

# **Molekularbiologisches Praktikum**



## **Versuch *in vitro* Mutagenese**

**Der Versuch startet am ersten Versuchstag um 9:00 mit einem schriftlichen  
Antestat im Raum NC5/174**

# ***In vitro* Mutagenese**

Prof. Dr. B. Hovemann

## **Antestat**

Unmittelbar vor Beginn des Versuches muss von jeder Teilnehmerin und jedem Teilnehmer ein Antestat abgelegt werden. Dafür wird vorausgesetzt, dass die theoretischen Hintergründe beherrscht werden und der prinzipielle, praktische Ablauf des Versuches bekannt ist. **Bei groben Wissenslücken müssen die Teilnehmerin oder der Teilnehmer vom Versuchstag ausgeschlossen werden.**

Es sei hier explizit darauf hingewiesen, dass diese Versuchsbeschreibung keine vollständige Darstellung aller zugrunde liegenden biochemischen und molekularbiologischen Hintergründe leisten soll. Neben dieser Versuchsbeschreibung wird deshalb die Kenntnis des

- Skriptes zur Vorlesung „***Molekulargenetische Methoden in der Biochemie -- SS 2013***“ (VL-Nr. 184404) von Prof. Dr. Hovemann, sowie des
- Skriptes „***GFP – Fluoreszierende Proteine***“

vorausgesetzt.

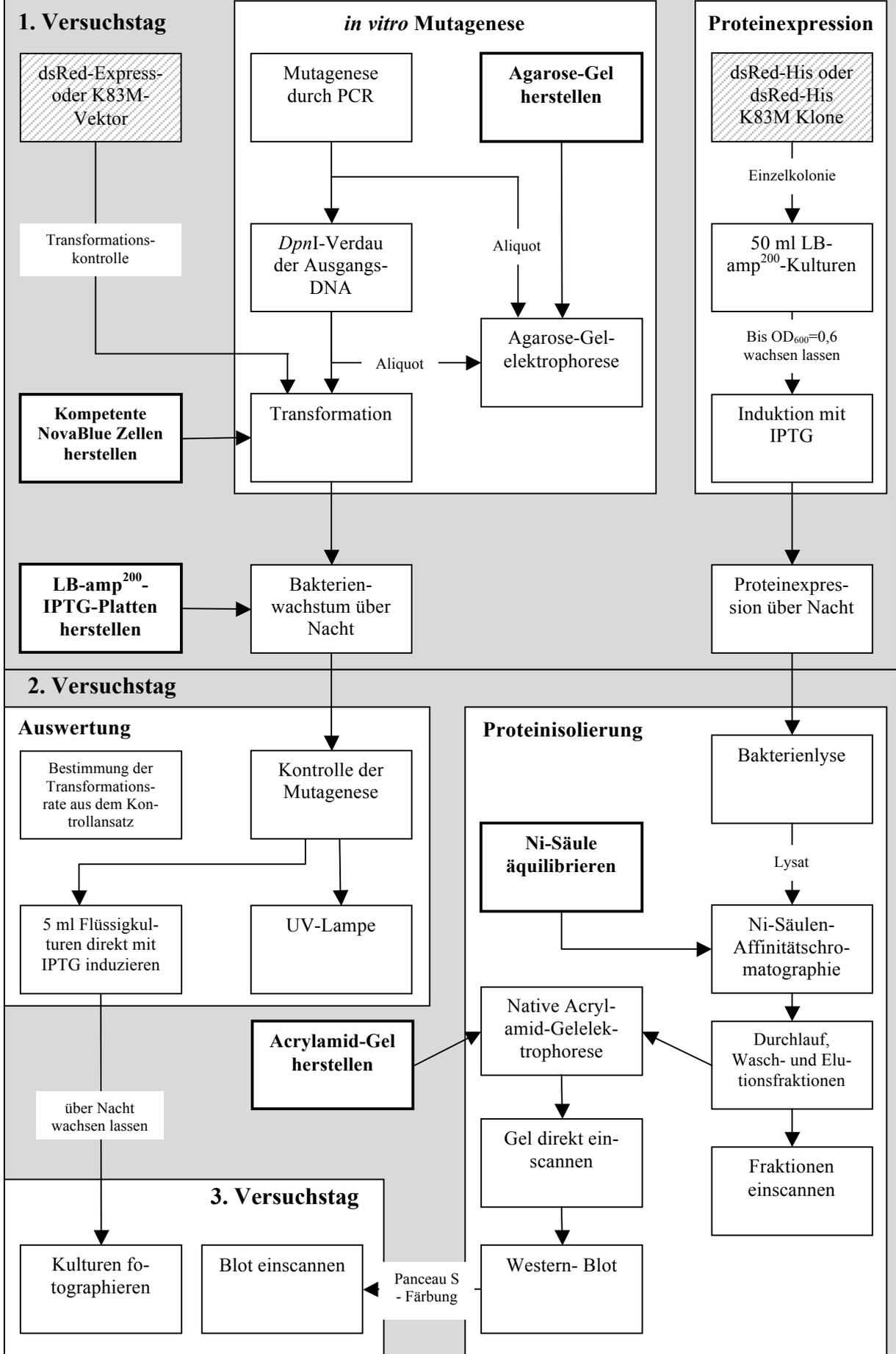
Im Antestat werden Kenntnisse zu den Themen

