

## DNA-Extraktion aus Zwiebelzellen



### DNA Extraktion

- Isolation von DNA aus Zwiebelzellen.
- Beschreibe Aussehen und physikalische Charakteristika von DNA.
- Stelle die Vorzüge und den biotechnologischen Einsatz dieser Methode heraus und diskutiere die Risiken und Vorteile.

### Was ist Biotechnologie?

Vor der Durchführung eines Projektes, ist wichtig, genau zu wissen, was "Bio-technologie" ist und wozu sie nützt. Der erste Teil des Wortes "Bio" - bedeutet "lebend". Der zweite Teil des Wortes - "Technologie" beschreibt "die praktische Anwendung von Wissen." Biotechnologie kann also als die "praktische Anwendung der erworbenen Kenntnisse aus dem Studium der Lebewesen" definiert werden.

Viele dieser Anwendungen sind nicht neu für uns. Menschen stellen seit Jahrhunderten Lebensmittel, Medikamente und andere Produkte mit einzigartigen Eigenschaften von

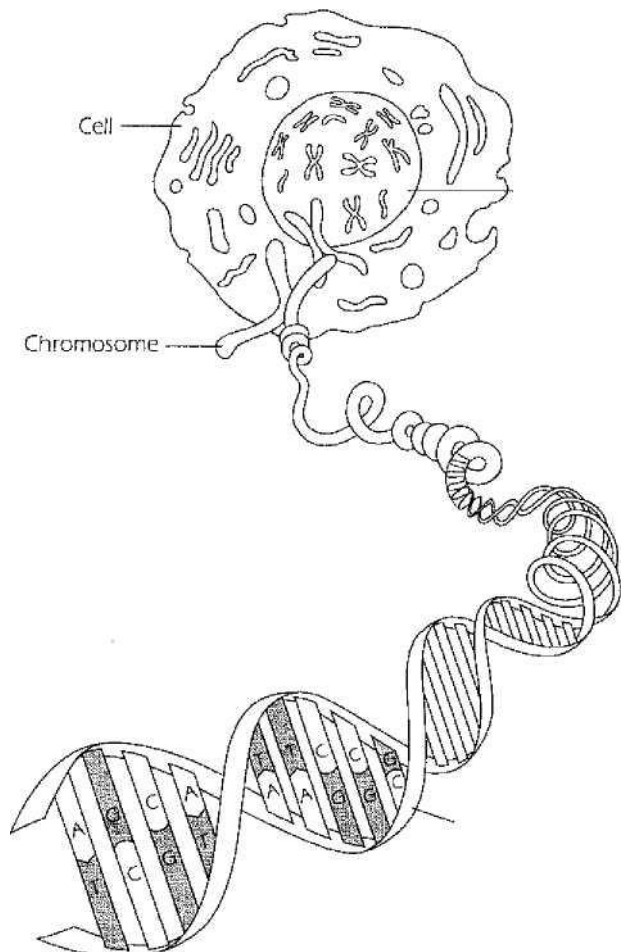
lebenden Organismen her. Schon die alten Ägypter wussten, wie man Wein und Bier aus der Vergärung von Trauben und Körner macht. Seit Jahrhunderten nehmen Menschen bestimmte Eigenschaften von Lebewesen in Anspruch um Käse und Brot herzustellen. Wir haben mittlerweile sogar gelernt, dass es möglich ist durch geschickte Kombination von Merkmalen Kühe zu züchten die mehr Milch geben.

Das vollkommen neue an der Biotechnologie ist unser Verständnis Ihrer Funktion. Die alten Ägypter und frühen Bauern wussten nicht wirklich, wie und warum Fermentation oder selektive Züchtung funktionierte. Sie lernten durch ständiges Probieren. Heute verstehen Wissenschaftler jeden Schritt dieser komplexen biologischen und chemischen Prozesse. Alle Prozesse werden von der Zelle gemäß den Anweisungen die in ihrem genetischen Code verankert sind ausgeführt. Nachdem Wissenschaftler den genetischen Code einer Zelle geknackt haben, können sie die zellulären Funktionen der Zelle derart verändern, dass sie zur Herstellung bestimmter Produkte biotechnologisch genutzt werden können.

