

Bernhard- Strigel-Gymnasium
Memmingen

Kollegstufe Jahrgang: 2006/ 2008

Leistungskurs: Biologie

Kollegiat: Mareike Kellerer

Facharbeit

Amplifikation des 16S rRNA-Gens aus *E.coli* und *Bacillus spec.*

Abgegeben am: 25. 01. 2008

Bewertung:

Facharbeit: _____ Punkte

Mündliche Prüfung: _____ Punkte

Gesamtergebnis: _____ Punkte

Datum und Unterschrift des Kursleiters: _____

Inhaltsverzeichnis	2
Abkürzungen	3
1. Zusammenfassung.....	4
2. Einleitung.....	5
3. Material.....	7
3.1 Verwendete Gase	7
3.2 Verwendete molekularbiologische Hilfsmittel	7
3.3 Verwendete Gerätschaften	7
4. Methoden	8
4.1 Testlauf des PCR-Gerätes	8
4.2 Herstellung der Flüssigmedien	8
4.3 Herstellung der Agarplatten	8
4.4 Isolation eines <i>c.f. Bacillus</i> aus Bodensubstrat	9
4.5 Anlegen einer Übernachtskultur	10
4.6 Isolation chromosomaler DNA aus <i>Escherichia coli</i>	10
4.7 Isolation chromosomaler DNA aus <i>c.f. Bacillus</i>	10
4.7.1 Isolation mittels Abkochen	10
4.7.2 Isolation mit Hilfe des QIAamp DNA Mini Kit	10
4.8 Agarosegelelektrophorese	12
4.9 Amplifikation chromosomaler DNA mittels PCR.....	12
4.10 Restriktionsverdau des PCR-Produktes mit <i>Eco RI</i>	13
5. Ergebnisse.....	13
5.1 Testlauf des PCR-Gerätes	13
5.2 Isolation eines <i>c.f. Bacillus</i> aus Bodensubstrat	13
5.3 Analyse des PCR-Produktes (RFLP-basiertes Fingerprinting).....	14
6. Diskussion	16
7. Literaturverzeichnis	21
8. Danksagung	22
9. Selbstständigkeitserklärung.....	23

Anhang

Abkürzungen

ad	zugeben
Bp	Basenpaare
bzw.	beziehungsweise
demin.	demineralisiert
kBp	Kilobasenpaare
RE	Restriktionsenzym
RFLP	Restriktionsfragmentlängenpolymorphismus
rpm	revolutions per minute (Umdrehungen pro Minute)
RT	Raumtemperatur
TAE	Tris-Acetat-EDTA
w/v	Gewicht pro Volumen

1. Zusammenfassung

Ribosomale RNA, kurz rRNA, ist heute sowohl in jedem Prokaryont als auch Eukaryont zu finden. Ebenso erfüllen sie dieselbe Funktion. Daher eignet sich die 16S rRNA der 70S Ribosomen aus Prokaryonten besonders gut, um eine Verwandtschaft unter Bakterien zu bestimmen.

Um einen Organismus zu identifizieren, wird dessen 16S rRNA-Gen zuerst mit der PCR (Polymerase chain reaction) vervielfältigt und anschließend mit einem oder mehreren Restriktionsenzymen geschnitten. So erhält man ein für jeden Mikroorganismus typisches Fragmentierungsmuster, das mit anderen Fragmentmustern verglichen werden kann und man somit einen bestimmten Verwandtschaftsgrad der untersuchten Mikroorganismen feststellen kann (RFLP).

In meiner Facharbeit versuchte ich, einen *Bacillus subtilis* zu isolieren und dessen 16S rRNA-Gen mit Hilfe der PCR zu vervielfältigen. Anschließend sollte das 16S rRNA mit dem RE *Eco RI* geschnitten werden, um den isolierten Mikroorganismus zu definieren. Ebenfalls wurde auch das 16S rRNA-Gen aus *E.coli* mittels PCR vervielfältigt, mit *Eco RI* geschnitten, um eine anschließende Verwandtschaft der beiden Organismen zu bestimmen.

Dabei wurden folgendes festgestellt:

- Ein Bakterium wurde aus Bodensubstrat isoliert. Sowohl aufgrund des mikroskopischen und makroskopischen Erscheinungsbildes als auch auf die Gram-positiven Eigenschaften des isolierten Organismus ist es sehr wahrscheinlich, dass es sich um einen Vertreter der *Bacillus* Gattung handelt.
- Es fand keine Amplifizierung statt und auch das RFLP-basiertes Fingerprinting blieb erfolglos. Somit konnte keine Identifizierung des isolierten Organismus vorgenommen werden. Es konnte folglich auf keine Verwandtschaft der beiden Organismen geschlossen werden.

2. Einleitung

Um eine verwandtschaftliche Beziehung zwischen zwei Organismen festzustellen, werden von beiden Organismen DNA-Abschnitte, die für dasselbe codieren, untereinander verglichen. Die ribosomale RNA ist Bestandteil jeder lebenden Zelle und erfüllt sogar in jeder dieselben Aufgaben. An ihr lässt sich die Entwicklungsgeschichte eines jeden Organismus feststellen. Gerade deshalb eignet sich rRNA besonders gut als molekularer Marker, auch molekulare Uhr, um eine Verwandtschaft unter Organismen zu bestimmen.

