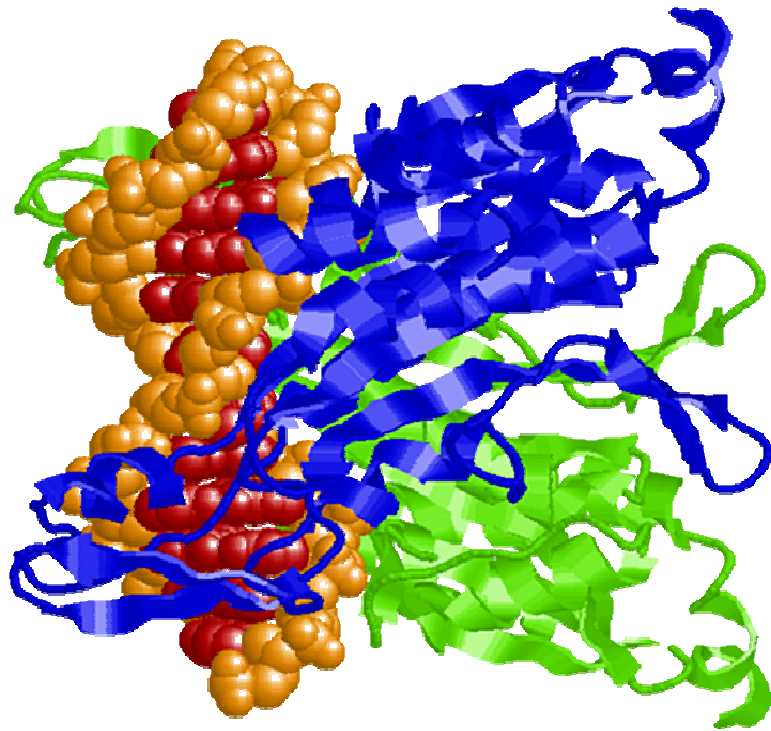


Lehrerdossier

Plasmid-Restriktionsverdau

der selbst gezüchteten Bakterien



Zur Maturaarbeit 2006, Kantonsschule Trogen

Autoren:

Joel Bänziger und Susanne Widmer

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung und allgemeine Bemerkungen	III
1.1	Material.....	III
1.2	Zeitaufwand	V
1.3	Sicherheitsüberlegungen	VI
2	Zucht der Bakterien.....	7
2.1	Material und Zeitaufwand	7
2.2	Nährböden herstellen	8
2.3	Bakterien vorbereiten.....	9
2.4	Nährböden impfen.....	9
2.5	Bakterien züchten und separieren.....	9
2.6	Flüssignährlösung herstellen.....	10
2.7	Bakterien in die Flüssignährphase überimpfen.....	11
2.8	Optionale Vorversuche zu den Bakterien.....	11
3	Extraktion der Plasmide.....	13
3.1	Material und Zeitaufwand	13
3.2	Lösungen für alkalische Lyse herstellen.....	14
3.3	Bakterien vorbereiten.....	15
3.4	Plasmide mittels alkalischer Lyse extrahieren	15
3.5	Optionale Reinigung durch Alkoholfällung	16
3.6	Plasmidnachweis mit Hilfe der Gelelektrophorese.....	16
4	Restriktionsverdau und Gelelektrophorese.....	17
4.1	Material und Zeitaufwand	17
4.2	Probleme und Überlegungen zum Restriktionsverdau.....	18
4.3	Restriktionsverdau	19
4.4	Gel herstellen.....	19
4.5	Gelelektrophorese	20
4.6	Gel einfärben	20
4.7	Resultat und Interpretation	21
5	Anhang.....	XXII
5.1	Glossar	XXII
5.2	Lagerung und Entsorgung	XXII
5.3	Adressen für Materialbestellungen.....	XXIII
5.4	Enzymtabelle – Empfehlungen.....	XXIII
5.5	Referenz, weitere Literatur und Internet.....	XXIV
5.6	Impressum.....	XXIV

1 Einleitung und allgemeine Bemerkungen

Es freut uns sehr, dass Sie einen Blick in diese Arbeit und auf dieses spezielle Experiment werfen. Es lohnt sich auf jeden Fall, mindestens Teile des Versuches mit den Lernenden durchzuführen und ihnen ein modernes Gebiet der Molekularbiologie zu zeigen.

Zur Vereinfachung haben wir in der Anleitung für die Lernenden die Du-Form gewählt und hoffen auf Ihr Verständnis. Die angegebenen Mengen sind ausser bei den herzustellenden Lösungen für eine Person berechnet und müssen für eine Schulklasse entsprechend hochgerechnet werden. Die angegebenen Adressen und entsprechenden Katalognummern der Reagenzien und Geräte unterliegen dauernden Veränderungen, sodass wir ihre Richtigkeit nicht garantieren können. Meistens führen die Suchfunktionen auf den entsprechenden Homepages zu den gewünschten Resultaten.

Zu diesem Lehrerdossier gibt es ein Schülerdossier, in dem die Materiallisten, Zeitberechnungen und andere für die Lernenden nicht notwendigen Punkte gestrichen wurden. Das Lehrerdossier kann auch sehr gut einem interessierten Lernenden abgegeben werden, da es absolut selbsterklärend ist. Mit Ausnahme der Materialbereitstellung könnte die ganze Arbeit von einem interessierten Schüler selbst geleistet werden.

In den folgenden zwei Unterkapiteln werden alle benötigten Materialien und die erforderliche Zeit beschrieben. In den einzelnen Kapiteln wird noch einmal spezifisch auf das jeweilig verwendete Material und auf den Zeitaufwand hingewiesen.

Nun wünschen wir Ihnen viel Erfolg und gute Resultate mit dieser Anleitung.

1.1 Material

Material	Menge	Bemerkungen
Gerätschaften, die üblicherweise vorhanden sind:		
Magnetrührheizplatte, Magnetrührfischchen	je 1 x	Rührfischchen mind. 1,5cm
pH-Messgerät und pH-Elektrode	je 1 x	
Pipette L-2000 (sonst L-1000)	1 x	200-2000µl (100-1000µl)
Pipette L-200 (sonst L-100)	1 x	20-200µl (10-100µl)
Pipette L-100 (sonst L-50)	1 x	10-100µl (5-50µl)
Pipette L-10	1 x	1-10µl
Zentrifuge	1 x	mind. 3000 U/min
Dampfkochtopf	1 x	sollte relativ gross/hoch sein
Bunsenbrenner	1 x	im Abzug
Brutkasten	genügend Platz	Regulierbar auf 37°C
Kühlschrank	genügend Platz	keine Lebensmittel
Mikroskop (mind. 40x Objektiv)	1 x	optional
Gerätschaften, die möglicherweise angeschafft werden müssen:		
Wide Mini-Sub Cell GT System	1 x	Bio-Rad: 170-4468
Netzgerät PowerPac 300	1 x	Bio-Rad: 165-4351
Impfnadel (Platin/Iridium, Edelstahl)	1 x	Ösendurchmesser 3 – 5mm
Evtl. Schüttler (Vortex™)	1 x	optional
Evtl. Zentrifuge für Eppendorfer Tubes	1 x	optional
Gefässe und Utensilien, die üblicherweise vorhanden sind:		
Vollkolben 1000ml	1 x	
Vollkolben 100ml	1 x	
Duran-Erlenmeyerkolben 500ml	1 x	hitzebeständig

Duran-Erlenmeyerkolben 200ml	1x	hitzebeständig
Erlenmeyerkolben 400ml	1x	
Erlenmeyerkolben 250ml	1x	
Becherglas 200ml	1x	
Becherglas 120ml	1x	
Becherglas 100ml	1x	
Becherglas 50ml	1x	
Becherglas 30ml	2x	schmal und hoch
Messzylinder 500ml	1x	
Messzylinder 300ml	1x	
Messzylinder 100ml	1x	
Messzylinder 25ml	1x	
Messpipette	1x	mind. 20ml Skala
Duran-Reagenzgläser	5x	hitzebeständig
Probengläschen 5ml	1x	mit Deckel
Glastrichter	1x	Durchmesser ca. 10cm
Färbeschale	1x	ungefähr 12 x 18 x 5cm
Waschschale (Glasschale)	2x (evtl. 3x)	mindestens 15 x 20 x 5cm
Glasplatte	2x	ca. 10 x 15cm
Objektträger	3x	hitzebeständig
Einwegpipetten steril	6x	Glas oder Plastik
Pipettenspitzen Blau (steril)	genügend	passend für L-2000 (L-1000)
Pipettenspitzen Gelb (steril)	genügend	passend für L-200 (L-100)
Pipettenspitzen Weiss (steril)	genügend	passend für L-10
Plastikpetrischalen	9x	steril
Reagenzglasständer	1x	
Holzklammer	1x	um Objektträger zu halten
Wasserfester Filzschreiber	1x	
Parafilm	genügend	wenn möglich 10cm breit
Durchsichtiges Klebeband	genügend	
Alufolie	genügend	

Gefäße und Utensilien, die möglicherweise angeschafft werden müssen:

Wattestopfen	5x	passend zu den Reagenzgläsern
Zentrifugenröhrchen steril	4x	Glas oder Plastik
Eppendorfer Tubes	genügend	mind. 1,5ml Inhalt

Chemikalien, die üblicherweise vorhanden sind:

Leitungswasser (bis 55°C)	genügend	
Destilliertes Wasser	genügend	
70% Ethanol	genügend	praktisch in einer Sprayflasche
Ethanol ≥99.8% (konzentriert)	3ml	
Essigsäure konzentriert	genügend	Achtung ätzend!
Salzsäure 5M	genügend	Achtung ätzend!
NaOH 0,2M	20ml	0,2mol/l Konzentration

Glukose	0,9g	
Natriumchlorid	0,054g	
Natriumacetat	4,92g	
Bakterienagar	3,6g	mit normalen Nährstoffen
Chemikalien, die möglicherweise angeschafft werden müssen:		
Gram Staining Kit	ganzes Set	Fluka: 77730
Certified™ Molecular Biology Agarose	0,9g	Bio-Rad: 161-3100
Nucleic Acid Sample Loading Puffer (5x)	400µl	Bio-Rad: 161-0767
EZ Load™ 500 bp Molecular Ruler	50µl	Bio-Rad: 170-8354
Fast Blast™ DNA Stain (500x)	60ml	Bio-Rad: 166-0420EDU
Enzyme (mind. 3 verschiedene)	je 3µl	zur Auswahl siehe Punkt 5.4
Puffer (evtl. verschiedene)	je Enzym 6µl	passend zu den Enzymen (!)
EDTA	0,399g	Bio-Rad: 161-0728
Tris	0,42g	Bio-Rad: 161-0715
TAE-Puffer (50x)	20ml	Bio-Rad: 161-0743
SDS	0,2g	Fluka: 71725
Chloroform	6 Tropfen	Achtung Betäubungsmittel!
CASO-Bouillon (oder ähnliches)	3g	Merck: 105459
Weitere Ausrüstung, die üblicherweise vorhanden ist:		
Labormantel	1 x	
Laborbrille	1 x	
Laborhandschuhe	4x	geeignete Grösse

1.2 Zeitaufwand

In den meisten Schulen wird zuwenig Zeit zur Verfügung stehen, um dieses relativ grosse und zeitraubende Experiment komplett durchzuführen. Es gibt jedoch Varianten, die auch für Schulklassen anwendbar sind.

