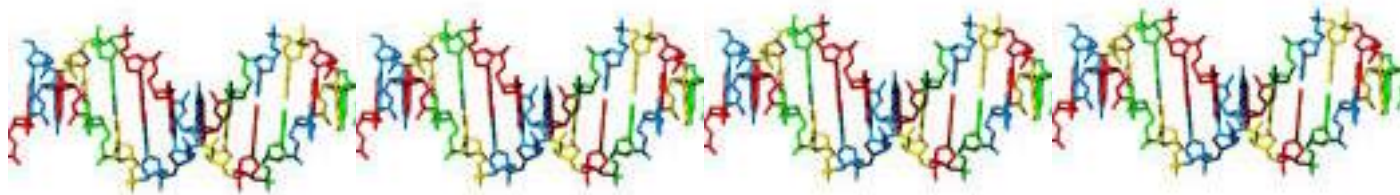


Kurs 3 Grundpraktikum Genetik

„Isolierung menschlicher DNA,
Restriktion und Gelelektrophorese“



AG Hankeln (iOME)
hankeln@uni-mainz.de

**Technische Säulen
der Molekulargenetik....**



Isolierung von Genom-DNA aus eukaryotischen Zellen

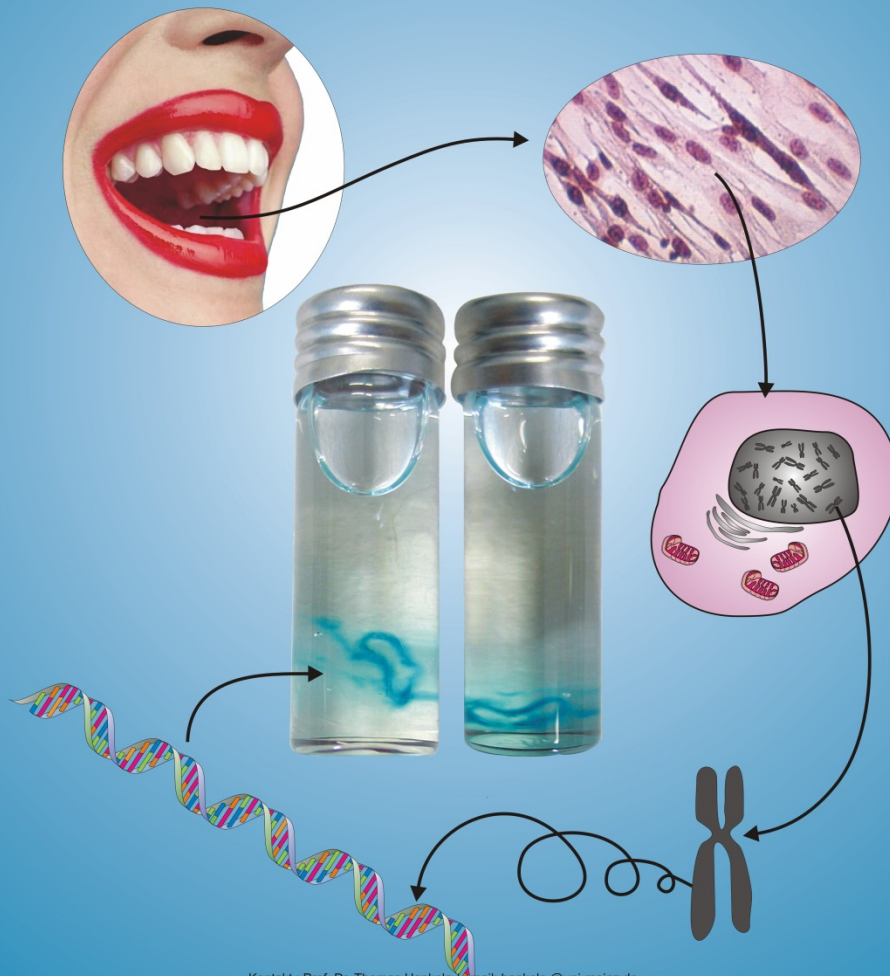
IMSB

Institut für
Molekulargenetik
gentechnologische Sicherheitsforschung
und Beratung