Mit Hilfe der PCR (**P**olymerase **c**hain **r**eaction = Polymerasekettenreaktion), die 1987 von Kary B. Mullis entwickelt wurde, lassen sich schon wenige Moleküle DNA klonieren, was als Amplifikation bezeichnet wird. Für eine PCR benötigt man lediglich ein Stück doppelsträngiger DNA (**T**emplate), die dazu passenden **P**rimers, freie Nukleotide und eine hitzestabile **P**olymerase. Das Prinzip einer PCR ist schnell erklärt: Eine PCR lässt sich in folgende drei Schritte einteilen, nämlich **D**enaturierung, **A**nnealing und **E**longation. Bei der Denaturierung wird die doppelsträngige DNA durch Erhitzen auf 94°C in zwei Einzelstränge aufgetrennt (die Denaturierung ist von Template zu Template unterschiedlich, liegt jedoch immer ungefähr um 94°C). Dann wird die Temperatur auf die primerspezifische Annealingtemperatur gesenkt, so dass sich die Primer an die spezifischen Stellen an der Template-DNA binden. Anschließend wird auf das Temperaturoptimum der Polymerase erhöht, die dann an die Primer anlagert und die DNA-Einzelstränge komplementär ergänzt, so dass sie am Schluss des Zyklus wieder als Doppelstrang und als Kopie des Ausgangsmoleküls vorliegt.

Ein weiteres angewandtes Experiment ist das RFLP-basierte Fingerprinting. RFLP steht für **r**estriction **f**ragment **l**ength **p**olymorphism, zu Deutsch Restriktionsfragmentlängenpolymorphismus. Hierbei handelt es sich um eine Methode, bestimmte Fragmentierungsmuster durch das Schneiden von DNA mit Restriktionsenzymen zu erhalten. RFLPs werden daher oft zur Genkartierung verwendet, um für einen definierten Organismus sein Fragmentmuster zu bestimmen.

In der vorliegenden Arbeit wurden alle drei Methoden der Molekularbiologie angewandt, woraus sich folgende Zielsetzungen ergaben:

- Isolation eines *Bacillus subtilis* aus Bodensubstrat
- Isolierung der chromosomalen DNA aus dem isolierten Bodenbakterium und *E.coli*
- Amplifizierung des 16S rRNA-Gens aus beiden Mikroorganismen mittels PCR
- Restriktionsverdau des Amplifikats mit dem RE *Eco RI*
- Restriktionsanalyse zur Identifizierung des isolierten Bakteriums
- RFLP zur Bestimmung des Verwandtschaftsgrades zwischen den beiden Mikroorganismen

3. Material

3.1 Verwendete Gase

- Flüssiger Stickstoff, Rinderbesamung Memmingen

3.2 Verwendete molekularbiologische Hilfsmittel

- DNA Längenstandard "Gene Ruler™ 1kb DNA Ladder" (Fermentas)
- QIAamp DNA Mini Kit (Quiagen AG)
- Ready-to-go-beads (GE Healthcare)
- Restriktionsenzym Eco RI, Universität Ulm
- Primer (Biomers)

Bezeichnung	Nukleotidsequenz
27f	5'-AGA GTT TGA TCA TGG CTC AG-3'
1492r	5'-GGT TAC CTT GTT ACG ACT T-3'

3.3 Verwendete Gerätschaften

- Pipetten mit passenden sterilen Spitzen
- Erlenmayerkolben
- Bunsenbrenner
- Schüttler
- Platin-Impföse
- Autoklav
- Drigalski-Spatel
- sterile Reagenzgläser
- Vortexer
- Tischzentrifuge
- PCR-Gerät
- Heizblöcke
- UV-Leuchttisch
- Kühlschrank

4. Methoden

4.1 Testlauf des PCR-Gerätes

Um die Funktionsfähigkeit des PCR-Gerätes zu testen, wurde vor dem eigentlichen Versuch ein Probelauf gestartet, bei dem die sog. Integrase nachgewiesen werden sollte. Die Template DNA wurde mittels des Abkochverfahrens (s. 4.6; 4.7.1) aus einer bakterienhaltigen Wasserprobe gewonnen. 1µl dieser Template DNA wurde gemeinsam mit 1µl Primer und 23 µl Wasser auf die Ready-to-go-beads pipettiert. Anschließend wurde der PCR-Ansatz bei folgendem PCR-Programm amplifiziert:

1. Einleitende Denaturierung: 60 sec bei 94°C
2. Amplifikation in 35 Zyklen zu je:
 - 60 sec bei 94°C (Denaturierung)
 - 30 sec bei 55°C (Annealing)
 - 2,5 min bei 72°C (Elongation)
3. Abschließende Amplifizierung möglich unvollständiger Amplifikate: 10 min bei 72°C

4.2 Herstellung der Flüssigmedien

Komponente	Einwaage [g]
LB-Broth	10
Demin. H ₂ O	ad 500 ml

Tabelle1: Zusammensetzung des LB-Mediums

Komponente	Einwaage [g]
NaCl	30
Hefeextrakt	0,5
Kartoffelstärke	5
Demin. H ₂ O	ad 500 ml

Tabelle2: Zusammensetzung des Bacillusmediums

Die in Tabelle 1 und 2 aufgeführten Medien wurden bei 121°C autoklaviert.

4.3 Herstellung der Agarplatten

Zur Herstellung der Agarplatten wurden die aus 4.2 unter Tabelle 1 und 2 angegebenen Medien mit 1,5% (w/v) Agar versetzt und autoklaviert (121°C). Danach wurden die noch flüssigen Medien in sterile Petrischalen gegossen und auf RT abgekühlt. Die Agarplatten wurden bei max. 10 °C in einer verschlossenen Plastiktüte im Kühlschrank aufbewahrt.

