

# Isolierung von DNA

Noch vor Jahren antwortete bei einer Umfrage fast die Hälfte der Befragten, dass normale Tomaten keine Gene enthalten. Nach Genen in Äpfeln, Bananen, Orangen oder Zwiebeln wurde nicht gefragt. Aber vermutlich hätten viele ihnen auch keine Gene zugetraut. Dabei brauchen alle Lebewesen Gene: Pflanzen, Tiere, Mikroorganismen und der Mensch. Ohne Gene gäbe es sie alle nicht. Gene sind unsere Erbanlagen, sie bilden die "informativen" Abschnitte auf den DNA-Strängen und sorgen dafür, dass sich Organismen entwickeln. Defekte Gene können krank machen. Sehen kann man Gene nicht, nur mit Hightech-DNA-Analyseverfahren und Computerprogrammen lassen sie sich entschlüsseln. Aber die aus vielen Zellen isolierte DNA kann man tatsächlich mit bloßen Augen sehen. Sie lässt sich mit einfachen Mitteln z.B. aus Früchten herausholen.

## Isolierung von DNA aus verschiedenen Früchten

*Material:*

zur Herstellung der Versuchslösung:

40 ml Spülmittel  
12 g Kochsalz  
360 ml Wasser

zur DNA-Fällung:

Brennspiritus (aus dem Baumarkt) oder  
vergällter Alkohol aus der Apotheke

Früchte

1 mittelgroße Tomate, 1 kleine Zwiebel, 1 halbe Banane, 1 halber Apfel – und andere, falls Ihr probieren wollt, wie sich beispielsweise Kartoffel, Kiwi, Paprika.... verhalten

Zum Experimentieren:

- je Frucht ein Becherglas oder Marmeladenglas, in dem man mit dem Pürierstab arbeiten kann.
- je Fruchttest 2 Reagenzgläser oder alternativ andere hohe, schmale Gläser (Tablettenröhrchen oder Schnapsgläser) - jeweils Doppelbestimmungen zur Reproduktion der Ergebnisse
- Pürierstab
- Wasserbad, Kochplatte
- Eisbad bzw. Kühlschrank
- Kaffeefilter und gegebenenfalls Trichter
- raue Holzstäbchen (z.B. Schaschlikspieße)

*Arbeitsschritte:*

1. Kochsalz in das Spülmittel geben. Mit Wasser auf 400 ml auffüllen.  
Gut rühren, um das Salz aufzulösen.  
Die 400 ml der Spülmittel-Salz-Lösung auf 4 (Becher-)Gläser verteilen (pro Glas 100 ml).

Die Tomate, die Zwiebel, den halben Apfel und die halbe Banane (oder weiteres Obst und Gemüse) in kleine Stücke schneiden und in je eines der Gläser mit der Spülmittel-Salz-Lösung geben.

Etwa 5 Minuten stehenlassen und anschließend mit dem Pürierstab kurz pürieren (5-10 Sekunden).

2. Die Gläser für ca. 15 Minuten in ein etwa 60°C warmes Wasserbad stellen und immer wieder rühren. Nicht kochen!
3. Die Mischungen in einem Eisbad oder alternativ im Kühlschrank (Gläser abdecken!) für einige Minuten abkühlen.
4. Den Zellaufschluss (die gekühlten Mischungen) filtrieren und die Filtrate (die Flüssigkeiten, die durch den Filter durchgehen) in je einem Gefäß auffangen (Trichter sind hierbei hilfreich). Zur Filtration genügen einfache Kaffeefilter.
5. Führt für jedes Filtrat eine Doppelbestimmung durch, um eure Beobachtungen abzusichern!  
In 8 hohen, schmalen Glasgefäßen (am besten Reagensgläser, alternativ auch Schnapsgläser oder ähnliches) eiskalten Brennspritus vorlegen (einige Milliliter; zumindest sollte der Flüssigkeitsstand ca. 4-5 Zentimeter betragen). Dann wird für jede Doppelbestimmung ungefähr die gleiche Menge des filtrierten Zellextraktes vorsichtig zugegeben.
6. Beobachtet, was passiert. Notiert Eure Beobachtungen! Versucht nach ca. 30 Minuten, mit einem Holzstäbchen die entstandene Masse aus dem Glas zu ziehen.