JOHANNES
GUTENBERG
UNIVERSITÄT
MAINZ

DNA Take-away

Präparieren Sie Ihre eigene Erbsubstanz



Kontakt : Prof. Dr. Thomas Hankeln / email: hankeln@uni-mainz.de
Prof. Dr. Erwin R. Schmidt / email: eschmidt@uni-mainz.de

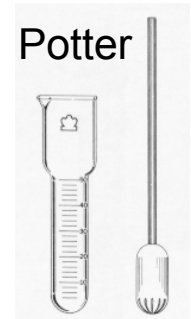


Wissenschaftsmarkt
Mainz

Schritte der DNA-Isolierung

...wenn man's besonders ordentlich machen will

1. Gewebeaufschluss (lassen wir weg)
2. Sammeln der Zellkerne (lassen wir weg)
3. Zell- und Kernlyse mit Proteindenaturierung
4. Entfernung von Proteinen durch Extraktion mit organischen Lösungsmitteln
5. DNA-Fällung
6. DNA-Aufbewahrung



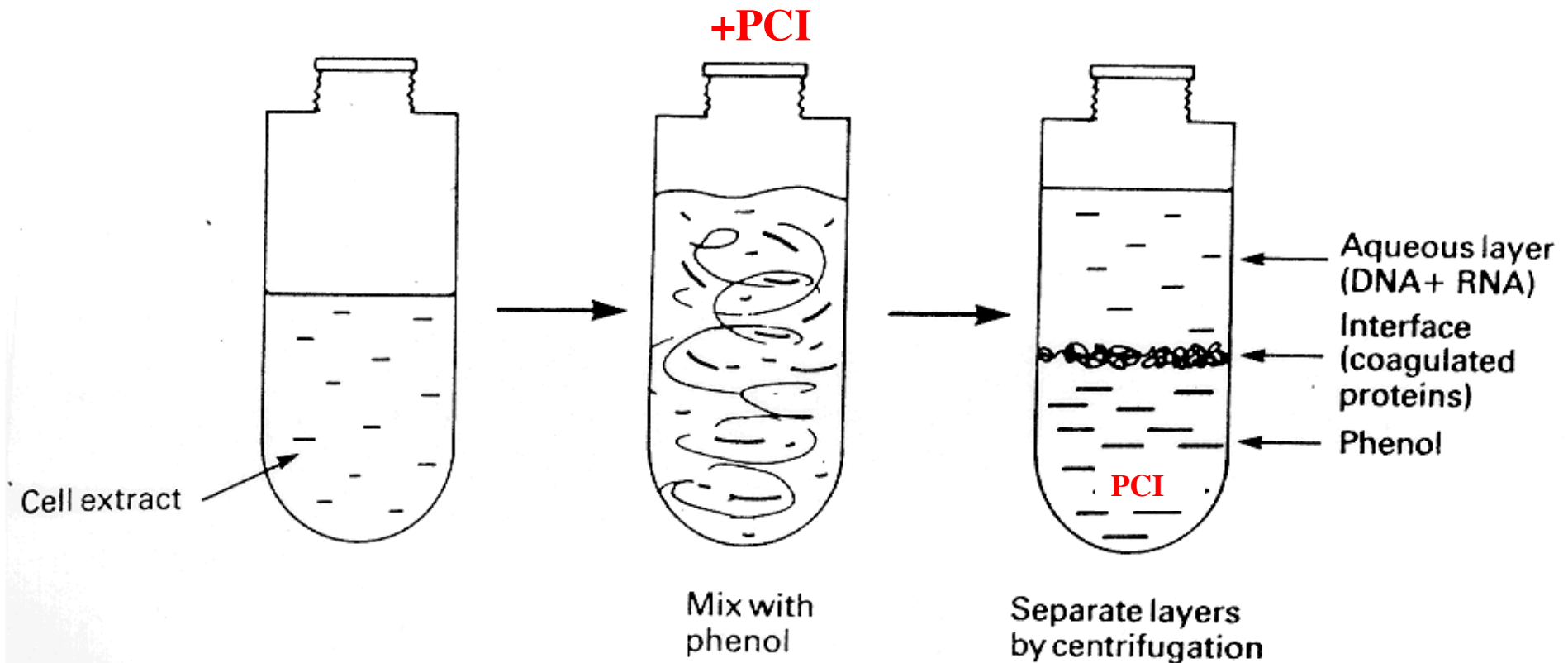
3. Gewebeaufschluss & Kernlyse

Scherkräfte vermeiden! DNasen stoppen!



- heute: nur chemisch mit Detergens (lat. detergere – abwischen)
 - 1 -3 % Na-Dodecylsulfat (SDS; alternativ: Spülmittel)
 - SDS denaturiert Proteine und hemmt DNasen irreversibel
- auf Eis arbeiten
