

Plasmidisolierung

Mit Plasmiden können Sie Gene in Organismen einschleusen und so deren Eigenschaften verändern.

Was können Sie lernen?

- Sie lernen eine ringförmige DNA, ein Plasmid, zu isolieren.
- Mit diesem Plasmid können Sie Gene in andere Bakterien übertragen (Vectorfunktion).
- In nachfolgenden Experimenten lernen Sie
 - das Plasmid mit einer Agarosegelelektrophorese zu analysieren
 - und in einem einfachen Klonierungsexperiment als Vector wieder in *E. coli* zu transformieren.



Sie benötigen ...

unter anderen

- einen Reagenziensatz
- plasmidhaltige *E. coli* Zellen

Hinweis:

- Versuchsdauer etwa 1 h
- Das nachfolgende Verfahren entspricht den Anweisungen des Qiagen kits.

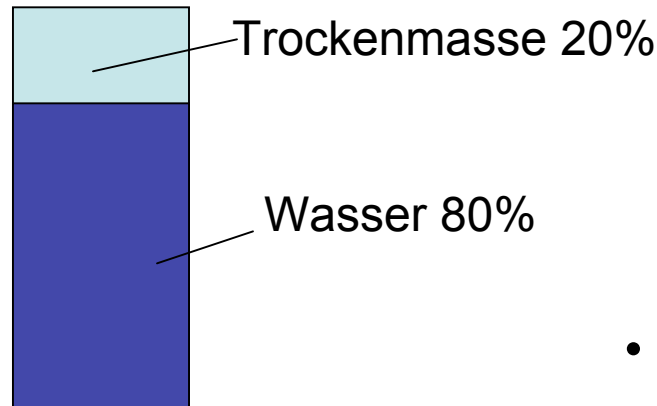
Was Sie beachten sollten ...

- Verhindern Sie, dass plasmidhaltige Lösungen unbehandelt in den Abguss gelangen. Sammeln Sie ihre Abfälle in einer Flasche „Biologische Abfälle“.
- Autoklavieren Sie zum Abschluss des Experimentes alle Gefäße, Flüssigkeiten und Hilfsmittel, die mit Plasmiden in Berührung gekommen sind.

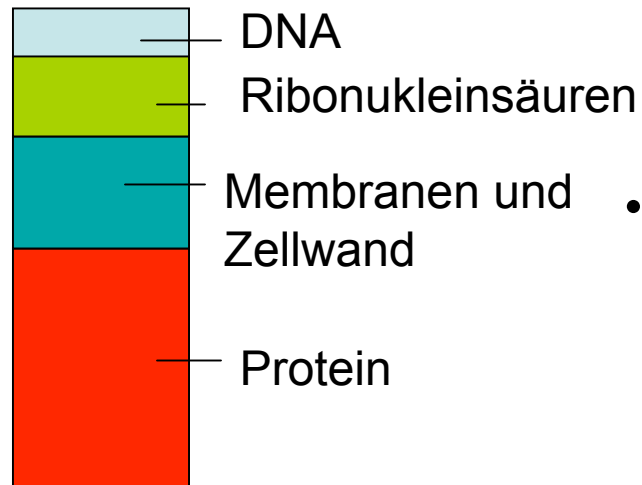
Hinweis:

- Sie verhindern durch diese Maßnahmen eine Ausbreitung der Antibiotika-Resistenz, die auf den Plasmiden kodiert.