- Eigenschaften von DNA
- Chromophorbildung bei fluoreszierenden Proteinen
- Mutageneseverfahren, speziell QuikChange-Verfahren
- Native PAGE vs. SDS-PAGE, Polymerisation von Gelen
- Proteinexpression in Bakterienkulturen
- Proteinisolierung durch Affinitätschromatographie
- Gefahrstoffe in diesem Versuch und der Umgang mit ihnen

erwartet.

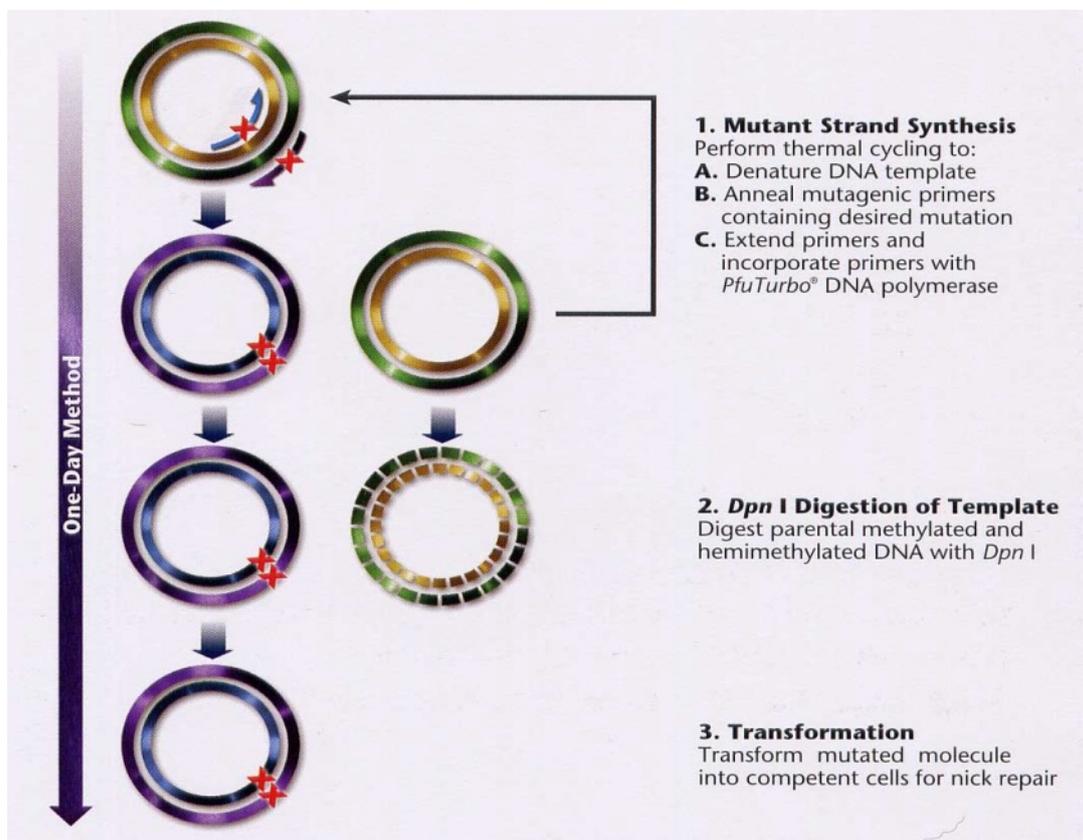
***gez. B. Hovemann, die Praktikumsbetreuer***

***in vitro* Mutagenese**  
Molekularbiologisches Praktikum 5. Semester AG Hovemann



Die *in vitro* Mutagenese gehört zu den wichtigen Methoden der Molekularbiologie, da sie das gezielte Modifizieren von Gensequenzen ermöglicht. Damit ist man nicht mehr auf ungerichtete Mutations-Ereignisse angewiesen ist, wie dies bei *in vivo* Mutagenese Methoden (Röntgenstrahlung, chemische Reagenzien) der Fall ist. Eingesetzt wird die *in vitro* Mutagenese häufig für die Untersuchung essentieller Proteinregionen, z. B. katalytischer Domänen und Co-Faktor-Bindestellen. Ziel ist es dabei, einzelne Aminosäuren dieser Regionen aus zu tauschen und die Auswirkung auf die Proteinaktivität zu bestimmen.

