

DNA-Extraktion aus Tomate



I. Erläuterung

DNA (Desoxyribonukleinsäure) ist die in den meisten Organismen vorkommende Erbinformation. Obwohl die DNA in einer Zelle etwa 10.000 Mal so lang ist wie die Zelle selbst, beansprucht sie doch nur 10 % des Zellinnenraums. Die DNA nimmt nur deshalb einen so geringen Platz innerhalb der Zelle ein, weil sie stark gefaltet und mit Proteinen zusammen in komplexe Einheiten gepackt ist, die als Chromosomen bezeichnet werden. Mit diesem Verfahren wird chromosomale DNA aus einer gewöhnlichen Tomate extrahiert. Dazu wird die Tomate zuerst in einen Mixer gegeben, um die festen Pflanzenzellwände aufzubrechen. Im nächsten Schritt werden dann die Zellmembranen zerstört. Zellmembranen bestehen aus Proteinen und Fetten. Genauso wie ein Detergens (z. B. Spülmittel) Fett in einer Bratpfanne löst, lassen sich auch Zellmembranen durch den Zusatz von ein wenig Detergens auflösen. Diesen Vorgang Zellen aufzubrechen, nennt man Lyse. Die Schüler verwenden bei diesem Verfahren ein Heißwasserbad und eine Zellyselösung (Cell Lysis Solution) auf Detergensbasis, um die Zellmembranen der Tomate aufzulösen. Bei der Auflösung der Zellmembranen fließt der Zellinhalt aus und bildet eine Suppe aus DNA, anderen Nukleinsäuren, zerstörten Membranen, Zellproteinen und weiteren Inhaltsstoffen. Es ist nicht notwendig, hoch reine DNA herzustellen, da die Aufgabe nur darin besteht, diese sichtbar zu machen. Die DNA, die die Schüler aus der Zellsuppe isolieren, ist daher unrein und enthält zelluläre Proteine sowie weitere Zellbruchstücke. Um die DNA sichtbar zu machen, geben die Schüler eine DNA-Präzipitationslösung (DNA Precipitation Solution) auf Alkoholbasis zu der Zellsuppe hinzu. Da die DNA in Alkohol nicht löslich ist, wird sie präzipitieren (ausfallen) und es bildet sich eine „weiße Wolke“ aus feinen, zähen Fasern. Die DNA kann dann auf ein Holzstäbchen aufgewickelt und genauer betrachtet werden. Dieses Verfahren ist bekannt als das Aufspulen der DNA. Dieses Praktikum eignet sich für wissenschaftliche Anfänger.

II. Materialien

Das Reagenssystem enthält alle erforderlichen Reagenzien, um chromosomale DNA aus Tomaten mit Hilfe des nachfolgenden Verfahrens zu reinigen. Die Materialien sind ausreichend für 15 Einzelpräparationen und werden ausschließlich zur Verwendung mit diesem Kit bereitgestellt. Die Carolina Biological Supply Company übernimmt keine Verantwortung, wenn diese Materialien zu anderen Zwecken benutzt werden.

Das Kit beinhaltet die folgenden Materialien:

- ° Zell-Lysepuffer (10x konzentriert), 40ml, 2 Stück
- ° Proteasegemisch, 500mg, 1 Stück
- ° Flachbodenröhrchen (50ml Volumen), 15 Stück
- ° Trichter: 5 Stück
- ° Holzstäbchen, 15 Stück
- ° Schüler-Arbeitsblatt als Kopiervorlage: 1 Stück
- ° Lehrerhandbuch: 1 Stück

Achtung: Alle Materialien können bei Raumtemperatur gelagert werden. Vor jeder Verwendung des 10x konzentrierten Zell-Lysepuffers das Röhrchen kräftig schütteln, so dass das Salz darin gleichmäßig verteilt ist, wenn eine Teilmenge entnommen wird.

