokoll des Quiaprep-Kits

Protocol: QIAprep Spin Miniprep Kit Using a Microcentrifuge

This protocol is designed for purification of up to 20 µg of high-copy plasmid DNA from 1–5 ml overnight cultures of *E. coli* in LB medium. <...>

Note: All protocol steps should be carried out at room temperature.

Procedure

1. Resuspend pelleted bacterial cells in 250 µl Buffer P1 and transfer to a microcentrifuge tube.

Ensure that RNase A has been added to Buffer P1. No cell clumps should be visible after resuspension of the pellet.

2. Add 250 µl Buffer P2 and gently invert the tube 4–6 times to mix.

Mix gently by inverting the tube. Do not vortex, as this will result in shearing of genomic DNA. If necessary, continue inverting the tube until the solution becomes viscous and slightly clear. Do not allow the lysis reaction to proceed for more than 5 min.

3. Add 350 µl Buffer N3 and invert the tube immediately but gently 4–6 times.

To avoid localized precipitation, mix the solution gently but thoroughly, immediately after addition of Buffer N3. The solution should become cloudy.

4. Centrifuge for 10 min at 13,000 rpm (~17,900 x g) in a table-top microcentrifuge.

A compact white pellet will form.

5. Apply the supernatants from step 4 to the QIAprep spin column by decanting or pipetting.

6. Centrifuge for 30–60 s. Discard the flow-through.

7. (Optional): Wash the QIAprep spin column by adding 0.5 ml Buffer PB and centrifuging for 30–60 s. Discard the flow-through.

This step is necessary to remove trace nuclease activity when using *endA+* strains such as the JM series, HB101 and its derivatives, or any wild-type strain, which have high levels of nuclease activity or high carbohydrate content. Host strains such as XL-1 Blue and DH5α™ do not require this additional wash step.

8. Wash QIAprep spin column by adding 0.75 ml Buffer PE and centrifuging for 30–60s.

9. Discard the flow-through, and centrifuge for an additional 1 min to remove residual wash buffer.

IMPORTANT: Residual wash buffer will not be completely removed unless the flow-through is discarded before this additional centrifugation. Residual ethanol from Buffer PE may inhibit subsequent enzymatic reactions.

10. Place the QIAprep column in a clean 1.5 ml microcentrifuge tube. To elute DNA, add 50 µl Buffer EB (10 mM Tris-Cl, pH 8.5) or water to the center of each QIAprep spin column, let stand for 1 min, and centrifuge for 1 min.

Agarose-Gelelektrophorese der isolierten Plasmide

Die Agarose-Gelelektrophorese ist die einfachste und effektivste Methode, mit der DNA-Fragmente zwischen 0,5 und 25 kB (= kilo-Basen) Länge voneinander getrennt und identifiziert werden können.

Das Prinzip der Elektrophorese beruht darauf, dass geladene Moleküle, wie z. B. DNA im elektrischen Feld wandern. Die Auftrennung erfolgt in einem elektrischen Gleichstromfeld unter konstantem pH-Wert (→ Elektrophoresepuffer), wobei die Fragmente je nach Ladung, Masse und Gestalt unterschiedlich schnell durch das Agarosegel wandern.

Benötigte Komponenten

Agarosegel

Das Agarosegel wird aus Agarose und Elektrophoresepuffer hergestellt, indem die Agarose im Puffer aufgekocht wird. Anschließend gießt man die Mischung in eine Gelkammer und setzt einen kleinen Kunststoffkamm ein. Beim Erkalten wird die Agarose fest. Nach Entfernen des Kamms hat das Gel kleine Taschen, in die nachher die aufzutrennenden Proben hineingegeben werden können.

Die Konzentration der Agarose richtet sich nach der Größe der aufzutrennenden Fragmente. Für kleinere Fragmente wählt man eine größere Konzentration, da die Poren des Gels mit zunehmender Konzentration enger werden. Meist verwendet man ein einprozentiges Agarosegel, das für die Auftrennung von Fragmenten zwischen 0,5 und 7 kB geeignet ist.

Elektrophoresepuffer

Der Elektrophoresepuffer wird sowohl zur Herstellung des Gels als auch zur Überschichtung des Gels während der Elektrophorese benötigt. Er enthält Puffersubstanzen und ist auf einen leicht alkalischen pH-Wert eingestellt. Seine Aufgabe ist es, eine Denaturierung der DNA zu verhindern und die anionische Form der Nukleinsäuren zu erhalten. Außerdem dient er als Elektrolyt und verhindert ein Austrocknen des Gels.