Biotechnologie beginnt mit der DNS. DNS ist die Abkürzung für "Desoxyribonukleinsäure". Sie ist in nahezu allen lebenden Zellen zu finden. Keine andere Substanz ist so bedeutend wie die DNA. Sie enthält eine Reihe von chemischen Anweisungen, die zur Kontrolle der Zellaktivität wichtig sind und und ist Träger der kodierten Informationen, die jeden Menschen individuell machen.

Die Suche nach der Quelle der genetischen Information begann vor mehr als einem Jahrhundert. Im Jahre 1868 entdeckte der Schweizer Wissenschaftler Friedrich Miescher eine Methode zur Trennung des Kernes einer Zelle vom Rest der Zelle. Er stellte fest, dass Zellkerne eine Säure enthalten, die er "nuklein" nannte. Dieses Material, das wir heute als "Nukleinsäure" kennen, ist Teil der DNA.

In den 50er Jahren verwendeten Wissenschaftler Chromatographie und Röntgenstrahl-Techniken um ein Modell der DNA zu finden. Sie ist aus Untereinheiten, sogenannten "Nukleotiden" derart zusammengesetzt, dass das resultierende Molekül einer langen, verdrillten Leiter ähnelt. Jeder Holm der Leiter besteht aus alternierenden Zucker-und Phosphat-Einheiten. Die Sprossen der Leiter sind aus Nukleotid-Basen-Paaren.



**Abbildung 1:** Der Kern einer jeden Zelle enthält Chromosomen. Ein Chromosom besteht aus Protein und langen Ketten aneinandergereihten Nukleotidbasen. Dabei werden vier verschiedene Arten von Nukleotiden unterschieden: Guanin (G), Cytosin (C), Thymin (T) und Adenin (A).

Jedes Nukleotid besteht aus dem Zucker Deoxyribose sowie einer Phosphat-Gruppe und einem Stickstoff-Molekül. Zucker- und Phosphat-Moleküle sind in jedem Nukleotid gleich; als Stickstoffbasen existieren vier komplementäre Basen: Adenin (A), Thymin (T), Cytosin (C) und Guanin (G).

Sie lagern sich sehr spezifisch zusammen: Adenin paart mit Thymin, während Cytosin ausschließlich mit Guanin paart. Die Reihenfolge der Nukleotide in einem DNA-Molekül (Sequenz) enthält alle Anweisungen zur Bildung von Aminosäuren und damit auch zum Aufbau von Proteinen. Proteine sind verantwortlich für die reibungslose Funktion der Zelle, da sie die meisten chemischen Reaktionen kontrollieren: Ohne Protein kann unser Körper beispielsweise nicht wachsen. Ein Stück DNA, das alle erforderlichen Informationen zur Herstellung eines Proteins trägt nennt man "Gen".

### **Nähere Betrachtung der DNA – DNA extrahieren**

Jetzt könntest Du denken, dass es unmöglich ist DNS ohne ein Elektronenmikroskop sichtbar zu machen, aber der folgende Laborversuch zeigt Dir, dass es möglich ist. Du wirst DNS extrahieren und ihre physikalischen Eigenschaften untersuchen.

DNS Extraktion ist der wichtigste Schritt bei der Analyse und Veränderung des genetischen Materials. Wissenschaftler extrahieren DNS um genetische Defekte feststellen zu können, um einen genetischen Fingerabdruck oder rekombinante Organismen herzustellen. Die Methode beruht auf den folgenden Schritten:

Zunächst wird die Zellmembran unter Verwendung einer Salz/Detergenzlösung aufgebrochen. Salz rückt die Phosphatenden der DNS näher zusammen und erleichtert so ein Ausfällen der DNS aus der Lösung. Dann wird das Gemisch sanft erhitzt um die Enzyme (DNAsen), welche die DNS in kleine Fragmente spalten zu zerstören, sonst ist es später nicht möglich die DNS aufzurollen (im Laborjargon nennt man diesen Vorgang auch „spoolen“). Damit die DNS ausgefällt werden kann, gibt man eiskaltes Ethanol zu dem Zellgemisch.

