

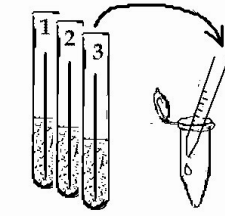
# Plasmiden auf der Spur

-Identifizierung von unterschiedlichen Plasmiden mit Hilfe eines Restriktionsenzym-

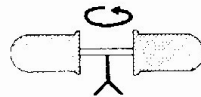
Die in der Gentechnik verwendeten, künstlichen Plasmide unterscheiden sich in der Größe sowie im Bau (Promotoren, Antibiotikaresistenzgene u.a.). Solche strukturellen Unterschiede nutzen wir in unserem Versuch zur Identifizierung verschiedener Plasmide in *Escherichia coli*-Kulturen.

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

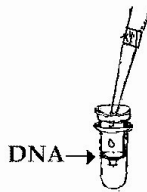
1



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.



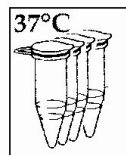
Am Ende wird die hoch gereinigte Plasmid-DNA -in einem Puffer gelöst- in einem Eppendorfgefäß aufgefangen.

## 2. Restriktionsabbau der Plasmid-DNA

2



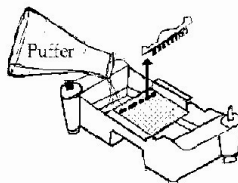
Die Plasmid-DNA der unterschiedlichen Plasmide wird nun mit einer Restriktionsendonuklease (Restriktionsenzym) geschnitten. Dieses Enzym zeichnet sich dadurch aus, dass es nur innerhalb einer ganz spezifischen DNA-Sequenz das Plasmid auseinander schneidet. Wir verwenden in unserem Versuch das Restriktionsenzym *EcoRI*. Nach der Restriktion mit *EcoRI* zeigen die in ihrer Sequenz verschiedenen Plasmide ein für sie charakteristisches Fragmentmuster.



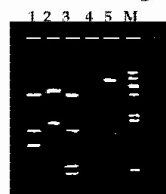
Im Brutschrank lässt man dann das Restriktionsenzym für ca. 1 h auf die Plasmid-DNA einwirken.

## 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 das jeweilige Plasmid identifiziert werden.