4.4 Isolation eines *c.f. Bacillus* aus Bodensubstrat

Zuerst wurde eine Kartoffel in flächige Stücke geschnitten, die daraufhin mit Erde eingerieben und mit Leitungswasser bedeckt in einem Becherglas über dem Bunsenbrenner für 10 min gekocht wurden. Das Wasser wurde abgegossen und das mit Alufolie verschlossene Gefäß über Nacht bei 35°C bebrütet. Tags darauf wurde mit einer ausgeglühten Impföse eine Einzelkolonie von der Oberfläche eines Kartoffelstückes entnommen und auf einer Bacillus-Agarplatte ausgestrichen. Da *Bacillus* insbesondere in der Lage ist, Stärke abzubauen, dient dieser Schritt zur Selektion. Die Agarplatte wurde über Nacht bei 35°C bebrütet. Von dieser Agarplatte wurde eine Einzelkolonie in steriles Leitungswasser gegeben, auf dem Vortexer vermischt und eine Bacillus-Agarplatte mit 50 µl der Lösung ausgestrichen und über Nacht bei 35°C bebrütet. Nach der Bebrütung wurde eine Einzelkolonie mit einer Impföse in 300 µl 2mM Calcium- und 2mM Magnesiumhaltiges steriles Wasser beimpft und im Kühlschrank für eine Woche inkubiert, was zur Versporung der Bakterien dient. Nach einer Woche wurden 50µl dieser Lösung auf einer Bacillus-Agarplatte ausgestrichen und bei 35°C über Nacht bebrütet. Am nächsten Tag wurde von der Agarplatte mit einer Impföse eine Einzelkolonie entnommen, auf einer weiteren Bacillus-Agarplatte ausgestrichen und über Nacht bei 35°C bebrütet. Dieser Schritt wurde noch zweimal durchgeführt um am Schluss eine Reinkultur zu erhalten, die nur einen *Bacillus* enthält.

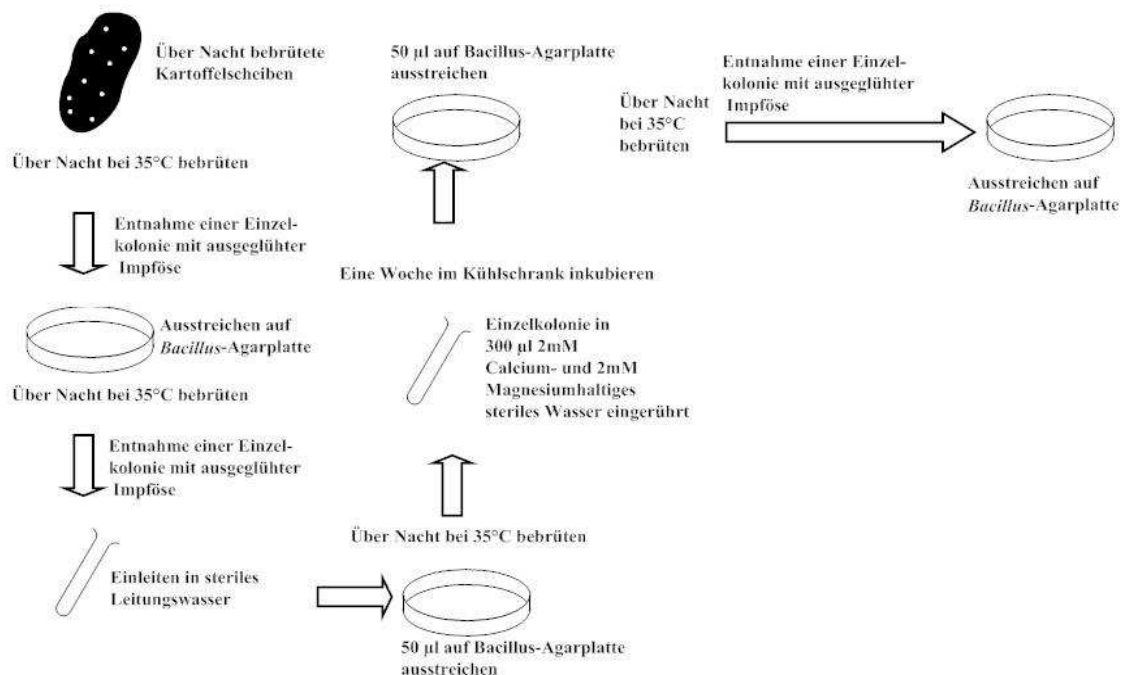


Abbildung 1: Schematische Darstellung der *Bacillus*-Isolation

4.5 Anlegen einer Übernachtskultur

Dazu wurde eine Einzelkolonie mittels einer Impföse in ein steriles, mit LB-Broth gefülltes und mit einer Alu-Kappe verschlossenes, Reagenzglas gegeben und über Nacht bei 35°C unter Schütteln inkubiert.

4.6 Isolation chromosomaler DNA aus *Escherichia coli*

Da es sich bei *E.coli* um ein Gram-negatives Bakterium handelt, wurde chromosomale DNA mit Hilfe des Abkochverfahrens isoliert. Dazu wurden 2 ml einer mit *E.coli* angeimpften Übernachtskultur in einem sterilen Eppendorfgefäß für 5 min bei 13000 rpm abzentrifugiert und der Überstand verworfen. Der Niederschlag wurde in 100 µl Wasser resuspendiert und für 10 min bei 98°C in einem Heizblock inkubiert. Anschließend wurde die Probe 5 min auf Eis abgekühlt. Der Zellaufschuss wurde dann erneut für 5 min bei 13000 rpm zentrifugiert. Der DNA-haltige Überstand wurde in ein steriles Eppendorfgefäß pipettiert, welcher dann als Template DNA für die PCR diente.

4.7 Isolation chromosomaler DNA aus *C. Bacillus*

4.7.1 Isolation mittels Abkochen

Um chromosomale DNA zu isolieren, wurden 2 ml einer Übernachtskultur, die mit einer *Bacillus*-Einzelkolonie angeimpft wurde, entnommen. Anschließend wurde wie in 4.6 beschrieben fortgefahren.