Feuchte Zelle



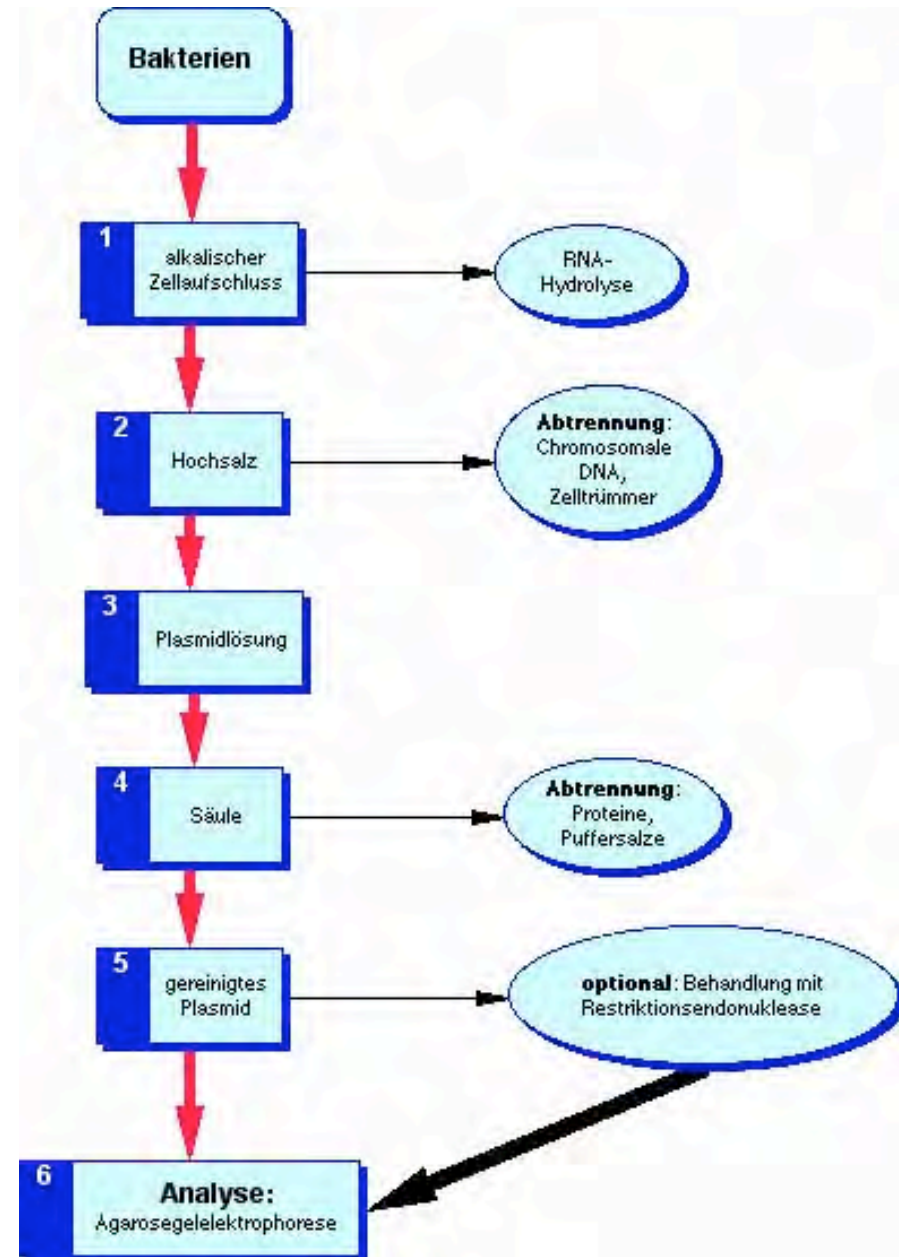
Trockenmasse



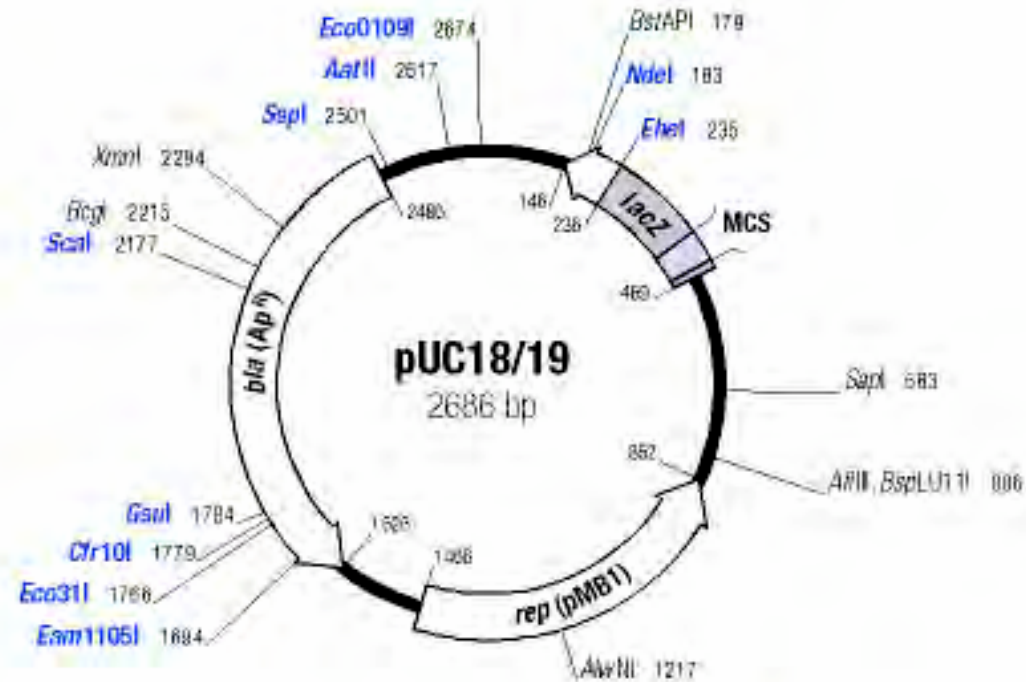
Das Problem

- Eine Zelle besteht überwiegend aus Wasser und Proteinen. Wenn also DNA isoliert werden soll, so muss die Nukleinsäure von Proteinen und anderen Zellbestandteilen getrennt werden. Das folgende Verfahren gewährleistet diese Trennung.
- Plasmid-DNA stellt nur einen Bruchteil der Gesamt-DNA einer Bakterienzelle dar. Manche Plasmide kommen außerdem nur als „low copy“ Plasmide vor, d.h. von diesem Plasmid existieren nur 3-8 Plasmidmoleküle pro Zelle.
- pUC18 ist ein „high copy“ Plasmid, von dem bis zu 500 Moleküle pro Zelle gebildet werden.

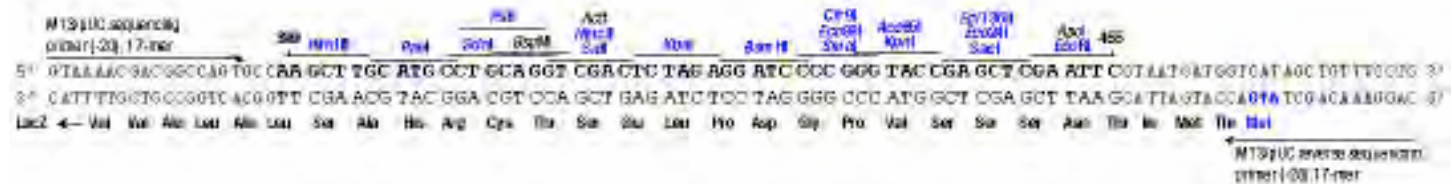
Schematische Übersicht zur Plasmidisolierung



Sie isolieren aus *E. coli* pUC18



pUC18



1. Schritt



- Zentrifugieren Sie 1-2 ml plasmidhaltige *E. coli* Übernachtskultur in einem **Eppendorfreaktionsgefäß** ab:
 - 5000 x g, 5 min, RT



Hinweise:

- Die Bakterien befinden sich in einem beigen Niederschlag am Boden des Zentrifugationsgefäßes.
- Pipettieren Sie den Überstand (antibiotikahaltiges Medium) in ein Sammelgefäß.

2. Schritt



- Resuspendieren Sie die *E.coli* Zellen in **250 µl Puffer P1**, der RNase A enthält.

Hinweise:

- Es dürfen keine Zellklumpen übrig bleiben!
- Die Zellmembranen werden unter alkalischen Bedingungen und mit Hilfe von Detergenzien aufgelöst.
