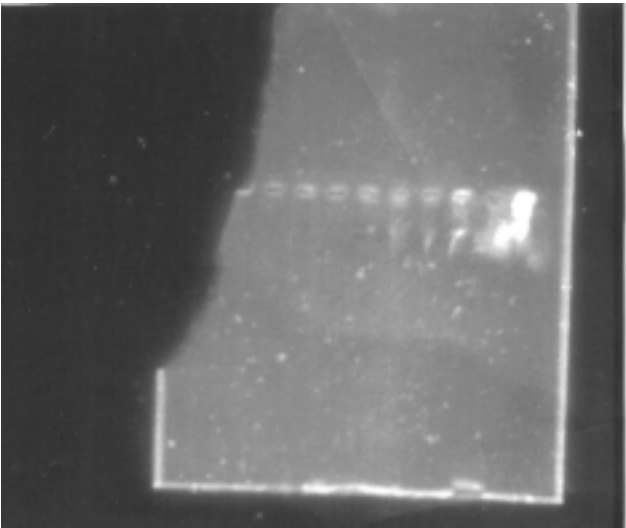


Experiment Nr.22	Isolation of Plasmid-DNA from bacteria																
Verfasser	Axel Flury Julia Burgener Daniel Möckli																
Betreuer	Konrad Egli [kegli@botinst.unizh.ch]																
Einleitung	In diesem Versuch ging es darum, Plasmid-DNA aus 2 verschiedenen <i>Escherichia coli</i> -Klonen zu isolieren, um sie im weiteren (Experiment 23) mit Restriktions-Enzymen zu verdauen und anschliessend durch Gel-Elektrophorese zu analysieren.																
Vorgehen	Uns wurden <i>E.coli</i> Bakterienkulturen bereitgestellt, welche aufgetaut und anschliessend 3 min abzentrifugiert werden mussten, damit sich die Bakterien am Boden absetzten. (Zentrifuge auf 10k rpm) Der Überstand konnte dann mit einer Pipette vorsichtig abgesaugt und verworfen werden. Das Bakterien-Pellet resuspendierten wir mit 0.5 ml PBS-Puffer. (Composition of PBS (phosphate buffered saline, per liter): 8g NaCl, 0.2g KCl, 1.44g Na₂HPO₄, 0.24g KH₂PO₄, pH 7.4) Danach erhitzen wir die Eppendorf-Tübchen (ET) auf 94° einige min lang. Nach dem Abkühlen zentrifugierten wir sie, um den Überstand weiter zu verwenden. Wir nahmen 3 µl des plasmidenthaltenden Überstandes, mischten 20 µl des vorbereiteten PCR-Gemisches hinzu und füllten mit einer Taq-Polymerase-Lösung auf. PCR (polymerase chain reaction) 1. Preparation of a "master-mix" per sample <table border="1"> <tr> <td>dH₂O (steril)</td><td>18.175 ul</td></tr> <tr> <td>Buffer (10 x)</td><td>2.5 ul</td></tr> <tr> <td>dNTP (2.5 mM)</td><td>2 ul</td></tr> <tr> <td>forward primer (5 uM)*</td><td>1 ul</td></tr> <tr> <td>reverse primer (5 uM)**</td><td>1 ul</td></tr> <tr> <td>BSA (bovine serum albumin, 20 mg / ml)</td><td>0.125 ul</td></tr> <tr> <td>Taq DNA Polymerase (5 U/ul)</td><td>0.2 ul</td></tr> <tr> <td>Total:</td><td>25 ul</td></tr> </table> Primers used: * M13 Forward: 5'-GTA AAA CGA CGG CCA G-3' Tm: 50° C ** M13 Reverse: 5'-CAG GAA ACA GCT ATG AC-3' Tm: 50 °C 2. Mix the master-mix well on a vortex.	dH ₂ O (steril)	18.175 ul	Buffer (10 x)	2.5 ul	dNTP (2.5 mM)	2 ul	forward primer (5 uM)*	1 ul	reverse primer (5 uM)**	1 ul	BSA (bovine serum albumin, 20 mg / ml)	0.125 ul	Taq DNA Polymerase (5 U/ul)	0.2 ul	Total:	25 ul
dH ₂ O (steril)	18.175 ul																
Buffer (10 x)	2.5 ul																
dNTP (2.5 mM)	2 ul																
forward primer (5 uM)*	1 ul																
reverse primer (5 uM)**	1 ul																
BSA (bovine serum albumin, 20 mg / ml)	0.125 ul																
Taq DNA Polymerase (5 U/ul)	0.2 ul																
Total:	25 ul																

	3. Put 1-3 μl sample (from DNA extraction) and 25 μl Master-Mix into a 200μl tube. Centrifuge only for a short time. Stop again, as soon as the centrifuge has reached a moderate speed; this avoids sedimentation of the polymerase. Typical PCR program on the Techne Progene / Genius thermocyclers used in the practical course (Program 84-86). 1 cycle of: 94°C 1min 30 sec 30 cycles of: 94°C 15 sec 50 °C 30 sec 72 °C 1min 14 sec + 1 sec per cycle 1 cycle: 72 °C 8 min Hold 10 °C 4. Put the 200 μl tubes containing the samples into the thermocycler and press the start button. Watch the first 20 seconds whether it starts at the right position of the program. 5. Prepare a 1% agarose gel (in TAE-buffer). We will need this to check whether we obtained PCR products. 6. Load 4 μl of your PCR products onto the gel (in loading buffer). Wie oben beschrieben gaben wir die ETs in den Thermocycler und füllten dann 4 Proben in ein vorbereitetes Agarose-Gel.  Leider klappte es nicht so richtig, siehe Foto.
Weiterführende Fragen	Wie ist es möglich, chromosomale DNA von Plasmid-DNA zu trennen? Mit einem sauren Puffer beschädigt man die Zellwand der Bakterien, die daraufhin abgetötet werden und in kleinere Teile zerfallen. Die chromosomale DNA bleibt an den Zellwandbruchstücken haften, das für uns interessante Plasmid schwimmt frei in der Lösung.