Der komplette Versuch vom Herstellen der Lösungen, der Entnahme der Proben bis zur Interpretation der Resultate benötigt für ungeübte Personen bei reibungslosem Ablauf zusammen über zwölf Stunden Arbeit, jedoch mit mehreren grösseren und kleineren Pausen dazwischen. Weil die Bakterien langsam wachsen, zieht sich der Versuch über mindestens zwei Wochen hin.

Wird der ganze Versuch von einer erfahrenen Person durchgeführt, kann sich diese Zeitangabe bis auf knapp zehn Stunden reduzieren. Lässt man die optionalen Vorversuche und die zusätzliche Alkoholreinigung weg, können so noch einmal eineinhalb Stunden, von erfahrenen Personen knapp eine Stunde Zeit eingespart werden.

Sollen die Lernenden nur die wichtigen Teilversuche durchführen und eine Assistenz- oder Lehrperson die Nährböden, Flüssigmedien und verschiedenen Lösungen herstellen, so beläuft sich der minimale Aufwand noch auf etwa sechseinhalb Stunden Arbeit. Sehr schnelle, geübte Personen schaffen den Versuch sogar in fünf Stunden. Natürlich ergeben sich auch hier mehrere grosse und kleine Pausen, die nicht mit eingerechnet wurden.

Ein für eine Schulklasse sinnvoller Ablauf kann daher folgendermassen aussehen:

Zeit	Tätigkeit	Kapitel	Dauer
1. Teil	Vorbereiten der Bakterien	2.3	10min
	Nährböden impfen	2.4	30min

4 bis 7 Tage später:

2. Teil	Bakterien separieren	2.5	30min
4 bis 7 Tage später:			
3. Teil	Bakterien in die Flüssignährphase überimpfen	2.7	30min
4 bis 7 Tage später:			
4. Teil	Bakterien vorbereiten	3.3	15min
	Plasmide mittels alkalischer Lyse extrahieren	3.4	160min
Beliebige Zeit später:			
5. Teil (I)	Plasmidnachweis per Gelelektrophorese	3.6	5min
	→ Gelelektrophorese	4.5	30min
80 Minuten später:			
5. Teil (II)	→ Gel einfärben	4.6	20min
	Interpretation	3.6	5min
Beliebige Zeit später:			
6. Teil (I)	Restriktionsverdau	4.3	30min
60 Minuten später:			
6. Teil (II)	Gelelektrophorese	4.5	30min
80 Minuten später:			
6. Teil (III)	Gel einfärben	4.6	20min
	Resultat und Interpretation	4.7	10min
Totale Arbeitszeit:			ca. 7h

1.3 Sicherheitsüberlegungen

Der wohl wichtigste Faktor sind unsere verwendeten "Versuchstiere". Die Bakterien, die in unserem Experiment undefiniert sind, können harmlos sein. Sie können jedoch auch krankheitserregend und somit bei falscher Handhabung gefährlich sein. Es ist daher sehr wichtig auf Sauberkeit und Sterilität zu achten. Die Lernenden müssen Labormantel und Laborbrille tragen, sowie Hände, Arme, Geräte und Arbeitsfläche immer vor und nach dem Gebrauch desinfizieren. Offene Wunden müssen mit Pflaster gut abgedeckt werden und im Labor soll auf keinen Fall gegessen oder getrunken werden. Sollte jemand einmal Flüssigkeit verschütten, müssen die verschmutzten Oberflächen sofort mit 70% Ethanol gut gereinigt und desinfiziert werden. Auf keinen Fall sollen die Bakterien direkt berührt werden. Werden diesen Vorsichtsmassnahmen eingehalten, ist die Bakterienzucht unbedenklich.

Bei der Extraktion der Plasmide werden zwar mehrere leicht gesundheitsschädigende und reizende Chemikalien eingesetzt, die jedoch, wie auch die Essigsäure und die 5M Salzsäure, nur für die Herstellung der Lösungen benötigt werden. Diese Arbeit wird wahrscheinlich vom Assistenten/in oder von der Lehrperson übernommen und stellt daher kein Problem dar. Das Chloroform kann von der Lehrperson den Lernenden in der Kapelle jeweils direkt dazu gegeben werden. So lassen sich gefährliche Chemikalien in den normalen unbedenklichen Grenzen verwenden.

Der letzte heikle Punkt ist die Färbung des Gels. Der Farbstoff "Fast Blast™ DNA Stain" wird als absolut ungefährlich verkauft und könnte daher auch so gehandhabt werden. Da er jedoch DNA einfärbt und dies zum Beispiel bei Ethidiumbromid (völlig andere Farbanbindung) mutagen wirken kann, ist in einer Schule trotzdem Vorsicht geboten. Die Lernenden sollen daher doppelte Handschuhe, Labormantel und Laborbrille verwenden. Mit diesen Vorsichtsmassnahmen ist auch die Färbung problemlos in einer Schule durchführbar.

Unter Beachtung oben genannter Punkte ist der Versuch ohne grössere Sicherheitsvorkehrungen problemlos durchführbar.

2 Zucht der Bakterien

2.1 Material und Zeitaufwand

Material	Menge	Bemerkungen
für 2.2 – Nährböden herstellen		
Duran-Erlenmeyerkolben 500ml	1 x	hitzebeständig
Messzylinder 500ml	1 x	
Magnetrührheizplatte, Magnetrührfischchen	je 1 x	Rührfischchen mind. 1,5cm
Dampfkochtopf	1 x	sollte relativ gross/hoch sein
Bunsenbrenner	1 x	im Abzug
Plastikpetrischalen	9x	steril
Alufolie	ca. 15 x 15cm	
Parafilm	genügend	wenn möglich 10cm breit
Destilliertes Wasser	300ml	
Bakterienagar	3,6g	mit normalen Nährstoffen
70% Ethanol	genügend	praktisch in einer Sprayflasche
für 2.3 – Vorbereitung der Bakterien		
Erlenmeyerkolben 250ml	1 x	sauber
Parafilm	ca. 8 x 8 cm	
für 2.4 – Nährböden impfen / 2.5 – Bakterien züchten und separieren		
Bunsenbrenner	1 x	im Abzug
Impfnadel (Platin/Iridium, Edelstahl)	1 x	Ösendurchmesser 3 – 5mm
Wasserfester Filzschreiber	1 x	
Parafilm	genügend	wenn möglich 10cm breit
70% Ethanol	genügend	praktisch in einer Sprayflasche
Kühlschrank	genügend Platz	erst für 2.5
für 2.6 – Flüssignährlösung herstellen		
Becherglas 200ml	1 x	
Magnetrührheizplatte, Magnetrührfischchen	je 1 x	Rührfischchen mind. 1,5cm
Dampfkochtopf	1 x	sollte relativ gross/hoch sein
Messpipette	1 x	mind. 20ml Skala
Duran-Reagenzgläser	5x	hitzebeständig
Reagenzglasständer	1 x	
Wattestopfen	5x	passend zu den Reagenzgläsern
Alufolie	5x	ca. 15 x 20cm
Zusammengeknüllte Alufolie	1 x	ca. 10 x 5 x 5cm
Destilliertes Wasser	100ml	
CASO-Bouillon (oder ähnliches)	3g	Merck: 105459
für 2.7 – Bakterien in die Flüssignährphase überimpfen		
Bunsenbrenner	1 x	im Abzug
70% Ethanol	genügend	praktisch in einer Sprayflasche
Impfnadel (Platin/Iridium, Edelstahl)	1 x	Ösendurchmesser 3 – 5mm

Wasserfester Filzschreiber	1 x	
Parafilm	genügend	wenn möglich 10cm breit
Kühlschrank	genügend Platz	
für 2.8 – Optionale Vorversuche		
Becherglas 100ml	1 x	
Becherglas ca. 30ml	1 x	schmal und hoch
Glasschale	1 x	ca. 15 x 20 x 5cm
Bunsenbrenner	1 x	im Abzug
Objekträger	3x	hitzebeständig
Einwegpipetten steril	3x	Glas oder Plastik
Holzklammer	1 x	um Objekträger zu halten
Wasserfester Filzschreiber	1 x	
Gram's crystal violet Solution	einige Tropfen	aus Fluka: 77730
Gram's iodine Solution	einige Tropfen	aus Fluka: 77730
Gram's Decolorizer Solution	ca. 25ml	aus Fluka: 77730
Gram's safranin Solution	einige Tropfen	aus Fluka: 77730
70% Ethanol	genügend	praktisch in einer Sprayflasche
Mikroskop	1 x	mind. 40x Objektiv

Für die Herstellung der Nährböden und der Flüssignährlösungen benötigen ungeübte Personen je ungefähr eine Stunde Zeit, weil die Sterilisation eine knappe halbe Stunde dauert. Es ist eventuell sinnvoll, diese Arbeiten als Lehrperson oder Assistenz schon im Voraus zu erledigen.

