

Versuchsanleitung:

RFLP als Modell für einen DNA-Fingerprint

Teil 1: Restriktionsverdau

- 1.1:** Thermoblock / Wasserbad auf 37° C vorheizen
- 1.2:** Puffer Y+/Tango auftauen und auf Eis stellen
- 1.3:** 4 Proben, RSA I und H₂O demin. auftauen und auf Eis stellen
- 1.4:** 4 leere Eppendorf Reaktionsgefäße aus dem sterilen Gefäß mit wasserfestem Stift eindeutig beschriften:
Kürzel der Arbeitsgruppe und jeweils Namen der Proben.

-- Protokoll: Beschriftung ! --

- 1.5:** Pipettiere in folgender Reihenfolge in jedes Eppendorfgefäß

	1. 6 µl destilliertes Wasser	4 x gleiche Spitze verwenden !
Neue Pipettenspitze	2. 2 µl 10x Puffer Y+/Tango	4 x gleiche Spitze verwenden !
Neue Pipettenspitze	3. 2 µl Rsa I	4 x gleiche Spitze verwenden !
Neue Pipettenspitze bei jeder Probe !!	4. 10 µl DNA aus der jeweiligen Probe	

- 1.6:** Alle Ansätze im Vortexmischer gut durchmischen.
- 1.7:** Alle Ansätze kurz in der Tischzentrifuge abzentrifugieren
- 1.8:** Alle Ansätze für 30 min. bei 37° C inkubieren

-- Protokoll: Zeit ! --

Während dieser Zeit Teil 2 →

Versuchsanleitung:

RFLP als Modell für einen DNA-Fingerprint

Teil 2: Agarosegelelektrophorese

Herstellen des Agarose – Gels:

Es wird für zwei Arbeitsgruppen ein Agarose-Gel hergestellt.

- 2.1:** Einwiegen von 1, 2 % w/v Agarose in 1 x TAE Puffer:
(Ansatz 30 ml)

360 mg Agarose in 30 ml TBE Puffer
--

- 2.2:** Lösen durch Aufkochen in Mikrowelle (2 -mal kurz bei 600 W), bis die Lösung klar ist.

**Achtung: Siedende Flüssigkeit:
Schutzbrille tragen, Leder-Handschuhe !**

- 2.3:** Abkühlen lassen der Agarose bis etwa 60° C; prüfe die Temperatur mit der Hand !

Niemals im kalten Wasser abkühlen !!

- 2.4:** Baue in der Zwischenzeit die Elektrophorese-Apparatur zusammen
s. gesonderte Anleitung

- 2.5:** Gieße das Gel, setze sofort anschließend den Kamm an der richtigen (!) Polseite ein

Auf der Seite des ■ Pols

- 2.6:** Das ausgehärtete Gel wird vorsichtig mit TAE – Puffer (Beschriftung: Laufpuffer) bedeckt, und bis ca. ½ cm überschichtet.

- 2.7:** Entferne vorsichtig den Kamm, die Taschen dürfen nicht zerreißen!

Versuchsanleitung:

DNA-Elektrophorese

Teil 3: Beladen des Gels

Probenvorbereitung:

3.1: Stelle die vier Eppi's mit den geschnittenen Proben entsprechend ihrer Nummerierung in den Eppi-Ständer.

Zusätzlich wird ein Gefäß mit Loading Dye ausgegeben.

-- *Protokolliere die Reihenfolge der Gelbeladung* --

Zu jeder der vier Proben werden jeweils je 4 µl Loading Dye gegeben und kurz durchmischt.

Von diesen Mischungen werden je 10 µl in die Taschen geladen.

Und zwar wie folgt:

3.2: In die 1. Tasche pipettiert die Lehrkraft zur Demonstration 10 µl des D N A-Markers (D N A-ladder) (→ D N A-Marker muss nicht mit Loading Dye versetzt werden.)

In die Taschen 3,4,5 jeweils die Probe eines Tatverdächtigen.

In die 6. Tasche die Probe vom Tatort.

Dann kommen die Proben der zweiten Gruppe:

7. Tasche frei, dann pUC18 usw.

1	2	3	4	5	6	2. Gr.
						2. Gr.
Marker	frei	pUC18	pBR32	pTZ 19	T	2. Gr.
D N A-Ladder		"3Tatverdächtige"			Tatortprobe	

Achtung: Das Gel nicht mit der Pipettenspitze durchstechen.
Beim Herausziehen der Mikropipette Druckknopf gedrückt halten

3.3: Schließe die Gelkammer unter **Aufsicht der Lehrkraft** an die Spannungsquelle an. Achte auf -/+ Pol !

3.4: Lege eine Gleichspannung von 120 V an.
Drücke "RUN" und starte dadurch die Elektrophorese.
-- *Protokoll: Zeit !* --

3.5: Lasse die Elektrophorese solange laufen, bis der blaue Farbstoff 1 cm vor dem unteren Ende des Agarosegels gewandert ist (30-40').