Die im Versuch eingesetzte Methode ist das QuikChange-Verfahren. Bei diesem Verfahren wird eine Punktmutation durch eine PCR-ähnliche Methode (PCR-Zyklus Bedingungen, jedoch ohne exponentiellen Produktanstieg → Warum?) direkt in das klonierte Gen eingeführt. Der Einfachheit halber wird diese im weiteren Verlauf des Skriptes trotzdem als „PCR“ bezeichnet. Das Gen befindet sich in einem Plasmid, das aus *dam*<sup>+</sup> *E. coli* präpariert worden ist. Anschließend wird die DNA des unveränderten Ausgangsplasmids durch die methylierungsabhängige Restriktion mit *DpnI* zerstört. Das neusynthetisierte, nicht methylierte Plasmid mit der veränderten Gensequenz bleibt erhalten und wird in einen geeigneten Bakterienstamm transformiert (siehe Abbildung).



Im Praktikumsversuch wird eine *in vitro* Mutagenese des rot fluoreszierenden dsRed-Express-Proteins durchgeführt (siehe auch: [GFP - Fluoreszierende Proteine](#)). Durch den Austausch des Lysins an Position 83 gegen Methionin (K83M Mutante) wird der Rotanteil des Emissionsspektrums des Proteins verändert, so dass das Protein anschließend lila fluoresziert. Ebenso kann durch die Rückmutation (M83K) das wildtypische Emissionsspektrum wieder hergestellt werden. Die Farbveränderung ist in Bakterienkolonien nach Ausbildung des Chromophors sichtbar. Dieser Prozess dauert einige Stunden. Das Ergebnis des Experiments lässt sich so nach einigen Stunden direkt auf der Agarplatte beurteilen.

## Versuchstag 1

### 1. Herstellung kompetenter NovaBlue Bakterien

#### a) Reagenzien:

<u>TB(transformation buffer), pH 6,7</u>	<u>Für 250 ml</u>
15 mM CaCl <sub>2</sub> · 2 H <sub>2</sub> O	0,756 g
250 mM KCl	0,55 g
10 mM PIPES	4,66 g
pH-Wert von 6,7 mit 5 N KOH	einstellen
55 mM MnCl <sub>2</sub> · 4 H <sub>2</sub> O	2,72 g
ddH <sub>2</sub> O	auf 250 ml

<u>LB(lysogeny broth)-Medium</u>	<u>Tetracyclin-Stocklösung</u>
5 g Hefeextrakt	12,5 mg/ml Tetracyclin
2 g MgCl <sub>2</sub> · 2 H <sub>2</sub> O	in EtOH (abs.)
5 g NaCl	
10 g Pepton	
in 1 l ddH <sub>2</sub> O	

#### b) Durchführung:

Kompetente  
NovaBlue  
Bakterien

50 ml frisches LB-tet<sup>25</sup>-Medium werden mit 1,5 ml einer vorbereiteten über Nacht Kultur angeimpft und bei 37 °C und 240 rpm im Schüttler bis zu einer OD<sub>600</sub> von 0,5 bis 0,6 wachsen gelassen (viertelstündlich kontrollieren!). Jede Gruppe nimmt sich 10 ml Kultur in ein 15 ml Röhrchen ab und kühlt die Zellen für 10 Minuten im

Eis/Wasser-Bad. **(Um eine möglichst hohe Kompetenz der Zellen zu erhalten, müssen die Zellen ab diesem Zeitpunkt möglichst auf Eis gehalten werden und die Zeiten dazwischen, z. B. beim Zentrifugieren, müssen minimiert werden!)**

Die Bakteriensuspension wird bei 4 °C in einer Tischzentrifuge 1 Minute bei 3.073 rpm (1.700 g) pelletiert. Nach der Zentrifugation, werden die Bakterien in 2,4 ml eiskaltem TB-Puffer resuspendiert und die Suspension 10 Minuten auf Eis inkubiert. Es wird wiederum 1 Minute bei 4 °C und 3.073 rpm zentrifugiert, das Pellet in 340 µl TB-Puffer resuspendiert und die Suspension dann auf zwei Reaktionsgefäße aufgeteilt. Nun werden je 11,9 µl DMSO zugegeben, gemischt und die Zellen bis zur Verwendung im Eis/Wasser-Bad gelagert (mindestens 10 min).

## ***2. Animpfen der Expressionskulturen***

### **a) Reagenzien:**

- LB-Medium
- 1 M IPTG-Stocklösung
- 40 mg/ml Carbenecillin-Stocklösung

### **b) Durchführung:**

50 ml LB-carb<sup>40</sup>-Medium werden mit einer vorbereiteten über Nacht Kultur auf eine OD<sub>600</sub> von etwa 0,1 angeimpft und bei 37 °C und 240 rpm bis zu einer OD<sub>600</sub> von 0,5 bis 0,6 wachsen gelassen. Anschließend wird mit 50 µl 1 M IPTG (1 mM Endkonzentration) die Proteinexpression über Nacht bei 37 °C im Schüttler induziert.

