

Name: Rothenbücher
Stammlistennummer: 214

Vorname: Max
Arbeitsplatznummer: 15

Datum: 26/08/07^{11/1}

Molekulargenetik-Kurs 10

Einzelleistung

1. Erläutern Sie stichpunktartig, wie eine Agarosegelelektrophorese funktioniert und wie man damit PCR-Produkte analysieren kann!

Zuerst erstellt man das Agarosegel (Kochen der Agarose mit Lauspuffer), danach füllt man es in eine geeignete Form und "drückt" die Kammer, in die später DNA gefüllt ~~werden~~ wird, in das Gel.

Die DNA wird in die Kammer gefüllt und das ~~Gel~~ mit Flüssigkeit gefüllt. Gel unter Strom gesetzt.

Die DNA läuft nun im Gel. Unter ~~gel~~ Schwarzlicht kann man die fluoreszierende DNA-Stücke erkennen.

DNA fluoresziert durch Ethidiumbromid, mit dem es angefärbt wurde.

2. Wodurch kann DNA während der Präparation kontaminiert werden?

~~Wenn~~ Wenn die Pipetenspitze nicht jedes mal gewechselt wird; Wenn keine Handschuhe getragen werden kann Fremd-DNA die zu untersuchende Probe kontaminieren. -Tuben zu lange geöffnet.

2P

3. Weshalb ist das für die DNA-Darstellung im Agarosegel verwendete Ethidiumbromid gesundheitsgefährlich?

Es ist karsinogen und lagert sich zwischen die ~~Basen~~ Basenstapel ein.

Kurs 10

1. Analysieren Sie, ob das Restriktionsenzym *Sau3A I* das angegebene DNA-Fragment schneiden kann!

5'...T TGCT T TAAA	GGAGGAATGC	CAT GAGC TAG	CGGATC TAC T ...3'
3'...AACG AAATT T	CC TCCT TACG	GTAC TC GATC	GGC TAGATG A...5'

Erkennungssequenz von *Sau3A I*:

5'.../GATC...3'
3 ... CTAG/...5'

Teilfragmentgrößen:

2. In der folgenden Sequenz wurde bei einem Probanden ein Basenaustausch T>C gefunden. Welches der drei Enzyme ist geeignet, mittels RFLP den Wildtyp und die Mutante zu unterscheiden?

5'...T TGCT TTAAA	GCCAG T T TGC	CATCAGCAAG	CCGTT C TACT ...3'
3'...AACGAAATT T.....	CGGTC A AACG.....	GTACTCGT TC.....	GGCAAGATGA...5'

Sau3A I

(Quelle: *Staphylococcus aureus* 3A)

5'.../GATC...3'
3 ... CTAG/...5'

Alu I

(Quelle: E. Coli mit Alu I-Gen von *Arthrobacter luteus*)

5'... AG/CT...3'
3 ... TC/GA...5'

Bcl I

(Quelle: E. Coli)

5'... T/GATCA...3'
3 ... ACTAG/T...5'

Teilfragmentgrößen:

Name: Spindler
Stammlistennummer: 54

Vorname: Anne K.
Arbeitsplatznummer: 57

Datum: 1.02.2011

5

Molekulargenetik-Kurs 10

Einzeleistung

1. Erläutern Sie stichpunktartig, was man unter dem Begriff „PCR“ versteht und wie diese Methode funktioniert!

- Def. PCR = Polymerase-Ketten-Reaktion (Vervielfältigung eines bestimmten DNA-Abschnittes, der durch die endgültigen Primer begrenzt wird)

- Ablauf:
- (1) • Aufschmelzen doppelsträngiger DNA unter Hitzebehandlung (Denaturierung), da Einzelstrang Voraussetzung
 - (2) • Nutzung von Primern (Amplimer) zur Amplifikation des einzelsträngigen DNA
• Primer lagern sich komplementär an DNA an
 - (3) • da Primer nur DNA-Sequenzen erfolgt ihre Verlängerung durch DNA-Polymerase & Synthese neuer DNA-Stränge (3' → 5'), dabei