Das Vorbereiten der Bakterien und das Impfen der Nährböden ist eine abwechslungsreiche Arbeit und braucht besonders für den Unerfahrenen ungefähr 45 Minuten. Darauf müssen die Bakterien erst einmal einige Tage wachsen. Es entsteht also zwingend eine Pause von 4 bis 7 Tagen.

Auch das Züchten, das Separieren und darauf das Überimpfen in die Flüssiglösung benötigen je ungefähr 30 – 45 Minuten Zeit.

Dagegen brauchen die optionalen Vorversuche sehr unterschiedlich viel Zeit. Der Geruch lässt sich in wenigen Minuten beschreiben, die Gramfärbung verlangt jedoch mindestens eine Stunde.

2.2 Nährböden herstellen

Mit dieser Anleitung wirst du drei Bakterienstämme züchten und somit schlussendlich mit drei Proben den Restriktionsverdau durchführen. Natürlich kannst du auch entsprechend mehr Bakterienstämme züchten und den Verdau mit mehr Proben durchführen.

Die erste Arbeit für das Experiment ist die Herstellung der Nährböden, auf denen du die Bakterien züchtest. Da Bakterien überall, also auch in der Luft, vorhanden sind, musst du sehr sauber und steril arbeiten. Du willst ja später nur deine Bakterien züchten.

1. Wiege in einem 500ml Duran-Erlenmeyerkolben 3,6g Bakterienagar ab und messe 300ml destilliertes Wasser im Messzylinder ab.
2. Giesse das Wasser in den Erlenmeyerkolben und gib ein Magnetrührfischchen dazu.
3. Erwärme das Ganze unter Rühren auf der Magnetrührheizplatte bis sich der Agar vollständig aufgelöst hat. → Achtung Siedeverzug!
4. Verschliesse den Erlenmeyerkolben gut mit Alufolie und stelle diesen in den mit ca. 1cm Wasser gefüllten Dampfkochtopf.
5. Verschliesse den Kochtopf und erwärme ihn auf der Heizplatte, bis das Ventil zur zweiten Markierung aufsteigt.
6. Reguliere die Temperatur so, dass die zweite Markierung immer sichtbar bleibt und sterilisiere 20 Minuten lang.

7. Schalte die Heizplatte aus und lass den Dampfkochtopf langsam abkühlen.
8. Entnimm den Erlenmeyerkolben und begib dich damit unter den laufenden Abzug.
9. Entzünde den Bunsenbrenner im Abzug, stelle neue, sterile Petrischalen bereit und ziehe eventuell deine Uhr oder anderes aus.
10. Reinige den Arbeitsbereich sowie deine Hände und Unterarme mit 70% Ethanol.
11. Öffne nun den Erlenmeyerkolben und flamme den Glashals für einige Sekunden ab.
12. Hebe den Deckel der Petrischale an und giesse ca. 5-8mm hoch Agar ein.
13. Schliess den Deckel sofort wieder und schiebe die Petrischale nach hinten zum Auskühlen.
14. Wiederhole die Schritte 12 und 13 bis der Agar aufgebraucht ist. (mind. noch 5x)
15. Schalte den Bunsenbrenner aus.
16. Verschliesse die ausgekühlten Petrischalen zur Lagerung jeweils mit einem abgeschnittenen, ca. 1,5cm breiten und 10cm langen Streifen Parafilm. → Petrischale nicht öffnen!
17. Räume deinen Arbeitsplatz auf.

2.3 Bakterien vorbereiten

Die Bakterien, die du züchten willst, musst du natürlich zuerst einmal haben. Auch hier gilt es möglichst sauber zu arbeiten. Es wird hier nur beschrieben, wie Bakterien aus dem Wasser entnommen werden können. Du könntest jedoch auch andere Bakterienquellen verwenden.

1. Begib dich mit dem 250ml Erlenmeyerkolben und einem Stück Parafilm an die Probenstelle.
2. Spüle den Erlenmeyerkolben einige Male mit Standortwasser.
3. Fülle ihn jetzt mit möglichst wenig verdrecktem Wasser bis zur Hälfte.
4. Verschliesse ihn mit dem Parafilm.
5. Verarbeite die Probe möglichst bald weiter.

2.4 Nährböden impfen

Um die Bakterien zu züchten, musst du sie auf die vorbereiteten Nährböden bringen. Hier ist das sterile Arbeiten unter dem Abzug absolut zwingend. Sind auf den Nährböden schon jetzt Verunreinigungen, Bakterien oder Pilze zu sehen, wurde nicht steril gearbeitet und du musst alle Böden entsorgen und nach Punkt 2.2 neue giessen.

1. Entzünde den Bunsenbrenner im Abzug, stelle die Nährböden, die Impfnadel und das Weiherwasser bereit und zieh eventuell deine Uhr oder anderes aus.
2. Reinige die Arbeitsfläche, deine Hände und die Unterarme mit 70% Ethanol.
3. Entferne die Parafilmstreifen. → Petrischalen nicht öffnen!
4. Öffne den Erlenmeyerkolben und flamme den Glashals für einige Sekunden ab.
5. Flamme die Impfnadel über der Flamme zweimal glühend ab.
6. Tauche die Spitze der Impfnadel einmal in die Bakterienprobe.
7. Öffne den Deckel der Petrischale an und streiche mit der Impfnadel über den Nährboden.
8. Schliess den Deckel sofort wieder.
9. Wiederhole die Schritte 5 bis 8 für eine weitere Petrischale.
10. Schalte den Bunsenbrenner aus.
11. Verschliesse die geimpften Petrischalen jeweils mit einem Streifen Parafilm und schreibe sie mit einer eindeutigen Bezeichnung an. → Petrischalen nicht öffnen!
12. Beschrifte einen ungeimpften und ungeöffneten Nährboden als Referenz.
13. Lagere die drei Nährböden an einem sicheren Ort bei Zimmertemperatur auf dem Kopf.
14. Räume deinen Arbeitsplatz auf.

2.5 Bakterien züchten und separieren

Nach einigen Tagen wachsen auf den zwei geimpften Nährböden verschiedene Bakterienkolonien und eventuell Pilze. Bakterien haben normalerweise eine schleimige, glitschige Konsistenz und weisen eine Farbe von durchscheinend, weiss, gelb bis rot auf. Dagegen sehen Pilze meistens fädig, samtig, fein und oft grau aus. Auf der ungeimpften Referenz darfst du nichts sehen, sonst hast du

schon vor diesem Punkt unsteril gearbeitet. Du musst nun die einzelnen Kolonien trennen und züchten. Auch in diesem Schritt ist das sterile und saubere Arbeiten der Schlüssel zum Erfolg.

1. Markiere auf dem Petrischalenboden drei gut aussehende Bakterienkolonien (keine Pilzkolonien!) und beschrifte jede mit einem eindeutigen Namen.
2. Entzünde den Bunsenbrenner im Abzug, stelle die geimpften und die leeren Nährböden, sowie die Impfnadel bereit und zieh eventuell deine Uhr oder anderes aus.
3. Reinige die Arbeitsfläche, die Hände und die Unterarme mit 70% Ethanol.
4. Entferne die Parafilmstreifen. → Petrischalen nicht öffnen!
5. Flamme die Impfnadel über der Flamme zweimal glühend ab.
6. Öffne einen Nährboden mit Bakterienkolonien, tippe die Spitze der Impfnadel in die markierte Kolonie und schliesse diese wieder.
7. Öffne den Deckel einer frischen Petrischale an und streiche mit der Impfnadel einige Male quer über den Nährboden.
8. Schliesse den Deckel sofort wieder.
9. Wiederhole die Schritte 5 bis 8 für die weiteren zwei markierten Bakterienkolonien.
10. Schalte den Bunsenbrenner aus.
11. Verschliesse alle geimpften Petrischalen jeweils mit einem Streifen Parafilm und schreibe sie mit einer eindeutigen Bezeichnung an.
12. Lagere die drei neu geimpften Böden und die Referenz aus Punkt 2.4 an einem sicheren Ort auf dem Kopf bei Zimmertemperatur.
13. Lagere die zwei älteren Kulturen im Kühlschrank.
14. Räume deinen Arbeitsplatz auf.

Nach einigen Tagen wachsen in den drei neu geimpften Petrischalen wiederum Bakterienkolonien. Es sollte auf jedem Boden nur ein einziger Typ Bakterium wachsen. Wenn du irgendwie noch verschiedene Typen identifizieren kannst, musst du mit dieser Kultur die vorherigen Schritte so oft wiederholen, bis du mit Sicherheit eine Reinkultur auf dem Nährboden kultivierst.

2.6 Flüssignährlösung herstellen

Um die Reinkulturen für das Experiment verwenden zu können, musst du ein Flüssignährmedium herstellen, aus dem du später die Bakterien gewinnst.

1. Wiege in einem 200ml Becherglas 3g CASO-Bouillon ab und messe im Messzylinder 100ml destilliertes Wasser ab.
2. Gib das Wasser und ein Magnetrührfischchen dazu.
3. Erwärme das Becherglas unter Rühren auf der Magnetrührheizplatte bis sich die Bouillon vollständig aufgelöst hat.
4. Stelle fünf Reagenzgläser in den Reagenzglasständer.
5. Fülle mit der Messpipette in jedes Reagenzglas ca. 15ml der Nährbouillon.
6. Schüttele den Rest der Bouillon weg.
7. Verschliesse jedes Reagenzglas mit einem Wattestopfen.
8. Umwickle zusätzlich jeden Wattestopfen und den oberen Rand der Reagenzgläser mit einem Stück Alufolie, sodass sie gut verschlossen sind.
9. Knülle die Alufolie zu einem Quader von ca. 10 x 5 x 5cm zusammen, sodass du die Reagenzgläser im Dampfkochtopf leicht schräg liegend sterilisieren kannst.
10. Fülle den Dampfkochtopf mit ca. 1,5cm Wasser, gib den "Alufolienquader" hinein und lege die Reagenzgläser schräg darauf.
11. Schliesse den Dampfkochtopf und erwärme ihn auf der Heizplatte bis zur zweiten Stufe.
12. Reguliere die Temperatur so, dass die zweite Markierung immer sichtbar bleibt und sterilisiere so 20 Minuten.
13. Drehe die Heizplatte aus und lass den Dampfkochtopf langsam abkühlen.
14. Entnimm die Reagenzgläser, stell sie in den Ständer und bringe sie in den Abzug.
15. Räume deinen Arbeitsplatz auf.

