

	Nukleinsäuren I	S II
	Der Lambda-Kit: Ergänzungen zum Original-Arbeitsheft	

Kurzbeschreibung: Mit Restriktionsenzymen wird DNA geschnitten. Die DNA-Fragmente werden danach durch Gelelektrophorese getrennt und durch Anfärbung sichtbar gemacht.

Der λ -Kit enthält DNA und Enzyme für 16 Versuche und 5 Elektrophoresekammern. Somit können 5 Schüler-Arbeitsgruppen zeitgleich folgende Arbeitsschritte durchführen:

Arbeitsschritt-Nr. laut Original-Arbeitsheft	Arbeitsschritt	Zeit	
1	Gebrauch der Mikropipetten	D o p p e l s t u n d e	5 min
2	Reaktivierung der getrockneten DNA		15 min
3,4	Schneiden der DNA des Lambda-Phagens mit drei verschiedenen Restriktionsenzymen ^{*)}		35-50 min oder länger
5	Vorbereiten des Agarose-Gels		Während 3,4
6	Vorbereiten der aufzutragenden DNA-Fragmente (Proben) und Beladen des Gels		5-10 min
7	Gelelektrophorese		3-12 Stunden
8	Färben der DNA im Agarose-Gel, Herauswaschen der Hintergrundfärbung (Entwicklung)		5 min, 30 min oder länger

^{*)} Die Restriktionsansätze können bei Bedarf im Gefrierfach bis zur weiteren Verwendung aufbewahrt werden.

Lernvoraussetzungen:

- Bau und Funktion der DNA
- Bau und Vermehrung des λ -Phagens (siehe Original-Arbeitsheft)
- Bedeutung der λ -Phagen als Vektoren

Ein Vektor ist ein DNA-Stück, das sich in einer Zelle selbstständig, d.h. unabhängig von Chromosomen, vermehren kann. Vektoren dienen als Transport- und Vermehrungsmoleküle für DNA-Stücke, die in Zellen eingeführt werden sollen. Als Vektoren dienen Plasmide und Viren.

- Funktion der Restriktionsenzyme

Ein Restriktionsenzym erkennt eine ganz bestimmte Nukleotidsequenz im DNA-Molekül und kann das DNA-Molekül an dieser Stelle spalten (schneiden). Es gibt verschiedene Sorten von Restriktionsenzymen für unterschiedliche Schnitte. Sie werden aus Bakterien gewonnen.

- Trennprinzip der Gelelektrophorese

Unter Elektrophorese versteht man eine Trennmethode für elektrisch geladene Moleküle (Proteine, DNA, RNA) mit Hilfe eines elektrischen Feldes. Die in der Pufferlösung negativ geladenen DNA-Fragmente wandern im elektrischen Feld, wobei die kleineren DNA-Stücke schneller durch das Maschenwerk des Agarose-Gels gelangen als die größeren.

Zusätzlich zum Lambda-Kit benötigte Materialien:

Pro Gruppe:

- destilliertes Wasser
- Stoppuhr oder Kurzzeitwecker
- Reaktionsgefäßständer mit Gruppennummer

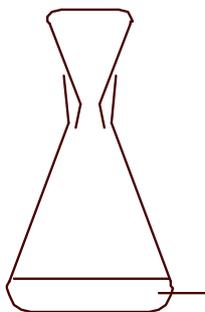
Tipp: Bodenteil einer Petrischale mit darüber gelegter Platte (ca. 35 x 100 mm) aus Hartschaum oder Sperrholz. Die Platte enthält für die Aufnahme der Reaktionsgefäße und das DNA- bzw. Farbmarker-Gefäß 5 Bohrungen mit 6 mm (4x) und 12 mm (1x) Durchmesser.