- Das Plasmid wird aus den Zellen freigesetzt; das größere Chromosom bleibt in den Zellen zurück.
- RNase hydrolysiert die RNA auch in Gegenwart von Detergenzien.
- **Verwenden Sie einen neuen Kit zum erstenmal, so muss diese Lösung mit RNase A komplettiert werden! Haken Sie danach das Kontrollkästchen auf dem Deckel ab!**



3. Schritt



- Geben Sie **250 µl Puffer P2** hinzu, mischen Sie die Lösungen vorsichtig und inkubieren Sie den Ansatz für 5 min bei Raumtemperatur.

Hinweis:

- Mischen Sie die Lösungen vorsichtig durch schwenken über der Längsachse des Gefäßes.

4. Schritt

- Inkubieren Sie den Ansatz 5 min bei Raumtemperatur.



5. Schritt



- Geben Sie **350 μ l Puffer N3** dazu und mischen Sie sofort **vorsichtig!**

Hinweise:

- 5-6 mal das EppendorfgefäÙe umdrehen
- die Lösung kann trübe werden

6. Schritt



- Zentrifugieren Sie die Lösung ab.
 - Tischzentrifuge: maximale Leistung, 10 min, Raumtemperatur

Hinweise:

- Der Überstand enthält das Plasmid.
- Mit diesem **Überstand wird weiter gearbeitet.**
- Der Niederschlag enthält die Zelltrümmer; er wird verworfen.

7. Schritt



- Geben Sie den Überstand der Zentrifugation mit einer Pipette auf eine **Qiagen-Säule**, die in ein 2 ml Eppendorfgefäß gesteckt wird.

Hinweise:

- Vermeiden Sie beim pipettieren Scherkräfte.
- Scherkräfte können das Plasmid-DNA-Molekül teilweise brechen.