2.7 Bakterien in die Flüssignährphase überimpfen

Nun sollst du die Bakterien auf deinen Reinkulturen in die frischen Flüssigmedien überimpfen. Hier ist ebenfalls höchste Sorgfalt und sehr steriles Arbeiten gefordert.

1. Entzünde den Bunsenbrenner im Abzug, stelle die Reinkulturen, die Reagenzgläser und die Impfnadel bereit und zieh eventuell deine Uhr oder anderes aus.
2. Entferne die Alufolie von den Reagenzgläsern.
3. Reinige die Arbeitsfläche, die Hände und die Unterarme mit 70% Ethanol.
4. Entferne die Parafilmstreifen der Reinkulturen. → Petrischalen nicht öffnen!
5. Flamme die Impfnadel mit der linken Hand über der Flamme zweimal glühend ab.
6. Nimm ein neues Reagenzglas in die rechte Hand und zieh mit dem kleinen und dem Ringfinger der linken Hand den Stopfen heraus. → Stopfen nicht ablegen!
7. Flamme den oberen Rand des Reagenzglases einige Sekunden ab.
8. Tippe die Spitze der Impfnadel in die reine Bakterienkolonie.
9. Schliesse diese wieder und streiche die Impfnadel an der Reagenzglasinnenseite gut ab. → Mit der Impfnadelhalterung die Glaswand nicht berühren!
10. Drehe das Reagenzglas so, dass die Flüssigkeit die abgestreiften Bakterien erreichen und mindestens einige davon mitschwimmen kann.
11. Flamme das Reagenzglas erneut ab und verschliesse es wieder mit dem Wattestopfen.
12. Stelle das Reagenzglas zurück in den Ständer und beschrifte es eindeutig.
13. Wiederhole Punkt 5 bis 12 mit den zwei anderen Reinkulturen.
14. Schalte den Bunsenbrenner aus.
15. Verschliesse die Reinkulturen mit Parafilm.
16. Beschrifte das vierte Reagenzglas mit Referenz.
17. Lagere die Flüssignährlösungen bei Zimmertemperatur.
18. Lagere die Reinkulturen im Kühlschrank.
19. Räume deinen Arbeitsplatz auf.

2.8 Optionale Vorversuche zu den Bakterien

Bakterien kannst du mit verschiedenen kleineren Versuchen schon einigermaßen zuverlässig ordnen. Weil die Versuche relativ schnell und unkompliziert sind, kannst du sie gut als kleine Vorstudie zum eigentlichen Versuch benutzen.

2.8.1 Geruch

Bakterien riechen oft sehr stark, aber auch unterschiedlich. Den Geruch zu vergleichen ist sehr einfach, jedoch oft etwas eklig. Lass also Vorsicht walten und atme nicht direkt einen vollen Zug ein.

1. Nimm die Reinkulturen aus dem Kühlschrank.
2. Suche das Ende des Parafilmstreifens → Parafilm NICHT entfernen!
3. Halte diese Stelle unter die Nase, drücke die Petrischale zwischen den Fingern leicht zusammen und drücke so ein wenig Luft heraus.
4. Jetzt solltest du den Geruch riechen können und kannst ihn mit den anderen Proben vergleichen.

2.8.2 Gramfärbung

Mit dieser Bakterienfärbung kannst du deine Bakterien in zwei Kategorien einteilen. Grampositive Bakterien sind normalerweise Krankheitserreger, gramnegative eher keine. Dieses Experiment musst du eventuell mehrmals durchführen, um sichere und schöne Resultate zu bekommen.

1. Stelle im Abzug drei saubere Objektträger, drei sterile Pipetten und deine drei Flüssigbakterienkulturen bereit.
2. Reinige die Arbeitsfläche, die Hände und die Unterarme mit 70% Ethanol und entzünde den Bunsenbrenner.
3. Nimm eine sterile Einwegpipette in die linke Hand.

4. Halte eine deiner Bakterienkulturen in der rechten Hand und zieh mit dem kleinen und dem Ringfinger der linken Hand den Stopfen heraus. → Stopfen nicht ablegen!
5. Flamme das Reagenzglas kurz ab.
6. Entnimm mit der sterilen Pipette einige Tropfen der Bakterien.
7. Flamme das Reagenzglas ab und verschliese es wieder.
8. Tropfe die Bakterienlösung auf den Objektträger und streiche die Flüssigkeit mit der Pipette ein wenig aus. (ca. 2cm² Fläche)
9. Erwärme den Objektträger mit einer Holzklammer vorsichtig über der Bunsenbrennerflamme, sodass die Flüssigkeit eintrocknet, aber nicht braun wird, beziehungsweise verbrennt.
10. Lass den Objektträger abkühlen und schreibe ihn eindeutig an.
11. Wiederhole die Schritte 3 – 10 mit den zwei anderen Kulturen.
12. Schalte den Bunsenbrenner aus und räume deinen Arbeitsplatz auf.
13. Gib in das schmale hohe Becherglas ungefähr 6cm hoch "Gram's Decolorizer Solution" und in das grosse Becherglas lauwarmes Wasser.
14. Tropfe über einer Glasschale auf deinen ersten fixierten Objektträger einige Tropfen der "Gram's crystal violet Solution" und stoppe 60 Sekunden.
15. Wasche den Objektträger sehr vorsichtig in einem lauwarmen Wasserbad.
16. Tropfe nun über der Glasschale einige Tropfen der "Gram's iodine Solution" darauf und stoppe 60 Sekunden.
17. Wasche den Objektträger erneut vorsichtig in lauwarmem Wasser.
18. Schüttele das Wasser möglichst gut ab.
19. Entfärbe das Präparat vorsichtig im Becherglas mit "Gram's Decolorizer Solution" bis sich keine blauen Wolken mehr heraus lösen.
20. Wasche den Objektträger erneut vorsichtig im lauwarmen Wasserbad.
21. Tropfe nun über der Glasschale "Gram's safranin Solution" für 60 Sekunden darauf.
22. Wasche den Objektträger zum Schluss noch einmal sorgfältig in dem lauwarmen Wasser.
23. Lass ihn gut trocknen.
24. Wiederhole die Schritte 14 – 23 für die beiden anderen Objektträger.
25. Nun sind die Bakterien im Durchlicht entweder violettblau für grampositiv oder hellrot für gramnegativ eingefärbt und du solltest sie relativ einfach einteilen können.

Du kannst diese Objektträger auch unter dem Mikroskop betrachten. Die Bakterien sind jedoch immer noch sehr klein. Du wirst sie zwar sehen, aber mit der schulischen Ausrüstung höchstwahrscheinlich keine Details zu Gesicht bekommen. Möglicherweise kannst du aber eine Aussage bezüglich der Bakterienform machen. Wenn genügend Zeit vorhanden ist, lohnt sich ein Blick durchs Mikroskop auf jeden Fall, einfach damit du deine Versuchstiere mal sehen kannst.

3 Extraktion der Plasmide

3.1 Material und Zeitaufwand

Material	Menge	Bemerkungen
für 3.2 – Lösungen für alkalische Lyse herstellen		
100ml Vollkolben	1x	
120ml Becherglas	1x	
50ml Becherglas	1x	
30ml Becherglas	1x	schmal und hoch
Magnetrührer und Magnetschiffchen	je 1x	
pH-Messgerät und pH-Elektrode	je 1x	genau geeicht
Wasserfester Filzschreiber	1x	
Destilliertes Wasser	genügend	
Natriumacetat	4,92g	
Essigsäure konzentriert	genügend	Achtung ätzend!
Salzsäure 5M	genügend	Achtung ätzend!
Glukose	0,9g	
EDTA	0,399g	Bio-Rad: 161-0728
SDS	0,2g	Fluka: 71725
Tris	0,42g	Bio-Rad: 161-0715
NaOH 0,2M	20ml	0,2mol/l Konzentration
für 3.3 – Bakterien vorbereiten		
Zentrifuge	1x	mind. 3000 U/min
Wasserfester Filzschreiber	1x	
Zentrifugenröhrchen steril	4x	Glas oder Plastik
Einwegpipetten steril	3x	Glas oder Plastik
für 3.4 – Plasmide mittels alkalischer Lyse extrahieren		
Zentrifuge	1x	mind. 3000 U/min
evtl. Zentrifuge für Eppendorfer Tubes	1x	sonst normale Zentrifuge
Eppendorfer Tubes	4x	mind. 1,5ml Inhalt
Wasserfester Filzschreiber	1x	
Pipette L-2000 (L-1000)	1x	200-2000µl (100-1000µl)
Pipette L-200 (L-100)	1x	20-200µl (10-100µl)
Pipettenspitzen Blau (steril)	3x	passend für L-2000 (L-1000)
Pipettenspitzen Gelb (steril)	12x	passend für L-200 (L-100)
Ethanol ≥99.8% (konzentriert)	3ml	
Chloroform	6 Tropfen	Achtung Betäubungsmittel!
Lösung I	450µl	aus Punkt 3.2
Lösung II	450µl	aus Punkt 3.2
Lösung III	450µl	aus Punkt 3.2
TE-Puffer	150µl	aus Punkt 3.2
Kühlschrank	1x	genügend Platz für Zentrifuge

für 3.5 – Optionale Reinigung durch Alkoholfällung		
Zentrifuge	1x	mind. 3000 U/min
Pipette L-2000 (L-1000)	1x	200-2000µl (100-1000µl)
Pipette L-200 (L-100)	1x	20-200µl (10-100µl)
Pipettenspitzen Blau (steril)	6x	passend für L-2000 (L-1000)
Pipettenspitzen Gelb (steril)	3x	passend für L-200 (L-100)
Natriumchlorid	0,054g	3x 0,018g
Ethanol 70%	genügend	zwingend 70%
TE-Puffer	150µl	aus Punkt 3.2
Kühlschrank	1x	genügend Platz
für 3.6 – Plasmidnachweis mit Hilfe der Gelelektrophorese		
Eppendorfer Tubes	3x	mind. 1,5ml Inhalt
Pipette L-10	1x	1-10µl
Pipettenspitzen Weiss (steril)	6x	passend für L-10
TE-Puffer	30µl	aus Punkt 3.2
Restliches Material siehe Punkte 4.4 bis 4.6		

Für die Herstellung der vier Lösungen benötigen ungeübte Personen schnell mehr als eine Stunde. Dies ist im Schulbetrieb nicht sehr sinnvoll und sollte daher besser (in grösseren Mengen) von der Lehrperson oder der Assistenz durchgeführt werden.

