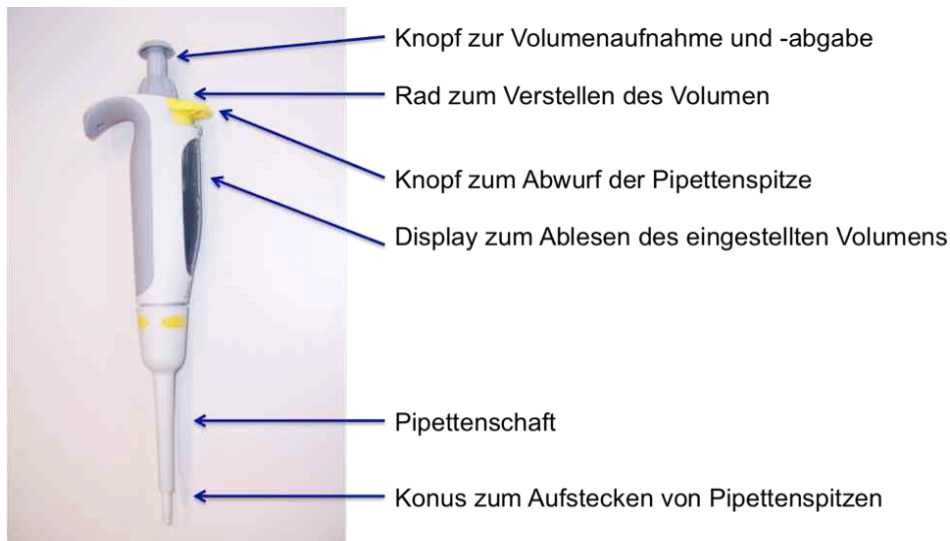


## 1. Die Mikropipette



## 2. Umgang mit der Mikropipette

- Pipetten immer gerade halten, damit Flüssigkeiten nicht in den Schaft laufen
- Bei Nichtgebrauch Pipetten in den Ständer hängen
- **Wichtig: Vor dem ersten Pipettieren den Volumenverstellerschutz (siehe Abbildung) nach oben ziehen!**

**Bei Nichtbeachtung kann die Pipette stark beschädigt werden!**



Den Hebel für den Volumenverstellerschutz unbedingt nach oben ziehen

(Wenn der Hebel für den Volumenverstellerschutz nach unten gestellt ist, lässt sich das Volumenrad nur schwer bewegen bzw. knackt das Rad dabei sehr laut.)

## 3. Pipettiervolumen

- Blaue Pipette: 100 – 1000 µl, blaue Spitzen
- Gelbe Pipette: 10 – 100 µl, gelbe Spitzen
- graue/weiße Pipette: 0,5 – 10 µl, weiße Spitze

Mit den jeweiligen Pipettentypen nicht außerhalb ihres Pipettiervolumens pipettieren

## 4. Aufsetzen der Pipettenspitze

- Box mit den Pipettenspitzen der jeweiligen Farbe öffnen und den Konus der Pipette auf eine Spitze setzen
- Pipette **leicht** andrücken und hochziehen

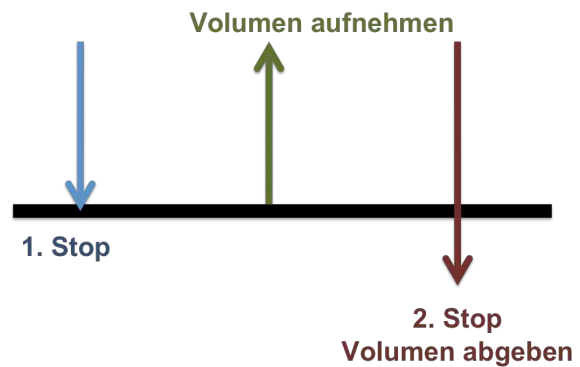
## 5. Abwerfen der Pipettenspitze

- Pipette über den Tischabfall halten und den farbigen „Abwurfknopf“ drücken

**Während des gesamten Pipettiervorgangs nicht die Spitzen berühren!**

## 6. Volumenaufnahme und Abgabe

- Vor dem ersten Pipettieren die zwei verschiedenen Druckpunkt des Pipettierknopfs ausprobieren (siehe Abbildung)
- neues Reaktionsgefäß mit einer Pinzette aus der Box entnehmen und in den Ständer stellen (nach der Entnahme kann das Reaktionsgefäß mit den Händen angefasst werden)



