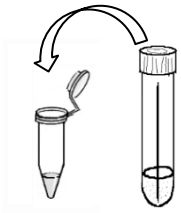
Plasmid – Puzzle mit ´pBioS14´

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.

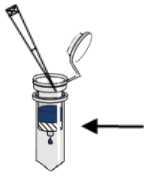
1. Isolierung der Plasmid-DNA mit Hilfe von Silika-Technologie und Zentrifugation

1



Es werden Bakterienzellen aus einer Übernacht-Kultur von *Escherichia coli* verwendet.

Durch Zentrifugation werden die Plasmide von den übrigen Zellbestandteilen getrennt.

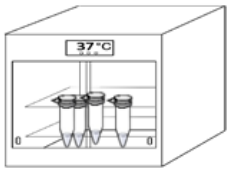


Mit Hilfe eines speziellen Verfahrens wird die DNA an einer Silika-Membran (Pfeil) in einem Reaktionsgefäß gebunden.

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

2. Restriktionsabbau der Plasmid-DNA

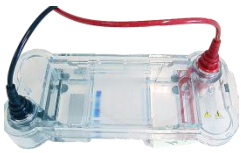
2



Die Plasmid-DNA wird nun mit Restriktions-Endonucleasen (Restriktionsenzymen) 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. Die DNA des Plasmids ´pBioS14´ wird während des enzymatischen Verdaus in einer ganz charakteristischen Weise in verschieden lange Fragmente zerschnitten.
Dies erfolgt im Wärmeschrank bei ca. 37°C.

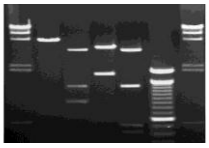
3. Auftrennung der Plasmid-Fragmente durch Gelelektrophorese und Auswertung

3



Um die 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 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.

Zeitbedarf für dieses Experiment mit Auswertung ca. 9h