## **Sicherheit & Entsorgung**

Befolge immer die von Deinem Lehrer vorgegebenen Sicherheitshinweise. Sie dienen dem Erlernen einer guten Laborpraxis.

Trage immer Schutzbrille und einen Laborkittel zum Schutz von Augen und Kleidung vor Chemikalien bei der Arbeit!

Verwende immer Hitze-Schutzhandschuhe und trage einen Augenschutz beim Umgang mit heißen Flüssigkeiten!

Alle Abfälle können im Ausguss entsorgt werden.

## **Versuch 1**

Herstellung des Zwiebel-Lysates

### **Material**

#### **(je Schüler)**

Handschuhe

Schutzbrille

Laborkittel

#### **(für die gesamte Klasse)**

Becherglas 1L

1 Kaffeefilter

1 Trichter

Wasserbad

Eisbad

3 Zwiebeln

1 Mixer

**Hinweis:** Aus Sicherheitsgründen kann Dein Lehrer die Zwiebel-Lysat Lösung bereits vorbereiten. Die aus drei Zwiebeln hergestellte Lösung ist ausreichend für eine ganze Klasse.

**Achtung:** Trage Schutzbrille, Handschuhe und Laborkittel

### **Schritt 1**

Zerhacke drei Zwiebeln unter der Aufsicht deines Lehrers in mittelgroße Stücke und gib sie in ein 1 L Becherglas.

**Bemerkung:** Sei vorsichtig im Umgang mit scharfen Messern!

### **Schritt 2**

Gib genug Zell-Lysis Puffer zu den Zwiebeln um die Stücke vollständig damit zu bedecken und mixe das Gemisch für 10s in kurzen Impulsen – nicht zu lange mixen, sonst zerstörst Du die DNS.

**Bemerkung:** *Dieser Puffer bricht die Zellmembran auf. Die Salze die darin enthalten sind rücken die Phosphatenden der DNS näher zusammen und erleichtern so das Ausfällen der DNS.*

### **Schritt 3**

Stelle das Becherglas für 10 min in ein Wasserbad, welches Du zuvor auf 55-60°C erhitzt hast.

**Bemerkung:** *Hitze zerstört die Enzyme, welche die DNS in kleine Stücke zerlegen, die DNAsen.*

**Achtung:** Trage immer Schutzbrille, Handschuhe und Laborkittel wenn Du mit heißen Flüssigkeiten arbeitest!

### **Schritt 4**

Kühle das Gemisch für 5 min im Eisbad.

Bemerkung: *Schnelles Abkühlen verhindert, dass die DNS zu stark abgebaut wird (degradiert).*

### **Schritt 5**

Kleide einen Glasrichter mit einem Kaffeefilter aus und filtriere das Zwiebel-Puffer-Gemisch. Du kannst die so erhaltene Zwiebel-Lösung entweder bis zur weiteren Verwendung im Eisbad aufbewahren oder in 10ml Portionen einfrieren.

### **Schritt 6**

Wasch Deine Hände und entsorge alle Materialien wie von Deinem Lehrer ange-wiesen.

## **Versuch 2**

Extraktion von DNS aus Zwiebel-Lysat

### **Material**

#### **(je Schüler)**

Laborkittel

Schutzhandschue Schutzbrille

DNS spooler (Zahnstocher oder Glasstab)

3 ml EtOH, 95%, eiskalt !!!

10 ml Zwiebel-Lysat

1 Plastikpipette

1 Falcon

**Achtung:** Trage Schutzbrille, Handschuhe und Laborkittel

### **Schritt 1**

Gib 10 ml des Zwiebel-Lysates in ein Falcon.

