Modul 2B: Analyse von Plasmiden II – PCR in der Wissenschaft

Plasmide sind kleine ringförmige DNA-Moleküle, die in den meisten Bakterien, in einigen Hefen, aber nicht in höheren Eukaryoten vorkommen. Sie wurden in den fünfziger Jahren entdeckt, als man der schnellen Ausbreitung von Antibiotikaresistenzen auf die Spur kommen wollte und entdeckte, dass die Gene, die für die Ausbildung einer solchen Resistenz verantwortlich sind, in der Regel auf Plasmiden zu finden sind. Ende der 60er und Anfang der 70er Jahre wurden dann als weiteres wichtiges Werkzeug für die aufkommende Gentechnologie die Restriktionsenzyme, ebenfalls in Bakterien, entdeckt. Dies führte zu der Idee ganz verschiedene DNA-Stücke aus unterschiedlichen Spezies in einem künstlichen Plasmid im Reagenzglas neu zu (re-)kombinieren und dieses „künstliche“ Plasmid anschließend wieder in Bakterien einzuführen.
Da Bakterien sehr schnell wachsen – und mit ihnen die Plasmide entsprechend vermehrt werden – legt man eine beliebig große Bakterienkultur an, aus der dann die Plasmide in kleinen, mittleren oder großen Mengen präpariert werden können. Unsere Bakterienkultur ist nur einige Milliliter groß, und so führen wir also eine Minipräparation durch. Die Ausbeute beträgt dabei etwa einige Mikrogramm Plasmid-DNA – eine winzig erscheinende Menge, die jedoch ausreicht, um damit eine ganze Reihe von Versuchen wie z.B. Analysen mittels Polymerasekettenreaktion, duchzuführen. Plasmide, funktionell häufig auch als Vektoren bezeichnet, gehören heute zu den wichtigsten Arbeitspferden biomedizinischer Forschung.

Unser Plasmid:

In unser Plasmid ist ein Gen „eingebaut“ worden, das für das Enzym ß-Galactosidase kodiert. ß-Galactosidase kann den Milchzucker (Lactose) in der Milch spalten und so zur Herstellung lactosefreier Milch genutzt werden.
Wenn man ein Plasmid in ein Bakterium eingebracht hat, muss man erst durch z.B. Restriktionsverdaue oder PCR gucken, ob das Bakterium auch das richtige Plasmid aufgenommen hat.

Und darin besteht heute eure Aufgabe:

Führt eine Plasmid-Minipräparation mit anschließender PCR durch, um zu analysieren, ob die Bakterien auch wirklich das gewünschte pET-14b ß-Gal Plasmid tragen!

Zu Anfang gleich ein paar Tipps:

Wichtig: Beschriftet eure Eppis immer gut, sonst findet ihr eure Probe nicht mehr!

Zu den Pipetten:

1000er Pipette (blau): blaue Spitzen benutzen und nur 100-1000 µL pipettieren

200er Pipette (gelb): gelbe Pipettenspitze und nur 20-200 µL pipettieren

20er Pipette (gelb): gelbe Pipettenspitze und nur 2-20 µL pipettieren

Legende zum Skript:

Arbeitsanweisung Zusatzinformation Zusatzfragen

Schritt 0: Ansetzen der Bakterienkultur und Ernten der Bakterien

(das haben wir bereits erledigt!)

1. Isolierung der Plasmid-DNA

Schritt 1: Resuspendieren der Zellen

Bakterienpellet in 100 µL Lösung S1 suspendieren, indem man kräftig mit dem Zeige- oder Mittelfinger gegen das Eppi schnippt.

Lösung S1: *Puffer, der den pH-Wert konstant hält und dazu dient, die im Pellet (Niederschlag) konzentrierten Bakterien in einer wässrigen Lösung zu verdünnen (suspendieren). Die Bakterien werden dabei nicht aufgelöst, sondern bleiben als Teilchen in Lösung (= Suspension) erhalten.*

*Wie sieht die Bakteriensuspension aus?*_____

Schritt 2: Lyse der Zellen

200 µL Lösung S2 zugeben und durch mehrmaliges Umdrehen (vorher das Eppi schließen ;-)) durchmischen. 5 Minuten stehen lassen.

Lösung S2: *Das* ***SDS*** *ist ein Waschmittel, das die Zellwand der Bakterien auflöst (erst jetzt haben wir eine Lösung!). Dadurch werden Proteine, Chromosomen-DNA, Plasmid-DNA und RNA freigesetzt. Die Lösung wird zähflüssig (viskos).*
Natronlauge *(NaOH) wirkt denaturierend auf DNA. Sowohl Chromosomen- als auch Plasmid-DNA werden dadurch in Einzelstränge getrennt. Die Lösung wird sehr alkalisch.*
Auch die ***Proteine*** *werden in diesem Schritt* ***denaturiert****, d.h. sie verlieren ihre charakteristische dreidimensionale Faltung.*

*Hat sich im Eppi etwas verändert ?*_____

Schritt 3: Fällung der Proteine

150 µL eiskalte Lösung S3 zugeben, kräftig schütteln und dann 10 Minuten auf Eis stellen.

