

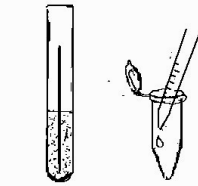
Plasmid-Puzzle mit pBioS14

-Restriktionskartierung eines Plasmids-

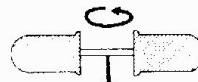
In der Gentechnik werden Plasmide als Transportmittel (Vektoren) für die DNA-Klonierung genutzt. Hierfür ist es unbedingt notwendig, bestimmte strukturelle Merkmale des Plasmids zu kennen. Am Beispiel des Vektors "pBioS14" aus einem gentechnisch veränderten Bakterienstamm von *Escherichia coli* wird eine einfache Restriktionskarte erstellt.

1. Isolierung der Plasmid-DNA mit Hilfe von Silika Technologie und Zentrifugation

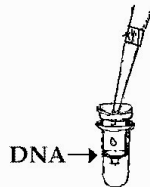
1



Es werden Bakterienzellen aus einer Über-Nacht-Kultur von *E. coli* verwendet.



In Zentrifugationsschritten werden die Plasmide von den übrigen Zellbestandteilen getrennt.



Mit Hilfe eines speziellen Verfahrens wird die DNA an einer Silika-Membran (Pfeil) in einem Reaktionsgefäß gebunden.



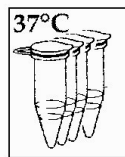
Am Ende wird die hoch gereinigte Plasmid-DNA -in einem Puffer gelöst- in einem Eppendorfgefäß aufgefangen.

2. Restriktionsabbau der Plasmid-DNA

2



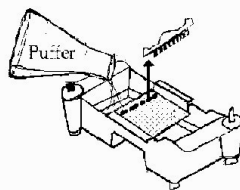
Die Plasmid-DNA wird nun mit Restriktionsendonucleasen (Restriktionsenzyme) geschnitten. Diese Enzyme zeichnen sich dadurch aus, dass sie nur innerhalb ganz spezifischer DNA-Sequenzen das Plasmid auseinander schneiden. Wir verwenden für unsere Kartierung verschiedene Restriktionsenzyme, die wir einzeln und in Kombination einsetzen. Auf diese Weise wird die DNA des Plasmids pBioS14 in einer ganz charakteristischen Weise in Fragmente geschnitten.



Im Brutschrank lässt man dann die Restriktionsenzyme für ca. 1 h auf die Plasmid-DNA einwirken.

3. Auftrennung der Fragmente durch Gelelektrophorese und Auswertung

3



Um die Fragmente sichtbar zu machen, wird die geschnittene Plasmid-DNA danach auf ein Gel aufgebracht. Nach Anlegen einer Spannung wandert die Plasmid-DNA durch das Porensystem des Gels.



Kleinere Fragmente können schneller als größere Fragmente durch das Porensystem gelangen, so dass sich die Fragmente ihrer Länge nach auf dem Gel auftrennen.

Durch Vergleich der Fragmentmuster aus den verschiedenen Restriktionsansätzen kann auf die Position der Restriktionsschnittstellen und der Fragmente im Plasmid geschlossen werden. Auf diese Weise gelingt es, eine Restriktionskarte des Plasmids zu erstellen.

