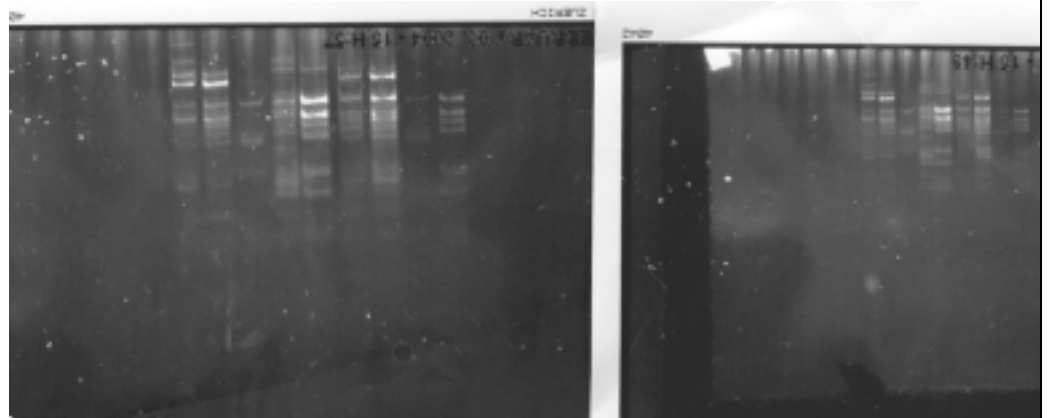


Experiment 23	PCR-RFLP (PCR-Restriction Fragment-Length Polymorphism) of 16S-rDNA from pure cultures or clones												
Verfasser	Axel Flury Julia Burgener Daniel Möckli												
Betreuer	Konrad Egli kegli@botinst.unizh.ch												
Einleitung	Restriktionsenzyme erkennen bestimmte Sequenzen auf der DNA und können sie schneiden. Die entstehenden DNA-Fragmente haben unterschiedliche Länge und somit auch unterschiedliche Grösse. Sie können mittels Gelelektrophorese voneinander getrennt werden. Dabei wandern verschieden grosse Stücke nicht gleich schnell (siehe Anleitung).												
Vorgehen	- Digestion of PCR products with Rsa I (cutting motif: 5'-GT/AC-3') & HpaII (cutting motif: 5'-C/CGG-3') oder - Digestion of PCR products with Hinf I (cutting motif: 5'-G/ANTC-3') & HaeIII (cutting motif: 5'-GG/CC-3') 1. Preparation of RFLP: <table border="1"> <thead> <tr> <th>Assay</th><th>Per Sample</th></tr> </thead> <tbody> <tr> <td>dH₂O (steril)</td><td>1 ul</td></tr> <tr> <td>Appropriate buffer (M) for endonuclease (10x)</td><td>1ul</td></tr> <tr> <td>HinfI (10 U/ml) and HaeIII (6 U/ml)</td><td>0.1 and 0.16 ul</td></tr> <tr> <td>DNA (PCR-products): add later!</td><td>8 ul</td></tr> <tr> <td>Total:</td><td>10.26 ul</td></tr> </tbody> </table> 2. dH₂O mit Puffer und Enzym mischen 3. Die Lösung in sterile 1.5 ml Tübchen oder PCR-Tübchen geben, markieren und 2 µl der Mutterlösung mit den verdauten PCR-Produkten dazugeben. 4. Je 8 µl der DNA (PCR Produkte) nehmen, gut mischen (am besten mit der Pipette) 5. Alle Proben bei 37°C mindestens 2 Stunden inkubieren. 6. 4 µl jeder Probe ins Gel (Acrylamide oder 2 % Agarose) geben und das Gel bei Raumtemperatur 2 Stunden bei 130V entwickeln lassen. 7. Das Gel mit 1 µg/ml Ethidium Bromid färben (etwa 10-15 min) und dann	Assay	Per Sample	dH ₂ O (steril)	1 ul	Appropriate buffer (M) for endonuclease (10x)	1ul	HinfI (10 U/ml) and HaeIII (6 U/ml)	0.1 and 0.16 ul	DNA (PCR-products): add later!	8 ul	Total:	10.26 ul
Assay	Per Sample												
dH ₂ O (steril)	1 ul												
Appropriate buffer (M) for endonuclease (10x)	1ul												
HinfI (10 U/ml) and HaeIII (6 U/ml)	0.1 and 0.16 ul												
DNA (PCR-products): add later!	8 ul												
Total:	10.26 ul												

noch etwa gleichlang entfärben, um überschüssige „Farbe“ zu entfernen.

8. Foto machen.



Diskussion der Ergebnisse

Während der Praktikumsstunden in molekularer Mikrobiologie konnten ein paar grundlegende molekularbiologische Techniken zur Bestimmung der Biodiversität geübt werden. Die folgenden Techniken wurden verwendet: Extraktion von Plasmiden aus einer Übernachtskultur von *E.coli*, welche meistens von der Vortagesgruppe neu angeimpft wurde, nach kurzer Hitzebehandlung. Nachdem die Zelltrümmer entfernt worden waren, konnte die plasmidhaltige Lösung für das PCR verwendet werden. Die PCR Produkte konnten auf einem 1% Agarosegel (mit einem Grössenmarker) visualisiert werden. Leider gab es beim Laden wegen fehlender Routine nicht immer schöne Banden, so dass es bei einigen wenigen Proben schwierig war, abzuschätzen, ob das PCR erfolgreich funktionierte. Es wurden total 5 klonierte 16S rDNA Fragmente analysiert. Die PCR-Produkte wurden mit 2 Enzymen verdaut und dann auf einem vorbereiteten Polyacrylamidgel aufgetragen. Mit wenigen Ausnahmen hat dieser Verdau funktioniert. Man konnte deutlich verschiedene Bandenmuster erkennen. In diesem Praktikum konnten die Kenntnisse in Molekularbiologie an naheliegenden mikrobiologischen Beispielen eingesetzt werden. Die Experimente erlaubten, wichtige Schritte bei der Aufarbeitung und der Analyse von Polynukleotiden kennen zu lernen und die praktischen Fähigkeiten zu verbessern.