## ***3. in vitro Mutagenese***

### **a) Reagenzien:**

- 10× *Pfu* Polymerase-Puffer
- 50 ng/µl Plasmid-Lösung (pDsRed-Express oder pDsRed-Express K83M)
- dNTP-Mix (je 10 mM pro Nukleotid)
- 2,5 U/µl *Pfu* DNA-Polymerase
- 10 U/µl FastDigest *DpnI*

TBE(TRIS-Borat-EDTA)-Puffer, pH 8,0

1 mM EDTA  
40 mM TRIS/Acetat

1 l Stocklösung (50×)

100 ml 0,5 M EDTA  
242 g TRIS  
57,1 ml Eisessig  
auf 1 l mit ddH<sub>2</sub>O >> pH 8,0

SOB(*super optimal broth*)-Medium

5 g Hefe-Extrakt  
2,5 mM KCl  
10 mM MgCl<sub>2</sub>  
8,6 mM NaCl  
20 g Pepton  
in 1 l ddH<sub>2</sub>O

SOC(SOB *with catabolite repression*)-Medium

20 mM Glukose  
in SOB-Medium

Ethidiumbromid-Stocklösung

10 mg/ml Ethidiumbromid  
in ddH<sub>2</sub>O

**b) Verwendete Primer:**

***Wildtyp zu Mutante (K83M):***

K83M forward: 5'-CGACATCCCCGACTACATTGAAGCTGTCCTTCCCCGA-3'

K83M reverse: 5'-TCGGGGAAGGACAGCTTCATGTAGTCGGGGATGTCG-3'

***Mutante zu Wildtyp (M83K, entspricht pDsRed-Express):***

M83K forward: 5'-CGACATCCCCGACTACAAGAAGCTGTCCTTCCCCGAGG-3'

M83K reverse: 5'-CCTCGGGGAAGGACAGCTTCTTGTAGTCGGGGATGTCG-3'

### c) Durchführung:

Der PCR-Ansatz wird nach folgendem Schema pipettiert:

#### PCR-Ansatz:

40 µl ddH<sub>2</sub>O  
5 µl 10× *Pfu* Polymerase-Puffer mit MgSO<sub>4</sub>  
1 µl Plasmid-Lösung (entspricht 50 ng)  
1 µl 50 µM Primer *forward*  
1 µl 50 µM Primer *reverse*  
1 µl dNTP-Mix  
dann 1 µl *Pfu* DNA Polymerase

Anschließend erfolgt die PCR nach folgendem Programm:

#### PCR-Programm:

Vorbehandlung	2 Minuten bei 95 °C	
12 Zyklen mit	}	30 Sekunden bei 95 °C Denaturierung
		1 Minute bei 55 °C Annealing
		7 Minuten bei 72 °C Elongation (2 min/kb)
Nachbehandlung	10 Minuten bei 72 °C	

Während die PCR läuft, werden drei zur Selektion transformierter Bakterien benötigte LB-carb<sup>40</sup>-IPTG-Platten hergestellt. Dazu werden in der Mikrowelle 1,5 % (w/v) Agar-Agar in 100 ml LB-Medium geschmolzen (nicht überkochen lassen), nach Abkühlen auf ca. 60 °C mit 200 µl Carbenicillin-Stocklösung und 100 µl IPTG-Stocklösung versetzt und in Schalen gegossen. Nach dem Erstarren werden die Platten markiert und zum Trocknen in den 37 °C Brutschrank gegeben.

LB-amp<sup>200</sup>-  
IPTG-Platten

Da sowohl PCR als auch *DpnI*-Verdau auf einem Agarose-Gel analysiert werden sollen, wird auch dieses während die PCR läuft hergestellt. Dazu wird 1 % (w/v) Agarose in TBE-Puffer geschmolzen (nicht überkochen lassen!), Ethidiumbromid-Stocklösung mit einer Verdünnung von 1:20.000 zugegeben und in die mit einem Kamm versehene Form gegossen.

Agarose-Gel

**Gefahrenhinweis: Ethidiumbromid ist sehr giftig, mutagen, umweltgefährdend und somit gefährlich für den Laboranten. Deshalb müssen alle Arbeiten mit Ethidiumbromid unter dem Abzug durchgeführt werden. Da die im Laborgebrauch üblichen Latex-Handschuhe von Ethidiumbromid durchdrungen werden können, müssen bei allen Arbeiten Nitril-Handschuhe getragen werden. Mit Ethidiumbromid in Kontakt gekommene Gegenstände und Pufferlösungen müssen in den besonders gekennzeichneten Abfallbehältern entsorgt werden.**

Zum Überprüfen der PCR wird ein 15 µl Aliquot abgenommen und auf Eis gelagert. Zum restlichen PCR-Ansatz wird 1 µl FastDigest *DpnI* gegeben und fünf Minuten bei 37 °C inkubiert. Vom *DpnI*-Verdau werden anschließend ebenfalls 15 µl abgenommen und zusammen mit dem PCR-Aliquot durch Gelelektrophorese analysiert.