Die Bakterien vorzubereiten, ist eine kurze Angelegenheit von knapp 20 Minuten. Ohne Pause sollte dann mit der alkalischen Lyse begonnen werden. Diese benötigt für den ersten Teil bis zur viertelstündigen Zentrifugation für ungeübte Personen ungefähr 40 Minuten. Während der Zentrifugation könnte von geübten Personen nach Punkt 4.4 knapp ein Gel für Punkt 3.6 hergestellt werden. Nach der Zentrifugation werden noch einmal ca. 10 Minuten benötigt. Insgesamt sollte man für die Extraktion der Plasmide (Punkte 3.3 und 3.4) etwa 90 Minuten einrechnen.

Die optionale Reinigung durch Alkoholfällung erfordert inklusive der zwei Zentrifugationszeiten ungefähr 40 Minuten, kann aber auch weggelassen werden.

Für den Plasmidnachweis benötigen unerfahrene Personen inklusive dem Herstellen des Gels und der Laufzeit von 80 Minuten gut 2 Stunden und 45 Minuten. Ungefähr 60 Minuten werden vor der Auftrennung benötigt und 20 Minuten danach zum Einfärben. Geübtere Personen schaffen dies jedoch in knapp zwei Stunden, wenn sie das Gel während der Zentrifugation herstellen.

3.2 Lösungen für alkalische Lyse herstellen

Um die Plasmide aus den Bakterien zu extrahieren, brauchst du verschiedene Lösungen, die du zuvor herstellen musst. Damit die Extraktion klappt, sollst du hier sehr genau arbeiten.

3.2.1 Lösung I

1. Miss 0,9g Glukose, 0,3g Tris und 0,37g EDTA ab und gib alles in einen 100ml Vollkolben.
2. Fülle den Vollkolben bis 100ml mit destilliertem Wasser auf.
3. Schüttele die Lösung bis sich alles vollständig gelöst hat.
4. Schreibe den Vollkolben mit "Lösung I" und dem Datum an.

3.2.2 Lösung II

1. Miss in einem 50ml Becherglas 0,2g SDS ab.
2. Gib 20ml NaOH Lösung (0,2mol/l Konzentration) dazu.
3. Mische den Inhalt bis sich das SDS vollständig gelöst hat.
4. Schreibe das Becherglas entsprechend an.

3.2.3 Lösung III

1. Miss in einem hohen 30ml Becherglas 4,92g Natriumacetat ab.
2. Gib exakt 20ml destilliertes Wasser dazu.
3. Schüttle das Gemisch bis sich das Natriumacetat vollständig gelöst hat.
4. Stelle das Becherglas auf den Magnetrührer und gib das Magnetfischchen dazu.
5. Fixiere die pH-Elektrode im Glas und schalte das Messgerät und den Magnetrührer ein.
6. Gib nun vorsichtig konzentrierte Essigsäure dazu bis der pH-Wert auf 4,8 steht.
7. Schreibe das Becherglas entsprechend an.

3.2.4 TE-Puffer

1. Miss in einem 120ml Becherglas 0,12g Tris ab und gib 100ml destilliertes Wasser dazu.
2. Schüttle das Gemisch bis sich das Tris vollständig gelöst hat.
3. Stelle das Becherglas auf den Magnetrührer und gib das Magnetfischchen dazu.
4. Fixiere die pH-Elektrode im Glas und schalte das Messgerät und den Magnetrührer ein.
5. Gib nun langsam und vorsichtig wenig 5M Salzsäure dazu bis der pH-Wert auf 7,4 steht.
6. Miss auf dem Messpapier 0,029g EDTA ab und gib dieses dazu.
7. Mische erneut bis sich alles gelöst hat und schreibe das Becherglas entsprechend an.

3.3 Bakterien vorbereiten

Für die alkalische Lyse im folgenden Versuch musst du die Bakterien vorbereiten. Arbeite hier zu deinem eigenen Schutz unter dem Abzug.

1. Schüttle die drei geimpften Flüssigmedien bis sich die Bakterien homogen verteilt haben.
2. Entnimm jeweils mit einer sterilen Einwegpipette 3ml Flüssigkeit mit möglichst vielen Bakterien und gib die Lösung in je ein Zentrifugenröhrchen.
3. Schreibe diese eindeutig an.
4. Fülle in ein viertes Zentrifugenröhrchen 3ml Wasser.
5. Stelle die Röhrchen jeweils einander gegenüber in die Zentrifuge und zentrifugiere für ca. 8min bei ungefähr 3000 Umdrehungen pro Minute bis die Bakterien gut pelletiert sind.
6. Kippe die Nährlösung vorsichtig in den Abguss, sodass das Bakteriumpellet möglichst trocken zurück bleibt. → Achtung: Pellet kann zu wenig fest sein und mitrutschen!

3.4 Plasmide mittels alkalischer Lyse extrahieren

Nun führst du die eigentliche Extraktion der Plasmide deiner Bakterien durch. In diesem Schritt musst du besonders darauf achten, genau nach der Anleitung und möglichst sauber zu arbeiten, da sonst der Verlust an Plasmiden sehr hoch werden kann.

1. Stelle die 200µl Pipette auf 150µl ein und steche mit ihr eine gelbe Pipettenspitze auf.
→ Pipettenspitze nicht berühren!
2. Gib mittels dieser 200µL Pipette 150µL der Lösung I zum ersten Bakterienpellet.
3. Entferne durch Drücken des Abwurfhalters die Spitze und entsorge diese im Abfall.
4. Wiederhole die Schritte 1 bis 3 für die zwei weiteren Pellets.
5. Löse die Bakterien durch Schütteln möglichst vollständig darin auf.
6. Pipettiere so wie oben 150µL der Lösung II zu jeder Probe und mische gut.
7. Lass das Gemisch mindestens eine Minute reagieren, bis die Bakterien lysiert sind, daher bis das Gemisch leicht schleimig ist.
8. Pipettiere nun jeweils 150µL der Lösung III dazu und mische erneut gut durch.
9. Lass dir nun vom Lehrer unter dem Abzug je 2 Tropfen Chloroform dazugeben und mische.
10. Fülle in das vierte Zentrifugenröhrchen gleichviel Wasser als Ausgleich für die Zentrifuge.
11. Zentrifugiere die Röhrchen für ca. 5 Minuten bei ca. 3000 Umdrehungen pro Minute.
12. Schütte den klaren Überstand ohne die weissen Flocken in je ein neues Eppendorfer Tube.
13. Schreibe die Eppendorfer Tubes eindeutig an.
14. Pipettiere mit der 2000µl Pipette und den blauen Pipettenspitzen jeweils 1ml Ethanol dazu und mische gut für mindestens 3 Minuten.

15. Fülle in das vierte Eppendorfer Tube 1,5ml Wasser als Ausgleich für die Zentrifuge
16. Zentrifugiere mindestens 15 Minuten bei 4°C und ca. 3000 Umdrehungen pro Minute.
17. Kippe den Überstand vorsichtig in den Abguss, so dass möglichst keine Flüssigkeit mehr vorhanden ist. → Möglichst trocken!
18. Pipettiere jeweils mit der 200µl Pipette 50µl TE-Puffer dazu und wasche damit alle Plasmide an der Wand des Tubes herunter. → Möglicherweise siehst du nichts, es können jedoch trotzdem Plasmide vorhanden sein!
19. Die extrahierten Plasmide kannst du im TE-Puffer nun problemlos verschlossen einige Tage im Kühlschrank lagern und später weiter verarbeiten.
20. Räume deinen Arbeitsplatz auf.

3.5 Optionale Reinigung durch Alkoholfällung

Die in Punkt 3.4 erhaltenen Plasmide sind normalerweise schon sehr sauber. Du kannst sie aber mit dieser optionalen Reinigung noch einmal säubern. Es besteht jedoch das Risiko, erneut Plasmide zu verlieren und darum solltest du auch hier möglichst exakt arbeiten.

1. Gib in deine drei Eppendorfer je 0,018g Natriumchlorid.
2. Pipettiere nun 1,5ml 70% Ethanol dazu und mische gut bis sich alles gelöst hat.
3. Zentrifugiere für 10 Minuten bei mindestens 3000 Umdrehungen pro Minute.
4. Kippe den Überstand in den Abguss und gib noch einmal ungefähr 1ml Ethanol dazu.
5. Mische bis sich endgültig alles übrige Salz gelöst hat.
6. Zentrifugiere erneut für 10 Minuten und mindestens 3000 Umdrehungen pro Minute.
7. Giesse den Überstand in den Abguss, so dass möglichst keine Flüssigkeit mehr vorhanden ist.
8. Pipettiere 50µl TE-Puffer dazu und wasche damit alle Plasmide an der Wand herunter.
9. Auch so kannst du die Plasmide geschlossen einige Tage im Kühlschrank aufbewahren.
10. Räume deinen Arbeitsplatz auf.