### Volumenaufnahme:

- Pipettierknopf bis zum ersten Anschlag drücken
- Pipettenspitze in die Flüssigkeit (blaue Übungslösung im Reaktionsgefäß) tauchen
- Pipettierknopf langsam hochziehen, dabei Flüssigkeit nicht „hochschnalzen“ lassen und keine Luft mitpipettieren
- Pipettenspitze aus der Flüssigkeit herausziehen
- in der Spitze dürfen keine Luftblasen in der aufgenommenen Flüssigkeit vorliegen, da sonst das zu pipettierende Volumen nicht stimmt

### Volumenabgabe

- Pipettenspitze in die Innenwand des neuen Reaktionsgefäßes halten
- Pipettierknopf langsam bis zum zweiten Anschlag drücken
- den letzten Tropfen an der Spitze an der Gefäßinnenwand abstreifen

**Immer auf Augenhöhe pipettieren!**

**Beim späteren Experimentieren jedes Mal eine neue Pipettenspitze verwenden**

## 7. Übung

Pipettiere verschiedene Volumina von der blauen Übungsflüssigkeit in ein leeres Reaktionsgefäß. Das Volumen wird mit dem Rad unterhalb des Pipettierknopfs eingestellt (bei der gelben und grauen Pipette markiert ein Strich im Display die Kommastelle). Zum Beispiel:

- 520  $\mu\text{l}$
- 52,0  $\mu\text{l}$
- 5,2  $\mu\text{l}$

Wähle den richtigen Pipettentyp (blau, gelb oder grau) für das jeweilige Volumen. Tausche mit deinen Tischnachbarn die verschiedenen Pipettentypen und probiere weitere selbstgewählte Volumina.

Probiere mit der grauen Pipette sehr kleine Volumina zu pipettieren. Benutze hierfür eine kleine Folie (auf dem Arbeitsplatz) und setze auf diese einen Tropfen von

- 1  $\mu\text{l}$  und
- 5  $\mu\text{l}$

## 1. Experiment: Schneiden des Plasmids

### Material

- sterile Reaktionsgefäße
- Pinzette
- sterile Pipettenspitzen
- in einer Eisbox (für 3 Arbeitsgruppen):
  - Plasmid in Reaktionsgefäß
  - Restriktionsenzyme *Bam*HI und *Hind*III in farbigen Reaktionsgefäß
  - Restriktionspuffer in Reaktionsgefäß
  - steriles H<sub>2</sub>O in Reaktionsgefäß



Eisbox mit Versuchsreagenzien

### Durchführung

1. ein Reaktionsgefäß mit der Pinzette entnehmen und mit der Gruppennummer beschriften
2. den Reaktionsansatz pipettieren. Die Reihenfolge der Pipettierschritte sollte unbedingt eingehalten werden.
3. **für jeden Pipettierschritt eine neue Pipettenspitze verwenden!**

In das sterile, beschriftete Reaktionsgefäß werden pipettiert:

14 µl Plasmid

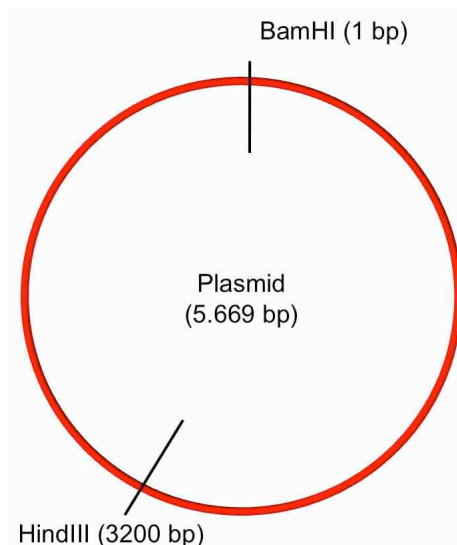
2 µl Restriktionspuffer

2 µl Enzym *bam*HI

2 µl Enzym *hind*III

Gesamtvolumen: 20 µl

4. Den Reaktionsansatz mit der Pipettenspitze leicht rühren und kurz abzentrifugieren (ca. 10 sek).
5. Den Ansatz in das auf 37°C vorgeheizte Wasserbad stellen und 30 min inkubieren



6.