- pH auf 7,5-8,5 (DNasen haben Opt. < 6,5)
- Komplexbildner „chelieren“ Mg^{++} :
 - EDTA Ethylendiamin-Tetraacetat
 - SSC Standard-Salz-Citrat

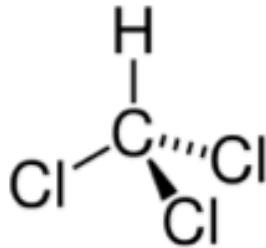
4. Protein-Extraktion mit organischen Lösungsmitteln



- > einmal mit **P**henol/**C**hloroform/**I**soamylalkohol (PCI; 25:24:1)
- > einmal zum Abschluss: reines Chloroform zur Entfernung von Phenolresten

Organische Lösungsmittel

Chloroform



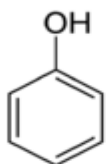
1847:
Der Geburtshelfer
James Young Simpson
und Freunde...

gesundheitsschädlich, reizend
Schutzhandschuhe, Kittel, Brille
Dekontaminieren durch Wasserspülung



Organische Lösungsmittel

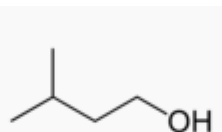
Phenol



giftig, ätzend
Schutzhandschuhe, Kittel, Brille
Dekontaminieren durch Wasserspülung



Iso-Amyl-
alkohol



gesundheitsschädlich, reizend, entzündlich
Schutzhandschuhe, Kittel, Brille
Dekontaminieren durch Wasserspülung