3.6 Plasmidnachweis mit Hilfe der Gelelektrophorese

Nun solltest du herausfinden, ob und in welchen Proben du Plasmide extrahiert hast. Dazu brauchst du die Gelelektrophorese, die in Kapitel 4.4 bis 4.6 beschrieben wird. Da du nur wenig Plasmidlösung hast, solltest du hier keine Fehler machen, weil sonst die Plasmidmenge nicht ausreicht.

1. Stelle wie in Punkt 4.4 beschrieben ein Gel her.
2. Pipettiere mit der 10µl Pipette und jeweils einer neuen weissen Spitze je 10µl deiner Plasmidlösung in entsprechend angeschriebene frische Eppendorfer Tubes.
3. Pipettiere jeweils 10µl TE-Puffer dazu.
4. Lade das Gel wie in Punkt 4.5 beschrieben und lass es bei 75V 80 Minuten lang laufen.
5. Färbe darauf nach Punkt 4.6 ein und betrachte dein Resultat.

Am besten kannst du die Resultate gegen das Licht zum Beispiel auf dem Hellraumprojektor sehen. Fotografiere das Gel zur Fixierung der Resultate, zeichne auf einer darauf gelegten Folie die einzelnen Banden und Flecken ein und halte die Probenamen sowie das Datum fest.

Du solltest auf dem Gel dunkle Flecken und Banden sehen. Die dunklen Wolken, die ungefähr auf der Höhe des Sample-Loading-Buffers liegen, bestehen wahrscheinlich hauptsächlich aus RNA. Plasmide bilden auf dem Gel mehr oder weniger klare Banden und sind normalerweise deutlich hinter dem Sample-Loading-Buffer anzutreffen. Somit solltest du erkennen können in welcher Probe es wie viele verschiedene Plasmide hat.

Sei jedoch nicht zu arg enttäuscht, wenn du nichts auf deinem Gel erkennen kannst. Es kann dafür mehrere Gründe geben. Entweder besitzt das Bakterium keine Plasmide, du hast die Plasmide bei der Extraktion verloren oder die Plasmidmenge war für die Färbung nicht ausreichend. Du kannst also auch einfach Pech haben. Wenn du jedoch hier gar nichts siehst und du alle Schritte korrekt gemacht hast, lohnt es sich nicht, die weiteren Schritte auszuführen. Du würdest sehr wahrscheinlich nach dem Restriktionsverdau und der Färbung erneut nichts sehen.

Das Gel kannst du auf der Glasscheibe in Küchenfolie eingepackt im Kühlschrank bei 4°C einige Wochen aufbewahren.

4 Restriktionsverdau und Gelelektrophorese

4.1 Material und Zeitaufwand

Material	Menge	Bemerkungen
für 4.3 – Restriktionsverdau		
Eppendorfer Tubes	genügend	mind. 1,5ml Inhalt
Pipette L-10	1x	1-10µl
Pipettenspitzen Weiss (steril)	genügend	passend für L-10
Wasserfester Filzschreiber	1x	
Destilliertes Wasser	genügend	
Enzyme (mind. 3 verschiedene)	je 3µl	zur Auswahl siehe Punkt 5.4
Puffer (evtl. verschiedene)	je Enzym 6µl	passend zu den Enzymen (!)
Evtl. Schüttler	1x	
Brutkasten	genügend Platz	Regulierbar auf 37°C
für 4.4 – Gel herstellen		
Magnetrührheizplatte, Magnetrührfischchen	je 1x	Rührfischchen mind. 1,5cm
Gelelektrophoresegerät	1x	aus Bio-Rad: 170-4468
Geltray	1x	aus Bio-Rad: 170-4468
Kamm (20 Taschen)	1x	aus Bio-Rad: 170-4468
Duran-Erlenmeyerkolben 200ml	1x	hitzebeständig
Vollkolben 1000ml	1x	
Messzylinder 100ml	1x	
Messzylinder 25ml	1x	
Wasserfester Filzschreiber	1x	
Durchsichtiges Klebeband	genügend	
Destilliertes Wasser	genügend	
TAE-Puffer (50x)	20ml	Bio-Rad: 161-0743
Certified™ Molecular Biology Agarose	0,9g	Bio-Rad: 161-3100
für 4.5 – Gelelektrophorese		
Vorbereitetes Gelelektrophoresegerät	1x	aus Punkt 4.4
Netzgerät PowerPac 300	1x	Bio-Rad: 165-4351
Probengläschen 5ml	1x	mit Deckel
Pipette L-2000 (L-1000)	1x	200-2000µl (100-1000µl)
Pipette L-100 (L-50)	1x	10-100µl (5-50µl)
Pipette L-10	1x	1-10µl
Pipettenspitzen Blau (steril)	2x	passend für L-2000 (L-1000)
Pipettenspitzen Gelb (steril)	genügend	passend für L-100 (L-50)
Pipettenspitzen Weiss (steril)	genügend	passend für L-10
Wasserfester Filzschreiber	1x	
Destilliertes Wasser	genügend	
Nucleic Acid Sample Loading Puffer (5x)	400µl	Bio-Rad: 161-0767
EZ Load™ 500 bp Molecular Ruler	50µl	Bio-Rad: 170-8354

für 4.6 – Gel einfärben		
Laborhandschuhe	4x	geeignete Grösse
Labormantel	1x	
Laborbrille	1x	
Erlenmeyerkolben 400ml	1x	
Messzylinder 300ml	1x	
Messzylinder 100ml	1x	
Glastrichter	1x	Durchmesser ca. 10cm
Färbeschale	1x	ungefähr 12 x 18 x 5cm
Waschschale	2x	mindestens 15 x 20 x 5cm
Glasplatte	1x	ca. 10 x 15cm
Wasserfester Filzschreiber	1x	
Parafilm	5 x 5cm	
Destilliertes Wasser	genügend	
Leitungswasser (bis 55°C)	genügend	
Fast Blast™ DNA Stain (500x)	60ml	Bio-Rad: 166-0420EDU

Der Zeitaufwand für den Restriktionsverdau hängt von der verwendeten Anzahl Enzyme ab. Für das Ansetzen eines Enzyms, also drei Proben, benötigen ungeübte Personen ungefähr 10 Minuten. Für drei Enzyme sollte man also ungefähr 30 Minuten rechnen. Dazu kommt noch eine Stunde Reaktionszeit, in der man nach Punkt 4.4 ein Gel herstellen kann.

Dieses Herstellen des Gels beansprucht ungefähr 30 Minuten und zum Auskühlen noch einmal ca. 30 Minuten. Es passt also gut in die Pause, die bei Punkt 4.3 entsteht.

Für das Laden des Gels, das einiges an Fingerspitzengefühl verlangt, benötigen unerfahrene Personen wahrscheinlich bis zu einer halben Stunde, je nach Anzahl Proben. Geübtere Personen brauchen dafür nur ca. 15 Minuten. Während die Proben auf dem Gel laufen, entsteht eine Pause von 80 Minuten.

Das Färben des Gels zum Schluss benötigt ungefähr 20 Minuten Zeit und die darauf folgende Interpretation und Diskussion der Resultate erfordert je nach dem ob der Versuch erfolgreich war oder nicht, noch einmal ungefähr 20 Minuten.

4.2 Probleme und Überlegungen zum Restriktionsverdau

Der Restriktionsverdau ist im Grunde das Kernstück des Versuches, ist jedoch auch der schwierigste und problematischste Teil davon. Weil wir keine klaren Aussagen über das Plasmidmaterial machen können, wird auch der Restriktionsverdau mehr ein Experimentieren und Probieren, als eine klare Methode mit klaren Resultaten sein.

In der Schule stellt sich noch das Probleme, dass die Gerätschaften und Möglichkeiten moderner Labore ersetzt werden müssen. Ein Gelelektrophoresegerät sowie das zugehörige Netzgerät ist zwingend notwendig und muss gegebenenfalls gekauft werden. Dazu kommt wenn möglich ein Brutkasten für 37°C. Ein zusätzliches Gerät, das hilfreich, aber nicht dringend notwendig ist, wäre ein Schüttler. Eine kleine nützliche Utensilie ist ein Haltertablett für die Eppendorfer Tubes, das jedoch sehr einfach durch ein Stück Styropor mit passenden Löchern ersetzt werden kann.

In einer Schule muss vor allem das Ethidiumbromid ersetzt werden, da es stark mutagen wirkt. Dieses einzusetzen, ist in einer Schule nicht zu verantworten. Hier wird auf eine Färbemethode zurückgegriffen, die als ungefährlich eingestuft wird. Der Nachteil ist die geringere Färbekraft, die weniger klare Resultate zeigt.

Auch bei den verschiedenen Enzymen stehen Schulen schnell vor einem Problem. Enzyme sind teilweise sehr teuer und meistens nur ein bis zwei Jahre haltbar. Da die Plasmide undefiniert sind, wird eine hohe Variabilität der Enzyme benötigt, um mit einer gewissen Sicherheit schneiden zu können und die Resultatchancen zu erhöhen. So müssen die Enzyme mehr oder weniger auf gut

Glück bestellt werden oder es gibt die Möglichkeit, die Enzymdatenbank aus einem modernen Labor benutzen zu dürfen.

Die Chancen, ein wirklich gutes Resultat zu erhalten, sind also relativ gering. Trotzdem lohnt es sich, den Versuch durchzuführen. Erstens versteht der Lernende die Anwendung der Theorie besser, zweitens lernt er das praktische molekularbiologische Arbeiten und drittens können auch oft mit weniger eindeutigen Resultaten einige interessante Aussagen und Interpretationen über die Bakterien und ihre Plasmide gemacht werden.