## 2. Herstellung eines Agarose-Gels

### Material:

- Agarose
- TAE-Puffer
- Laborflasche
- Gelelektrophoresekammer
- Gelträger
- Gelkamm
- Spannungsquelle
- Ladepuffer
- DNA-Leiter

### Herstellung des TAE-Puffers:

TAE = Tris-Acetat-EDTA-Puffer

Für 1 l 1x TAE-Puffer:

- 4,84 g Tris-Base
- 11,42 ml Essigsäure (100%)
- 2 ml 0,5 M EDTA
- auf pH 8,0 einstellen

⇒ mit H<sub>2</sub>O auf 1000 ml auffüllen

(TAE-Puffer kann auch als Fertiglösung, meist in Stammkonzentrationen, bei verschiedenen Firmen für Life Science und Laborbedarf bezogen werden)

### Herstellung des Agarosegels

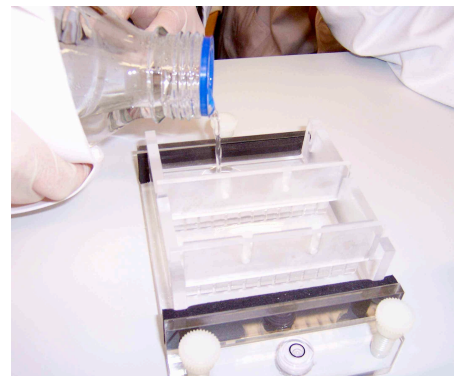
Für die meisten Anwendungen ist ein 1%iges Agarosegel ausreichend. Die Gesamtmenge hängt von der Größe der Gelkammern ab.

Für ein 1% Gel: 1 g Agarose je 100 ml abwiegen.

Agarose in eine Laborflasche geben und mit TAE-Puffer bis zum gewünschten Gesamtvolumen auffüllen. Die Flasche bei mittlerer Temperatur in der Mikrowelle langsam erhitzen bis die Agarose vollständig gelöst ist. Zwischendrin die Flasche herausnehmen und schwenken (Vorsicht Siedeverzug!). Das Gel sollte nicht zu lange kochen, gegebenenfalls die Temperatur der Mikrowelle senken und das Gel langsam weiter erhitzen. Die Agarose ist vollständig gelöst, wenn beim Schwenken im Gegenlicht keine Festkörper mehr zu sehen sind.

Das flüssige Gel nun vorsichtig in die Gelträger gießen. Das Gel sollte nicht zu heiß oder gar kochend in die Kammern gegossen werden, da das Material dadurch porös werden kann. Um das Abkühlen des Gels zu beschleunigen kann die Flasche unter einem kalten Wasserstrahl gekühlt werden.

Das flüssige Gel erstarrt je nach Außentemperatur in ca. 20-30 min und kann nun mitsamt des Gelträgers in die Gelkammern gesetzt werden (vorher die Gelkämme vorsichtig in aus dem Gel herausziehen). In den Gelkammern zuerst die Gelträger mit den festen Gelen geben und anschließend mit 1X TAE-Puffer befüllen. Die Gele sollten leicht mit dem Puffer bedeckt sein. Wichtig ist, dass die Taschen mit dem Puffer befüllt sind und sich keine Luft mehr darin befindet. Der Puffer kann mehrmals verwendet und über einige Zeit in den Kammern belassen werden. Bei Bildung von Schlieren sollte der Puffer allerdings unbedingt ausgetauscht werden (in der Regel hält der Puffer max. 2 Wochen frisch).