Gelladungspuffer

Die zu analysierenden DNA-Proben werden in die Taschen des Gels pipettiert. Damit sie nicht zu schnell wieder heraus diffundieren, werden sie vorher mit Gelladungspuffer vermischt. Dieser besteht meistens aus Glycerin und zwei verschiedenen Farbstoffen. Das Glycerin erhöht die Dichte der Probelösung im Vergleich zum Elektrophoresepuffer und führt somit dazu, dass die Proben, wenn sie einmal in die Geltaschen pipettiert wurden, auch dort „liegen bleiben“. Die anionischen Farbstoffe dienen der optischen Kontrolle während der Elektrophorese, da sie parallel zu den Nukleinsäuren durch das Gel wandern.

Gelkammer

Die Gelkammer besteht lediglich aus einer Kunststoffwanne, in die an gegenüberliegenden Enden zwei korrosionsbeständige Metalldrähte (z. B. Platin) als Elektroden eingelassen sind. An die beiden Elektroden wird eine Gleichspannung von 50-100 V angelegt, die die Wanderung und somit die Auftrennung der Nukleinsäurefragmente bewirkt.



Abbildung 10: Pipettieren von Proben in die Geltaschen

Größenstandard

Bei der Analyse von DNA mittels eines Agarosegels benötigt man einen Maßstab, anhand dessen man beurteilen kann, welche Größe die nachgewiesenen Fragmente haben. Hierzu gibt es käuflich erwerbbar Größenstandards. Das sind Mischungen, die mehrere DNA-Fragmente definierter Länge enthalten. Man trägt diese Mischungen neben den eigentlichen Proben auf das Gel mit auf und kann so anhand einer mitgelieferten Legende (siehe Abb. 11) bei der Auswertung des Gels die eigenen Proben zuordnen.

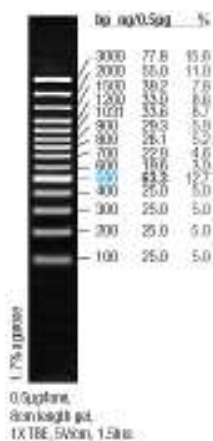


Abbildung 11: Legende zum verwendeten Größenstandard

Färbelösung und UV-Tisch

Ist die Gelelektrophorese beendet, so ist noch ein Problem zu lösen: die DNA, und zwar sowohl der Proben als auch des Größenstandards, ist mit dem bloßen Auge nicht zu sehen. Deshalb benötigt man eine möglichst einfache Methode, um sie auf dem Gel sichtbar zu machen. Dazu verwendet man meistens eine Ethidiumbromidlösung und einen UV-Leuchttisch.

Das Gel wird nach dem Lauf etwa 10-30 Minuten in Ethidiumbromidlösung eingelegt und dann auf einem UV-Leuchttisch betrachtet.

Ethidiumbromid hat die Eigenschaft, sich in die DNA einzulagern. Die Verbindung aus DNA und Ethidiumbromid fluoresziert unter UV-Anregung violett (s. Abb. 12). So kann man auf dem Leuchttisch direkt im Gel Erfolg oder Misserfolg seines Experimentes mit bloßem Auge betrachten und photographisch dokumentieren.



Abbildung 12: Mit Ethidiumbromid gefärbte DNA-Fragmente auf dem UV-Leuchttisch

Durchführung der Gelelektrophorese

Gießen des Gels

Material:

- Agarose
- TAE-Puffer
- Rührfisch
- Glasflasche
- Gelschlitten bzw. Gelkammer mit Kamm
- Lederhandschuhe

Durchführung:

- 0,6 g Agarose abwiegen und mit TAE-Puffer auf 60 ml aufgießen (1 % Agarose).
- Rührfisch in die Flasche geben (vermeidet Siedeverzug) und Gel unter Beobachtung in der Mikrowelle aufkochen (**Handschuhe!**).
- Heiße Mischung vorsichtig in die Gelkammer gießen und Kamm einsetzen.
- Gel abkühlen lassen, bis es milchig-trübe wird.