2. Wie wirkt sich eine höhere Agarosegellkonzentration auf die elektrophoretische Trennung von PCR-Produkten aus?

- zu hohe Dichte des Gels & schlechte Einlagerung v. Ethidiumbromid-Molekülen

Wanderungsgeschwindigkeit ↓

schlechte Trennung von großen PCR Produkten

3. Was versteht man unter der Annealing-Temperatur?

- Temperatur unter die Synthese von DNA begünstigt möglich wird
- Annealing = Hybridisierung des Oligonucleotid-Primer mit einzelsträngiger DNA-Matrize (dabei Entstehung eines Doppelstranges)

↑ P

Name: *infrer*
Stammlistennummer: *77*

Vorname: *Julia*
Arbeitsplatznummer: *1*

Datum: *01.02.074/1*

Molekulargenetik-Kurs 10

Einzeleistung

1. Erläutern Sie stichpunktartig, welche Schutzmaßnahmen bei molekularbiologischen Arbeiten unbedingt erforderlich sind!

- Schutz von Händen (Handschuhe) und Augen (Schutzbrille) , auch Kittel wichtig, da z.B. Ethidiumbromid karzinogen, mutagen
- Schutz vor schädlichen chem. Substanzen
- Verunreinigen von Proben vermeiden (Wecheln der Pipettenspitzen !!!)
- bei explosionsod. ^{od. ätzend} giftigen chem. Materialien evtl. unter einer Glaswand / Glasschleibe arbeiten

2. Was verstehen Sie unter der Extensionstemperatur?

72°C ;
DNA-Polymerase verlängert bei dieser Temp. besonders gut die Primäre ^{de} Extensionen
denaturierten DNA-Matrize \rightarrow Synthese neuer DNA-Fränge ($3' \rightarrow 5'$) mit komplementärer Sequenz zu Matrize

\rightarrow und bei Gegenwart von dNTPs

2P

3. Wie kann man die DNA im Agarosegel sichtbar machen?

- Einlagerung von Ethidiumbromid in DNA (bn. Basenstapel)
 \rightarrow UV-Licht \rightarrow DNA sichtbar
- Markieren mit fluoreszierenden Sonden
- " mit radioaktiven Sonden

Name: Schaffrath
Stammlistennummer: 38

Vorname: Judith
Arbeitsplatznummer: 37

Datum: 31.01.07/1

Molekulargenetik-Kurs 10

Einzelleistung

1. Erläutern Sie stichpunktartig, wie eine Agarosegelelektrophorese funktioniert und wie man damit PCR-Produkte analysieren kann!

- Herstellung des Agarosegels durch Schmelzen d. Agarose in geeignetem Laufpuffer und ausgießen in geeignete Apparaturen
- Erzeugung d. Taschen, in die DNA eingefüllt wird, durch Einweichen von Kammern in das noch flüssige Gel
- elektr. Spannung an Gel anlegen
(Zuvor: DNA-Lösung in Taschen füllen)
- DNA (negativ geladen) wandert, je nach Größe d. Fragmente verschieden schnell, zur Anode
- in DNA-Fragmente wurde zuvor Ethidiumbromid eingelagert, welches die Fragmente nun unter UV-Licht sichtbar macht

2. Wodurch kann DNA während der Präparation kontaminiert werden?

- bei mehrmaliger Benutzung d. Pipettenspitzen ist Kontamination mit anderer DNA möglich
- beim Arbeiten ohne Handschuhe kann Schweiß, Schmutz, Hautzellen in Probe gelangen
- durch zu langes Öffnen d. Tubes können ebenfalls Verschmutzungen auftreten

2P

3. Weshalb ist das für die DNA-Darstellung im Agarosegel verwendete Ethidiumbromid gesundheitsgefährlich?

Ethidiumbromid wirkt kanzerogen und mutagen, indem es sich zwischen den Basenpaaren d. DNA einlagert