### 3. Beladen eines Agarose-Gels mit Proben

#### Übung

##### Material

- blaue Probelösung für Probe-Gel (mit X gekennzeichnet)
- Probe-Gel in Petrischalen

##### Durchführung

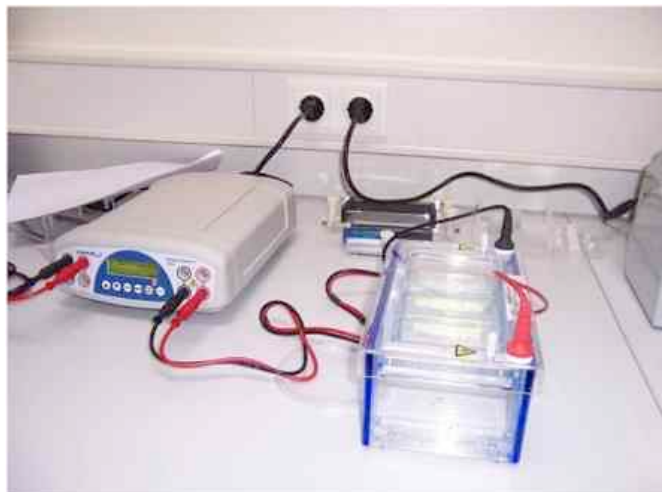
Zunächst das Pipettieren von Lösungen in Geltaschen üben. Hierzu:

1. das Probe-Gel in der Petrischale vorsichtig mit etwas Wasser bedecken, so dass die Taschen des Gels mit Wasser befüllt sind
2. mit der gelben Pipette 16 µl von der blauen Probelösung (mit X gekennzeichnet) pipettieren
3. mit der Pipettenspitze vorsichtig in eine der Geltaschen des Probe-Gels tauchen
4. Probelösung langsam und vorsichtig in die Tasche pipettieren. Hierbei den Pipettierknopf NICHT bis zum zweiten Druckpunkt durchdrücken, sondern nur bis zum 1. Anschlag
5. den Pipettierknopf gedrückt halten und die Pipettenspitze vorsichtig aus der Tasche herausziehen; erst dann den Pipettierknopf wieder loslassen

#### Beladen der Gele mit dem Reaktionsansatz des Plasmidverdau

Vor dem Beladen der Gele zu jeder Probe Ladepuffer hinzugeben und durch auf- und abpipettieren mischen. Die Menge des Ladepuffers richtet sich nach dem Gesamtvolumen der Probe, in der Regel wird 1/5 des Gesamtvolumens zur Probe hinzugegeben (bei einem Gesamtvolumen von 20 µl werden also 4 µl Ladepuffer hinzugegeben).

Von den Proben mit einem Gesamtvolumen von nun 24 µl ca. 15 µl in die Taschen des Gels pipettieren. Bei jedem Pipettierschritten stets die Spitze wechseln. In einer der Taschen die DNA-Leiter als Längenstandard hinzugeben.



#### Elektrophoretische Auftrennung

Deckel auf die Kammern setzen und dabei auf die Polung der Anschlüsse achten. DNA ist negativ geladen und läuft in Richtung des positiven Pols. Spannung bei ca. 100 V anlegen und das Gel ca. 30 min laufen lassen.

Die Laufzeit ist abhängig von den aufzutrennenden Banden. Sind sehr kurze oder dicht liegende Banden zu erwarten sollte die Laufzeit bei niedriger Spannung erhöht werden (evtl. auch die Agarosekonzentration im Gel erhöhen, z.B. auf 2%). Laufzeit und Laufweite kann auch zwischen den Gelelektrophorese-Modellen variieren

## 4. Färben des Gels

### mit Methylenblau:

Gel aus dem Gelträger nehmen und in eine Schale zum Färben geben. Gel mit einer 0,003%igen Methylenblaulösung gut bedecken und ca. 20 min einwirken lassen. Regelmäßiges Schwenken mit der Hand oder einem Schüttler (wenn vorhanden) beschleunigt den Färbevorgang. Bereits während des Färbens sollten blaue Banden sichtbar werden. Anschließend das Gel für 20 min in  $H_2O_{dest.}$  entfärben. Mit Methylenblau gefärbte Gele können auch gut über einen Overheadprojektor ausgewertet werden.