3.6: Stelle den Strom ab -- *Protokoll: Zeit !* --

Versuchsanleitung:

DNA-Elektrophorese

Teil 4: Färben des Gels und Auswertung

→ **Achtung:** Da GelRed ein D N A-Farbstoff ist und Karzinogenität nicht ganz ausgeschlossen ist, werden die folgenden Schritte **vom Praktikumsleiter durchgeführt !!**

- 4.1:** Gel mit Ethidiumbromid färben. Dazu vorsichtig den Schlitten mit dem Gel herausnehmen. Gel darf nicht herunterfallen ! Gel in die Färbeschale gleiten lassen: Position merken
- 4.2:** Das Agarosegel wird mit GelRed überschichtet und ca. 10 min. gefärbt.
Anschließend wird es aus dem Färbebad genommen.
- 4.3:** Das Gel wird in einem speziellen Apparat („Gel-Doku“) unter UV-Licht abfotografiert und das Ergebnis auf USB-Stick gespeichert.

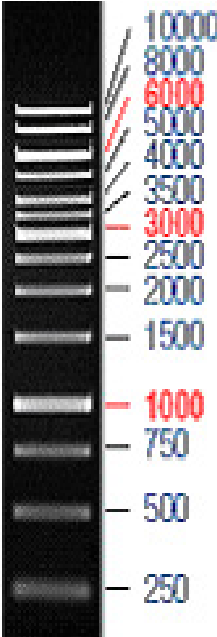
Ergebnisprotokoll RFLP

- Berechne die Fragmentlängen, die bei den 3 verschiedenen Plasmiden entstehen:

Plasmid	Gesamt-länge [bp]	Erkennungssequenz des Enzyms RsaI bei bp	berechnete Längen der geschnittenen Fragmente in bp
pUC 18	2686	168, 439, 2178	
pBR322	4361	164, 2280, 3845	
pTZ 19	2862	628, 2424	

Ergebnis:

- Wie sieht das zu erwartende (errechnete) Bandenmuster der drei Plasmide im Gel aus? (mit *schwarz* (Bleistift) eintragen)
- Wie sieht das tatsächliche Ergebnis für die 3 Plasmide im Gel aus? (mit *blau* eintragen)
- Wie sieht das Bandenmuster des „Täterplasmids“ aus? (*rot* eintragen) Wer ist der Täter?
- Anhand des Markers kannst du die Längen der DNA-Fragmente überprüfen. Stimmen sie mit den erwarteten Längen überein?
- Versuche Abweichungen von der Erwartung zu erklären.

Marker (bp)	pUC 18	pBR322	pTZ 19	Täterplasmid
				

Liebe Praktikumsteilnehmer:

Beim Experiment "RFLP-Verfahren als Simulation eines D N A-Fingerprints" lernt ihr die wichtigsten Schritte und Verfahren molekularbiologischen Arbeitens mit D N A. Das Verfahren wird mit Plasmid - D N A durchgeführt, d.h. der kriminalistische Hintergrund ist simuliert. Das PCR-Verfahren (Teil eines echten Fingerprints) wird hier aus Zeitgründen nicht eingesetzt.

Viel Spaß und guten Erfolg beim Experimentieren.

 **Hier erfahrt ihr, was von euch verlangt wird und welche Regeln ihr unbedingt einhalten müsst:**

➤ **Sicherheit:**

Die verwendeten Chemikalien sind mit Ausnahme des D N A-Farbstoffes Ethidiumbromid ungefährlich. Mit Ethidiumbromid arbeitet deshalb nur der Kursleiter, ihr kommt damit nicht in Berührung.

Im Labor ist es verboten zu essen oder zu trinken.

Beim Arbeiten mit Lösungen ist stets auf Sauberkeit zu achten. Geht einmal etwas daneben, wird dieses sofort mit einem Papierhandtuch aufgewischt und entsorgt.

Für benützte Pipettenspitzen und Eppi-Abfall stehen gekennzeichnete Abfallbehälter bereit.

Alkoholische Lösungen sind Zellgifte und sollten nicht mit der Haut und auf keinen Fall auf Schleimhäute gelangen!

In einer Sicherheitsbelehrung vor Beginn der Laborarbeiten wurde auf alle einzuhaltenden Punkte hingewiesen. Mit seiner Unterschrift hat jeder Teilnehmer die Belehrung bestätigt und sein Einverständnis zur Einhaltung erteilt.

➤ **Hitze, kochende Flüssigkeiten:**

Beim Aufkochen der Agarose Schutzbrille tragen.

Lederhandschuhe für Transport heißer Gefäße verwenden

➤ **Sorgfalt im Geräteumgang:**

Alle verwendeten Geräte sind sehr teure Laborwerkzeuge. Sie sind mit äußerster Sorgfalt zu behandeln.

Pipetten nicht über den oberen Messpunkt hinausdrehen.

Pipetten dürfen nicht herunterfallen.

➤ **Protokoll:**

In Absprache mit der begleitenden Lehrkraft: Über den Ablauf des Praktikums ist ggf. ein namentlich beschriftetes Protokoll zu fertigen, das die in der Arbeitsgruppe durchgeführten Schritte genau dokumentiert, sowie die Lösungen der gestellten Aufgaben enthält. Pro Versuchsteil (1. - 4.) sind ca. ½ bis 1 Seite zu erwarten. An besonders wichtige Notizen wird in der Versuchsanleitung erinnert.

Das Verlaufsprotokoll dient dem Abhaken der einzelnen Schritte und nennt Fragen und Aufgaben, es ersetzt das eigene Protokoll nicht.

Bitte klärt mit Eurer Lehrkraft ab, ob die Protokolle bewertet werden.

Die Permanentschreiber dürfen nicht für das Protokollschreiben verwendet werden.