8. Schritt



- Zentrifugieren Sie die Qiagen-Säule im Eppendorfgefäß ab.
 - Volle Leistung, 30-60 sec, Raumtemperatur
 - Verwerfen Sie den Durchlauf

Hinweise:

- Das Plasmid bleibt auf der Säule hängen.
- Puffersalze und Zellinhaltsstoffe werden ausgewaschen.

9. Schritt



- Waschen Sie die Säule mit **0,5 ml Puffer PB.**

Hinweise:

- Geben Sie den Puffer auf die Säule und zentrifugieren Sie 30 sec. bei voller Leistung.
- Das Plasmid bleibt weiterhin auf der Säule hängen.
- Verwerfen Sie den Durchlauf, der Proteine und Puffersalze enthält.



10. Schritt

- Tragen Sie auf die QIAprep-Säule **0.75 ml Puffer PE** auf.
- Zentrifugieren Sie dann bei voller Leistung 30-60 sec.



Hinweise:

- Das Plasmid befindet sich auf der Säule.
- Verwerfen Sie den Durchlauf, der Puffersalze und Zellinhaltsstoffe enthält.
- **Verwenden Sie einen neuen Kit zum erstenmal, so muss dieser Puffer mit Ethanol komplettiert werden! Die benötigte Menge steht auf der Flasche. Haken Sie danach das Kontrollkästchen auf dem Deckel ab!**

11. Schritt



- Zentrifugieren Sie erneut, **ohne** eine Lösung auf die Säule aufgetragen zu haben.
 - Volle Leistung, 1 min

Hinweis:

- Sie müssen alle Puffersalze **vollständig** aus der Säule entfernen.

12. Schritt



- Stecken Sie das Säulchen in ein **frisches, steriles** 1ml Eppendorfreaktionsgefäß.
- Geben Sie auf die Säule 50 μ l **steriles, demineralisiertes Wasser** (oder **Puffer TE**).

Hinweise:

- Sie erniedrigen die Salzkonzentration auf der Säule, dadurch wird das Plasmid eluiert.
- Wenn Sie unsteril arbeiten, sind Bakterien vorhanden. Damit sind auch Nuklease anwesend, die ihre Plasmid-DNA zerkleinern könnten.
- TE-Puffer hemmt vorhandene Nukleasen. Er sollte verwendet werden, wenn die Plasmidprobe längere Zeit aufbewahrt werden soll.

13. Schritt



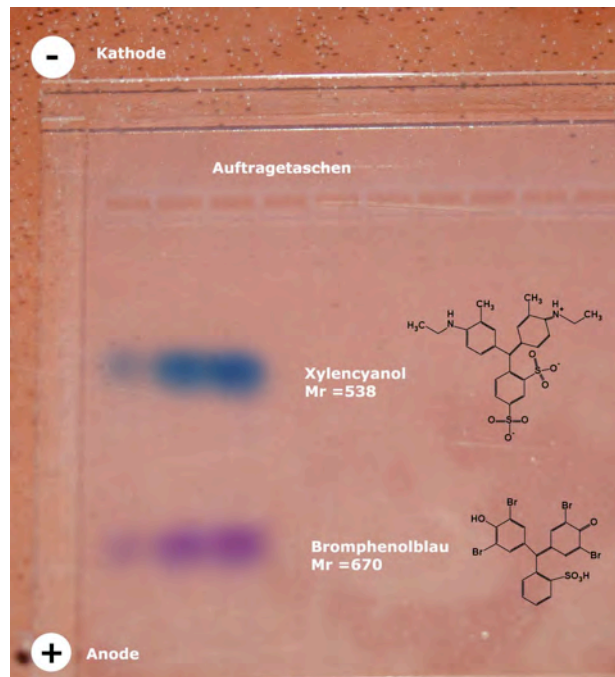
- Inkubieren Sie den Ansatz 1 min bei Raumtemperatur.
- Zentrifugieren Sie dann bei voller Leistung 1 min.

Hinweis:

- Der Durchlauf enthält die **Plasmid-DNA**.

14. Schritt

- Analysieren Sie 2 µl ihrer Plasmidlösung in einer Agarosegelelektrophorese.



Hinweis:

- Erst hier sehen Sie, ob überhaupt und wieviel Plasmid Sie isoliert haben.
- Lagern Sie ihre Plasmidlösung bis zum nächsten Gebrauch bei -20°C .

**Herzlichen Glückwunsch zum
erfolgreichen Experiment!**

Sie haben gerade eine grundlegende Methode
der Klonierungstechnik erlernt!