Bei der Verwendung von Methylenblau ist zu beachten, dass der Farbstoff wesentlich weniger sensitiv ist als Ethidiumbromid. Banden können in der Regel erst ab einer DNA-Menge von ca. 40 µg sichtbar gemacht werden. In diesem Fall müssen die im Plasmidverlauf angegebenen Mengen entsprechend erhöht werden.

### mit Ethidiumbromid (Auswertung nur mit einem UV-Tisch möglich):

**Beachten Sie bei der Verwendung von Ethidiumbromid die Sicherheitsvorschriften und Entsorgen Sie die Abfälle sachgerecht!**

#### 1. Möglichkeit: direkte Zugabe des Ethidiumbromids in das Gel:

Agarosegel wie oben beschrieben vorbereiten. Nach dem Aufkochen des Gels in der Mikrowelle, das Gel auf ca. 70°C runterkühlen lassen und je 100 ml Gel 10 µl Ethidiumbromid zugeben. Agarosegel wie oben beschrieben gießen und weiterverwenden. Das Gel kann direkt nach dem Gellauf unter UV-Licht ausgewertet werden.

#### 2. Möglichkeit: Färben des Gels mit Ethidiumbromid nach dem Gellauf:

Gel wie oben beschrieben vorbereiten und laufen lassen. Nach der elektrophoretischen Auftrennung das Gel in eine Färbeschale geben. Zur Herstellung der Färbelösung 1X TAE-Puffer in die Schale für das Färbebad geben (z.B. 200 ml). Je 100 ml Puffer 10 µl Ethidiumbromid zugeben. Wanne auf einen Wippschüttler stellen, Gel vorsichtig in das Bad geben und ca. 15-20 min wippen. Gel herausnehmen und unter UV-Licht auswerten.

Das Färbebad kann mehrmals benutzt und auch für mehrere Tage aufgehoben werden. Da Ethidiumbromid lichtempfindlich ist, sollte die Wanne abgedeckt werden. Es ist auch möglich das Färbebad mit einem Tropfen Ethidiumbromid „aufzufrischen“.

### Umgang mit Ethidiumbromid

Gefährdungseinstufung für Ethidiumbromid:

- Gesundheitsschädlich beim Verschlucken (R 22)
- Sehr giftig beim Einatmen (R 26)
- Reizt die Augen, die Atmungsorgane und die Haut (R 36/37/38)
- Verdacht auf mutagene Wirkung (R 68)

Ethidiumbromid ist als krebserregender Arbeitsstoff zugeordnet, wobei bisher keine Fälle bekannt sind, bei denen Ethidiumbromid tatsächlich einen Tumor ausgelöst hat.

Beim Umgang mit Ethidiumbromid sind unbedingt Nitril-Handschuhe zu tragen, da Latex für Ethidiumbromid durchlässig sind. Das Einatmen von Ethidiumbromid unbedingt vermeiden, also Agarosegele nicht mit Ethidiumbromid aufkochen. Ethidiumbromid nicht als Feststoff, sondern nur in gelöster Form kaufen.

Die folgende Liste gibt nur einen Überblick möglicher Bezugsquellen für Laborgeräte und Materialien aus dem Life Science-Bereich. Die Liste erhebt keinen Anspruch auf Vollständigkeit. Neben den hier aufgeführten Herstellern oder Vertrieben können fast alle Materialien auch von anderen, hier nicht aufgeführten, Firmen bezogen werden.

**Hinweis:** Fast alle Firmen bieten spezielle Rabatte für Schulen an. Es lohnt sich auf jeden Fall immer nach Preisnachlässen zu fragen!

