

## Plasmide, Vektoren und Klonierung

### *Erstellen einer Restriktionskarte des Plasmids pBR322*

#### 1) Einleitung

Will man Plasmide charakterisieren, so ist eine Möglichkeit dazu die Restriktionsanalyse. Das Plasmid wird hierbei mit verschiedenen Kombinationen von Restriktionsenzymen verdaut. Durch anschließende Analyse der DNA-Fragmente auf einem Agarose-Gel und Vergleich mit Fragmenten bekannter Größe kann die Länge der Fragmente ermittelt werden. Mit den erhaltenen Daten lässt sich dann eine Restriktionskarte erstellen, die die Lage der Schnittstellen auf dem Plasmid relativ zueinander angibt.

#### 2) Material

s. Skript, S.24

#### 3) Methode

Bestimmt wurde die relative Lage der Schnittstellen der Restriktionsenzyme *EcoRI*, *HinclI* und *AflIII* im Plasmid pBR322, indem das Plasmid zuerst mit verschiedenen Kombinationen der Restriktionsenzyme geschnitten wurde und dann eine entsprechende Analyse der Plasmid-Fragmente auf Agarose-Gel durchgeführt wurde.

Vorgegangen wurde dabei nach dem Skript, S.23f. Auch die Kombinationen der einzelnen Restriktionsenzyme sind dort aufgeführt.

#### 4) Ergebnisse und Diskussion

Da das originale Photo des Agarose-Gels recht klein ist und somit beim Messen der Laufweiten eher Ungenauigkeiten auftreten, haben wir das Photo etwas vergrößert und aus Gründen der leichteren Handhabbarkeit in sein Negativ umgewandelt. Auf diese Vergrößerung (s. S.2) beziehen sich all unsere, im Folgenden verwendeten Messdaten. Das originale Photo liegt diesem Protokoll auf Seite 5 bei.

Aus der Abbildung des Agarose-Gels (s. S.2) wurde aus den Laufweiten des verwendeten Längenstandards eine Eichkurve auf semilogarithmischem Papier erstellt. Da wir bei uns feststellten, dass die beiden Längenstandards nicht die gleichen Laufweiten aufweisen, wurden Eichkurven *beider* Längenstandards aufgetragen und die DNA-Fragmente, deren Größe daraus zu analysieren war, wurden dann abhängig davon, welchem Standard sie auf dem Gel näher waren, bewertet. Das Blatt mit den Eichkurven ist dem Protokoll auf Seite 6 beigefügt.

Als zusätzliche Kontrolle der erhaltenen Größen der Fragmente wurden in der Abbildung des Agarose-Gels auf Seite 2 die beiden Längenstandards mit gestrichelten Linien verbunden.

Im Folgenden sind nun das vergrößerte, ins Negativ gekehrte und beschriftete Photo des Agarose-Gels und die daraus erhaltenen Messdaten in mm, denen dann mit Hilfe der Eichkurven (s. S.6) die entsprechenden Fragmentlängen, die bereits in die Banden der Abbildung des Agarose-Gels gedruckt wurden, zugeordnet worden sind.