Molekulargenetik-Kurs 10

Einzelleistung

1. Welche Komponenten sind in der PCR-Reaktion unverzichtbar und wozu dienen sie?

- dNTPs → Verlängerung des Primers durch DNA-Polymerase
(~~einzelsträngige DNA~~)
- Primer → Starthilfe (kurze DNA-Stück)
- DNA-Polymerase → Verlängerung des Primers
(↳ Synthese neuer DNA Stränge)

2. Wie kann die Größe eines PCR-Produktes im Agarosegel abgeschätzt werden?

- Agarosekonzentration:

• hohe Konzentration → groß. feine Poren
↳ größere PCR-Produkte
passen nicht durch

↳ Darstellung der kleinen
Produkte

• niedrige Konzentration → auch gr. Produkte passen
durch Poren
(↳ größere Gelporen)

↳ Darstell. auch der
gr. Produkte

- „Laufweite“ → lange Stücke laufen weiter
als kurze PCR-Produkte

3. Welche Auswirkung hat eine Erhöhung der Spannung auf die elektrophoretische Wanderungsgeschwindigkeit?

→ Spannung ↑ ↳ Wanderungsgeschwindigkeit ↑

Molekulargenetik-Kurs 10

Einzeleistung

1. Erläutern Sie stichpunktartig, was man unter dem Begriff „PCR“ versteht und wie diese Methode funktioniert!

- Def. PCR = Polymerase-Ketten-Reaktion (Vervielfältigung eines bestimmten DNA-Abschnittes, der durch die endgesetzten Primer begrenzt wird)

- Ablauf:
- (1) • Aufschmelzen doppelsträngiger DNA unter Hitzebehandlung (Denaturierung), da Einzelstrang voranschreitet
 - (2) • Nutzung von Primern (Amplimer) zur Amplifikation des einzelsträngigen DNA
• Primer lagern sich komplementär an DNA an
 - (3) • da Primer aus DNA-Sequenzen erfolgt ihre Verlängerung durch DNA-Polymerase & Synthese neuer DNA-Stränge (3' → 5'), wobei

2. Wie wirkt sich eine höhere Agarosegellkonzentration auf die elektrophoretische Trennung von PCR-Produkten aus?

- zu hohe Dichte des Gels & schwächere Einlagerung v. Ethidiumbromid-Molekülen
Wanderungsgeschwindigkeit ↓

↳ bessere Trennung von großen PCR-Produkten

3. Was versteht man unter der Annealing-Temperatur?

- Temperatur unter der die Synthese von DNA begünstigt möglich wird
- Annealing = Hybridisierung des oligonucleotid-Primer mit einzelsträngiger DNA-Matrize (dabei Entstehung eines Doppelstranges)

- Größenabschätzung in PCR
 - Zugabe einer Kontrolllösung - DNA Ladder der DNA-Fragmente bekannter Größe enthält

- Auswirkungen bei Erhöhung der Spannung auf Wanderungsgeschwindigkeit
 - Je größer die Spannung, desto schneller die Laufgeschwindigkeit

- Wie kann man durch Agarosegelelektrophorese PCR-Produkte analysieren?
 - ob ein PCR-Produkt entstanden ist
 - ob das PCR-Produkt im erwarteten Größenbereich liegt
 - ob das PCR-Produkt in einer Restriktionsanalyse die richtigen Fragmente ergibt

- Kontaminationen wodurch
 - Fremde DNA von unsauberen Pipetten
 - Husten, Niesen, Dreck

- Warum ist Etidiumbromid gesundheitsschädigend?
 - EtBr ist mutagen, es kann in die DNA interkalieren und dort Leserahintergründe verursachen

• PCR, Funktion

- in-vitro Technik

- Methode zur Herstellung vieler Kopien eines DNA-Abschnitts

- polymerase chain reaction

- um ausreichende Mengen eines bestimmten DNA-Abschnitts für weiterführende Untersuchungen gewinnen zu können (Vater-Identifikation)

• Höhere Agarosegelkonzentration

- kann kleinere DNA-Fragmente auftrennen

• Annealing-Temperatur

- Temperatur, bei der sich Primer komplementär an DNA anlagern können (58°C)

• Schutzmaßnahmen bei molekularbiologischen Arbeiten

- Scheibe zum Schutze beim Arbeiten mit UV-Licht

- Schutze durch das Tragen von Handschuhen (infektiöses Material)

- Gleichzeitig Schutze der Probe

- Sauberes Arbeiten (Austauschen der Pipettenspitzen, etc.)