4.7.2 Isolation mit Hilfe des QIAamp DNA Mini Kit

Zuerst wurde 1 ml einer Übernachtskultur in ein steriles Eppendorfgefäß pipettiert und für 5 min bei 5000 rpm abzentrifugiert und der Überstand verworfen. Der Zellniederschlag wurde in 180 µl ATL-Puffer resuspendiert und mehrmals in flüssigen Stickstoff getaucht und wieder auf RT erwärmt. Dann wurden 20 µl Proteinase K hinzugegeben, mit dem Vortexer gemischt und für 56°C in einem Heizblock für 30 min inkubiert. Zwischendurch wurde die Suspension 2-3-mal mit dem Vortexer gemischt. Anschließend wurde das Eppendorfgefäß kurz zentrifugiert, damit sich die Flüssigkeit vollständig an der Gefäßunterseite befindet. Es wurden 4 µl RNase hinzugegeben, auf dem Vortexer gemischt und für 2 min bei RT inkubiert. Danach wurde das Gefäß wieder kurz zentrifugiert. Dann wurden 200 µl AL-Puffer zugegeben, auf dem Vortexer gemischt und für 10 min bei 72°C im Heizblock inkubiert. Nach erneutem kurzem Zentrifugieren wurden 200 µl 96%-iger Ethanol zugegeben und durch Vortexen

gemischt. Anschließend wurde wieder kurz zentrifugiert. Dann wurde dieses Gemisch auf eine QIAamp Spin Säule, die in einem 2 ml Eppendorfgefäß gegeben wurde, pipettiert und für 1 min bei 8000 rpm zentrifugiert. Das Eppendorfgefäß, das das Filtrat beinhaltet, wurde verworfen und die QIAamp Spin Säule wurde in ein neues 2 ml Eppendorfgefäß gegeben. Es wurden 500 µl AW1-Puffer zugegeben und für 1 min bei 8000 rpm zentrifugiert. Erneut wurde die Säule in ein neues steriles 2 ml Eppendorfgefäß gegeben und das Filtrat verworfen. Dann wurden 500 µl AW2-Puffer zugegeben und bei 13.000 rpm für 3 min zentrifugiert. Der Durchlauf und das Eppendorfgefäß wurden verworfen, die Säule in ein neues steriles 2 ml Eppendorfgefäß gegeben, 200 µl AE-Puffer wurden zugegeben und 6 min bei RT inkubiert. Abschließend wurde die Säule bei 8000 rpm für 1 min zentrifugiert und das Eluat, welches als DNA Template fungierte, bei -20°C gelagert.

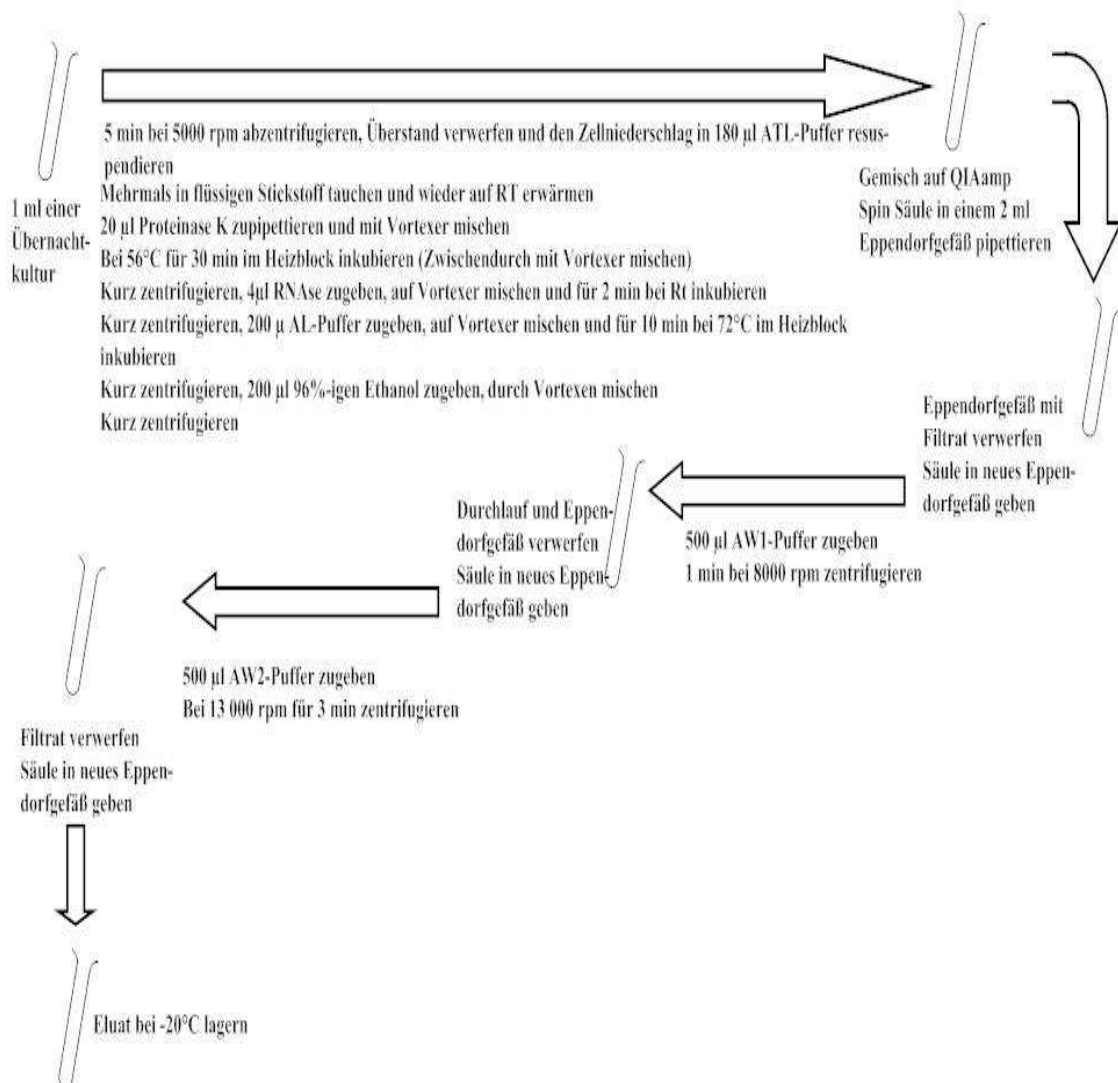


Abbildung 2: Schematische Darstellung der Isolation chromosomaler DNA mittels des QIAamp DNA Mini Kit