- Filzschreiber
- Gefäß für 25 mL Pufferlösung
- 10-mL-Pipette
- Pipettierhilfe (z.B. Pi-pump)
- 50-mL-Becherglas, kurzer Glasstab (zur Verhinderung des Siedeverzuges beim Agarosekochen), Brenner + Zündhölzer + Vierfuß + Ceranplatte oder **alternativ** 1 Mikrowellengerät für alle Gruppen (siehe Anmerkung 1)
- 1-3 9-V-Batterien oder **alternativ** Netzgerät + 2 Experimentierkabel + 2 Krokodilklemmen (siehe Anmerkung 2)
- Einmal-Schutzhandschuhe
- Gefäß für DNA-Färbelösung
- breiter Spatel (zum Abheben des Gels)
- 100-mL-Flasche mit verdünntem Spiritus, σ (Ethanol) = 70 % (siehe Anmerkung 3)
- Abfallbehälter (z.B. Joghurtbecher)
- Papiertücher

Pro Klasse:

- 37°C-Wasserbad oder Brutschrank
- Waage (Ablesbarkeit: 0,01 g)
- Gefäß für „gebrauchte DNA-Färbelösung“ und Trichter dazu

Anmerkung 1: Schmelzen des Agarose-Pulvers im Mikrowellengerät:



0,08 g Agarose
+ 10 mL Pufferlösung

Die Inhalte der kleinen Erlenmeyerkolben ¹⁾ (siehe Skizze) aller Gruppen werden im Mikrowellengerät bei mittlerer Stärke dreimal kurz (15 - 30 s) aufgekocht. Es dürfen keine Schlieren erkennbar sein!

¹⁾ Bsp.: 100-mL-Weithals- und 50-mL-Enghals-Erlenmeyerkolben

Anmerkung 2: 9-V-Batterien oder **Netzgerät**

Die Dauer der Elektrophorese beträgt	bei 9V	≈	12 Stunden,
	bei 18 V	≈	5-6 Stunden,
	bei 25 V	≈	3-4 Stunden *)
	bei 60 V	≈	1 Stunde *)

- *) Spannungsquellen bei Schülerversuchen müssen galvanisch vom Netz getrennt sein. Diese Forderung erfüllen z.B. Sicherheitstransformatoren nach VDE 0551, bei denen die Primär- und Sekundärwicklung völlig getrennt sind.

Bei Schülerversuchen in der **Mittelstufe** mit nicht berührungssicheren Schaltungen sollen Spannungen von 25 V nicht überschritten werden, auch nicht bei Gleichspannungen.

Nach VDE 0100 TI.410 Ziffer 4.1 darf bei Spannungen bis 25 V Wechselspannung oder **60 V Gleichspannung** in normalen Anwendungsfällen auf Maßnahmen zum Schutz gegen direktes Berühren verzichtet werden.

Anmerkung 3: Für 1 L Spiritus, σ (Ethanol) = 70 %, werden 745 mL Spiritus mit 255 mL destilliertem Wasser gemischt.

Bezugsquelle: National Centre for Biotechnology Education (NCBE), University of Reading, Whiteknights, Reading, RG6 6AJ, United Kingdom, German Version. Nähere Informationen und die Bestell-Adresse (ncbe@reading.ac.uk) finden Sie im Internet unter <http://www.reading.ac.uk/NCBE> (→ Materials → DNA Science → Modular electrophoresis technology → Lambda DNA).

Preis: Originalversion für 16 Versuche, 5 Elektrophoresekammern 115,00 £

Nachfüllpackungen:

DNA and enzymes pack for 8 tubes	20,00 £
λ -DNA for 16 tubes	15,00 £
Bam HI for 16 tubes	14,00 £
Eco RI for 16 tubes	14,00 £
Hind III for 16 tubes	14,00 £
Agarose, 2 g	6,00 £

zzgl. Versand

Weitere Versuchs-Kits: Elektrophorese-Verfahren der Firma Schlüter, auch zu beziehen über die Firma Hedinger.

- Abbau von DNA und Nachweis der DNA-Fragmente durch Elektrophorese
- Elektrophorese: Genetischer Fingerabdruck „DNA-Fingerprint“