

## ISOLATION VON PLASMID- DNA AUS BAKTERIEN UND PCR

Verfasser     Andreas Frei  
                  Reto Bertschinger  
                  Claudio Rüber

Betreuung     Konrad Egli

---

### Einleitung

Ziel des Versuchs war es, DNA Fragmente von Genen (16s ribosomale RNA) von verschiedenen Bakterien zu isolieren, welche zuvor in ein Plasmid von *E.coli* kloniert wurden. Diese wurden via PCR amplifiziert und im folgenden (Experiment 23) mit Restriktionsenzymen verdaut und durch Gel-Elektrophorese getrennt und analysiert. In grösserem Umfang könnte auf diese Weise eine Umweltprobe analysiert und die darin vorhandenen Bakterien unterschieden und identifiziert werden.

### Vorgehen

Extraktion der Plasmide mit den klonierten Genen (16S rDNA) aus *E.Coli*

- *E.coli* (5 ml LB) wuchsen bereits über Nacht bei 37°C
- Davon je 1ml in Eppendorfröhrchen zentrifugiert (2min bei 10K)
- Die resuspendierten Zellen in 0.5ml PBS-Puffer geben
- Zellen für 4min bei 93°C erhitzen
- Zentrifugieren um Zelltrümmer zu entfernen, Überstand in neues Eppendorf geben
- 3µl der Plasmidlösung zu 20µl der vorbereiteten PCR-Reaktionslösung geben (Zusammensetzung siehe Praktikumsanleitung) und mit verdünnter Taq-Polymerase auf 25µl auffüllen

PCR (polymerase chain reaction)

- PCR Reaktionslösung in 200µl Röhrchen geben und nur kurz zentrifugieren, damit die Polymerase nicht sedimentiert
- Die Röhrchen mit den Proben in den Thermocycler geben und die Amplifizierung starten  
PCR Programm     - 1 Zyklus bei 94°C, 1min 30sec  
                          - 30 Zyklen bei 94°C, 15sec, 50°C 30sec, 72°C  
                                  1min 14sec + 1sec pro Zyklus  
                          - 1 Zyklus bei 72°C, 8 min  
                          - auf 10°C kühlen bis weiter verwendet
- 1% Agarose Gel vorbereiten (in TEA-Puffer)
- je 4 µl der PCR Produkte auf Gel mit Ladepuffer laden. Das Gel dient zur Überprüfung, ob PCR Produkte entstanden sind.

### Ergebnisse

Es wurden in jedem Fall Produkte für die weitere Verwendung im Experiment 23 erhalten.

## Diskussion

### Pufferlösungen

Im Verlauf dieses Experiments wurden verschiedene Puffer verwendet. Diese können unter anderem RNA auf der Bakterienoberfläche zerstören, die Zellwände der Bakterien zerstören, DNA stabilisieren oder Proteine ausfällen um nur einige Anwendungen zu nennen.

Wie ist es möglich, chromosomale DNA von Plasmid-DNA zu trennen?

Mit einem sauren Puffer können die Zellwände von Bakterien beschädigt werden, die somit in kleinere Teile zerfallen. Die chromosomale DNA bleibt dabei an den Zellwandbruchstücken haften, wobei die viel kleineren Plasmide in Lösung bleiben. Ein zu starkes Schütteln der Lösung muss verhindert werden, da sich sonst die DNA von den Zellwänden ablösen kann.