Lösung S3: *enthält* ***Kaliumacetat****: Dadurch wird die in Schritt 2 alkalisch gewordene Lösung wieder neutralisiert. Die Plasmide bleiben dabei in Lösung, während die Chromosomen-DNA und die Proteine verklumpen und ausfallen.*

*Was kannst du beobachten?*_____

*Kennst du dieses Phänomen aus dem Alltag?*_____

_____

10 Minuten zentrifugieren (10.000xg). Den **Überstand (!)** abnehmen und **in ein neues Eppi** überführen.

Durch Zentrifugation werden wir die Chromosomen-DNA und die denaturierten Proteine los. Im Überstand verbleiben die Plasmide, die wir haben wollen.

Schritt 5: Fällung der Plasmid-DNA

1 mL 100% EtOH (2,5 faches Volumen des abgenommenen Überstands) zugeben und mehrfach umschütteln. 5 Minuten auf Eis stellen.

***100% Ethanol** macht die Lösung unpolarer, so dass sich die Plasmid-DNA nicht mehr lösen kann und ausfällt. Die Ausfällung der DNA funktioniert bei niedriger Temperatur (auf Eis) besser; aber es geht auch ohne.*

10 Minuten zentrifugieren (10.0000xg). Dann den Überstand vorsichtig abschütten. Aufpassen, dass das Pellet im Eppi bleibt.

Nach Beendigung der Zentrifugation haben wir ein winzig kleines, manchmal kaum sichtbares Pellet, das nur die gewünschten Plasmide enthält.

Keine Angst, die Plasmide bleiben schon im Eppi, wenn man nicht gerade mit Brachialgewalt schüttet. Es ist normal, dass ein Tropfen im Eppi zurückbleibt.

Schritt 8: Waschen der Plasmid-DNA

1 mL 70%igen Ethanol zugeben, dann 5 Minuten zentrifugieren, Überstand abgießen, Eppi einige Sekunden mit der Öffnung nach unten halten und den angesammelten Tropfen abtupfen. Das geöffnete Eppi ;-) anschließend für wenige Minuten in einen 50 °C warmen Heizblock stellen.

Der 70%ige Ethanol sorgt dafür, dass die Plasmide nicht in Lösung gehen können. Die 30% Wasser in dieser Lösung waschen Salze und alle möglichen Substanzen, die wir vorher dazugegeben hatten, aus dem Pellet aus. Diese nehmen wir mit der Lösung ab und schmeißen sie weg.

Es wird möglichst alle Flüssigkeit abgenommen, ohne das Pellet abzusaugen, damit die Plasmide im Heizblock schnell trocknen. Ein wenig Vorsicht ist geboten, da sich das Pellet im 70%igen Alkohol leicht vom Eppi löst.

Keine Panik! Nach dem Trocknen ist das Pellet unsichtbar. Es ist aber trotzdem noch da. Versprochen!

Schritt 9: Lösen der Plasmid-DNA in UV-Wasser

(Unsichtbares) Pellet in 20 µL UV-Wasser aufnehmen.

UV-Wasser ist mit UV-Licht (UV = ultraviolett) bestrahltes Wasser. Bei der Bestrahlung wurden alle sich „zufällig“ im Wasser befindlichen Nucleinsäuren zerstört, so dass diese bei den folgenden Schritten nicht stören können.

2. Vervielfältigung von DNA-Abschnitten mittels PCR

Bei der Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR = polymerase-chain-reaction) können gezielt betsimmte DNA Sequenzen kopiert werden.

☐ Wir mischen gemeinsam den **Mastermix**, der alle für die Reaktion notwendigen Komponenten enthält. Der Master-Mix wird dann in spezielle Reaktionsgefäße („PCR-tubes“) für die PCR-Machine gefüllt (je 23 µL). Jeder gibt anschließend 2 µL der isolierten Plasmid-DNA dazu.

Vorsichtig mischen, aber NICHT mehr dagegen Schnippen, da man diese kleinen Eppis nicht mehr zentrifugieren kann.
Da wir mit sehr kleinen Mengen arbeiten, bitte sehr sorgfältig pipettieren.

