

Ergebnisprotokoll Versuch 19

Restriktionsanalyse und Hybridisierung von DNA

1. Stichworte

- Plasmide (*Aufbau, Funktion, Vorkommen*)
- Restriktionsenzyme (*Polylinker, Schnittmechanismen*)
- Messmethoden (*Gelelektrophorese, Southern Transfer, DNA-Sonden*)

2. Einleitung

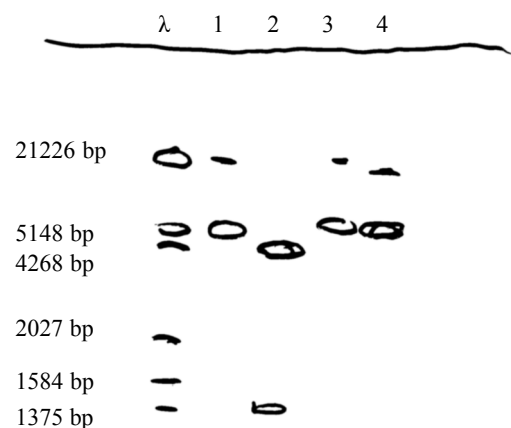
Ein Plasmid soll dahingehend untersucht werden, ob es eine Transketolasesequenz enthält. Hierzu schneidet man es zunächst mithilfe von Endonukleasen bekannter Schnittsequenz und trennt anschließend die so gewonnenen Fragmente durch eine Gelelektrophorese. Nachdem man die Größe der einzelnen Fragmente durch Vergleich mit einem Größenstandard ermittelt hat, transferiert man diese durch einen *southern transfer* auf eine Nylonmembran. Nach thermischer Fixierung der DNA-Fragmente weist man das gesuchte Transketolasefragment durch Hybridisierung mit einer dioxygeninmarkierten Sonde nach. Zum Nachweis bindet ein dioxygeninspezifischer Antikörper mit alkalischer Phosphataseaktivität an die markierten Fragmente und katalysiert die Präzipitation eines blauen Farbstoffes.

3. Versuchsdurchführung

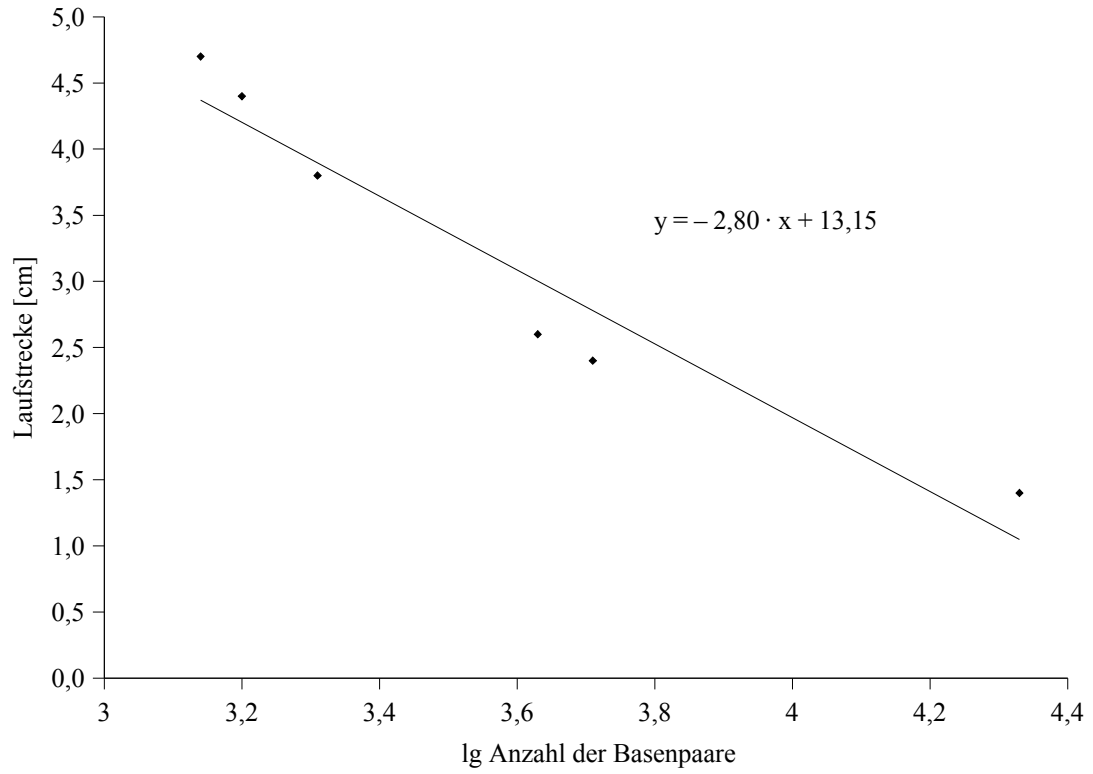
Der Versuch wurde nach den Angaben des Praktikumsskriptes¹ und nach Anweisung des Assistenten durchgeführt.