### **Fragen und Antworten:**

1. Was bewirkt das Mixen? Warum darf man nicht zu lange mixen?  
Was bewirkt die Zugabe des Spülmittels?

Um an die in einer Zelle enthaltene DNA heranzukommen, muss zunächst die Zelle aufgebrochen werden. Dies kann durch eine Kombination aus physikalischen und chemischen Effekten erfolgen.

Hierbei wird die Zellwand durch Scherkräfte des Mixers zerstört, während die Lipiddoppelschicht (= Zellmembran) durch die Tenside (oberflächenaktive Verbindungen =

an einer Seite polar an der anderen Seite unpolar) des Spülmittels aufgelöst wird, so dass die DNA aus den Zellen und den Zellkernen frei gesetzt wird.  
Es sollte nicht zu lange gemixt werden, da sonst die DNA geschert („zerissen“) wird.

2. a) Was bewirkt das Erhitzen?

Die thermische Energie unterstützt den Zellaufschluss und denaturiert störende Proteine wie z.B. DNAsen (= DNA abbauende Enzyme). Dieser Vorgang wird auch durch die in der Lösung befindlichen Salzionen unterstützt.

b) Warum sollte man die Dauer der Wärmebehandlung begrenzen?

Eine längere Wärmebehandlung schädigt die DNA. Durch die Abkühlung auf dem Eisbad bzw. im Kühlschrank wird dieses verhindert.

3. Was passiert beim Filtrieren?

Die anschließende Filtration trennt die groben Zelltrümmer und die denaturierten Proteine von der in Lösung bleibenden DNA und den gelösten Proteinen und weiteren gelösten Bestandteilen.

4. Was beobachtet ihr im Einzelnen, nachdem ihr die verschiedenen „Frucht- und Gemüsemischungen“ dem Brennspritus hinzugefügt habt? Gibt es Unterschiede?

Eine schlierig-schleimige Substanz reichert sich in wenigen Minuten in der oberen Schicht an. Bei dem Versuch mit Tomate und Zwiebel kann man die fadenartigen Strukturen der DNA-Fällung besonders gut erkennen.

Die unterschiedliche Zusammensetzung der verschiedenen Gewebe ergibt auch unterschiedlich gute Aufschlüsse der Zellen. Weitere Zellbestandteile wie z.B. Stärke (Kartoffeln) und Pektine (Äpfel) beeinflussen ebenfalls die Konsistenz des Aufschlusses.

5. Was passiert genau? Wie funktioniert die Ethanol-Fällung von DNA?

Bei einer Konzentration von ~ 70% Ethanol wird die Struktur der DNA destabilisiert und sie fällt aus. Diese Destabilisierung erfolgt durch die Verdrängung der stabilisierenden Hydrathülle um die Phosphatreste der DNA. Beim Mischen mit Ethanol entstehen zusätzlich Gasbläschen (stammen aus gelöster und beim Pürieren eingetragener Luft), die letztlich die ausgefällten DNA-Fäden nach oben ziehen.

Da die DNA so ein langes fadenartiges Molekül ist, bildet sie viskose, faserartige Ausfällungen – und läßt sich sehr gut mit einem rauen Holzstäbchen aus dem Glas fischen.

6. Den Nachweis könnt ihr mit einfachen Haushaltsmitteln nicht selbst durchführen. Ihr müsst glauben, dass es sich bei der Ausfällung um DNA handelt.  
Mit welchen Methoden weist man normalerweise DNA nach? Nennt 3 Methoden als Stichwort!

Grundsätzlich sollte zwischen einem generellen Nachweis von Desoxyribonukleinsäure (DNA) und dem Nachweis spezifischer DNA-Abschnitte (Sequenzen) unterschieden werden. Für die meisten wissenschaftlichen Fragestellungen spielt ein allgemeiner Nachweis von extrahierter DNA heutzutage praktisch keine Rolle mehr. Vielmehr interessiert der Nachweis spezifischer DNA Sequenzen, da die Sequenz auch häufig wichtige Rückschlüsse auf die Funktion des durch diese Sequenz codierten Proteins zulässt. Unabhängig davon, mit welchem Ziel die DNA untersucht wird, werden meistens spezifische Färbemethoden verwendet, um sie von anderen chemischen Bestandteilen der Zelle zu unterscheiden.

