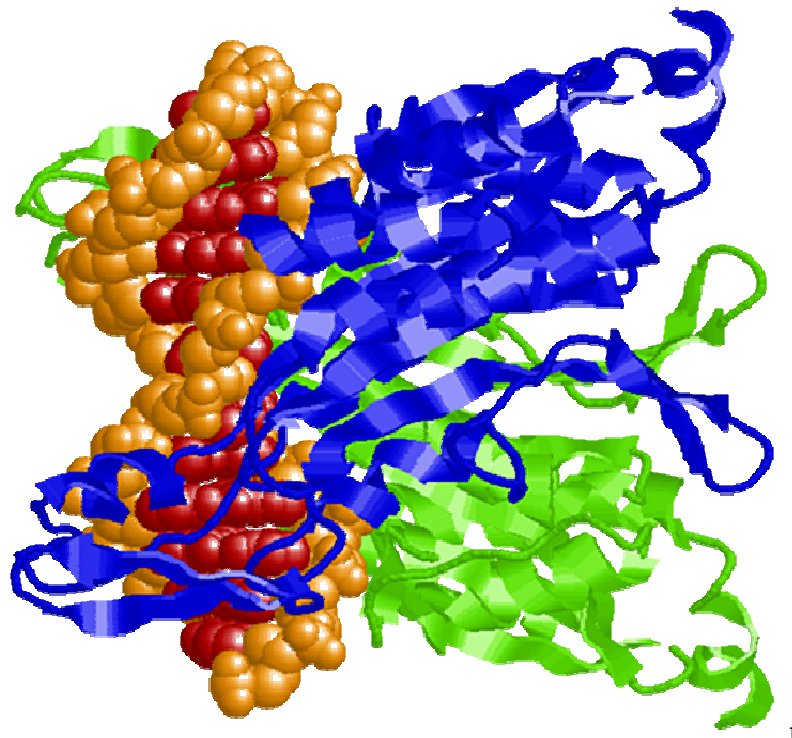


Schülerdossier

Plasmid-Restriktionsverdau

der selbst gezüchteten Bakterien



Zur Maturaarbeit 2006, Kantonsschule Trogen

Autoren:

Joel Bänziger und Susanne Widmer

1 Zucht der Bakterien

1.1 Bakterien vorbereiten

Die Bakterien, die du züchten willst, musst du natürlich zuerst einmal haben. 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.

1.2 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.

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.

1.3 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 fadig, samtig, fein und oft grau aus. Auf der ungeimpften Referenz darfst du nichts sehen, sonst wurde schon vor diesen Punkten 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. Schliess 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 1.2 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.

1.4 Bakterien in die Flüssignährphase überimpfen

Nun sollst du die Bakterien auf deinen Reinkulturen in die frischen Flüssigmedien überimpfen. Hier ist ebenfalls höchste Sorgfalt und 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 mitschwemmen 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.

1.5 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.

1.5.1 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.

1.5.2 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. Schüttle 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.

2 Extraktion der Plasmide

2.1 Bakterien vorbereiten

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

1. Schüttele 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!

2.2 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. Schüttele 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.

2.3 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 3.2 bis 3.4 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 3.2 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 3.3 beschrieben und lass es bei 75V 80 Minuten lang laufen.
5. Färbe darauf nach Punkt 3.4 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.

3 Restriktionsverdau und Gelelektrophorese

3.1 Restriktionsverdau

Du bist nun am Kernversuch dieser Anleitung angelangt. Es können hier verschiedene Probleme auftreten. 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.

Achte darauf, zu deinen verwendeten Enzymen die richtigen Puffer hinzu zu geben, weil das Enzym mit dem falschen Puffer seine Schneidwirkung nicht entfalten kann. Beachte auch, dass Restriktionsenzyme unbedingt bei -20°C gelagert werden müssen. Führe den Versuch mit mindestens drei verschiedenen Enzymen durch, damit du eine einigermaßen gute Variabilität erhältst. Nur schon bei diesen minimalen Annahmen entstehen neun verschiedene Proben. Schreibe deine Tubes also gut an und halte eine sinnvolle Ordnung.

1. Pipettiere mit der 10 μl Pipette aus einer Plasmidprobe 5 μl Plasmidlösung in ein frisches angeschriebenes Eppendorfer Tube.
2. Pipettiere dazu immer jeweils mit einer neuen Spitze 1 μl deines Enzyms, 2 μl des entsprechenden Puffers und 12 μl destilliertes Wasser.
3. Wiederhole die Schritte 1 und 2 für alle deine Proben und für alle deine Enzyme.
→ Achtung: Richtiger Puffer verwenden!
4. Klopfle 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 3.2 aus.
8. Schalte nach 60 Minuten den Brutschrank aus und entnimm die Proben.

3.2 Gel herstellen

Du sollst nun deine Proben auftrennen. Dafür benötigst du ein Gelelektrophoresegerät und ein dazu passendes 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. Klebe beide offenen Seiten deines Geltrays mit durchsichtigem Klebeband gut zu.
2. Stecke den Kamm mit 20 Taschen auf der einen Seite des Geltrays fest.
3. Stelle den vorbereiteten Geltray an einen waagrechten Ort.
4. Miss in einem 200ml Erlenmeyerkolben 0,9g Agarose ab.
5. Gib 90ml im Messzylinder abgemessenen TAE-Puffer 1x und ein Magnetrührfischchen dazu.
6. Erwärme den Inhalt des Erlenmeyerkolbens auf der Magnetrührheizplatte bis sich die Agarose vollständig gelöst hat und die Lösung klar ist. → Achtung Siedeverzug!
7. Lass die Lösung auf ca. $50-60^{\circ}\text{C}$ abkühlen.
8. Giesse die Lösung in den vorbereiteten Geltray und lasse das Gel ca. 30 Minuten erstarren.
9. Ziehe sehr vorsichtig den Kamm aus dem Gel und das Klebeband von den Seiten weg.
10. Lege das fertige Gel im Geltray mit den Geltaschen zur schwarzen Kathode in das Gelelektrophoresegerät.
11. Fülle das Gelelektrophoresegerät bis mindestens 3mm über das Gel und maximal bis zur Markierung am Gerät mit TAE-Puffer 1x.
12. Räume deinen Arbeitsplatz auf.

3.3 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.

3.4 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 Glasrichter 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.

3.5 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 2.3 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 2.3 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 zerstückelt 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.

¹ Titelbild: EcoR I, <http://www.bpc.mh-hannover.de/alves/rischema.gif>