Beladen und Lauf des Gels

Material:

- Plasmidlösung
- Gelladungspuffer
- DNA-Größenstandard
- TAE-Puffer
- Sterile Eppis
- Automatik-Pipette und passende Spitzen
- Gelkammer und Spannungsquelle

Durchführung:

- 5 µl Plasmid-Lösung in sterilem Eppi mit 2 µl Gelladungspuffer mischen.
- TAE-Puffer in die Gelkammer gießen, bis das Gel leicht bedeckt ist.
- Gelkamm entfernen.
- In die linke und rechte äußere Tasche 5 µl Größenmarker pipettieren.
- Proben vorsichtig in die Geltaschen zwischen den Markern pipettieren, dabei schriftlich festhalten, in welche Tasche welche Probe gefüllt wird.
- Spannungsquelle anschließen, dabei Polung beachten (zu welchem Pol wandert die DNA?).
- Spannungsquelle einschalten (maximal sieben Volt Spannung je Zentimeter Elektrodenabstand).
- Gel laufen lassen, bis blaue Bande fast am Ende des Gels angelangt ist.

Färbung und Auswertung des Gels

Aufgrund des krebserregenden Potenzials von Ethidiumbromid werden die Färbung des Gels mit Ethidiumbromidlösung und das Übertragen auf den UV-Leuchttisch durch die Lehrkraft durchgeführt.

Auf dem Gel sind dann unter UV-Anregung die Banden der Plasmide zu sehen!

Quantifizierung der isolierten Plasmid-DNA

Da für weitere Arbeitsschritte wie z. B. den Restriktionsverdau der Plasmid-DNA definierte Mengen von DNA eingesetzt werden müssen, sollte die Konzentration der Plasmidlösung nach der Isolierung bestimmt werden. Hierzu gibt es prinzipiell zwei Möglichkeiten. Zum einen kann man ein UV-Spektrum aufzeichnen, zum anderen kann man eine Verdünnungsreihe im Agarosegel anlegen. Die Verdünnungsreihe im Agarosegel bietet sich an, da sie eine sehr kostengünstige und einfache Lösung ist.

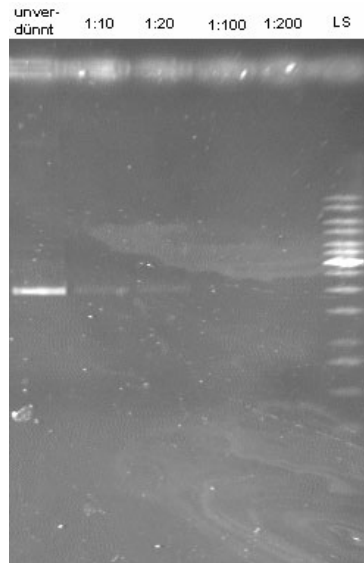


Abbildung 13: Verdünnungsreihe eines Plasmides

Die Abschätzung der Plasmidkonzentration kann nach folgendem Muster erfolgen (siehe Abb. 13):

Nach einer Plasmidpräparation liegt die Plasmid-DNA in 50 µl Gesamtvolumen vor. Ein Teil dieser Plasmidlösung wird verdünnt. Von der unverdünnten Ausgangslösung und von den verdünnten Proben werden jeweils 5 µl auf das Agarosegel aufgetragen. Nach der Auftrennung und der Anfärbung mit Ethidiumbromid ist bei der Verdünnungsstufe von 1:20 die DNA-Bande gerade noch sichtbar. Sie enthält also etwa 10 ng DNA in 5 µl aufgetragener Probe (Nachweisgrenze im Gel mit Ethidiumbromid). Damit enthält die unverdünnte Probe (10 ng x 20 =) 200 ng Plasmid-DNA / 5 µl unverdünnter Probe. Es wurden also insgesamt 2000 ng = 2 µg Plasmid-DNA isoliert

Anlegen einer Verdünnungsreihe von Plasmid-DNA-Lösung

Material:

- Steriles Wasser
- Sterile Eppis
- Automatik-Pipette und passende Spitzen
- Plasmidlösung

Durchführung:

Die Plasmidlösung wird mit sterilem Wasser in den Verdünnungsstufen 1:10, 1:20, 1:100 und 1:200 verdünnt.

→ Überlege dir zunächst eine sinnvolle Vorgehensweise

Bestimmung der Konzentration:

Jeweils 5 µl der Verdünnungsstufen werden entsprechend der oben angegebenen Vorgehensweise für die Gelelektrophorese vorbereitet und auf ein Gel aufgetragen.

Die Gelkammer muss nur sehr kurz an die Spannungsquelle angeschlossen werden, da hier keine Auftrennung der Proben stattfindet, sondern lediglich die Intensität der Banden verglichen werden soll. Nach der Färbung des Gels mit Ethidiumbromid kann auf die ursprüngliche Konzentration der Plasmidlösung zurückgerechnet werden.