4.3 Restriktionsverdau

Du bist nun am Kernversuch dieser Anleitung angelangt. Wie du im Punkt 4.2 schon gelesen hast, stellen sich hier einige Probleme. Sei also nicht allzu enttäuscht, wenn du keine brillanten Buchresultate erhältst. Der Misserfolg ist wie in der richtigen Forschung unangenehm, aber häufig Alltag. Mit ein wenig Glück kannst du jedoch auch sehr schöne Resultate erzielen. Konzentriere dich bei diesen Schritten gut, damit dir keine Flüchtigkeitsfehler die Resultate verderben.

Die zu verwendenden Restriktionsenzyme kannst du in der Enzymtabelle von Punkt 5.4 nachschauen und ihre jeweilig passenden Puffer herausfinden. Achte darauf, zum Enzym den richtigen Puffer hinzu zu geben, weil das Enzym sonst seine Schneidwirkung nicht entfalten kann. Führe den Versuch mit mindestens drei verschiedenen Enzymen durch, damit du eine einigermaßen gute Variabilität erhältst. Nur schon bei diesen minimalen Annahmen entstehen 9 verschiedene Proben. Schreibe deine Tubes also gut an und halte eine sinnvolle Ordnung.

1. Pipettiere mit der 10µl Pipette aus einer Plasmidprobe 5µl Plasmidlösung in ein frisches angeschriebenes Eppendorfer Tube.
2. Pipettiere dazu immer jeweils mit einer neuen Spitze 1µl deines Enzyms, 2µl des entsprechenden Puffers und 12µl destilliertes Wasser.
3. Wiederhole die Schritte 1 und 2 für alle deine Proben und für alle deine Enzyme.
→ Achtung Puffer ändert sich eventuell mit einem anderen Enzym!
4. Klopfe alles in den Eppendorfer Tubes gut herunter und vermische.
5. Bringe die angesetzten Proben in den Brutkasten und reguliere die Temperatur auf 37°C.
6. Lasse die Proben nun für 60 Minuten bei 37° reagieren.
7. Räume deinen Arbeitsplatz auf und führe während dieser Zeit Punkt 4.4 aus.
8. Schalte nach 60 Minuten den Brutschrank aus und entnimm die Proben.

4.4 Gel herstellen

Du sollst nun deine Proben auftrennen. Dafür benötigst du ein Gelelektrophoresegerät und einen dazu passenden Gel. Die Angaben hier sind nur explizit für das "Wide Mini-Sub Cell GT System" von Bio-Rad gültig. Wenn du ein anderes System gebrauchst, musst du die notwendigen Mengenangaben selbst aus der zugehörigen Anleitung errechnen. Diese Schritte hier beschreiben die normale Herstellung eines Gels. Schneller geht es mit einer Mikrowelle zum Erwärmen und einem kühlen Ort zum Erstarren.

1. Miss im Messzylinder 20ml TAE-Puffer 50x ab und gib dies in einen 1000ml Vollkolben.
2. Fülle den Vollkolben mit destilliertem Wasser auf und mische gut.
3. Schreibe den Vollkolben mit "TAE-Puffer 1x" an.
4. Klebe beide offenen Seiten deines Geltrays mit durchsichtigem Klebeband gut zu.
5. Stecke den Kamm mit 20 Taschen auf der einen Seite des Geltrays fest.
6. Stelle den vorbereiteten Geltray an einen waagrechten Ort.
7. Miss in einem 200ml Erlenmeyerkolben 0,9g Agarose ab.
8. Gib 90ml im Messzylinder abgemessenen TAE-Puffer 1x und ein Magnetrührfischchen dazu.
9. Erwärme den Inhalt des Erlenmeyerkolbens auf der Magnetrührheizplatte bis sich die Agarose vollständig gelöst hat und die Lösung klar ist. → Achtung Siedeverzug!
10. Lass die Lösung auf ca. 50-60°C abkühlen.
11. Giesse die Lösung in den vorbereiteten Geltray und lasse das Gel ca. 30 Minuten erstarren.
12. Ziehe sehr vorsichtig den Kamm aus dem Gel und das Klebeband von den Seiten weg.

13. Lege das fertige Gel im Geltray mit den Geltaschen zur schwarzen Kathode in das Gelelektrophoresegerät.
14. Fülle das Gelelektrophoresegerät bis mindestens 3mm über das Gel und maximal bis zur Markierung am Gerät mit TAE-Puffer 1x.
15. Räume deinen Arbeitsplatz auf.

Den TAE-Puffer 1x musst du natürlich nur das erste Mal herstellen und kannst bei eventuellen Wiederholungen den gleichen Puffer im Gerät nochmals verwenden.

4.5 Gelelektrophorese

Nun hast du alles vorbereitet um deine Proben auf dem Gel aufzutrennen. Diese Arbeit erfordert ein wenig Fingerspitzengefühl im Umgang mit Pipetten. Auch hier sind die Schritte nur explizit für das "Wide Mini-Sub Cell GT System" von Bio-Rad und für das Netzgerät "PowerPac 300" gültig.

1. Pipettiere in das kleine 5ml Probengläschen mit der 2000µl Pipette 1600µl destilliertes Wasser und 400µl "Nucleic Acid Sample Loading Puffer".
2. Mische das Gläschen und schreibe es mit "Sample-Loading-Buffer 1x" an.
3. Pipettiere mit einer 10µl Pipette jeweils 5µl Sample-Loading-Buffer 1x zu deinen Proben.
4. Mische die Eppendorfer Tubes gut.
5. Stelle die 100µl Pipette auf 25µl ein und sauge die erste Probe auf.
6. Pipettiere diese vorsichtig in die zweite Geltasche.
7. Wiederhole die Schritte 5 und 6 für die weiteren Proben mit den nächsten Geltaschen und mache zwischen den verschiedenen Enzymserien jeweils eine Tasche Abstand.
8. Sauge nun noch zweimal 25µl des Grössenmarkers (EZ Load™ 500 bp Molecular Ruler) auf und pipettiere diesen jeweils in die erste und die letzte Geltasche.
9. Notiere dir genau in welche Geltasche du welche Probe pipettiert hast.
10. Schliesse das Gelelektrophoresegerät, verbinde es richtig mit dem Netzgerät und stelle dieses auf 75V und 80 Minuten Laufzeit ein.
11. Kontrolliere ob das Gel mit den Taschen zur schwarzen Kathode richtig liegt, das Gelelektrophoresegerät richtig angeschlossen ist und schalte das Netzgerät ein.
→ Ob Strom fliesst, kannst du an den Blasen an der schwarzen Kathode erkennen!
12. Räume deinen Arbeitsplatz auf.
13. Schalte nach abgelaufener Zeit das Netzgerät ab.

Den Sample-Loading-Buffer 1x musst du nur das erste Mal herstellen und solltest ihn für weitere Versuche verschlossen im Kühlschrank lagern.

4.6 Gel einfärben

Nachdem du deine Proben auf dem Gel laufen gelassen hast, solltest du möglichst bald das Gel mit dem "Fast Blast™ DNA Stain" einfärben, da sonst die Banden wegdiffundieren und unscharf werden. Auch wenn dieser Farbstoff als ungefährlich gilt, färbt er doch DNA an. Obwohl nicht gesundheitsgefährdend, ist er sicher nicht gesundheitsfördernd und somit solltest du darauf achten den Farbstoff nicht an die Haut oder gar in Augen oder Mund zu bekommen.

1. Lege deine Uhr und eventuell anderes ab und ziehe dafür doppelte Handschuhe, einen Labormantel und eine Laborbrille an.
2. Miss im kleinen Standzylinder 60ml "Fast Blast™ DNA Stain (500x)" ab und gib dies in einen 400ml Erlenmeyerkolben.
3. Miss nun im grossen Standzylinder 240ml destilliertes Wasser ab, gib es ebenfalls dazu, mische die Lösung und schreibe sie mit "Färbung 100x" an.
4. Kippe die Färbung 100x in die Färbeschale.
5. Fülle in der grossen Waschschale ca. 55°C warmes Wasser und in der zweiten Waschschale handwarmes Wasser ein.
6. Lege die Glasplatte in die gefüllte Färbeschale.
7. Entnimm aus dem Gelelektrophoresegerät vorsichtig den Geltray und tropfe ihn gut ab.
→ Achtung Gel flutscht leicht weg!

8. Lasse das Gel vorsichtig auf die Glasplatte in die Färbeschale fahren.
9. Färbe das Gel für 2 bis 3 Minuten und entnehme es darauf auf der Glasplatte vorsichtig aus dem Färbebad.
10. Entfärbe nun das Gel für 10 Sekunden im 40-55°C warmen Wasserbad.
11. Wasche es darauf für 5 Minuten im handwarmen Waschbad.
12. Kippe das erste Wasserbad in den Abguss und fülle es neu mit handwarmem Wasser.
13. Wasche darauf das Gel noch einmal für 5 Minuten im neuen Waschbad.
14. Nimm das eingefärbte Gel auf der Glasplatte aus dem Wasser und tropfe es gut ab.
15. Nun erscheinen langsam innert 5-15 Minuten die Resultate.
16. Giesse die Färbung 100x aus der Färbeschale mit einem Glastrichter zurück in den Erlenmeyerkolben, verschliesse diesen mit Parafilm und giesse die Wasserbäder in den Abguss. → Die Farbe kann ohne weiteres mehrere Male benützt werden!
17. Räume deinen Arbeitsplatz auf und wirf die Handschuhe in den Abfall.

4.7 Resultat und Interpretation

Am besten kannst du die Resultate gegen das Licht zum Beispiel auf dem Hellraumprojektor sehen. Fotografiere das Gel zur Fixierung der Resultate, zeichne auf einer darauf gelegten Folie die einzelnen Banden und Flecken ein und halte die Probenamen sowie das Datum fest.