Der Rest (20 µl) wird verwendet, um die hergestellten, kompetenten NovaBlue Bakterien über Hitze-Schock zu transformieren. Als Kontrolle der Transformationseffizienz wird 1 µl des Ausgangsplasmids der PCR (5 ng/µl) in einem getrennten Ansatz transformiert.

Für die Transformation werden DNA und Bakterien kurz gemischt und 30 Minuten im Eis/Wasser-Bad inkubiert, bevor der Hitze-Schock durch 30 Sekunden Erwärmen auf 42 °C (Wasserbad!) erfolgt. Nach Zugabe von 800 µl eiskaltem SOC-Medium werden die Bakterien für 30 Minuten bei 37 °C unter Schütteln wachsen gelassen, bevor sie bei 4.000 rpm kurz pelletiert werden. Für die *in vitro* Mutagenese Ansätze wird der Überstand bis auf 200 µl entfernt, das Pellet darin resuspendiert und der gesamte Ansatz auf einer LB-carb<sup>40</sup>-IPTG-Platte ausgestrichen. Für die Kontrollen mit dem geschlossenen Plasmid wird 1/10 des gesamten Ansatzes auf eine Platte ausgestrichen und der Rest bei 4.000 rpm kurz pelletiert. Der Überstand wird bis auf 200 µl entfernt, das Pellet darin resuspendiert und der gesamte Ansatz auf einer weiteren LB-carb<sup>40</sup>-IPTG-Platte ausgestrichen. Anschließend werden die Platten über Nacht bei 37 °C im Brutschrank inkubiert.

## Versuchstag 2

### *1. Auswertung der Transformation*

Zur Bestimmung der Transformationseffizienz der kompetenten Zellen wird die Transformationsrate (Kolonien pro  $\mu\text{g}$  DNA) aus den Kontrollansätzen mit pDsRed-Express bzw. pDsRed-Express K83M bestimmt. Dazu werden die Kolonien auf der Platte gezählt und aus der eingesetzten DNA-Menge die Transformationsrate berechnet.

Zusätzlich wird aus der nach linearer Amplifikation und vollständigem Verdau des Ausgangsplasmids berechneten DNA-Menge die Transformationsrate der Mutagenese Ansätze bestimmt. Über den Anteil der für die Mutation positiven Klone kann daraus der Mutationserfolg ermittelt werden.

### *2. Kontrolle der Mutagenese*

Zum Nachweis der Mutagenese werden die Platten unter UV Licht ausgewertet. Eine Einzelkolonie wird in 5 ml LB-carb<sup>40</sup>-IPTG-Medium resuspendiert und über Nacht bei 37 °C unter Schütteln wachsen gelassen.

### 3. Protein-Präparation über Affinitätschromatographie

#### a) Geräte:



- Microfluidizer

#### b) Reagenzien:

- Protino Ni-TED 150 Säulen
- 8× LEW(*lysis-equilibration-wash*)-Puffer
- 4× Elutionspuffer

#### c) Durchführung:

Die am Vortag angeimpften Expressionskulturen werden in einer Kühlzentrifuge pelletiert (4.500 g, 10 min und 4 °C), in 20 ml 1× LEW-Puffer resuspendiert und auf

Eis aufbewahrt. Mittels eines Microfluiziders werden die Bakterienzellen aufgeschlossen. Anschließend erfolgt eine Zentrifugation bei 19.000 rpm (SS34-Rotor) und 4 °C für 20 Minuten, um die Bakterienreste zu pelletieren. Der Überstand wird in ein 50 ml Falkon überführt und auf Eis aufbewahrt.

Während die Zellreste pelletiert werden, wird die Protino Säule mit 1× LEW-Puffer äquilibriert. Dazu wird 320µl 1× LEW-Puffer auf die Säulen gegeben und der Durchlauf verworfen.

Nachdem die Säule äquilibriert wurde, wird das geklärte Lysat auf die Säule gegeben. **Der Durchlauf wird in einem 50 ml Röhrchen aufgefangen!**

Nachdem das Lysat durchgelaufen ist, wird die Säule zwei Mal mit je 320µl 1× LEW-Puffer gewaschen und diese beiden Waschfraktionen separat aufgefangen. Anschließend wird mit drei Mal je 240µl 1× Elutionspuffer eluiert. Dabei werden **jeweils 1 ml Fraktionen für die Elektrophorese in Reaktionsgefäßen aufgefangen** und für die Auswertung zusammen mit dem Durchlauf und den Waschfraktionen eingescannt.

