



Nukleinsäuren I

S II

DNA-Extraktion aus Pflanzenzellen

Grundlagen:

Dies ist eine grobe Methode, um DNA aus pflanzlichem Gewebe zu isolieren – sie zeigt die Grundprinzipien der DNA-Extraktion aus Geweben.

Das Gewebe wird zunächst mechanisch zerkleinert, danach werden die Zell- und Kernmembranen durch die Tensidwirkung eines Haushaltsreinigers zerstört. Beim Filtrieren bleiben die Zellreste im Filtrerrückstand, die Nukleinsäuren gelangen durch die groben Poren eines Kaffeefilters ins Filtrat. Um Nukleinsäuren aus wässrigen Lösungen zu fällen, muss ihnen die Hydrathülle entzogen werden. Dies gelingt mithilfe von eiskaltem Spiritus oder Ethanol. Ohne Hydrathülle lagern sich die langen DNA-Moleküle aneinander oder sie verknäueln sich. Die jetzt unlösliche DNA ist in Form von weißlichen Fäden sichtbar.

Die DNA-Fällung kann bei Raumtemperatur oder bei -20 °C erfolgen. Dabei gilt: Je höher die Temperatur, desto geringer ist die Ausbeute.

Die hohe Kochsalzkonzentration begünstigt die DNA-Ausfällung, indem die Na^+ -Ionen die negativen Ladungen der DNA-Moleküle neutralisieren.

Materialien: Kaffeefilterpapier, Trichter, Messer, Glasstab, 50-mL-Messzylinder, Mörser mit Pistill, Tropfpipette, 3 Reagenzgläser, Reagenzglasständer, Schneideunterlage, eventuell Gabel.

Banane (oder Kiwi, Tomate, Zwiebel, etc.), Extraktionspuffer, eiskalter Spiritus, Schiffs Reagenz (Fuchsin/Schweflige Säure) oder evtl. Toluidinblau ($w = 1\%$).

Durchführung:

1. Eine Drittel Banane (Kiwi, Tomate, Zwiebel) mit der Gabel zerdrücken und im Mörser bei Bedarf etwas zerreiben.
2. 30 mL Extraktionspuffer dazugeben (15 mL bei Kiwi).
→ Pufferzusammensetzung:
 - 44 g Natriumcitrat-dihydrat
 - 8,8 g Kochsalz
 - 100 mL Spülmittel (kein Konzentrat!)
 - mit dest. Wasser auf einen Liter auffüllen
3. Das Gemisch 5 – 10 min lang bei Zimmertemperatur stehen lassen.
4. Den Inhalt des Mörsers mindestens 5 min lang gut zerreiben.
5. Die erhaltene Suspension durch einen Kaffeefilter in ein Reagenzglas filtrieren
→ Filtrat.
6. Ein zweites Reagenzglas ca. 2 cm hoch mit diesem Filtrat füllen.
7. Das Reagenzglas schräg halten und mithilfe einer Tropfpipette etwa die gleiche Menge eiskalten Spiritus langsam hineinfließen lassen, damit 2 Phasen entstehen.

Die nun unlösliche DNA wird an der Grenzschicht zwischen beiden Phasen ausgefällt und ist dann in Form weißlicher Fäden sichtbar.

8. Nach dem Isolieren kann die DNA mit Schiffs Reagenz oder mit Toluidinblau angefärbt werden – vorher wird die Flüssigkeit am besten abdekantiert. Der Nachweis ist positiv, wenn sich die feste Masse nach Zugabe von Wasser nicht mehr entfärben lässt.

Hinweise und Variationen:

Kiwis enthalten mehr *Proteasen* als die anderen oben genannten pflanzlichen Gewebe, so dass die DNA nach der Fällung ohne allzu viele Eiweißverunreinigungen vorliegen.

Um die DNA von eventuell mitgefällten Proteinen zu trennen, kann man vor Schritt 7 einige Tropfen einer Protease-Lösung (z.B. Papain, enzymhaltiges Waschmittel) oder einige Milliliter frischen Ananassaft (enthält auch Proteasen) zugeben.

Bananen sind für die DNA-Extraktion sehr gut geeignet. Allerdings wird das Filtrat und damit die DNA infolge der enzymatischen Wirkung der Phenoloxidase relativ schnell bräunlich. Ersetzt man im Extraktionspuffer das Natriumcitrat durch Citronensäure, erhält man eine sehr schön weiße DNA.

Nachweismethoden von Nukleinsäuren (schulisch)

Anfärben von DNA:

Mit dem Schiffs Reagenz (Fuchsin/Schweflige Säure) erfolgt nach saurer Hydrolyse die Bildung eines rotvioletten Farbstoffes.

In der Histologie dient das Schiffs Reagenz bei der Feulgen-Färbung zur selektiven Anfärbung der Zellkerne in Gewebeschnitten. Es handelt sich um eine Farbreaktion mit der DNA.

Saure Hydrolyse der DNA und Nachweis von Hydrolyseprodukten:

Phosphatnachweis: Die DNA wird mit salpetersaurer Ammoniummolybdat-Lösung versetzt und 5 Minuten lang im kochenden Wasserbad erhitzt → gelber Niederschlag.

Fehling-Reaktion: Die DNA wird in verdünnter Schwefelsäure etwa 5-10 Minuten lang im kochenden Wasserbad erhitzt. Anschließend wird das Hydrolysat durch Zugabe von NaHCO_3 neutralisiert und die Fehling-Reaktion durchgeführt → rotbrauner Niederschlag.

Lit.: Bayrhuber H., Gliesche, C.G, Lucius, E.R.: DNA-Isolierung mit einfachen Mitteln. UB 151, Jan. 1990, 44

Braun, G. et al: DNA-Extraktion aus Tomaten oder Bananen

- <http://www.osa.s.bw.schule.de/gym/biologie/ARBEITSB/dna01.htm>

- <http://www.oberschulamt-stuttgart.de> (→ Regionale Lehrerfortbildungen Biologie → Biochem. Versuche)

EIBE European Initiative for Biotechnologie Education 1997: Unit 1: Microorganismen und Moleküle, 12-13

Jungbluth, A.: BioTech mobil, PdN-Ch. 4/47. Jg. 1998, 28-31

Krotscheck, F.: Biotechnologie – Vorbereitungspraktikum. Int. Gesamtschule Heidelberg 1998/99, 4-7

H.K.Schuster: DNA-Hydrolyse, persönliche Mitteilungen, Schlossgymnasium Künzelsau, 2003

Gerhard Braun, Gymnasium bei St. Michael Schwäbisch Hall, Tüngentaler Str. 92, 74523 Schwäbisch Hall; mail@braun-sha.de; März 2003