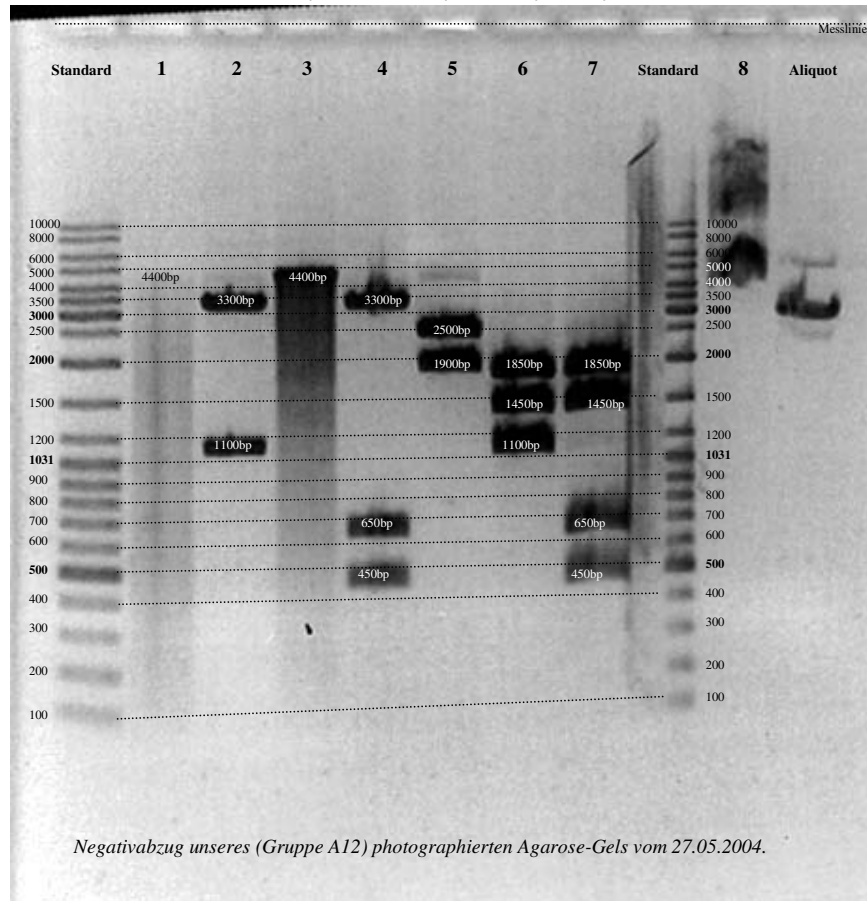
#### Photo des Agarose-Gels

Hier ist *anzumerken*, dass in Bahn 1 die Plasmid-DNA wahrscheinlich zerstört (die Größe des Fragments wurde deshalb – auf das Anraten der Assistenten – durch die obere Begrenzungslinie des Schmiers festgelegt) und die DNA der Bahn 3 wohl verunreinigt wurde, was den Schmier unterhalb der eigentlichen Bande verursacht hat. Laut des Assistenten, der das

Gel abgeleuchtet hat, sind die rechte Hälfte der 7. Bahn, sowie die linke Hälfte des rechten Standards aufgrund eines Fehlers im Gel etwas bzw. ganz verschmiert. Auch die Bahn 8 scheint aus ähnlichem Grund unregelmäßig gelaufen zu sein.

Folgende *Kombinationen von Restriktionsenzymen* wirkten am Verdau der Plasmid-DNA der jeweiligen Bahnen mit:

*EcoRI*: + + + + + -  
*HindIII*: + + + + + -  
*AflIII*: + + + + + -



Negativabzug unseres (Gruppe A12) photographierten Agarose-Gels vom 27.05.2004.

**Messdaten (=Laufweiten) der Banden pro Bahn in mm**, von der Messlinie aus:

(Der Übersicht halber relativ in etwa dort, wo sich auf dem Photo die entsprechenden Banden befinden.)

Standard	1	2	3	4	5	6	7	Standard	8	Aliquot
29								28	25,5	
30,5								29,5		
33								32		
35								34		
37,5	36		36					36,5	36	
39		39,5		39				38		
41,5								40		41
43,5					43			42,5		
48					48	48,5	48,5	46,5		
53,5						53	53	52		
58,5		60				59		57		
62								60,5		
65								63,5		
68								67		
70,5				71			70,5	69		
74								72		
77,5				78				76		
81,5							77,5	80		
86								84,5		
91,5								90		
97								95		

Die **Größe von pBR322** ist den Bahnen 1 und 3 zu entnehmen. Hier wird jeweils nur einmal geschnitten. Die Laufweite von 36mm entspricht in etwa **4400bp**. Dieser Wert deckt sich weitestgehend mit dem Literaturwert von 4362bp.