#### 4. Native Polyacrylamid-Gelelektrophorese

##### a) Reagenzien:

- Wassergesättigtes Butanol
- 10 % (v/v) Essigsäure

<u>Upper-TRIS (nativ)</u>	<u>Lower TRIS (nativ)</u>
0,5 M TRIS/HCl, pH 6,8 in ddH <sub>2</sub> O	1,5 M TRIS/HCl, pH 8,8 in ddH <sub>2</sub> O
<u>Sammelgel (4 %)</u>	<u>Trenngel (10 %)</u>
10,5 ml ddH <sub>2</sub> O	15 ml ddH <sub>2</sub> O
2 ml Rotiphorese Gel 30	5 ml Lower-TRIS
2,5 ml Upper-TRIS	10 ml Rotiphorese Gel 30
150 µl 10 % (w/v) APS-Lösung	300 µl 10 % (w/v) APS-Lösung
15 µl TEMED	30 µl TEMED

<u>Stopfgel</u>	<u>Probenpuffer (5×)</u>
1 % (w/v) Agarose	0,1 % (w/v) Bromphenolblau
16,7 % (v/v) Lower-TRIS (nativ)	25 % (v/v) Glycerin
in ddH <sub>2</sub> O	60 mM TRIS/HCl, pH 6,8
	in ddH <sub>2</sub> O
<u>Laufpuffer (nativ)</u>	<u>PanceauS - Lösung</u>
192 mM Glycin	0,2 % (v/v) PanceauS
25 mM TRIS/HCl, pH 8,8	5 % (v/v) Essigsäure
in ddH <sub>2</sub> O	in ddH <sub>2</sub> O

**Gefahrenhinweise: Unpolymerisiertes Acrylamid ist krebserregend und ein starkes Nervengift. Gefährlich sind vor allem das Verschlucken und die Berührung mit der Haut, daher müssen alle Arbeiten mit Acrylamid (auch den polymerisierten Gelen) mit Handschuhen durchgeführt werden.**

### b) Durchführung:

Es werden native diskontinuierliche Gele mit einem 4 %igen Sammelgel und einem 10 %igen Trenngel verwendet. Zum Gießen wird zunächst das Trenngel vorbereitet (**APS und TEMED jedoch erst unmittelbar vor dem Gießen zugeben!**) und luftblasenfrei in die mit Stopfgel abgedichtete Kammer gefüllt, wobei zum unteren Ende des Kamms mindestens 0,5 cm freibleiben müssen. Während der Polymerisation wird das Trenngel mit 200 µl wassergesättigtem Butanol überschichtet, da diese durch Luftsauerstoff gestört wird. Nach dem Polymerisieren des Trenngels (durch vorsichtiges Kippen der Kammer testen), wird das Butanol abgegossen und das Sammelgel gegossen. Dieses kann schon während der Polymerisation des Trenngels vorbereitet werden (**APS und TEMED jedoch erst unmittelbar vor dem Gießen zugeben!**). Um ein vollständiges Polymerisieren des Sammelgels zu gewährleisten, ist es wichtig, dass der Kamm so in die Kammer eingeführt wird, dass keine Luftblasen eingeschlossen werden. Dies gelingt am besten, wenn man den Kamm leicht schräg hält. Wenn die Polymerisation des Sammelgels abgeschlossen ist, wird die Kammer mit Laufpuffer gefüllt und erst dann der Kamm entfernt.

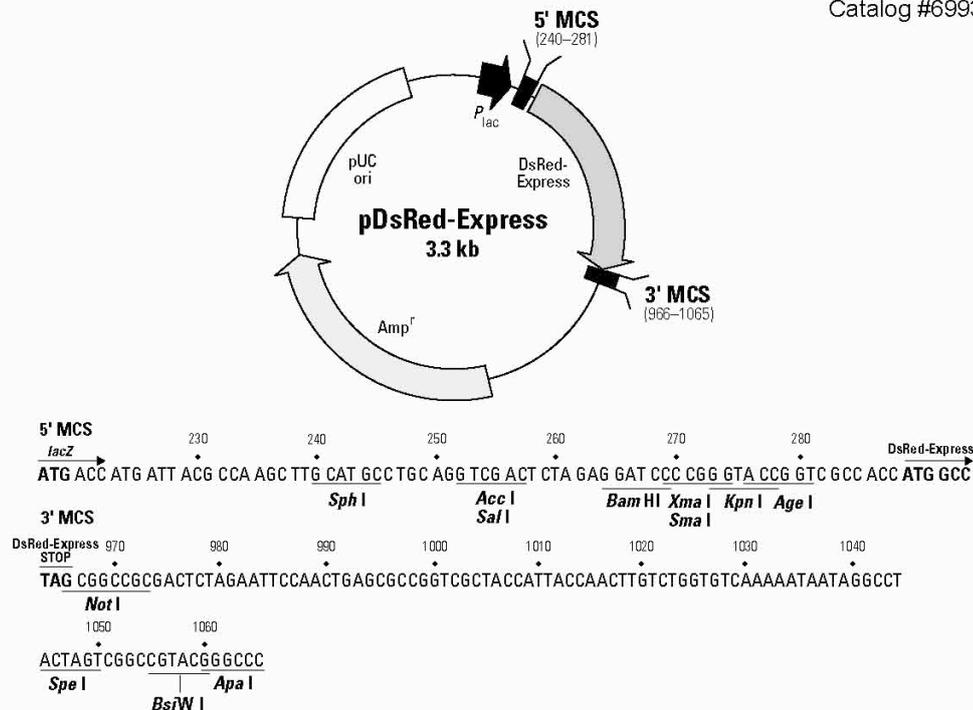
Polyacrylamid-Gel

Jeweils 20 µl der Proben aus den Fraktionen der Proteinisolierung werden vor dem Auftragen mit 5× Probenpuffer versetzt und dann aufgetragen. Während sich die Proben im Sammelgel befinden, wird eine Spannung von 8 V/cm angelegt. Die Spannung wird bei Eintritt der Proben in das Trenngel auf 12 V/cm erhöht.