5. Äthanolfällung von DNA

Zugabe von Salzen (NaCl) plus 100% Äthanol/Isopropanol

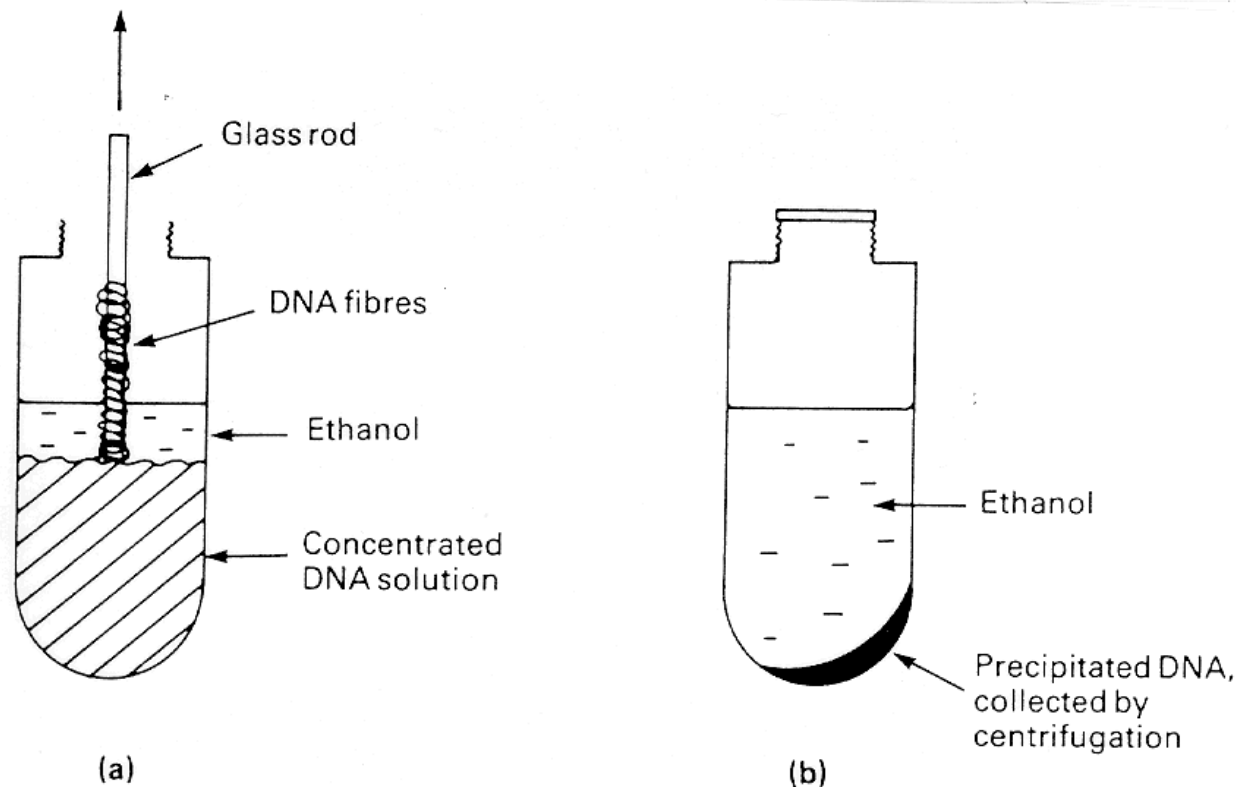


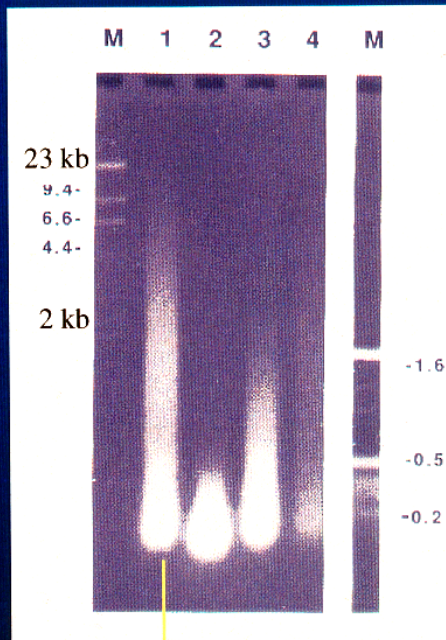
Figure 3.6 Collecting DNA by ethanol precipitation. (a) Absolute ethanol is layered on top of a concentrated solution of DNA. Fibres of DNA can be withdrawn with a glass rod. (b) For less concentrated solutions ethanol is added (at a ratio of 2.5 volumes of absolute ethanol to 1 volume of DNA solution) and precipitated DNA collected by centrifugation.