4.8 Agarosegelelektrophorese

Komponente	Einwaage [g]
Agarose	0,16
TAE- Puffer (1x)	ad 20 ml

Tabelle3: Zusammensetzung eines 0,8%-igen Agarosegels

Die entstehenden DNA-Fragmente werden mittels der Agarosegelelektrophorese aufgetrennt. Dazu wird die aus Tabelle 3 zusammengesetzte Suspension in einer Schraubdeckelflasche so lange in der Mikrowelle erhitzt, bis sie aufklart. Anschließend wird das Gel in eine 20 ml fassende Gelkammer gegossen und ein Kamm zur Ausbildung der Taschen eingesetzt. Sobald das Gel trübe geworden ist, wird der Kamm aus der Kammer gezogen und diese wird dann mit einfach konzentriertem TAE-Puffer übergossen, bis das Gel überdeckt und die Taschen mit Puffer gefüllt sind. Von der zu trennenden DNA Probe wurden 5 µl mit 2 µl Gelladungspuffer in einem sterilen Eppendorfgefäß vermischt und anschließend in die Geltaschen pipettiert. Zum Vergleich der DNA-Fragmente wurden 7 µl des Längenstandards "1kb DNA Ladder" (Fermentas) in eine andere Geltasche pipettiert, die neben der DNA Probe im Gel mitlief. Nachdem ein Spannungsfeld (maximal sieben Volt Spannung je Zentimeter Elektrodenabstand) angelegt wurde, ließ man das Gel so lange laufen, bis die blaue Bande fast das Ende der Gelkammer erreicht hatte. Die Spannungsquelle wurde abgestellt und das Gel wurde zum Anfärben der DNA 5-15 min in einer Ethidiumbromidlösung inkubiert. Das Gel wurde auf einen UV-Leuchttisch übertragen, auf dem die angefärbten DNA-Fragmente unter UV-Anregung orange-gelb fluoreszierten.

4.9 Amplifikation chromosomaler DNA mittels PCR

Komponente	Menge in µl
Steriles H ₂ O	19
Forward/reverse Primer	1
Template DNA	5

Tabelle4: Zusammensetzung des PCR Ansatzes

Zur Amplifikation chromosomaler DNA wurde das Prinzip der PCR (Polymerase Kettenreaktion) gewählt. Auf die Ready-to-go-beads wurden die in Tabelle 4 enthaltenen Komponenten pipettiert, gemischt und in das PCR-Gerät gestellt. Nachdem es gestartet wurde, durchlief es folgendes Programm:

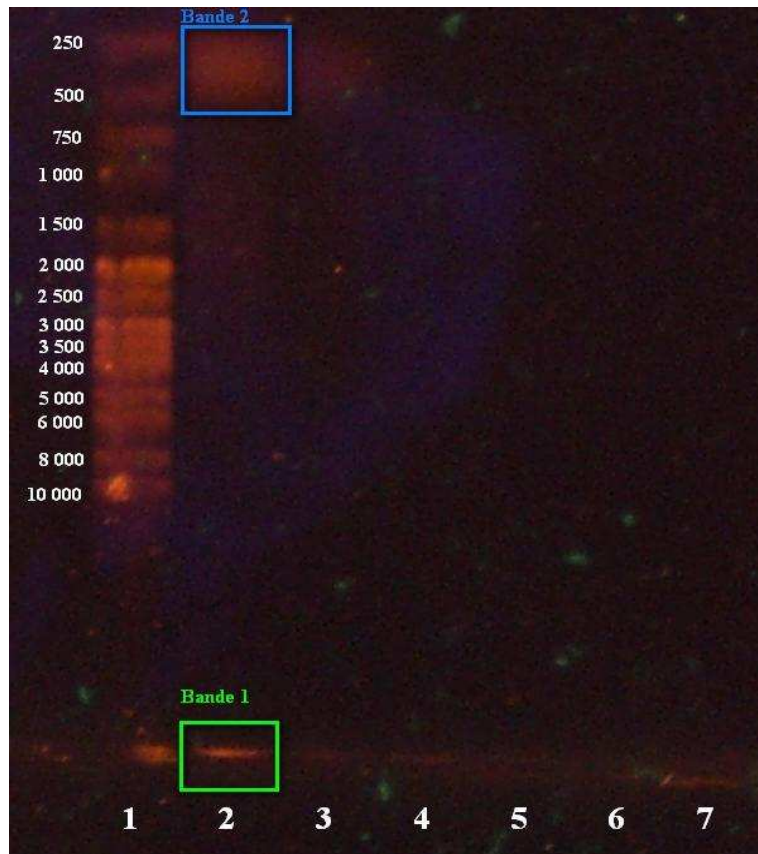


Abbildung 3: Über Nacht bebrütete Kartoffelscheiben

Durch mehrfaches Ausstreichen dieser Kolonien auf Bacillusmediumplatten wurde eine Reinkultur gewonnen. Um die Vermutung, einen *C. Bacillus* isoliert zu haben, zu stützen, kann ich auf die runde Kolonieform und das cremefarbene äußere Erscheinungsbild der Kolonien auf den Platten, sowie auf das mikroskopische Erscheinungsbild, bei dem die isolierten Bakterien als Stäbchen zu sehen waren, zurückgreifen. Jedoch ist zu berücksichtigen, dass diese beiden Aussagen alleine, mikroskopisches und makroskopisches Erscheinungsbild, nicht aussagekräftig genug sind, um sicher sagen zu können, dass es sich bei dem isolierten Mikroorganismus tatsächlich um ein *c.f. Bacillus* handelt. Um wirklich sicher zu gehen, wären weitere Bestimmungstests nötig (z. B. Schneiden des PCR-Produktes mit mehreren RE oder Nukleotidsequenzierung des aus dem Agarosegel isolierten PCR-Produktes).