Materialien, die benötigt werden, aber nicht enthalten sind:

- ° Mittelgroße Tomate, gelb oder weiß (pro Präparation)
- ° Messer und Schneidebrett
- ° 45 ml Wasser (pro Präparation)
- ° Mörser [**Artikelnummer: 200.0114**]
- ° Thermometer (um die Temperatur des Wasserbads zu prüfen) [**Artikelnummer: 200.0334**]
- ° Großer Wasserbehälter (60 – 65 °C)
- ° Eis

III. Zeitaufwand

Dieses Verfahren ist sehr einfach. Es bedarf nur einer minimalen Vorbereitung und kann

in einem Praktikum abgeschlossen werden.

30 min: Wasserbad auf 60—65 °C einstellen, DNA Precipitation Solution auf Eis kühlen und Schülerarbeitsplatte vorbereiten

40 min: Tomaten verflüssigen und Zellen lysieren

5 min: DNA extrahieren und aufspulen

IV. Praktikumsvorbereitung

Erhitzen Sie einen großen Behälter mit Wasser auf 60—65 °C.

Vorbereiten der Schülerarbeitsplätze

Legen Sie eine Tomate und ein konisches 50-ml-Röhrchen an jeden Schülerarbeitsplatz. (Sie können die Tomate, wenn Sie möchten, vorab schon zerkleinern. Falls Sie dies nicht tun, brauchen die Schüler Materialien, um die Tomate zu schneiden). Die Schüler müssen Zugang zu einem Mixer haben, um Ihre Tomaten aufzuschließen. Mit dem konischen 50-ml-Röhrchen können die Schüler 60 ml Wasser abmessen und zu der Tomate im Mixer hinzugeben. Geben Sie in jedes 15-ml Röhrchen 7 ml der Cell Lysis Solution, beschriften Sie die Röhrchen und stellen Sie jeweils ein solches Röhrchen an jeden Schülerarbeitsplatz. Geben Sie 14 ml der DNA Precipitation Solution in die Teströhrchen, beschriften Sie diese und stellen Sie je ein Röhrchen auf Eis an die Schülerarbeitsplätze. Legen Sie auch einen Filter und ein Holzstäbchen an jeden Arbeitsplatz.

V. Laborverfahren

- Eine mittelgroße Tomate schälen, fein zerkleinern und mit 50 ml Zell-Lysepuffer (1x konzentriert) mörsern bis eine feine Tomatesuspension entsteht (auch portionsweise möglich, falls die Mörserschale zu klein ist)
- Tomatesuspension in ein Becherglas überführen und ca. 10 Körnchen Proteasemischung hinzugeben, vermischen und für 15 Min. bei ca. 60°C inkubieren.
- Anschließend Suspension im Eisbad herunterkühlen.
- Den Trichter mit dem Papierfilter in das 50 ml Röhrchen setzen und ca. 20ml der heruntergekühlten Tomatesuspension filtrieren
- Das Röhrchen mit dem Filtrat wird nun schräg gehalten und vorsichtig einige Milliliter eiskaltem Ethanol (oder Isopropanol) hinzugeben, so dass sich der Ethanol nicht mit der Tomatesuspension vermischt.
- Die DNA fällt in der Ethanolphase bzw. an der Grenzfläche zur unteren wässrigen Phase aus und kann mit einem Holzstäbchen vorsichtig aufgewickelt werden.

DNA-Extraktion aus Tomate

Name: _____

Klasse: _____**Datum:** _____

Einleitung

DNA (Desoxyribonukleinsäure) ist die in den meisten Organismen vorkommende Erbinformation. Obwohl die DNA in einer Zelle etwa 10.000 Mal so lang ist wie die Zelle selbst, beansprucht sie doch nur 10 % des Zellinnenraums. Die DNA nimmt nur deshalb einen so geringen Platz innerhalb der Zelle ein, weil sie stark gefaltet und mit Proteinen zusammen in komplexe Einheiten gepackt ist, die als Chromosomen bezeichnet werden. Mit diesem Verfahren wird chromosomale DNA aus einer gewöhnlichen Tomate extrahiert. Dazu wird die Tomate zuerst in einen Mixer gegeben, um die festen Pflanzenzellwände aufzubrechen. Im nächsten Schritt werden dann die Zellmembranen zerstört. Zellmembranen bestehen aus Proteinen und Fetten. Genauso wie ein Detergens (z. B. Spülmittel) Fett in einer Bratpfanne löst, lassen sich auch Zellmembranen durch den Zusatz von ein wenig Detergens auflösen. Den Vorgang Zellen aufzubrechen, nennt man Zellyse. Sie verwenden bei diesem Verfahren ein Heißwasserbad und eine Zellyselösung (Cell Lysis Solution) auf Detergensbasis, um die Zellmembranen der Tomate aufzulösen. Bei der Auflösung der Zellmembranen fließt der Zellinhalt aus und bildet eine Suppe aus DNA, anderen Nukleinsäuren, aufgelösten Membranen, Zellproteinen und weiteren Inhaltsstoffen. Es ist nicht notwendig, hoch reine DNA herzustellen, da die Aufgabe nur darin besteht, diese sichtbar zu machen. Die DNA, die Sie aus der Zellsuppe isolieren, ist

