

Versuch: Präparation von DNA aus Zwiebel oder Tomate

Einleitung

Die Präparation von DNA aus Kalbsthymus ist ein klassischer Schulversuch, allerdings ist ein Thymus nicht immer einfach zu besorgen. Ein anderes oft verwendetes Ausgangsmaterial sind Bakterien, von denen allerdings über Nacht eine Kultur angesetzt werden muss. Die Zwiebel ist dagegen, wie die Tomate, ein alter Bekannter im Biologieunterricht und überall schnell zur Hand. Das folgende Protokoll kostet nur etwa 30 Minuten Zeit, kommt ohne kostspielige Geräte aus und kann in mehreren Kleingruppen parallel durchgeführt werden.

Das Experiment hat jedoch einen „Kurzschluss“ der bei geschickter Unterrichtsgestaltung ausgenutzt werden kann, um kritisches wissenschaftliches Arbeiten zu erläutern: in den meisten Fällen endet das Experiment mit der Sichtbarmachung mehr oder weniger fädigen Materials, das als DNA bezeichnet wird. Die Identität des Material wird selten hinterfragt. Die hier beschriebene Erweiterung des Experiments zeigt, dass nur ein kleiner Teil dieses Materials tatsächlich DNA ist.

Überblick

Eine Zwiebel wird fein gewürfelt, oder eine Tomate wird enthäutet und das wässrige Innere entfernt. Die Zellwände und Membranen der Zellen werden dann durch eine isotonische, gepufferte, stark spülmittelhaltige Extraktionslösung teilweise aufgelöst bzw. geschwächt. Hitze (60°C) und eiweißabbauende Enzyme (Proteasen), die in jedem Feinwaschmittel enthalten sind, beschleunigen diesen Prozeß. Durch eine kurze Homogenisierung im Mixer werden alle Zellen aufgebrochen und die Bestandteile im Extraktionspuffer aufgelöst. Nach einer Grobfiltration durch Verbandsmull wird die DNA mit Isopropanol ausgefällt.

Benötigte Materialien

- Zwei 250 ml Bechergläser oder Erlenmeyerkolben weite Form
- Eine große Zwiebel, fein gewürfelt oder eine Tomate, enthäutet und entkernt
- Extraktionspuffer: 8,8 g NaCl (0,15 M)
44,1g *tri*-Natriumcitrat-Dihydrat (0,15 M)
100 ml Geschirrspülmittel (möglichst farblos)
Mit dest. Wasser auf 1L auffüllen
- Wasserbad 60°C
- Eiswasser
- Haushaltsmixer, z.B. Krupps Zauberstab
- Trichter
- 5 Lagen Mull ca. 10x10 cm je nach Trichtergröße
- Reagenzglas mit Stopfen oder Falconröhrchen
- 3 Messpipetten 5 ml und Peleusball
- Isopropanol, eisgekühlt



Arbeitsanweisungen

1. 50 g fein gewürfelte Zwiebel oder vorbereitete Tomate (s.o.) in ein 250 ml Becherglas geben, mit 40 ml Extraktionspuffer und einigen Körnern Feinwaschmittel versetzen und für 15 min in ein 60°C Wasserbad stellen. Am Ende ist die Lösung hoch viskos.
2. Anschließend das Becherglas für 10 min in einen Behälter mit Eis stellen.
3. Die Mixtur wird dann für ca. 1 min mit einem Haushaltsmixer homogenisiert (falls möglich direkt im Becherglas mit einem Mixstab oder ggf. umschütten in ein Gefäß, das für den verwendeten Mixer geeignet ist). Die Lösung schäumt stark auf.
4. Der "Schaum" wird durch 5 Lagen Mull in ein frisches Gefäß filtriert.
5. 1,5 ml dieses u.U. leicht trüben Filtrats werden in einem Reagenzglas mit 1,5 ml Wasser verdünnt, um eine möglichst klare Lösung zu erhalten. Anschließend wird die DNA durch Zugabe von 5 ml eiskalten Isopropanols ausgefällt. Dazu wird das Reagenzglas mit dem Stopfen verschlossen bzw. das Falconröhrchen verschraubt und vorsichtig mehrfach auf den Kopf gestellt. Die DNA bildet einen fädigen großvolumigen Niederschlag, der als "Wolke" zur Oberfläche aufsteigt, nachdem das Reagenzglas auf den Kopf gestellt worden ist. Alternativ kann man man Isopropanol vorsichtig am Reagenzglasrand herablaufen lassen. Es bilden sich zunächst zwei Phasen (Alkohol oben, wässrige Phase unten), die DNA fällt an der Grenzfläche aus. Mit einem dünnen Glasstab (z.B. abgeschmolzene Pasteurpipette) kann die DNA aus dieser Grenzfläche heraus aufgewickelt werden. Die beiden Phasen werden nach und nach weiter vermischt und mehr und mehr DNA wickelt sich um den Glasstab.

Erweiterung:

Das Experiment kann fortgesetzt werden, um zu prüfen, ob es sich tatsächlich um DNA handelt. Dazu wird der Glasstab mit dem aufgewickelten Material einmal in ein Reagenzglas mit 70% Ethanol getaucht. Man kann Schlieren um den Glasstab beobachten, das sichtbare Material geht jedoch nicht in Lösung. Die „DNA“ wird dann für ca. 10 min an der Luft getrocknet und der Glasstab in ein Gefäß (Eppendorf) mit 200µl Wasser gestellt (wenn vorhanden ist es besser, statt Wasser 20mM Tris, pH 7 zu nehmen). Es kann länger dauern, bis die DNA in Lösung geht. Man sollte mindestens 15 min den vorsichtig Glasstab im Wasser bewegen oder ihn bis zum nächsten Tag im Wasser stehen lassen. Dann werden jeweils 10µl der Lösung in drei Eppendorfgefäße gegeben. Eine Probe bleibt unbehandelt, zu einer wird 1µl RNaseA gegeben und zur dritten RNaseA, einen Restriktionspuffer und ein Restriktionsenzym. Wenn möglich kann eine vierte Probe mit DNase behandelt werden. Nach einer Stunde bei 37°C werden jeweils 5µl Probenpuffer („Blaupuffer“) zu den Ansätzen gegeben, die Proben werden auf ein 1% Agarosegel aufgetragen (s. Versuch 2) und für 30 min. bis 60 min. bei 100V elektroforetisiert.

Während in der ursprünglichen Präparation sowohl DNA (eine hochmolekulare Bande) als auch RNA (ein mehr oder weniger kräftiger Schmier mit geringerem Molekulargewicht)



sichtbar sind, verschwindet der Schmier nach der RNase-Behandlung. Nach dem zusätzlichen Restriktionsverdau sieht man, dass die DNA geschnitten wurde und es viele kleinere Fragmente gibt, die jedoch wegen ihrer Größenheterogenität nicht als einzelne Banden erkennbar sind.

Bei einer DNase-Behandlung sollte die schwächere, hochmolekulare Bande verschwinden, der heterogene Schmier weiter unten im Gel jedoch erhalten bleiben. Allerdings sind die käuflichen DNasen meist nicht frei von RNase (Ausnahme: einige sehr teure Präparate). Deshalb kann in den DNase-behandelten Proben das ganze Material verschwunden sein.