### 1. Färbemethoden

Eine große Anzahl DNA-spezifischer Färbemethoden wurde über die Jahre für unterschiedlichste Anwendungen entwickelt. So gibt es z.B. Farbstoffe, die Zellwände und -membranen durchdringen können und die DNA in lebenden und/oder toten Zellen färben. Hierbei sind die Bindungsmechanismen an die Doppelhelix der DNA oft sehr unterschiedlich. In den meisten Fällen werden fluoreszierende Farbstoffe verwendet, deren Fluoreszenz durch die Bindung an DNA verstärkt wird und diese so sichtbar macht. Der nach wie vor am häufigsten eingesetzte Farbstoff ist Ethidiumbromid, der allerdings in Tierversuchen stark mutagene (erbgutverändernde) Wirkung gezeigt hat und deshalb mit besonderer Vorsicht eingesetzt werden muss.

Neben dem Färben von DNA macht man sich auch die Tatsache zunutze, dass DNA Licht mit einer Wellenlänge von 260nm absorbiert. So kann z.B. eine DNA Konzentrationsbestimmung in einem Photometer bei der Wellenlänge 260nm erfolgen.

### 2. Sequenzspezifische Methoden

Die sequenzspezifischen Methoden werden eingesetzt, um das Vorhandensein spezieller DNA-Abschnitte nachzuweisen. Auch hierfür wurde eine beträchtliche Anzahl ausgefeilter Methoden entwickelt. Als Beispiele sind drei häufig eingesetzte Methoden genannt:

#### 1. Ein spezifischer Verdau der DNA mittels Restriktionsenzymen

Restriktionsenzyme schneiden DNA-Stränge spezifisch an bestimmten Erkennungssequenzen. Mehrere tausend Restriktionsenzyme mit unterschiedlichen Erkennungssequenzen sind bekannt und viele kommerziell erhältlich. Wählt man eine geeignete Kombination dieser Enzyme, kann man über die Zusammensetzung der verdauten (zerschnittenen) DNA auf deren Zusammensetzung bzw. Sequenz Rückschlüsse ziehen (hierauf beruht z.B. auch das „DNA Fingerprinting“).

## 2. PCR basierte Methoden

Wie schon erwähnt, ist die Polymerase Kettenreaktion (PCR = polymerase chain reaction) zu der molekularbiologischen Methode schlechthin geworden. Sie wird sehr vielseitig eingesetzt. Zum Beispiel kann man mit ihr eine Teilsequenz aus einem kompletten Genom vervielfältigen und durch anschließendes Anfärben nachweisen.

## 3. Hybridisierungsmethoden

Unter Hybridisierung versteht man das spezifische Binden einer DNA-Sequenz an eine komplementäre DNA oder RNA-Sequenz. Diese Technik erlaubt nicht nur den qualitativen Nachweis (=in einer Probe vorhanden oder nicht) einer spezifischen Sequenz, sondern ermöglicht auch, den „Aufenthaltsort“ in einer Zelle oder einem Gewebe zu bestimmen. Hierfür werden sogenannte DNA-Sonden eingesetzt, die spezifisch binden und auf unterschiedliche Arten markiert werden können, um sie wiederzufinden.

## 3. Sequenzierungsmethoden

Die Sequenzierung von DNA-Abschnitten oder sogar ganzer Genome ist mittlerweile möglich und erlaubt die detaillierte Analyse von Genen und Genomen. Die wichtigsten Sequenzierungsmethoden sind die Maxam-Gilbert Sequenzierung und die Sanger-Sequenzierung, wobei die Sanger-Methode mittlerweile zur Standardmethode geworden ist.

### Weiterführende Literatur:

Alberts, B. (Hrsg.); *Molekularbiologie der Zelle*. 1863 Seiten, Wiley-Vch, 2003.

Mülhardt, C.; *Der Experimentator: Molekularbiologie/Genomics*; 280 Seiten, Spektrum Akademischer Verlag, 2003.

Lottspiech, F., Zorbas, H. (Hrsg.); *Bioanalytik*; 1035 Seiten, Spektrum Akademischer Verlag, 1998.