daher unrein und enthält zelluläre Proteine sowie weitere Zellbruchstücke. Um die DNA sichtbar zu machen, geben Sie eine DNA-Präzipitationslösung (DNA Precipitation Solution) auf Alkoholbasis zu der Zellsuppe hinzu. Da die DNA in Alkohol nicht löslich ist, wird sie präzipitieren (ausfallen) und es bildet sich eine „weiße Wolke“ aus feinen, zähen Fasern. Zu diesem Zeitpunkt können Sie die DNA auf ein Holzstäbchen aufwickeln und sie genauer betrachten. Dieses Verfahren ist bekannt als das Aufpulen der DNA.

Versuchsanleitung

Eine grob zerschnittene mittelgroße Tomate in den Mixer geben. 60 ml Wasser zugeben (das konische 50-ml-Röhrchen kann dazu als Messgefäß benutzt werden). 30 s bei niedriger Geschwindigkeit mixen, um die Tomate aufzuschließen. 10 s mixen, um die Tomate zu verflüssigen; pausieren und auf grobe Partikel prüfen; falls nötig, nochmals mixen. Schritt 4 zweimal wiederholen; die Tomate sollte nun verflüssigt sein. 7 ml der Tomatemischung in das Röhrchen geben, welches bereits 7 ml der Cell Lysis Solution enthält; den Inhalt durch Umdrehen des Röhrchens mischen. *Nicht schütteln.*

Fr 15 min. in ein Wasserbad mit 60 – 65 °C stellen; es ist wichtig, dass die Temperatur über 60 °C, aber unter 70 °C liegt. Eine Temperatur über 60 °C wird benötigt, um die Enzyme zu zerstören, die die DNA abbauen. Filter in 50-ml-Röhrchen einlegen; langsam die lysierte Tomatemischung über den Filter gießen und das klare, pinkfarbene Filtrat (gefilterte

Flüssigkeit) in das Röhrchen tropfen lassen. Vorsichtig ein entsprechendes Volumen der eiskalten DNA Precipitation Solution über das Filtrat, das sich am Boden des Röhrchens befindet, schichten.

Vorsicht: Die DNA kann nicht aufgespult werden, wenn sich die DNA- Präzipitationslösung mit dem Filtrat vermischt. Das Röhrchen sollte in einem leichten Winkel gehalten und die Präzipitationslösung so zugegeben werden, dass sie langsam an der Innenseite des Röhrchens abläuft, damit sie nicht direkt in das Filtrat hineintropft.

Die klare DNA Precipitation Solution wird sich oben in der Mischung abscheiden. Das klare pinkfarbene Filtrat wird sich am Boden des Röhrchens befinden und die DNA aus der Tomate sollte an der Grenzfläche der DNA Precipitation Solution und dem Filtrat vorliegen.

Die DNA erscheint als eine Wolke aus feinen, viskosen Fäden.

Die DNA wird zur genaueren Untersuchung mit Hilfe des Holzstäbchens aufgespult. Dazu das Holzstäbchen in das Röhrchen knapp unter die DNA-Wolke einführen; das Stäbchen drehen und dabei vorsichtig zwischen der DNA und dem pinkfarbenen Filtrat am Boden des Röhrchens vor- und zurück bewegen. Bitte darauf achten, dass die Schichten nicht vermischt werden. Die DNA sollte sich dann um das Holzstäbchen legen wie Garn um eine Spule.