Master-Mix

UV-Wasser	9,5 µL	
PCR-Puffer mit $MgCl_2$	2,5 µL	*Der Inkubationspuffer schafft eine „angenehme“ Umgebung für die Taq-Polymerase.*
dNTP-Mix	2,5 µL	*Der dNTP-Mix enthält alle Einzelbausteine, also die vier Nukleotide, die für die DNA-Synthese notwendig sind.*
Primer-Mix (aus 3-Primern)	2,5 µL	*Der Primer-Mix enthält drei Primer (kurze einzelsträngige DNA-Stücke), die der Taq-Polymerase beim Kopieren der gewünschten DNA-Abschnitte als Startpunkt dienen.* *Je nachdem ob das Gen in das Plasmid eingebaut wurde oder nicht, erhält man am Ende ein unterschiedlich großes PCR-Produkt.*
Taq-Polymerase	1 µL	*Die hitzestabile Taq-Polymerase ist das Enzym, das am Primer ansetzt und entsprechend der Vorlage einen neuen DNA-Strang synthetisiert. Sie kopiert also die DNA.*
DNA in Lsg.	2 µL	
Gesamtvolumen	25 µL	

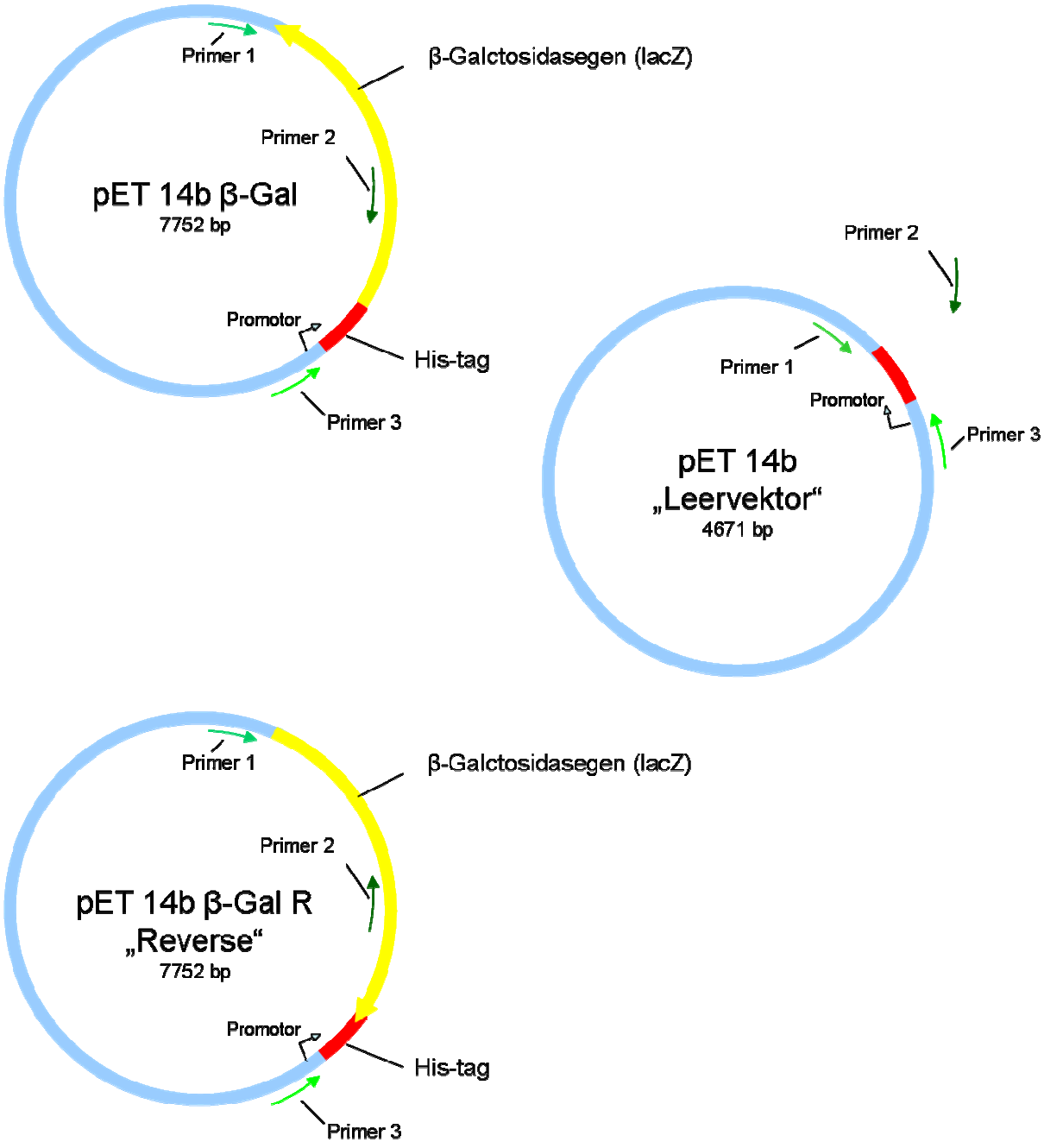
☐ Dann ist fürs erste alles getan und ihr müsst eure Eppis nur noch in die PCR-Maschine stellen. Wenn das Programm komplett durchgelaufen ist, könnt ihr eure Eppis wieder abholen.