4. Restriktionsanalyse und Gelelektrophorese

Fragment	Laufstrecke
21226 bp	1,4 cm
5148 bp	2,4 cm
4268 bp	2,6 cm
2027 bp	3,8 cm
1584 bp	4,4 cm
1375 bp	4,7 cm

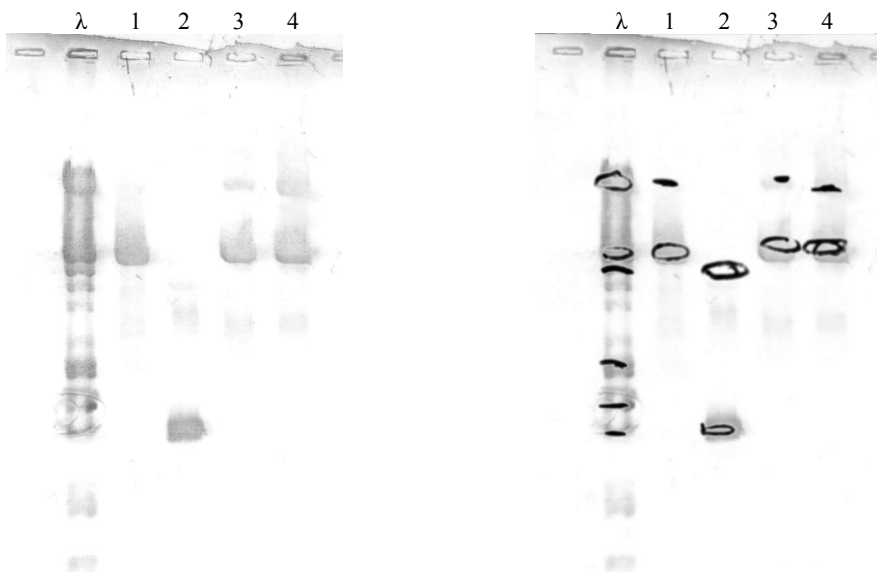


Kalibriergerade Größenstandard



	Fragment I		Fragment II	
	Laufstrecke	Größe	Laufstrecke	Größe
Laufstrecke I	1,5 cm	14670 bp	2,4 cm	6990 bp
Laufstrecke II	2,6 cm	5928 bp	4,9 cm	891 bp
Laufstrecke III	1,5 cm	14670 bp	2,4 cm	6990 bp
Laufstrecke IV	1,6 cm	13510 bp	2,4 cm	6990 bp

5. Southern Transfer und Hybridisierung



Die durch UV-Detektion bereits gewonnene Schablone der Gelelektrophorese stimmt mit der gefärbten Nylonmembran überein. Der Größenstandard kann daher wie in der rechten Abbildung gezeigt über die Nylonmembran gelegt werden.

	Theoretisches Fragment	Schnittstelle	Anfärbung durch Sonde	Gefundenes Fragment
Bahn I HindIII	7000	0,61 1,23 2,07	Sonde 1 – 4	6990
	6380	0,61 – 1,23		
	6160	1,23 – 2,07		
	5540	0,61 – 2,07		
	1460	0,61 – 2,07		
	840	1,23 – 2,07	Sonde 1	
	620	0,61 – 1,23	Sonde 4	
Bahn II NdeI	7000	0,00	Sonde 1 – 4	6990
Bahn III NdeI Sall	7000	0,00 0,04 2,07	Sonde 1 – 4	6990
	6960	0,00 – 0,04		
	4970	0,04 – 2,07		
	4930	0,00 – 2,07		
	2070	0,00 – 2,07		
	2030	0,04 – 2,07	Sonde 2	
	40	0,00 – 0,04		
Bahn IV HindIII PstI	7000	0,61 1,23 2,07 3,37	Sonde 1 – 4	
	6380	0,61 – 1,23		
	6160	1,23 – 2,07		5928
	5700	2,07 – 3,37		
	5540	0,61 – 2,07		
	4860	1,23 – 3,37		
	4240	0,61 – 3,37		
	2760	0,61 – 3,37		
	2140	1,23 – 3,37		
	1460	0,61 – 2,07		
	1300	2,07 – 3,37	Sonde 3	
	840	1,23 – 2,07	Sonde 1	891
	620	0,61 – 1,23	Sonde 4	

6. Diskussion der Versuchsergebnisse

Wenn auch nur in einem Fall das eingesetzte Plasmid in ausreichender Menge geschnitten werden konnte, wurden die Methoden im Hinblick auf die Auswertbarkeit erfolgreich angewandt. Wie die spätere Analyse der Fragmente ergab haben wir offensichtlich die Bahnen II und IV vertauscht. Die Bahnen I, III und IV zeigen fast ausschließlich ungeschnittenes Plasmid, was möglicherweise auf zerstörte Restriktionsenzyme hinweist. Die Ergebnisse für Bahn IV respektive Bahn II entsprechen den Erwartungen. Man muß beim Vergleich der theoretischen Basenpaarlängen mit den experimentell ermittelten einräumen, dass bereits ein falsch abgemessener Millimeter deutliche Auswirkung auf die berechnete Basenpaarlänge hat. Die Zeichnung der Restriktionsanalyse ist nicht so schwer zu gewichten wie die Färbung des *southern transfers*, da durch den schrägen Betrachtungswinkel beim Abzeichnen Abweichungen zustandekommen können. Nichtsdestotrotz zeigen die Restriktionsanalyse auf Bahn II, sowie die angefärbten Banden auf Bahn I,III und IV, dass das Transketolasegen auf dem Plasmid vorhanden ist.

7. Quellen

- 1 Arbeitsunterlagen zum Praktikum Pharmazeutische Biologie III SS 2004
 Methoden der phytochemischen Untersuchung, Pharmazeutische Biologie
 Rheinische Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn, Fassung SS 2004