Nach Abschluss der Elektrophorese (Bromphenolblaubande am unteren Ende des Gels) wird das Trenngel vom Sammel- und Stopfgel getrennt und eingescannt (fotographiert). Anschließend wird die Proteintrennung mit einem Semi-Dry Western Blot Verfahren auf Nitrocellulose übertragen und mit PanceauS-Färbung angefärbt. Diese Färbung wird dokumentiert (Einscannen).

### **Versuchstag 3**

Der dritte Versuchstag dient der Auswertung der Experimente vom Vortag. Dazu werden 1,5 ml der 5 ml Expressionskulturen aus der *in vitro* Mutagenese in Reaktionsgefäße überführt, die Zellen sedimentiert (1 min, 4.000 rpm) und eingescannt.



**Restriction Map and Multiple Cloning Site (MCS) of pDsRed-Express.** All sites shown are unique.

### Description

pDsRed-Express is a prokaryotic expression vector that encodes DsRed-Express, a variant of *Discosoma sp.* red fluorescent protein (DsRed; 1). DsRed-Express contains nine amino acid substitutions (listed on page 2), which improve the solubility of the protein and reduce the time from transfection to detection of red fluorescence (2). In addition, these substitutions reduce the level of residual green emission (2). When DsRed-Express is expressed in mammalian cell cultures, red-emitting cells can be detected by either fluorescence microscopy or flow cytometry 8–12 hours after transfection (DsRed-Express excitation and emission maxima = 557 nm and 579 nm, respectively). Although DsRed-Express most likely forms the same tetrameric structure as wild-type DsRed, DsRed-Express displays a reduced tendency to aggregate (2). The DsRed-Express coding sequence has been human codon-optimized for high expression in mammalian cells (3).

In pDsRed-Express, the DsRed-Express coding sequence is flanked at the 5' and 3' ends by separate and distinct multiple cloning sites (MCS), making it easy to excise the gene for use in other cloning applications. Alternatively, the DsRed-Express coding sequence can be amplified by PCR. In *E. coli*, DsRed-Express is expressed from the *lac* promoter as a fusion with several amino acids, including the first five amino acids of the *LacZ* protein. Note, however, that if you excise the DsRed-Express coding sequence using a restriction site in the 5' MCS, the resulting fragment will encode the native (i.e., non-fusion) DsRed-Express protein. A Kozak consensus sequence is located immediately upstream of the DsRed-Express gene to enhance translational efficiency in eukaryotic systems (4). The entire DsRed-Express expression cassette in pDsRed-Express is supported by a pUC19 backbone, which contains a high-copy number origin of replication and an ampicillin resistance gene for propagation and selection in *E. coli*.

### Use

pDsRed-Express is primarily intended to serve as a source of DsRed-Express cDNA. The flanking MCS regions make it possible to excise the DsRed-Express coding sequence and insert it into other expression vectors of choice. The vector can also be used in bacteria to produce DsRed-Express protein.

(PR23948; published 12 March 2002)

\_ Universität Göttingen

UW - C 541  
10/96



## Ethidiumbromid [1239-45-8]

3,8-Diamino-5-ethyl-6-phenyl-phenanthridiniumbromid (Homidiniumbromid).  
Wässrige Lösung von Ethidiumbromid ( $C_{21}H_{20}BrN_3$ ) für biochemische Zwecke

### Gefahren für Mensch und Umwelt

Von Oxidationsmitteln fernhalten.

Vor starker Erhitzung schützen; Entstehung gefährlicher Gase ( $NO_x$ ,  $Br_2$ ,  $HBr$ ) möglich.

Irreversibler Schaden möglich. Sehr giftig beim Einatmen. Gesundheitsschädlich beim Verschlucken.  
Reizt Augen, Atmungsorgane und Haut.

Lösung nicht in Abwasser, Erdreich oder Gewässer gelangen lassen!

### Schutzmaßnahmen und Verhaltensregeln

Dicht verschlossen, trocken an gut belüfteten Ort bei +15 bis +25 °C lagern. Darf nur für Sachkundige und deren Beauftragte zugänglich sein.

Bei Auftreten von Stäuben Partikelmaske tragen.

Schutzbrille mit Seitenschutz und oberer Augenraumabdeckung

Schutzhandschuhe aus Gummi nur als kurzzeitiger Staub- und Spritzschutz (Ethidiumbromid diffundiert hindurch). Schutzhandschuhe aus Nitril sind auch bei längerem Tragen dicht.