5.3 Analyse des PCR-Produktes (RFLP-basiertes Fingerprinting)

Nach der Amplifikation chromosomaler DNA aus *E.coli* und *c.f. Bacillus* (s. 4.9) und des Restriktionsverdaues mit *Eco RI* (s. 4.10) wurde das Ergebnis in einem 0,8%-igen Agarosegel analysiert. Das Resultat ist in Abbildung 4 zu sehen.



Spur 1	Längenstandard	
Spur 2	<i>E.coli</i>	unverdautes 16S rRNA Amplifikat
Spur 3	<i>E.coli</i>	verdautes 16S rRNA Amplifikat
Spur 4	<i>c. f. Bacillus</i>	unverdautes 18S rRNA Amplifikat aus Abkochverfahren
Spur 5	<i>c. f. Bacillus</i>	verdautes 16S rRNA Amplifikat aus Abkochverfahren
Spur 6	<i>c. f. Bacillus</i>	unverdautes 16S rRNA Amplifikat aus DNA Mini Kit
Spur 7	<i>c. f. Bacillus</i>	verdautes 16S rRNA Amplifikat aus DNA Mini Kit

Abbildung 4: Analyse des Amplifikats (Spur 2, 4, 6) und dessen Restriktionsverdaues (Spur 3, 5, 7)

Bei Bande 1 (grün), die von Spur 2 bis Spur 7 zu erkennen ist, handelt es sich um die jeweils verwendeten Primer im PCR-Ansatz, wobei es sich bei Bande 2, zu erkennen in Spur 2 und 3, um die unspezifischen Amplifikate aus der PCR handelt.

Man sieht, dass weder durch Abkochen, noch durch Isolation mittels des Kits chromosomale DNA aus *c. f. Bacillus* isoliert werden konnte, wogegen die Isolation aus *E.coli* erfolgreich war. Jedoch wurde nicht die spezifische Amplifikatlänge von ca. 1450 Bp erreicht.

An der Bande des verdauten *E.coli* Genamplifikats lässt sich erkennen, dass der Restriktionsverdau mit *Eco RI* und somit die Fragmentierung nicht erfolgreich war. Aufgrund der fehlgeschlagenen Isolation von chromosomaler DNA aus *c. f. Bacillus*

und der beiden fehlgeschlagenen Restriktionsverdau konnte kein Verwandtschaftsgrad zwischen den beiden Organismen festgestellt werden.

6. Diskussion

In der Diskussion möchte ich zunächst darauf eingehen, wie die Ergebnisse des PCR-Produktes und dessen Restriktionsverdau zu deuten sind. Anschließend daran, werde ich einige Verbesserungsvorschläge für diesen Versuch anführen.

Betrachten wir zuerst die fehlgeschlagene Isolation chromosomaler DNA aus *c. f. Bacillus*. Anders als bei *E.coli*, handelt es sich bei der *c. f. Bacillus*-Gattung um sog. Gram-positive Bakterien. Gram-positiv bedeutet, dass die um die eigentliche Zellmembran liegende Zellwand, die aus Peptidoglycan, oder auch Murein genannt, besteht, dicker ist als bei den Gram-negativen Bakterien. Dadurch ist der Prokaryont stärker geschützt. Will man also aus einem Gram-positiven Bakterium DNA isolieren, so muss die starke Mureinschicht durchbrochen werden. Deshalb sollte man bei der Isolation chromosomaler DNA aus Gram-positiven Bakterien die Zellsuspension mit einer Lysozymlösung behandeln, welche die bis zu 15 nm dicke Zellwand abbaut.

Für die nicht vollzogene Fragmentierung können eine unsterile Arbeitsweise oder auch Nukleasen, die in den Ansatz gelangt sind, verantwortlich sein. Ebenso denkbar wäre, dass die optimalen Bedingungen für das RE nicht eingehalten wurden. Bei einem erfolgreichen Verdau mit *Eco RI* hätte man laut dem NEBcutter folgendes Fragmentierungsmuster erhalten:

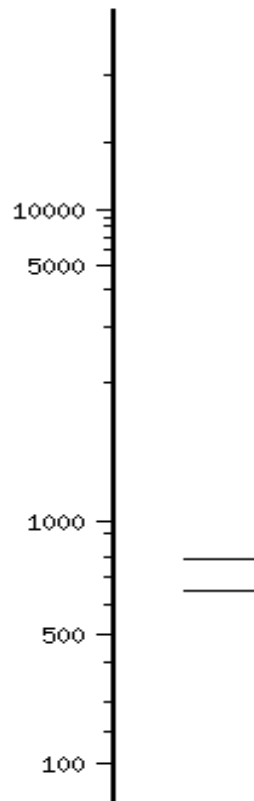


Abbildung 5: Verdau des 16S rRNA-Gens aus *E.coli* mit *Eco RI*

Kommen wir nun zur fehlgeschlagenen PCR-Reaktion, auf die ich in der Diskussion besonderes Augenmerk lege. Folgende Aspekte könnten bei der PCR zum Misslingen geführt haben:

- **Primer:** Die verwendeten Primer können sowohl miteinander hybridisieren als auch untereinander komplementär binden. Der eine Primer kann dem anderen als Template dienen, wenn sie an ihren 3'-Enden eine hohe Komplementarität aufweisen. Es kommt zu Primerdimeren. Die Menge an nutzbaren Primern sinkt und die Amplifikationseffizienz sinkt. Ebenso denkbar: bindet das 3'-Ende an eine andere Stelle in der DNA, kann die Polymerase weitere Basen an den Primer anhängen. Die verwendete Taq-Polymerase besitzt auch eine 5'-3'-Exonukleaseaktivität, d.h. wenn das 5'-Ende des Primers an die DNA bindet, kann die Polymerase Basen vom 5'-Ende des Templates entfernen.
- **Ölüberschichtung:** Wird ein PCR-Ansatz nicht mit Öl überschichtet, so kann es während der Reaktion zu Verdunstung des Tubeinhalts kommen. Bei kleineren Volumina können sich die Konzentrationsverhältnisse stark ändern und so eine erfolgreiche Amplifikation verhindern.

- **Mg²⁺-Konzentration:** Da Primer, freie Nukleotide und eventuell vorhandenes EDTA Mg²⁺ auffangen können, die Polymerase aber für seine Aktivität auch Mg²⁺ braucht, muss für jede PCR die optimale Mg²⁺-Konzentration berechnet werden. Wird zuviel Mg²⁺ von den anderen Komponenten beansprucht, kann das Enzym nicht mehr optimal arbeiten.
- **Zyklenzahl:** Bei zu hoher Zyklenzahl sinkt die Vermehrungsrate. Sowohl die Menge an intakter Nukleotide, als auch die Menge an intakter Polymerase nimmt ab und es kommt zu Fehlhybridisierungen und Primerdimeren. Somit entstehen neben dem eigentlich gewünschten Amplifikat falsche Produkte, die später auf dem Gel als Schmier zu erkennen sind.

Natürlich kann nicht nur eine einzelne Komponente schuld am Scheitern der Reaktion sein. Es wäre ebenso ein Zusammenspiel aus mehreren der aufgelisteten Gründe möglich.

Bei der PCR handelt es um einen sehr variablen Versuch, denn die Zahlen der möglichen Primer und Templates sind nahezu unendlich. Deshalb kann man sich bei der PCR auf kein Standardprotokoll einigen, da die Bedingungen von Experiment zu Experiment variieren. Im Anschluss werde ich einige Verbesserungen zu dem von mir durchgeführten Experiment vorschlagen.

- **Ölüberschichtung:** Wie oben bereits erwähnt, wird bei einer PCR der Ansatz mit Öl überschichtet, um eine Verdunstung der im Ansatz enthaltenen Komponenten zu verhindern. Anstelle des Öls können auch Wachskügelchen verwendet werden (s. **Hot start**).
- **Mg²⁺-Konzentration:** Die optimale Mg²⁺-Konzentration liegt, je nach PCR, zwischen 0,5 und 2 mM. Eine Konzentration von 2 mM liefert meistens gute Ergebnisse, in manchen Fällen ist die optimale Konzentration jedoch sehr klein. Dadurch lohnt es sich, die Mg²⁺-Konzentration zu optimieren, indem man variable Mengen an Mg²⁺ zu den Ansätzen pipettiert.
- **Zyklenzahl:** Je höher die Zyklenzahl, desto höher die Wahrscheinlichkeit, dass es am Ende der PCR zu unspezifischer Produktbildung kommt. Durch Verringerung der Zyklenzahl soll dies verhindert werden.
- **Annealingtemperatur:** Für jeden Primer lässt sich seine Schmelztemperatur (T_m) mit folgender Gleichung errechnen:

$$T_m = 4 \times (\text{Anzahl G bzw. C}) + 2 \times (\text{Anzahl A bzw. T})$$

Die aus dieser Gleichung errechnete Schmelztemperatur gibt allerdings nur Auskunft darüber, bei welcher Temperatur 50% des Primers nicht mehr an die Template-DNA hybridisiert. Sie gibt nicht an, wann der Primer sicher und zuverlässig an das Template bindet. Deshalb sollte man die Annealingtemperatur für den Primer zwischen 5 und 10 Grad niedriger ansetzen.

- **Hot start:** Das Prinzip einer Hot-Start-PCR beruht darauf, dass eine essentielle Komponente, z. B. Taq-Polymerase oder Primer, erst dann zum PCR-Ansatz hinzugefügt wird, wenn deren optimale Arbeitstemperatur erreicht ist. Somit werden Primerdimerbildung, Fehlhybridisieren der Primer und Verlängerung nicht spezifisch bindender Primer auf ein Minimales reduziert. Auch im Bereich der Hot-Start-Techniken ergeben sich mehrere Varianten:

- **Verwendung von Wachskügelchen:** Die Wachskügelchen können statt Öl verwendet werden. Sie verflüssigen sich ab 60°C. Bei der Verwendung von Wachskügelchen wird zunächst eine Hälfte des Ansatzes, der weder die Polymerase noch die Nukleotide enthält, zusammengemischt und anschließend das Wachs hinzugegeben. Dann wird der Ansatz erhitzt, bis sich das Wachs verflüssigt. Man lässt das Wachs wieder abkühlen, bis es erstarrt ist und eine Schicht bildet. Auf diese Schicht wird nun die zweite Hälfte des Ansatzes gegeben, der nun Polymerase und Nukleotide enthält. Die PCR wird gestartet und sobald das Wachs schmilzt, sinkt die obere Hälfte durch das Wachs in die untere Hälfte und die Amplifikation beginnt. Es ist jedoch zu beachten, dass die obere Hälfte ein Volumen von mindestens 10 µl haben muss, denn sonst kann sie nicht absinken und es findet keine Amplifizierung statt.
- **Verwendung von monoklonalen Antikörpern:** Die hier verwendeten Antikörper sind so gegen die Taq-Polymerase gerichtet, dass die Antikörper erst bei höheren Temperaturen denaturiert werden und somit die Taq-Polymerase freigeben.
- **Chemisch modifizierte Enzyme (z.B. Hot-StarTaq™-DNA-Polymerase, Quiagen):** Diese Enzyme sind nicht nur bei RT inaktiv, sondern auch in der Aufheizphase der PCR. Erst nach einer 15-minütigen Inkubation bei 95°C wird das Enzym aktiviert. Dadurch

