

Versuch 2: Isolation und Restriktionsverdau von DNA

Einführung:

Zuerst wird aus HELA-Zellen genomische DNA extrahiert und aufgereinigt (Ethanol-fällung). Im zweiten Schritt wird die gDNA und ein Plasmid mit Restriktionsenzymen gespalten. Bei der gDNA erwarten wir eine statistische Verteilung an Restriktionsschnittstellen. Bei dem Plasmid wollen wir herausfinden, ob das Plasmid in Sense- oder Antisense-Richtung eingebaut ist.

Durchführung:

Photometrische Gehaltsbestimmung: $A_{260} = 0,885$

$$\begin{aligned} C_{\text{Probe}} &= 50 \mu\text{g/ml} * A_{260} * \text{Verdünnung} \\ &= 50 \mu\text{g/ml} * 0,885 * 10 \\ &= 442,5 \mu\text{g/ml} \end{aligned}$$

Nach der Isolation wird die gDNA mit HindIII und AluI geschnitten. Da wir pro Ansatz 2 µg DNA nutzen sollen werden folgende Mengen genutzt:

$$\begin{aligned} V_{\text{Ansatz}} &= 2 \mu\text{g} / 442 (\mu\text{g/ml}) \\ &= 4,52 \mu\text{l} \end{aligned}$$

Probe 1:	Probe 2:	Probe 3:	Probe 4:	Probe 5:
4,5 µl DNA	4,5 µl DNA	4,5 µl DNA	1 µl Plasmid	3,2 µl Plasmid
1 µl HindIII	1 µl AluI	20,5 µl H ₂ O	24 µl H ₂ O	3 µl Puffer
2,5 µl Puffer	2,5 µl Puffer			1 µl BamHI
17 µl H ₂ O	17 µl H ₂ O			22,8 µl H ₂ O

Ergebnisse:



λ – Lambda-Marker

χ – Phi-Marker

- 1 – gDNA mit AluI geschnitten
- 2 – gDNA mit HindIII geschnitten
- 3 – gDNA positiv-Kontrolle
- 4 – Plasmid mit BamHI geschnitten
- 5 – Plasmid positiv-Kontrolle

Diskussion:

Ein Restriktionsenzym, welches eine Erkennungsstelle von 4 Basenpaaren (z.B. AluI) hat, scheidet bei dem HELA-Genome ($3,27 \cdot 10^9$ bp) ungefähr alle 256 Basenpaare (4^4 mal). Ein Restriktionsenzym mit einer Erkennungstelle von 6 Basenpaaren (z.B. HindIII) schneidet ungefähr alle 4096 (4^6 mal).

gDNA-Verdau:

In den Laufbahnen der genomischen DNA (1 – 3) kann man vollständige, nicht verdaute DNA Fragmente sehen, die weit größer als 25.000 Basenpaaren sind (Änderung zum Skript, hier wurde nach dem Aufschluss nicht gevortext, so dass keine ~ 20.000 bp entstanden sind).

Beim Vergleich der Banden 1 (AluI) und 2 (HindIII) kann man erkennen, dass es neben den Banden der großen genomischen DNA noch einen „Schlier“ gibt. Dies sind kleinere DNA-Fragmente, die durch Scherkräfte entstanden sind. Beim AluI kann man noch erkennen, dass hier vergleichsweise viele kleine Fragmente (300 – 600 bp) entstanden sind. Dies ist auf die erhöhte Restriktions-Wahrscheinlichkeit zurückzuführen.

Plasmid-Verdau:

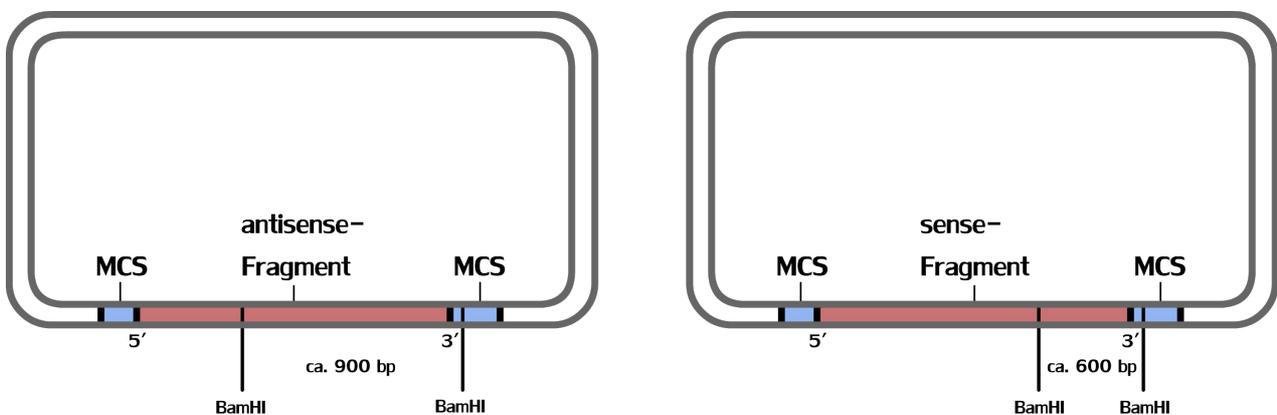
In der Laufstrecke 5 sieht man das unverdaute Plasmid. Es sind mindestens 3 Banden auszumachen. Die oberste Bande (die am kürzesten gelaufen ist) wird durch unvollständig replizierte Plasmide zurückzuführen. Die zweite, mittlere Bande ist wahrscheinlich das native Plasmid und die letzte Bande hat die supercoiled-Form.

Die Restriktion mit BamHI soll zeigen, ob das Fragment im Plasmid in sense- oder antisense-Richtung eingebaut ist.

Bekannt war:

- Das Fragment ist 1500 bp lang.
- An der 900sten Stelle des Fragments ist eine BamHI-Schnittstelle
- direkt am 3'-Ende des Fragmentes ist in der MCS des Plasmids auch eine BamHI-Schnittstelle

Einbaumöglichkeiten des Fragments:



Da die Bande in der Laufstrecke 4 bei ungefähr 900 bp liegt ist das Fragment in antisense-Richtung eingebaut.