Restriktionsanalyse

Restriktionsendonukleasen, oder abgekürzt "Restriktionsenzyme", sind eines der wichtigsten Hilfsmittel in der Molekularbiologie. Ohne sie wäre ein gezieltes Zerschneiden chromosomaler DNA nicht möglich. Da sie an den Fragmentenden häufig überlappende Enden tragen, die miteinander "verklebt" werden können, ermöglichen sie eine Neukombination von DNA-Fragmenten aus verschiedenen Organismen. So können neue biochemische Eigenschaften hergestellt werden. Zum Beispiel kann einem Bakterium die Fähigkeit zur Produktion eines menschlichen Genproduktes wie Insulin vermittelt werden.

Restriktionsendonukleasen werden aus Bakterien gewonnen. Dort dienen Sie der Abwehr ("Restriktion") von Phagen-Nukleinsäuren.

Durchführung des Restriktionsverdau

Im Versuch soll das vorher isolierte Plasmid pUC 18 mit dem Restriktionsenzym (RE) Apa I verdaut werden und der Verdau anschließend gelelektrophoretisch nachgewiesen werden.

Ansetzen des Restriktionsverdau**Material:**

- Plasmidlösung
- Apa I und entsprechender Puffer
- Steriles Wasser
- Sterile Eppis
- Automatik-Pipette und passende Spitzen

Durchführung:

- 0,1 – 2 µg Plasmid-DNA (Volumen berechnen) mit
- 1 µl 10fach konzentrierter Puffer,
- sterilem Wasser bis zu einem Volumen von 10ml und
- 0,5 µl RE-Lösung mischen.

Das Enzym wird immer zuletzt zugegeben (Warum?). Bei der Handhabung von Enzymen ist darauf zu achten, dass diese immer auf Eis gekühlt werden und nicht allzu oft aufgetaut und wieder eingefroren werden, um ihre Aktivität nicht negativ zu beeinflussen.

Der Ansatz wird gut durchmischt, abzentrifugiert und bei 37°C für 40-60 Minuten inkubiert. Anschließend können die meisten Enzyme durch einen Hitzeschock inaktiviert werden. Dieser Schritt ist aber für dieses Experiment nicht nötig.

2-10 µl des Reaktionsansatzes werden anschließend in einer Gelelektrophorese analysiert.

Auswertung des Restriktionsverdaus

Das Plasmid pUC 18 enthält drei Schnittstellen für das Enzym Apa LI (siehe Abb. 14).

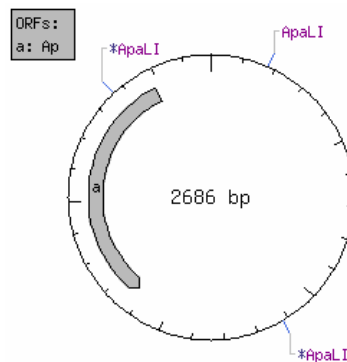


Abbildung 14: Schnittstellen des Enzyms Apa LI in pUC 18

Im Internet kann mit dem frei zugänglichen Online-Tool „NEB-Cutter“ (Google) sehr einfach eine virtuelle Simulation des zu erwartenden Bandenmusters im Agarosegel erstellt werden. (siehe Abb. 15)

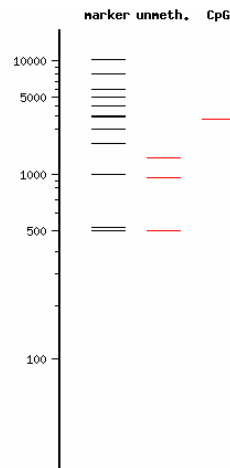


Abbildung 15: Gelsimulation für die Restriktion von pUC 18 mit Apa LI

Es sollten drei Banden mit den Längen von 1246, 943 und 497 bp zu identifizieren sein. Ein Vergleich mit dem realen Gel zeigt, ob tatsächlich das Plasmid pUC 18 vorhanden war.

Der Versuch ist ein einfaches Modell für die Genanalyse über den Restriktionsfragmentlängenpolymorphismus (RFLP). Verdaut man zwei DNA-Proben mit mehreren Restriktionsenzymen, so stimmen die nach der Agarosegelelektrophorese sichtbaren Bandenmuster überein, wenn die Sequenzen der DNA-Proben übereinstimmen. Gibt es Unterschiede in den DNA-Proben, die sich im Verlust, dem Hinzukommen oder der Verschiebung einer Schnittstelle für eines der Restriktionsenzyme äußern, so entstehen unterschiedliche Bandenmuster. Auf diese Weise können DNA-Proben direkt miteinander verglichen werden.

Dieses Prinzip wurde z. B. in der Forensik zur Erstellung von genetischen Fingerabdrücken verwendet.