Nach der Färbung stehen deine Resultate nun sozusagen dunkelblau auf hellblau fest. Du siehst wahrscheinlich wie auf dem ersten Gel aus Punkt 3.6 dunkle Flecken ungefähr auf der Höhe des Sample-Loading-Buffers, die hauptsächlich aus RNA bestehen. Interessant ist nun vor allem der Vergleich mit in Punkt 3.6 entdeckten Plasmiden. Tritt an ungefähr gleicher Stelle wie beim Plasmidnachweis eine Bande auf, haben die Restriktionsenzyme wahrscheinlich nicht oder mindestens nur einmal geschnitten. Das Plasmid ist daher noch in der gleichen Grösse vorhanden. Tritt eine Bande nicht mehr auf oder ist nur noch sehr schwach zu erkennen, lässt sich daraus schliessen, dass das Plasmid zerschnitten wurde. Findest du dort keine Banden, ist es wahrscheinlich geradezu zersstückelt worden, findest du hingegen zwei oder mehrere Banden weiter vorne, ist es dir gelungen, das Plasmid in schöne Einzelteile zu zerschneiden.

Mit ein wenig detektivischem Gespür kannst du nun versuchen Aussagen über die Verwandtschaft der Bakterienkolonien zu mache. Ist zum Beispiel bei zwei Kolonien beim gleichen Enzym die Plasmidbande weg, und bei den anderen Enzymen ist sie bei beiden Kolonien immer da, könnte es gut sein, dass diese Kolonien relativ nahe Verwandt sind.

Da Bakterien unter Umständen Plasmide unter sich austauschen können, kannst du auch mit diesem Restriktionsverdau keine unumstösslichen Aussagen über die Verwandtschaft machen. Es sind zwar immer logische Möglichkeiten, aber auf jeden Fall nur Vermutungen.

Das Gel kannst du gut auf der Glasscheibe in Küchenfolie eingepackt im Kühlschrank bei 4°C einige Wochen aufbewahren.

5 Anhang

5.1 Glossar

DNA	Desoxyribonukleinsäure
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
g	Erdbeschleunigung (gravity)
RNA	Ribonukleinsäure
SDS	Natriumdodecylsulfat (sodium dodecyl sulfate)
TAE-Puffer	Tris-Acetat-EDTA-Puffer
TE-Puffer	Tris-EDTA-Puffer
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
Tube (das)	Neu- bzw. Labordeutsch für Reaktionsgefäß
w/v	Masse/Volumen (weight/volume); Beispiel: 15% (w/v) = 150g pro 1l Lösung

5.2 Lagerung und Entsorgung

Material	Lagerung	Entsorgung
Nährböden (rein)	Bei Raumtemperatur	Im festen Abfall, oder für weitere Versuche verwenden
Nährböden (geimpft)	Im Kühlschrank bei 4°C (ausser während dem Wachstum)	Gut verschlossen im festen Abfall
Flüssignährmedien (rein)	Bei Raumtemperatur	Im Abguss
Flüssignährmedien (geimpft)	Im Kühlschrank bei 4°C (ausser während dem Wachstum)	Im Abguss, mit Wasser nachspülen
Gramfärbungen	Trocken, bei Raumtemperatur	Objektträger im Abguss waschen und wiederverwerten
Lösung I	Verschlossen bei Raumtemperatur	Mit genügend Wasser im Abguss
Lösung II	Einige Wochen verschlossen bei Raumtemperatur haltbar	Mit genügend Wasser im Abguss
Lösung III	Verschlossen bei Raumtemperatur	Mit genügend Wasser im Abguss
TE-Puffer	Verschlossen bei Raumtemperatur	Mit genügend Wasser im Abguss
TAE-Puffer	Verschlossen bei Raumtemperatur	Als gefährlichen Abfall entsorgen
Plasmide	Verschlossen im Kühlschrank bei 4°C	Verschlossen im festen Abfall
Gel	Auf der Glasplatte in Folie eingewickelt im Kühlschrank bei 4°C	Verschlossen im festen Abfall (nur mit beschriebener Färbung, Ethidiumbromid wäre sehr giftig und daher Sonderabfall)
Sample-Loading-Buffer	Verschlossen bei Raumtemperatur	Mit genügend Wasser im Abguss
EZ Load™ 500 bp Molecular Ruler	Verschlossen im Kühlschrank bei 4°C	Normalerweise nicht nötig, sonst verschlossen im festen Abfall
Fast Blast™ DNA Stain	Verschlossen bei Raumtemperatur (mehrmals verwendbar)	Mit genügend Wasser im Abguss
Restriktionsenzyme	Bei -20°C im Tiefkühlfach (auch beim Benutzen nie auftauen)	Normalerweise nicht nötig, sonst verschlossen im festen Abfall
Puffer	Bei -20°C im Tiefkühlfach	Normalerweise nicht nötig, sonst verschlossen im festen Abfall

5.3 Adressen für Materialbestellungen

Die benötigten Chemikalien und Geräte können bei den folgenden Lieferanten bestellt werden. Zu allen speziellen Materialien und Geräten, die in einer Schule eventuell dazu gekauft werden müssen, sind in den Materiallisten die jeweiligen Bestellnummern und der Lieferant angegeben.

Bio-Rad	Bio-Rad Laboratories AG Nenzlingerweg 2 4153 Reinach Tel. 061 717 95 55 http://www.Bio-Rad.ch
Fluka (Sigma-Aldrich)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH Industriestrasse 25, Postfach 9471 Buchs Tel. 081 755 25 11 http://www.fluka.ch
Merck	Merck (Schweiz) AG Rüchligstrasse 20 8953 Dietikon Tel. 044 745 11 22 http://www.merck.ch

5.4 Enzymtabelle – Empfehlungen

In der folgenden Tabelle sind einige geläufige Enzyme mit ihren Erkennungssequenzen und jeweiligen Puffern aufgelistet. Über die Bestellnummer können sie direkt bei Fluka bestellt werden. Natürlich können auch andere Enzyme benützt werden. Es sollte lediglich darauf geachtet werden, dass die Enzyme auch methylierte DNA schneiden und eine möglichst kurze Erkennungssequenz aufweisen, um die Wahrscheinlichkeit eines Schnittes zu erhöhen.

Enzym	Erkennungssequenz	Puffer	Bemerkungen	Bestellnummer
Alu I	5'-AG/CT-3'	SA	häufige Erkennungssequenz	Fluka: R6885
BamH I	5'-G/GATCC-3'	SB		Fluka: R0260
EcoR I	5'-G/AATTC-3'	SH	relativ billig	Fluka: R4640
EcoR V	5'-GAT/ATC-3'	SB		Fluka: R2756
Hind III	5'-A/AGCTT-3'	SB	sehr billig	Fluka: R1137
Kpn I	5'-GGTAC/C-3'	SL		Fluka: R1258
Msp I	5'-C/CGG-3'	SL	teuer, häufige Erkennungssequenz	Fluka: R4506
Pst I	5'-CTGCA/G-3'	SH	relativ billig	Fluka: R7023
Pvu I	5'-CGAT/CG-3'	SH	relativ teuer	Fluka: R1508
Pvu II	5'-CAG/CTG-3'	SM	teuer, schneidet bei spezieller Dam Methylase nicht	Fluka: R2631
Xho I	5'-C/TCGAG-3'	SH		Fluka: R6379

Die angegebenen Puffer werden normalerweise in ausreichenden Mengen mit den Enzymen mitgeliefert und müssen nicht zusätzlich bestellt werden. Restriktionsenzyme sollten unbedingt bei -20°C aufbewahrt werden. Es muss also ein gutes Kühlfach bereit stehen.

Im Internet gibt es einige gute Informationsquellen in Bezug auf die Restriktionsenzyme. Die grösste offene Plattform ist die englischsprachige Website von Dr. Richard J. Roberts and Dana Macelis: <http://rebase.neb.com>. Vor allem "REBASE search" leistet gute Dienste.

Die aktuell erhältlichen Restriktionsenzyme sind auf der Website von Fluka unter folgendem Link zu finden: <http://www.sigmaaldrich.com/catalog/search/TablePage/14572986>.

5.5 Referenz, weitere Literatur und Internet

- Der Experimentator – Molekularbiologie / Genomics, Cornel Mülhardt, Spektrum Akademischer Verlag; Elsevier GmbH, 5. Auflage, München 2006;
Modernes Buch über eine grosse Anzahl molekularbiologischer Verfahren
- Molekularbiologie der Zelle, Bruce Alberts, Alexander Johnson, Julian Lewis, Martin Raff, Keith Roberts, Peter Walter, Wiley-VCH Verlag GmbH & Co., 4. Auflage, Weinheim 2003;
Das grosse Buch zur Zell- und Molekularbiologie
- Fundamentals of Biochemistry, Life at the Molecular Level, Donald Voet, Judith G. Voet, Charlotte W. Pratt, Wiley & Sons INC, 2nd Edition, USA 2006;
Englisches Buch mit guten Erklärungen zum Thema
- 77730, Gram Staining Kit (Bacteria Staining Kit according to Gram), Datasheet, Fluka;
Mitgelieferte Anleitung der Gramfärbung "Gram Staining Kit" von Fluka
- 166-0420EDU, Fast Blast™ DNA Stain (500x), Instruction Manual, Bio-Rad;
Mitgelieferte Anleitung der Färbung "Fast Blast™ DNA Stain" von Bio-Rad
- Menz, Volkmar, Genetische Transformation als Schülerexperiment der Sekundarstufe II, <http://www.genetik.uni-koeln.de/teaching/lehramt/material/menz/index.html>, 28. Dezember 2006, 11.48 Uhr;
Umfangreiche Schüleranleitung mit guten Optimierungen, Ersatzmaterialien und Gerätschaften für den Eigenbau zu einem ähnlichen Thema

5.6 Impressum

Über Anregungen oder Kritik freuen wir uns sehr und Fragen versuchen wir möglichst gut zu beantworten. Kontaktieren Sie uns also ungeniert.

Die Autoren:

Joel Bänziger
Hinterdorf 35
9427 Wolfhalden

joel.baenziger@mymail.ch

Susanne Widmer
Höhe 911
9427 Wolfhalden

su.widmer@hotmail.com

Betreuerin:

Frau Christina Nef

Druck und Bindung:

Eugster Druck AG, Heiden