### **Schritt 2**

Verwende eine Pipette um 500 µl Protease-lösung zu dem Lysat zu pipettieren und mische vorsichtig durch invertieren (nicht schütteln, sondern langsam das Falcon auf den Kopf stellen und wieder in die Ausgangsposition bringen)

**Bemerkung:** Proteasen bauen verbleibende Proteine ab und helfen Dir so sehr reine DNS zu extrahieren.

### **Schritt 3**

Nimm das Falcon schräg in eine Hand. Wichtig ist, dass Du die 3 ml eiskaltes (aus dem Gefrierschrank!!!) EtOH ganz, ganz langsam in das Falcon fließen lässt. Es bildet sich sofort eine Grenzschicht zwischen Zwiebel-Lysat und Alkohol. Warte 2-3min ab. Die DNS präzipitiert an der Grenzfläche zwischen Lysat und Alkohol. Bei genauem Hinsehen kannst Du sie als graue Grenzphase erkennen.

### **Schritt 4**

Mit einem Zahnstocher oder einem Glasstab kannst Du nun die DNS "spoolen". Dazu tauchst Du vorsichtig in die Grenzschicht ein und versuchst die Fäden, die sich mittlerweile gebildet haben "aufzuwickeln" – ähnlich wie beim Spaghettie-essen. Es braucht etwas Übung um die DNS zu fischen ohne sie in Stücke zu reißen.

### **Schritt 5**

Schau Dir Deine DNS genau an und versuche sie zu beschreiben. Welche Farbe hat sie? Welche Konsistenz?

### **Schritt 6**

Wenn Du magst, kannst Du Deine DNS in ein kleines Eppendorf-Gefäß geben und aufbewahren.

1. Versuche mit eigenen Worten zu beschreiben was DNS ist!
2. Kennst Du andere Materialien die sich ähnlich verhalten?
3. Welche Funktion hat die DNS?

4. Wodurch wird die DNS in einer Pflanzen-zelle geschützt?
4. Was passiert mit der Pflanzenzelle bei Zugabe der Zell-Lyse-Lösung?
5. Wie kannst Du feststellen ob das von Dir extrahierte Material tatsächlich DNS ist?

### **Literaturverzeichnis**

Sherrow, Victoria. James Watson and Francis Crick: Decoding the Secrets of DNA. Woodbridge, CT: Blackbirch Press, 1995.

Lee, Thomas. Gene Future: The Promise and Perils of the New Biology. New York: Plenum, 1993.

Rainisand Nassis. Biotechnology Projects for Young Scientists. Danbury,CT: Franklin Watts, 1998.

Lampton, Christopher. DNA Fingerprinting. New York: Franklin Watts, 1991.

### **Lösungsschlüssel**

1. Beschreibe mit eigenen Worten zu was DNS ist!

DNS ist ein Makromolekül mit hohem Molekular-gewicht.

2. Kennst Du andere Materialien die sich ähnlich verhalten?

Sie besitzt eine Viskosität und Elastizität vergleichbar mit Honig oder Ahornsirup.

3. Welche Funktion hat die DNS?



DNA ist in fast allen lebenden Zellen zu finden. Die Abkürzung steht für „Desoxyribonukleinsäure“. Es gibt keine Substanz, die ähnlich bedeutend ist wie unsere DNS. Sie trägt die chemischen Anweisungen zur Kontrolle unserer Zellen und deren Aktivität. Außerdem ist in ihr die genetische Information enthalten die jeden von uns zum Individuum macht.

#### 4. Wodurch wird die DNS in einer Pflanzen-zelle geschützt?

Pflanzenzellen sind von einer Zellwand umgeben und die Kern-DNS wird zusätzlich von einer Kern-Membran geschützt.

#### 4. Was passiert mit der Pflanzenzelle bei Zugabe der Zell-Lyse-Lösung?

Der Zell-Lyse-Puffer bricht die Zellwand und die Kern-Membran der Zelle auf und erleichtert so ein präzipitieren der DNS.

#### 5. Wie kannst Du feststellen ob das von Dir extrahierte Material tatsächlich DNS ist?

Das extrahierte Material kann gelelektro-phoretisch getrennt werden oder die DNS kann mit einem Farbstoff angefärbt werden – dazu verwendet man Farbstoffe die mit der DNS interkalieren, d.h. sie lagern sich in das Leiter-gerüst der DNS.