wird die Bildung von Primerdimeren und Verlängerung nicht spezifisch bindender Primer verhindert. Alle Komponenten können gemeinsam bei RT zusammenpipettiert und in das PCR-Gerät gestellt werden. Da das Reaktionsgefäß für die Zugabe der essenziellen Komponente kein weiteres Mal geöffnet werden muss, ist das Risiko für eine Kontamination geringer.

- **Primer:** Helfen sowohl Herabsetzung der Annealingtemperatur als auch Verringerung der Zyklenzahl nicht, sollten andere Primer benutzt werden, bei denen man auf folgendes achten sollte, um die Wahrscheinlichkeit des Erfolges zu erhöhen:
 - Die **Primersequenz** sollte für das gewünschte Produkt **so spezifisch wie nur möglich** sein, damit der Primer auch nur an der gewünschten Stelle des Templates hybridisiert.
 - Die Primer sollten **am 3'-Ende eine geringe Komplementarität** aufweisen um eine Hybridisierung miteinander auszuschließen.
 - **An ihrem 3'-Ende** sollten die Primer, um eine bessere Hybridisierung an die Template-DNA und Elongation zu erhalten, **ein bis zwei G oder C** besitzen. Allerdings sollten sich höchstens drei G Oder C am 3'-Ende befinden, denn sonst steigt die Gefahr für fehlhybridisierende Primer und dadurch die Gefahr für unspezifische Amplifikationsprodukte.
- **NTC:** NTC steht für No Template Control, d. h. dass man neben dem eigentlichen PCR-Ansatz eine Negativkontrolle mit in das Gerät stellt, die alle Komponenten außer der Template-DNA enthält. Findet in diesem Ansatz eine Produktbildung statt, obwohl keine stattfinden sollte, handelt es sich um eine Kontamination. So lassen sich Kontaminationen in einer oder mehreren Komponenten feststellen.

7. Literaturverzeichnis

BAYRHUBER, Horst / LUCIUS, Eckhard R., 1992: Handbuch der praktischen Mikrobiologie und Biotechnik, Band 1: Mikrobiologische Grundlagen; Biotechnik der Nahrungs- und Genussmittelproduktion, Metzler-Schulbuchverlag GmbH Hannover, ISBN 3-8156-3349-4

BAYRHUBER, Horst / LUCIUS, Eckhard R., 1992: Handbuch der praktischen Mikrobiologie und Biotechnik, Band 3: Mikroorganismen im Unterricht, Metzler-Schulbuchverlag GmbH Hannover, ISBN 3-8156-3351-6

MORITZ, Christian, 2005: Isolation und Charakterisierung eines *Bacillus licheniformis* und eines dazu spezifischen Bakteriophagen, Facharbeit, Bertha-von-Suttner-Gymnasium Neu Ulm

MÜLHARDT, Cornel, 2003: Der Experimentator-Molekularbiologie/Genomics, Spektrum akademischer Verlag Heidelberg, 4. Auflage, ISBN 3-8274-1460-1

SCHMITT, o. J.: Einführung in die Grundarbeitstechniken der Molekularbiologie, Memmingen

SCHRIMPF, Gangolf, 2002: Gentechnische Methoden: Eine Sammlung von Arbeitsanleitungen für das molekularbiologische Labor, Spektrum akademischer Verlag GmbH Heidelberg-Berlin, 3. Auflage, ISBN 3-8274-1103-3

QIAamp DNA Mini Kit and QIAamp DNA Blood Mini Kit Handbuch

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/viewer.fcgi?db=nucleotide&id=174375>

<http://www.nugi-zentrum.de/> , 2007

<http://tools.neb.com/NEBcutter2/listdig.php?name=48385c8f-J01859&showgel=1>

http://de.wikipedia.org/wiki/Molekulare_Uhr , vom 23.10. 2007

<http://de.wikipedia.org/wiki/Restriktionsfragmentl%C3%A4ngenpolymorphismus>
vom 29.05.2007

http://de.wikipedia.org/wiki/Ribosomale_RNA , vom 29.12. 2007

8. Danksagung

In erster Linie muss ich mich bei zwei Menschen bedanken: Herrn Weber und Herrn Schmitt, die mit mir im Laufe meiner Facharbeit Erfolg und Misserfolg erlebt haben und mir immer zur Seite standen, wenn Not an der Frau war. Danke für die gute Zusammenarbeit und die Erleichterung des zu bewältigenden Laboralltags.

Besonderer Dank gilt Herrn Dr. Stupperich und seiner TA Julia Herzig. Herrn Dr. Stupperich möchte ich für seine Bereitschaft danken, sowohl bei Fragen als auch bei Problemen immer mit gutem Rat zur Seite zu stehen. Julia danke ich für die gute Betreuung während unseres Besuches an der Universität Ulm.

9. Selbstständigkeitserklärung

Ich erkläre, dass ich die Facharbeit ohne fremde Hilfe angefertigt und nur die im Literaturverzeichnis angeführten Quellen und Hilfsmittel benützt habe.

....., den