

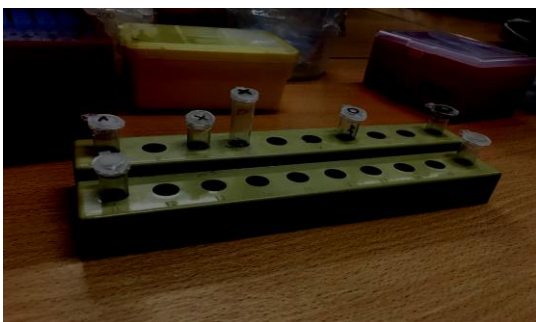
Gelelektrophorese, rekombinante Plasmide, Bacillus Amyloliquefaciens – Schon mal gehört ?

Am 10. Januar 2019 besuchten wir, die Schülerinnen und Schüler des Q1 Biologie Leistungskurses von Herr Rosenthal, das gentechnische Schülerlabor KölnPUB in Frechen. Dort wollten wir die im Unterricht theoretisch erlernten Inhalte praktisch unter professioneller Anleitung in drei aufeinanderfolgenden Experimenten - die Isolierung der Plasmid DNA, das Schneiden von Plasmid DNA und Fremd-DNA mithilfe von Restriktionsenzymen und den abschließenden Nachweis rekombinanter Plasmid mithilfe der Agarosegelelektrophorese - selber durchführen.

Zu Beginn stellten sich die Laborleiterin und ihr Assistent, die die durchzuführenden Experimente betreuen würden, vor. Sie erklärten dem Kurs, welche Materialien und Arbeitsmittel sie für das Experiment wie verwenden müssen.

Auf dem Bild rechts sieht man den Arbeitsplatz, an dem wir in Paaren die Experimente durchführen sollten. In der Mitte des Tisches erkennt man die Pipettenspitzen, die in kleinen, sterilen Boxen aufbewahrt werden und auch die Reaktionsgefäße und der Abfallbecher haben in der Mitte ihren Platz. Links und unten rechts befinden sich die Pipettierhilfen, mit

denen man sehr kleine Volumen wie zum Beispiel 1 Mikroliter pipettieren kann. Außerdem kann man rechts die Zentrifuge erkennen, die die Reaktionsgefäße in einer großen Geschwindigkeit dreht und somit die Bestandteile innerhalb des Reaktionsgefäßes trennt. Darunter befindet sich der Stromkasten, in dem im Laufe des Experiments die Gelelektrophorese angeschlossen wird.



Jede Gruppe hatte zwei Reaktionsgläser im Reaktionsglasständer, in denen sich zwei verschiedene Bakterienkulturen befanden, deren Plasmide isoliert werden sollten.

Los ging es:

Zunächst mussten wir die drei Lösungen in unterschiedlichen Mengen zu den Bakterien hinzupipettieren, bis wir eine trüben Lösung hatten. Die Reaktionsgefäße kamen anschließend für 10 Minuten in die Zentrifuge, um die flüssige Phase von der festen Phase zu trennen (Bild links)

Zunächst füllten wir die Geltaschen mit den gefärbten Ansätzen, die zuvor vorbereitet und mit einem blauen Farbstoff markiert wurden. Danach nur noch Deckel drauf, Strom an und abwarten!

In diesen 10 Minuten, während die Reaktionsgläser in der Zentrifuge waren, konnten wir nach zwei Stunden Pause machen. Anschließend konnten wir mit den zentrifugierten Bakterien weiterarbeiten. Um die Plasmide von der Bakterien zu trennen, mussten wir verschiedene Lösungen mit Hilfe der Pipettierhilfen dazugeben und anschließend erneut zentrifugiert.



Jetzt hatten wir endlich die Plasmide und konnten mit dem zweiten Experiment anfangen, und zwar mussten die Plasmide nun gespalten werden. Dazu hat man drei verschiedene Ansätze aufbereitet, in denen sich hauptsächlich die zwei verschiedenen Plasmide, die Fremd-DNA und die Restriktionsenzyme EcoR I, welches aus der Bakterie E.coli gewonnen wird, und BamH I, welches aus der Bakterie Bacillus Amyloliquefaciens gewonnen wird, befanden. Diese drei Ansätze wurden anschließend für 30 Minuten bei 37 Grad Celsius erwärmt, um den Restriktionsenzymen genügend Zeit zu geben, ihre Schnittstellen auf der DNA der Plasmide und der Fremd-DNA zu suchen und zu schneiden. In dieser Phase hatten wir Zeit, die Agarosegelelektrophorese vorzubereiten für den dritten Teil.



Nach etwa einer halben Stunde war es endlich soweit! Jetzt konnten wir unsere Ergebnisse sehen. Nachdem die Gele in einer Azur B Lösung getränkt wurden, die dazu führt, dass man die einzelnen Banden der DNA sehen kann. Wenn die Gele so aussahen, wie auf den beiden Bildern unten, wurden alle Arbeitsschritte richtig durchgeführt und das Ziel erreicht: Fremd-DNA wurde erfolgreich in das Plamid eingebaut.