Auch aus Bahn 8 müsste theoretisch die Länge des Plasmids zu erlesen sein. Allerdings ist dort zu beachten, dass das *ungeschnittene* Plasmid in verschiedenen Konfigurationen vorliegen kann. Die unterste Bande der Bahn 8 liegt in der **super coiled Form** (ccc-Form) vor, in der sie kompakter ist als die, durch einmaliges Schneiden linearisierte Form (Bahn 1 und Bahn 3), und somit im Gel weiter (hier um ca. 2mm) wandern müsste, als sie das in unserem Fall tut (36mm), was, wie oben schon erwähnt wahrscheinlich auf einen Fehler im Gel zurückzuführen ist. Der Schmier oberhalb dieser Bande besteht vermutlich aus der linearen Form, der oc-Form und eventuell gebildeten Dimeren.

### Erstellen der Restriktionskarte

Zunächst einzelne Auswertungen der Bahnen:

#### 1) EcoRI

→ 1 „Bande“ bei 36mm = 4400bp

Aus dem Photo sollte zu entnehmen sein (bei uns leider nicht so deutlich, weil die Plasmid-DNA in unserem Fall wahrscheinlich zerstört wurde – deshalb der Schmier unterhalb der Stelle, an der die Bande eigentlich sein sollte), dass *EcoRI* das Plasmid nur *einmal* schneidet. Diese Schnittstelle befindet sich nicht in der ori-Region, sondern in der multi-cloning-site des Plasmids. Aus diesem Grund beeinträchtigt auch ein Einfügen von DNA-Fragmenten an der Schnittstelle von *EcoRI* nicht die Replikation bzw. die Vermehrung des Plasmids.

#### 2) HincII

→ 2 Banden bei 39,5mm = 3300bp  
bei 60,0mm = 1100bp

#### 3) AflIII

→ 1Bande bei 36mm = 4400bp

Der Schmier unterhalb der Bande rührt von Verunreinigungen mit DNA her.

Um diese einzeln erhaltenen Schnittstellen auf dem Plasmid nun relativ zueinander auf einer Restriktionskarte des Plasmids einzeichnen zu können, sind enzymatische *Doppelverdau*s nötig:

#### 4) EcoRI + HincII

*HincII* hat zwei Schnittstellen, was zwei Banden auf dem Gel-Photo ergäbe, *EcoRI* hat eine Schnittstelle, die quasi eine „*HincII*-Bande“ wiederum in zwei Banden teilt; im Endeffekt ergibt das:

→ 3 Banden bei 39mm = **3300bp**  
bei 71mm = **650bp**  
bei 78mm = **450bp**

#### 5) EcoRI + AflIII

Jedes Enzym schneidet das Plasmid einmal, so dass entstehen:

→ 2 Banden bei 43mm = **2500bp**  
bei 48mm = **1900bp**

#### 6) AflIII + HincII

*HincII* hat zwei Schnittstellen, was wieder zwei Banden auf dem Gel-Photo ergäbe, *AflIII* hat eine Schnittstelle, die sozusagen eine „*HincII*-Bande“ wiederum in zwei Banden teilt; im Endeffekt ergibt das:

→ 3 Banden bei 48,5mm = **1650bp**  
bei 53mm = **1450bp**  
bei 59mm = **1100bp**

#### 7) EcoRI + HincII + AflIII

Dieser Verdau ergibt keine weiteren, d.h. durch die anderen Verdau noch nicht dargestellten Banden, die zur Erstellung der Restriktionskarte hilfreich wären und kann hier somit vernachlässigt werden, sprich, auf diesen Restriktionsansatz könn-

te man verzichten. Um der Vollständigkeit Willen werden hier dennoch die Laufweiten der Banden und die entsprechenden Fragmentgrößen angegeben:

- 4 Banden bei 48,5mm = 1850bp
- bei 53mm = 1450bp
- bei 70,5mm = 650bp
- bei 77,5mm = 450bp

Kombination der obigen Einzelergebnisse:

Beim Einzelverdau durch *HincII* entstehen zwei Banden der Größe **3300bp** und **1100bp**. Vergleicht man nun dieses Ergebnis mit dem des Doppelverdau durch *HincII* und *EcoRI*, bei dem Fragmente der Größe **3300bp**, **650bp** und **450bp** entstehen, so wird deutlich, dass die Schnittstelle für *EcoRI* auf dem **1100bp** großen Fragment liegt, und zwar eben genau so, dass dieses Fragment in ein **450bp** großes und ein **650bp** großes Teilstück geschnitten wird. Noch nicht bestimmen lässt sich allerdings in diesem Moment, auf welcher Seite der *EcoRI*-Schnittstelle welches dieser beiden Teilstücke liegt.

Vergleiche ich wieder den Einzelverdau durch *HincII*, diesmal aber mit dem Ergebnis des Doppelverdau durch *HincII* und *AflIII*, bei dem Fragmente der Länge **1850bp**, **1450bp** und **1100bp** entstehen, ist zu erkennen, dass *AflIII* seine Schnittstelle auf dem **3300bp** langen Fragment hat und dieses in ein **1850bp** langes und ein **1450bp** langes Teilstück teilt. Allerdings ist wieder, wie im ersten Fall noch nicht geklärt, welches Fragment auf welcher Seite von der *AflIII*-Schnittstelle liegt.

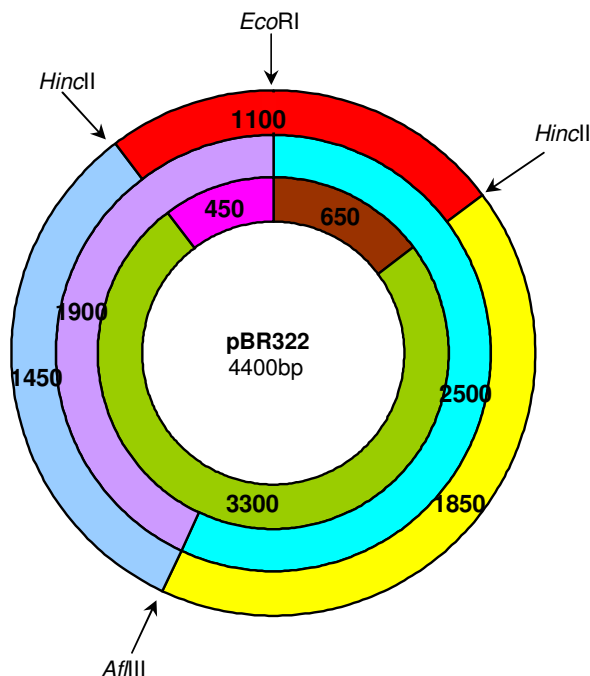
Um dieses Problem zu lösen, ist noch eine weitere Erkenntnis von Nöten, und zwar die, dass beim Doppelverdau des Plasmids durch *EcoRI* und *AflIII* zwei Fragmente der Längen **2500bp** und **1900bp** entstehen.

Nun muss man *ausprobieren*, wie man die Fragmente zusammenstückeln muss, dass die Summen sich in etwa entsprechen:

Die **2500bp** zwischen den Schnittstellen *EcoRI* und *AflIII* erhält man z.B. eben nur, wenn man die Fragmente(, die durch jeweiligen Doppelverdau mit *HincII* entstehen,) der Länge **650bp** und **1850bp** auf „die gleiche Seite“ von *EcoRI* und *AflIII* legt. Analog erhält man die „andere Seite“ zwischen den Schnittstellen *EcoRI* und *AflIII*, indem man die Fragmente der Länge **450bp** und **1450bp** (auch aus dem jeweiligen Doppelverdau mit *HincII*) auf einer Seite kombiniert.

Graphische Darstellung der ermittelten Restriktionskarte:

Die Zahlenwerte in der Graphik zeigen Basenpaare, die beschrifteten Pfeile zeigen die Lage der Schnittstellen an!



Originales Photo des Agarose-Gels unserer Gruppe:

