

6 NUKLEINSÄUREN

Nukleinsäuren sind Polynukleotide, wobei jedes Nukleotid sich aus einem Phosphat, einer Ribose (RNA) oder Desoxyribose (DNA) und einer Purin- oder Pyrimidin-Base zusammensetzt. Die einzelnen Nukleotide sind durch Phosphodiesterbindungen miteinander verknüpft.

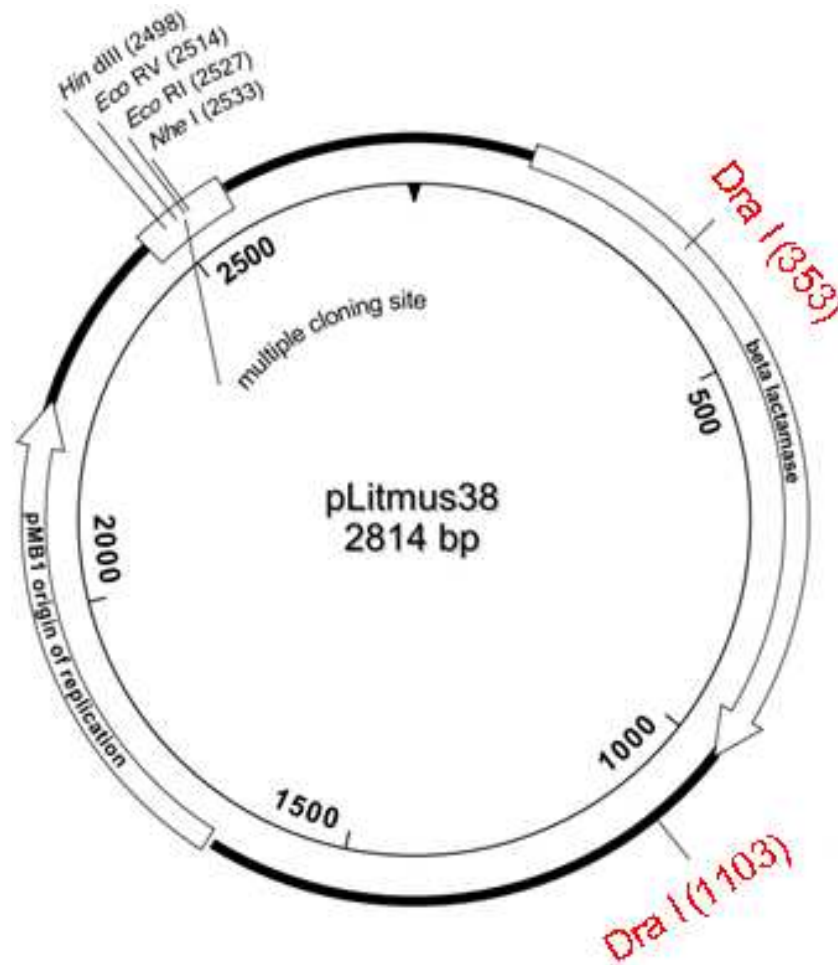
Nukleinsäuren kommen in Form der DNA (Desoxy-Ribonukleinsäure) und RNA (Ribonukleinsäure) vor. Die DNA ist der Träger der Erbinformation, während die verschiedenen RNAs an der Umsetzung der Erbinformation beteiligt sind.

Die DNA besteht aus zwei Polynukleotid-Strängen, die über Wasserstoffbrücken, die sich zwischen den Basen der gegenüberliegenden Nukleotide ausbilden, zusammengehalten werden. Durch die schraubenförmige Verwindung der beiden Polynukleotid-Stränge entsteht das charakteristische Bild der Doppelhelix.

Eine bestimmte Nukleotidsequenz der DNA, welche für die Aminosäuresequenz eines Proteins codiert, wird als Gen bezeichnet. Ein Gen kann viele tausend Nukleotide lang sein. Das Genom eines Organismus ist somit die Summe der genetischen Information eines Organismus. Man spricht dementsprechend von genomischer DNA. Bakterien besitzen darüber hinaus noch kurze, zirkuläre und sich autonom replizierende DNA-Moleküle, die als Plasmide bezeichnet werden.

In diesem Versuch wird ein kommerzielles Plasmid (pLitmus38[®], Firma: NEB, siehe Abbildung) eingesetzt.

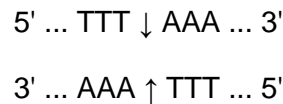
Solche Plasmide besitzen einen Replikationsursprung (origin of replication, Ori), Funktionsgene zur Selektion (z.B. Beta-Lactamase) und können desweiteren singuläre aber auch mehrfache Erkennungssequenzen für Restriktionsendonukleasen aufweisen. pLitmus38 besitzt eine Größe von 2814 bp und weist singuläre Restriktionsstellen für z.B. HindIII und EcoRV (multiple cloning site, MCS) und zwei Restriktionsstellen für **DraI** auf (siehe folgende Abbildung).



In dem durchzuführenden Versuch wird genomische DNA mit Hilfe eines kommerziellen Kits aus Vollblut (v. Schlachthof) isoliert. Dabei werden Zellen unter denaturierenden Bedingungen lysiert und danach die DNA an eine Silikatmatrix gebunden. Zellbestandteile, z.B. Proteine und andere Kontaminationen können durch „Waschen“ mit Puffer einfach entfernt werden. Die so gereinigte DNA wird darauf mit einem Nidrigsalzpuffer eluiert.

Die Konzentration von Nukleinsäuren kann photometrisch bestimmt werden. Hierbei wird die Extinktion einer DNA-Lösung bei 260 nm gemessen. Eine Extinktion von 1 entspricht einer Konzentration von 50 µg/ml DNA. Der Quotient von 260/280 gibt die Reinheit der DNA-Präparation an und sollte bei 1,8 liegen. Niedrigere Werte weisen auf eine Kontamination, beispielsweise mit Proteinen, hin.

In dritten Teil dieses Versuches wird sowohl die genomische als auch plasmidäre DNA mit der Restriktionsendonuklease Dral „geschnitten“. Enzyme, die die Phosphodiesterbindung der DNA sequenzspezifisch hydrolytisch spalten und somit die DNA „schneiden“, nennt man Restriktionsendonukleasen. Das Enzym Dral erkennt die folgende spezifische Sequenz



und „schneidet“ den DNA-Doppelstrang ohne überhängende Enden zu generieren („blunt end“).

DNA lässt sich auf Agarose-Gelen elektrophoretisch auftrennen. Bei entsprechendem pH-Wert liegen die Phosphatgruppen der Nukleotide dissoziiert vor (negative Ladung). Dementsprechend wandern die Nukleinsäuren im elektrischen Feld zur Anode. Die Wanderungsgeschwindigkeit wird bestimmt durch die elektrische Ladung, die Größe der DNA und deren Interaktion mit dem Agarosegel.

Ziel des Versuches ist, anhand der Restriktionsanalyse und anschließender elektrophoretischer Auftrennung der DNA zu evaluieren, welche der Proben die genomische und welche die plasmidäre DNA gewesen ist.

Diskutieren Sie bitte Ihre Beobachtung.

6.1 Isolierung von genomischer DNA aus Vollblut (Schweineblut, gerinnungsgehemmt, Schlachthof)

- (1) 200 µl Vollblut + 25 µl Protease + 200 µl B3-Puffer (Achtung: Puffer enthält chaotrope Salze!) 10 sec vortexen
- (2) 15 min bei 70°C inkubieren
- (3) Während der Inkubation 1x kurz vortexen
- (4) Nach der Inkubation werden 210 µl Ethanol hinzu pipettiert
- (5) Lösung vortexen und auf die Säule pipettieren
- (6) 1 min bei 11000 x g zentrifugieren
- (7) Säulendurchfluss verwerfen
- (8) 500 µl Waschpuffer1 auf die Säule pipettieren
- (9) 1 min bei 11000 x g zentrifugieren
- (10) Säulendurchfluss verwerfen
- (11) 600 µl Waschpuffer2 auf die Säule pipettieren
- (12) 1 min bei 11000 x g zentrifugieren
- (13) Säulendurchfluss verwerfen
- (14) Säule 1 min bei maximaler Geschwindigkeit trocken zentrifugieren
- (15) Säule in neues Gefäß stecken
- (16) 50 µl Elutionspuffer (70°C) auf die Säule pipettieren
- (17) Säule 3 min bei Raumtemperatur inkubieren
- (18) 1 min bei 11000 x g zentrifugieren
- (19) Durchfluss (enthält DNA) in neues Eppendorfgefäß pipettieren
- (20) Schritt 16 bis 19 wiederholen, die Eluate im Anschluss zusammen pipettieren und vorsichtig mischen
- (21) Eluat photometrisch messen

6.2 Photometrische Bestimmung der DNA-Konzentration und Reinheit

Mittels Extinktionsmessung der unverdünnten DNA-Lösung (aus 1.) können bei jeweils 260 bzw. 280 nm die Konzentration und weiterhin die Reinheit bestimmt werden.

Die Proben werden bei einer Wellenlänge von 260 nm gegen Elutionspuffer als Referenzwert photometrisch gemessen (gemessene Extinktion sollte 0,1 bis 1 betragen).

Dieser Wert erfasst die **DNA-Konzentration** in der Lösung (Erklärung s. S. 32).

$$E_{260} \times 50 = \mu\text{g DNA / ml}$$

Zusätzlich werden die Proben bei einer Wellenlänge von 280 nm photometrisch gemessen.

Der Quotient aus 260/280 wird zur Bestimmung der Reinheit der DNA-Präparation berechnet.

$$\frac{E_{260}}{E_{280}} = Q \left(\begin{array}{l} Q > 1,4 \text{ reine DNA} \\ Q < 1,4 \text{ verunreinigte DNA} \end{array} \right)$$

Diese präparierte DNA kann nun bei -20°C gelagert oder direkt für weitere Analysen verwendet werden.

6.3 Enzymatische Spaltung von DNA

- (1) Zu zwei unbekanntem Proben je 5 μ l werden je 10 μ l Puffer und je 5 μ l DraI (Restriktionsendonuklease) pipettiert.
- (2) Beide Ansätze werden gemischt, kurz zentrifugiert und für 15 min. bei 37°C inkubiert.
- (3) Danach wird zu beiden Ansätzen je 5 μ l Stopp-Mix pipettiert und die Proben mittels Agarose-Gel-Elektrophorese aufgetrennt.

6.4 Agarose-Gel-Elektrophorese von DNA

Je 20 μ l der vorbereiteten Proben (siehe oben) werden durch Unterschichten vorsichtig in die Taschen des Agarose-Gels pipettiert.

Von der Assistentin/dem Assistenten wird ein Marker als Größenstandard und ein ungeschnittenes Plasmid mit aufgetragen.

Es wird eine Spannung von 90 V für 45 Minuten angelegt.

Das Ergebnis wird unter UV-Licht ausgewertet: Ethidiumbromid, das dem Gel zugesetzt wurde, interkaliert mit dem DNA-Doppelstrang und fluoresziert im UV-Licht, wodurch die Nucleinsäuren im Gel sichtbar werden.

ACHTUNG! Die Augen sind unbedingt mit einem speziellen Schirm vor der UV-Strahlung zu schützen! Ethidiumbromid steht unter dem Verdacht karzinogen zu sein!

Die Größe der Banden kann über den Marker (Größenstandard) abgeschätzt werden.

Diskutieren Sie nun das Laufverhalten Ihrer Proben auf dem Agarosegel. Welche der Proben ist die plasmidäre und welche die genomische DNA und warum?

Beschreiben Sie weitere Beobachtungen.