6. Aufbewahren von DNA

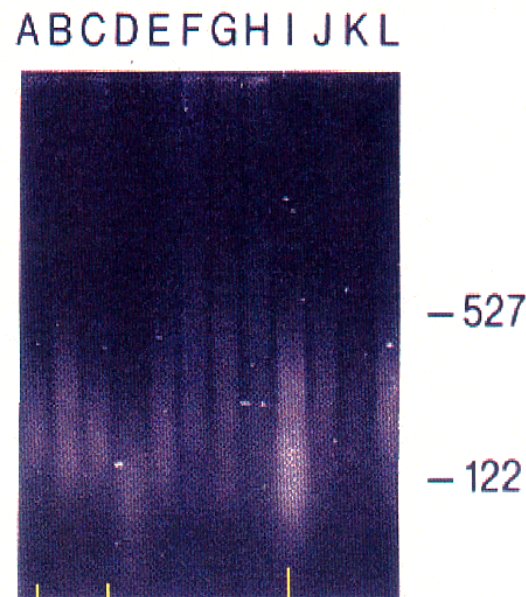


- in 100 % oder 70 % EtOH gefällt (*eternally!*)
- gefällte DNA durch Zentrifugation sammeln, Pellet mit 70% EtOH waschen, trocknen, in A. bident oder Puffer lösen
- gelöst kurzfristige Aufbewahrung bei 4°C, längerfristig bei -20°C.

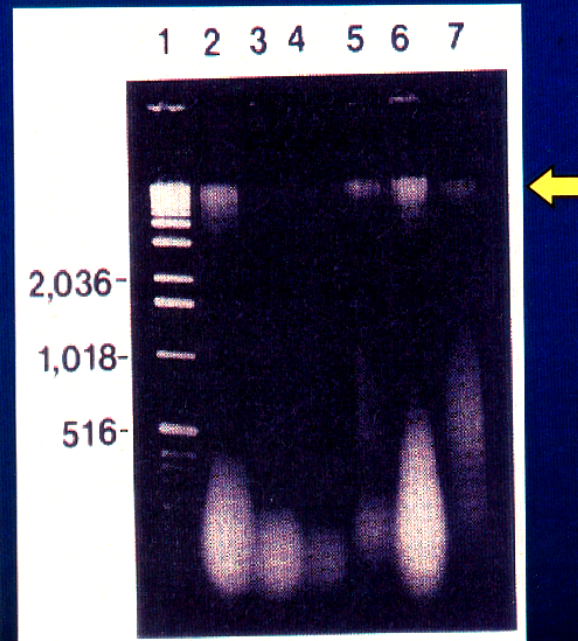
Stabilität von ‚Ancient DNA‘



Eis-Mumie, 1500 J.



Darm, ägypt. Mumie, 3 200 J.
Faultier-Haut, getrocknet, 13 000 J.
Schwein, getrocknet, 4 J.