### 1. Geräte

#### Gel-Elektrophorese-Anlagen

##### Gelsysteme und Spannungsquellen (Power Supplies), auch Fertiggele:

Biometra ([www.biometra.de](http://www.biometra.de))

BioRad Laboratories ([www3.bio-rad.com](http://www3.bio-rad.com))

Biostep (<http://www.biostep.de/>)

Peqleb ([www.peqleb.de](http://www.peqleb.de))

Serva Electrophoresis ([www.serva.de](http://www.serva.de))

##### Lonza Flashgel®-System:

Biozym (<http://www.biozym.com>)

VWR International (<http://de.vwr.com>)

##### einfaches batteriebetriebenes Elektrophorese-System für Schulklassen:

NCBE National Centre for Biotechnology Education (<http://www.ncbe.reading.ac.uk/>)

#### Pipetten

##### professionelle Mikropipetten mit variabler Volumeneinstellung:

(Preise zwischen 90 – 200 Euro)

BioRad Laboratories ([www3.bio-rad.com](http://www3.bio-rad.com))

Brand GmbH (<http://www.brand.de>)

Eppendorf Deutschland ([www.eppendorf.de](http://www.eppendorf.de))

Peqleb ([www.peqleb.de](http://www.peqleb.de))

Thermo Scientific ([www.thermo.com](http://www.thermo.com))

##### einfache „Schüler-Pipetten“ mit fixem Volumen

(Preise zwischen 15 – 30 Euro)

BioRad Laboratories ([www3.bio-rad.com](http://www3.bio-rad.com))

„Volac Minipipet“: NeoLab ([www.neolab.de](http://www.neolab.de))

NCBE National Centre for Biotechnology Education  
(<http://www.ncbe.reading.ac.uk/>)

Poulten & Graf (<http://web.poulten-graf.com>)

Wagner und Munz



### Dispenserspitzen

Biozym (<http://www.biozym.com>)

Brand GmbH (<http://www.brand.de>)

Eppendorf Deutschland ([www.eppendorf.de](http://www.eppendorf.de))

Genaxxon Bioscience ([www.genaxxon.de](http://www.genaxxon.de))

## 2. Schulkits

### Gerätekoffer oder Reagenzienkits speziell für den Schulunterricht:

BioRad Laboratories ([www3.bio-rad.com](http://www3.bio-rad.com)), unter der Rubrik „Life Science Education“

Blue Genes-Koffer (<http://www.roche.de/diagnostics/biochemica/bluegenes>)

NCBE National Centre for Biotechnology Education (<http://www.ncbe.reading.ac.uk/>)

Science Bridge (<http://www.sciencebridge.net/>)

## 3. Vertriebe für Verbrauchsmaterialien und Reagenzien aus dem Life Science-Bereich

z.B. für Reaktionsgefäße, Pipettenspitzen, Agarose, TAE-Puffer, Methylengrün etc.

Biozym (<http://www.biozym.com>)

Carl-Roth ([www.carl-roth.de](http://www.carl-roth.de))

NeoLab ([www.neolab.de](http://www.neolab.de))

Omnilab ([www.omnilab.de](http://www.omnilab.de))

Serva Electrophoresis ([www.serva.de](http://www.serva.de))

Sigma Aldrich Chemie GmbH ([www.sigmaaldrich.com](http://www.sigmaaldrich.com))

VWR International (<http://de.vwr.com>)

Zefa Laborservice ([www.zefa-laborservice.de](http://www.zefa-laborservice.de))

## 4. Plasmid pUC18 oder pUC19

Biocompare ([www.biocompare.com](http://www.biocompare.com))

Bioron ([www.bioron.net](http://www.bioron.net))

Fermentas Life Science ([www.fermentas.de](http://www.fermentas.de))

Genaxxon Bioscience ([www.genaxxon.de](http://www.genaxxon.de))

Invitrogen ([www.invitrogen.com](http://www.invitrogen.com))

## 5. Restriktionsenzyme, DNA-Leiter, Ladepuffer etc.

Fermentas Life Science ([www.fermentas.de](http://www.fermentas.de))

Genaxxon Bioscience ([www.genaxxon.de](http://www.genaxxon.de))

Metabion ([www.metabion.com](http://www.metabion.com))

New England Biolabs ([www.neb.com](http://www.neb.com))

Promega ([www.promega.com](http://www.promega.com))