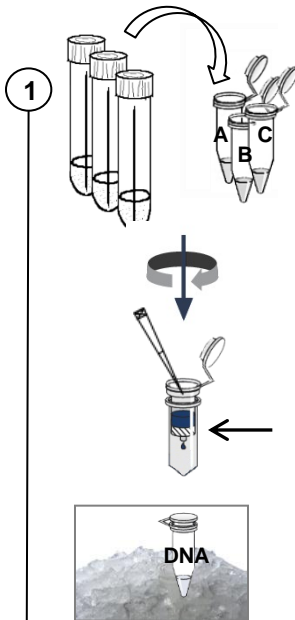


# Hier ist der Wurm drin – Plasmiden auf der Spur

Die in der Gentechnik verwendeten, künstlich hergestellten Plasmide unterscheiden sich in der Größe sowie im Bau (Promotoren, Antibiotikaresistenzgene, Art des Inserts u.a.).

Solche strukturellen Unterschiede nutzen wir in unserem Experiment zur Identifizierung verschiedener Stämme von *Escherichia coli*, die in ihrem Plasmid als Insert unterschiedliche DNA-Sequenzen des im Boden lebenden Nematoden *Caenorhabditis elegans* enthalten.

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



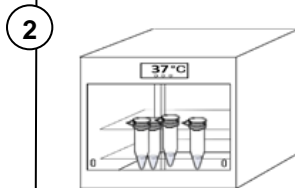
Es werden Bakterienzellen aus Übernachtskulturen unterschiedlicher Stämme von *Escherichia coli* verwendet, deren Plasmide sich in ihrem Insert unterscheiden.

Durch Zentrifugation 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.

Schließlich wird die hoch gereinigte Plasmid-DNA – in einem Puffer gelöst – in einem Reaktionsgefäß aufgefangen und auf Eis gestellt.

## 2. Restriktionsabbau der Plasmid-DNA



Die Plasmid-DNA wird nun mit einer Restriktions-Endonuclease (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*. Die Plasmide der untersuchten *E. coli*-Stämme besitzen Schnittstellen hierfür an unterschiedlichen Positionen. Der Restriktionsverdau erfolgt im Wärmeschrank bei ca. 37°C für die Dauer von ca. 1h .

## 3. Auftrennung der Plasmid-Fragmente durch Gelelektrophorese und Auswertung



Um die DNA-Fragmente sichtbar zu machen, wird die geschnittene Plasmid-DNA in die Taschen eines Agarosegels pipettiert. Nach Anlegen einer Spannung wandert die DNA durch das Porensystem des Gels.

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

Durch Vergleich der Fragmentmuster der verschiedenen Plasmide kann auf den entsprechenden Stamm von *E. coli* geschlossen werden.

Zeitbedarf für dieses Experiment mit Auswertung ca. 8h