PCR Programm:

32 Zyklen

95°C	Denaturieren	*Die doppelsträngige DNA wird einzelsträngig, da die Wasserstoffbrückenbindungen werden gespalten.*
70°C	Annealing	*Bei dieser Temperatur lagern sich die Primer an.*
72°C	Elongation	*Bei dieser Temperatur wird die Taq-Polymerase aktiv und synthetisiert einen neuen DNA-Strang anhand des vorliegenden Einzelstrangs. Dabei nutzt sie das Ende eines Primer als Startstelle.*

Weitere Informationen zu unserem Plasmid (pET 14b ß-Gal)



Abbildungen: Science Bridge 2008, Sara Müller

Warum ist es wichtig zu wissen, in welcher Orientierung das Gen in den Vektor ligiert wurde? Und was versteht man unter der „richtigen“ Orientierung?
Hinweis: Der Vektor soll benutzt werden, um Baketrien Lactase (ß-Galactosidase) herstellen zu lassen!

Liegt der Leervektor vor ist ein PCR-Fragment von 309bp zu erwarten.
Ist das Insert in der richtigen Orientierung eingebaut worden, erhält man ein PCR-Produkt von 600 bp. Bei Inetgration des Gens in der falschen Oriemtierung kann unter den gegeben Bedingungen kein PCR-Produkt erhalten werden.

2. Agarosegelelektrophorese

Trennung und Sichtbarmachung der durch Restriktionsverdau erzeugten DNA-Fragmente sowie der isolierten ungeschnittenen Plasmid-DNA mittels Agarosegelelektrophorese.

Schritt 11: Vorbereiten des 2%igen Agarose-Gels

2 g Agarose wird in ein Gefäß gegeben und mit 1x TBE-Puffer auf 100 mL aufgefüllt und gekocht. Damit nichts anbrennt, wird die Lösung mit einem „Rührfisch“ bei etwa 500 Umdrehungen gerührt.

Agarose ist ein Pulver aus der Agar-Agar Pflanze, mit dem man ein Gel herstellen kann. Den Puffer brauchen wir, um den pH-Wert konstant zu halten und das Wasser ist einfach zum Auffüllen da. Die Agarose löst sich beim Erhitzen im Wasser.

Die Lösung leicht abkühlen lassen und **in die Elektrophorese-Apparatur** füllen, Kamm einstecken und das Gel abkühlen und erstarren lassen.
Nach dem **Erstarren** (ca. 30 min später) den Kamm und die beiden Keile vorsichtig herauslösen und das Gel mit 1x TBE-Puffer übergießen, bis es vollkommen bedeckt ist.

Mit Hilfe eines „Kammes“ werden Taschen im Gel hinterlassen, in die ihr später eure DNA einfüllen könnt.

Schritt 12: Beladen des Gels

10 µL der verdauten DNA-Lösung in ein neues Eppi geben und dazu 5 µL Auftragspuffer pipettieren und mischen.
(Von der Plasmid-DNA, die nicht zur PCR genutzt wurde, tragen wir je 5µL + 5µL Auftragspuffer auf).

*Der **Auftragspuffer** enthält: **Glycerin** zum Beschweren der Lösung, die sich dann leichter in die Geltaschen pipettieren lässt.*
*Zwei **blaue Farbstoffe** (Bromphenolblau und Xylencyanol) zum Sichtbar-machen, denn sonst ist alles in der Lösung farblos und ihr könntet nicht sehen, wohin ihr pipettiert.*
*WICHTIG: Diese Farbstoffe färben **nicht** die DNA!!*
***SYBR-Gold**, ein Farbstoff, der sich an die DNA setzt (sie anfärbt) und bei UV-Licht floresziert. Man kann ihn also bei normalem Tageslicht nicht sehen.*

Nun pipettiert jeder von euch seine 15 µL Probe in eine der Geltaschen.

*In die erste Tasche wird ein **Marker** (Größenstandard) pipettiert, der uns nachher dabei hilft unseren Fragmenten eine Größe zuzuordnen!*
WICHTIG: Die Reihenfolge des Probenauftrags notieren!

Schritt 13: Starten der Gelelektrophorese

Strom anlegen (ca. 100 V – max. 120 V), die Elektrophorese beginnt. Man sollte sie 30-45 Minuten laufen lassen. Nach dieser Zeit nehmen wir das Gel aus dem Puffer und legen es auf den **Dark-Reader**. So können wir die Banden sichtbar machen.

Die DNA-Stücke (Ergebnisse der PCR) trennen sich der Länge nach auf.
Sie sind während des Laufs unsichtbar!!

Skript: Science Bridge 2008, Benjamin,Boesler, Sara Müller