• Extensionstemperatur

- Temperatur, bei der eine Synthese der DNA-Sequenzen begünstigt möglich ist (72°C)

• Sichtbarmachen von DNA im Agarosegel

- durch Einlagerung von Ethidiumbromid, das der Visualisierung der DNA-Banden dient

• Komponenten PCR-Methode

PCR, Funktion?

Höhere Agarosegelkonzentration?

Annealing-Temperatur?

Schutzmaßnahmen bei molekularbiologischen Arbeiten?

Extensionstemperatur?

Sichtbarmachen der DNA in Agarosegel?

Komponenten PCR-Methode?

Größenabschätzung in PCR?

Auswirkung höhere Spannung auf Wanderungsgeschw.?

Wie kann man durch Agarosegelelektrophorese PCR-Produkte analysieren?

Kontamination wodurch?

Warum ist Ethidiumbromid gesundheitsschädlich?

Name: Königsdorf
Stammlistennummer: 65

Vorname: Cornelia
Arbeitsplatznummer: 64

Datum: 16.01.05 4/1

Molekulargenetik-Kurs 10

Einzelleistung

1. Erläutern Sie stichpunktartig, welche Schutzmaßnahmen bei molekularbiologischen Arbeiten unbedingt erforderlich sind!

- Beim Arbeiten mit UV-Licht: Schutze ~~vor~~ für Schutz vor Blitzen
- Schutz der eigenen Person vor ~~der~~ ~~et.~~ bzw. mögl. infektiösem DNA-Material durch das Tragen von Handschuhen. Gleichzeitig Schutz der Probe vor Verunreinigung. ~~Dies~~
- Sauberes Arbeiten (Austauschen der Pipettenspitzen etc.)
- ~~Bei Anwendung von~~

2. Was verstehen Sie unter der Extensionstemperatur?

(bzw. DNA-Sequenzen)

- Temperatur, bei der ~~einer~~ eine Synthese der DNA^V begünstigt möglich ist.

3. Wie kann man die DNA im Agarosegel sichtbar machen?

Durch Einlagerung von Ethidiumbromidmolekülen, welche zwischen den Basenpaaren der DNA eingelagert werden, kann die DNA im UV-Licht sichtbar gemacht werden.

2P

Molekulargenetik-Kurs 10

Einzeleistung

1. Erläutern Sie stichpunktartig, was man unter dem Begriff „PCR“ versteht und wie diese Methode funktioniert!

Polymerase-Kettenreaktion

DNA-Abschnitte, von zwei bekannten DNA-Sequenzen flankiert werden amplifiziert um ausreichende Mengen ~~an~~ eines bestimmten DNA-Abschnittes für weitergehende Untersuchungen zu erhalten.
Doppelsträngige DNA wird bei ca. 92°C denaturiert \rightarrow wird einzelsträngig \rightarrow Annealing bei ca. 58°C lagern sich Primer an Template an \rightarrow DNA-Polymerase elongiert in Gegenwart von dNTPs bei 72°C (\rightarrow Extension)

Es werden mehrere (25-30) Zyklen gefahren.

2. Wie wirkt sich eine höhere Agarosegelkonzentration auf die elektrophoretische Trennung von PCR-Produkten aus?

Eine höhere Konzentration bewirkt ein feinporigeres Gel, d.h. die Poren durch die die DNA wandern muss sind kleiner u. die Laufzeit wird somit erhöht \rightarrow bessere elektrophoretische Auftrennung möglich (ev. sollte Stromstärke heraufgesetzt werden)

3. Was versteht man unter der Annealing-Temperatur?

Temperatur bei der sich Primer komplementär an DNA anlagern können (58°C). AP