Vorbeugender Hautschutz empfohlen.

### Verhalten im Gefahrfall (Unfalltelefon: 112)

Mit flüssigkeitsbindendem Material z.B. CHEMIZORB aufnehmen. Der Sonderabfall- Entsorgung zuführen. Nachreinigen mit Wasser. Atemschutz, falls Dämpfe und Aerosole auftreten; Lüftung z.B.

Öffnen von Fenstern. Warnung anderer Mitarbeiter.  
Wasserdampf, Wasserstrahl, Schaum, keine Trockenlöschmittel

## Erste Hilfe

**Nach Hautkontakt:** Sofort mit viel Wasser und Seife abwaschen!

**Nach Augenkontakt:** 15 Minuten bei gespreizten Lidern unter fließendem Wasser mit Augendusche ausspülen. Augenarzt konsultieren!

**Nach Einatmen:** Frischluft! Ggf. Atemspende oder Gerätebeatmung. Sofort Arzt verständigen.

**Nach Verschlucken:** Viel Wasser (ggf. mit Aktivkohle) trinken lassen! Erbrechen auslösen! Notarzt verständigen.

**Nach Kleidungskontakt:** Verunreinigte Kleidungsstücke sofort ausziehen und erst nach gründlicher Reinigung wiederverwenden.

Bei Unwohlsein ärztlichen Rat einholen.

**Ersthelfer:** siehe gesonderten Anschlag

## Sachgerechte Entsorgung

Falls Recycling nicht möglich, als Sonderabfall entsorgen, zuständige Stellen: Herr Hambloch:39-3220, :.

---

Universität Göttingen  
Institut für Organische Chemie  
UW - C 002  
08/95



## Acrylamid [79-06-11]

$C_3H_5NO$ . (Propenamid). Farblose Kristalle.

### Gefahren für Mensch und Umwelt

Gefährliche Reaktionen mit Laugen, Säuren, Oxidationsmitteln. Bei Erwärmung bis zum Schmelzpunkt kann heftige exotherme Polymerisation eintreten.

Kann Krebs erzeugen! Giftig beim Einatmen, Verschlucken und Berührung mit der Haut. Dämpfe und Lösungen reizen Augen und Haut. Acrylamid ist ein starkes Nervengift.

### Schutzmaßnahmen und Verhaltensregeln

Alle Arbeiten im Abzug durchführen. Flaschen dicht verschlossen, kühl, unter Lichtschutz aufbewahren.

Latex- oder Neoprenschutzhandschuhe (nur als kurzzeitiger Spritz- oder Staubschutz).

### Verhalten im Gefahrfall (Unfalltelefon: 112)

Verschüttete Substanz vorsichtig aufnehmen und als Sondermüll entsorgen. Verschüttete Lösung mit Bindemittel z.B. Rench-Rapid aufnehmen und als Sondermüll entsorgen.

Wasser, Schaum. **Kein Kohlendioxid!**

### Erste Hilfe

**Nach Hautkontakt:** Mit viel Wasser und Seife gründlich waschen.

**Nach Augenkontakt:** Mit viel Wasser bei geöffnetem Lidspalt mindestens 15 Minuten ausspülen.

Augenarzt!

**Nach Einatmen:** Frischluft.

**Nach Verschlucken:** Viel Wasser trinken. Erbrechen auslösen. Notarzt!

**Nach Kleidungskontakt:** Kontaminierte Kleidung sofort ausziehen.

Helfer auf Selbstschutz achten.

**Ersthelfer:** siehe gesonderten Anschlag

## **Sachgerechte Entsorgung**

Acrylamid-Lösungen nicht in den Ausguß gießen, sondern mit Wasser auf eine Konzentration von 8-10% bringen und in neutralem bis schwach alkalischem Milieu (pH 7-8) portionsweise (max. 50 ml in einem 200 ml Becherglas) im Abzug unter Zugabe von 1 µl 40%iger Ammoniumpersulfatlösung/ml und 0,5 µl Tetramethylethylendiamin/ml über Nacht auspolymerisieren lassen.

---



**11.a Beschreibung des Projektes, der Zielsetzung und der dazugehörigen Arbeitsschritte**

**11.b Risikobewertung**

Hierbei handelt es sich um eine konkrete Bewertung der verwendeten Organismen und übertragenen Gene eines Projektes, durchzuführen **vor Aufnahme der Arbeit** und **in regelmäßigen Abständen**. [weitere Hilfe-  
stellung/Kriterien siehe Anhang I zur GenTSV]

Verwendete Spenderorganismen und deren Risikogruppen:

Gefährdungspotentiale der übertragenen Nukleinsäuren:

Verwendete Vektoren:

Verwendete Empfängerorganismen und deren Risikogruppen:

Erzeugte GVO und deren Risikogruppen:

---

***Datum und Unterschrift der Projektleiterin bzw. des Projektleiters***

Aktenzeichen des Bescheides / Nr. der gentechnischen Anlage: \_\_\_\_\_