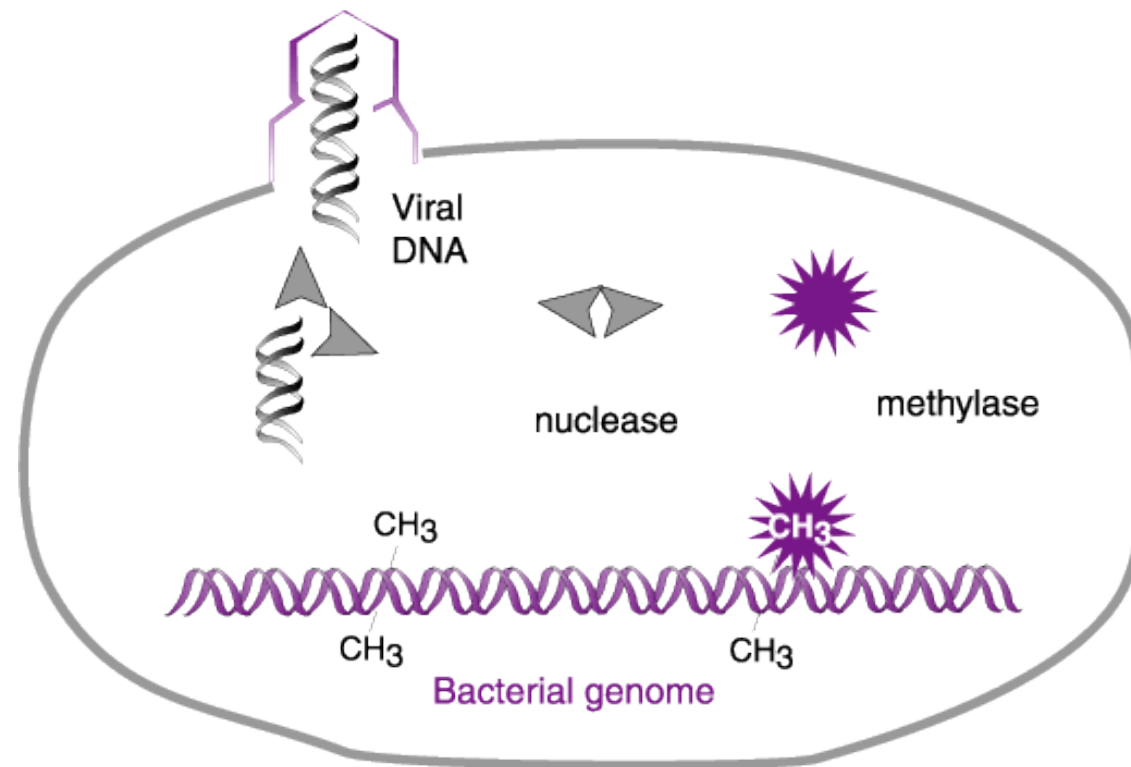
300 800 5000 Jahre
menschl. Knochen

**Technische Säulen
der Molekulargenetik....**



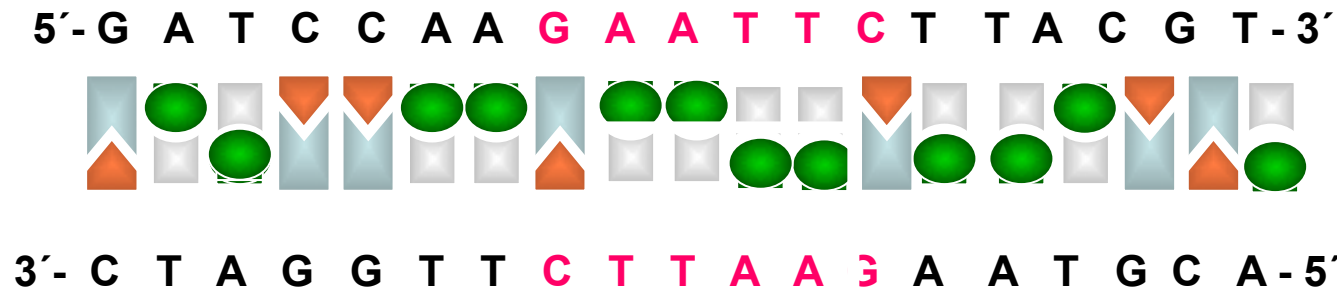
**Schneiden von DNA
mit Restriktions-
endonukleasen**

Restriktions/Modifikationsenzyme schützen Bakterien vor eindringender fremder DNA

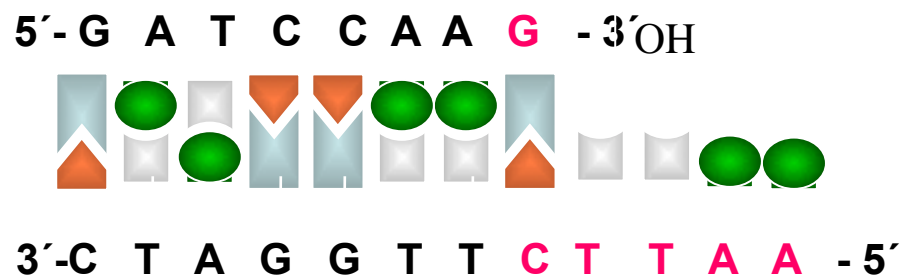


Modifikation der zelleigenen DNA erfolgt durch **Methylierung** am Cytosin oder Adenin (N6-Methyl-Adenin bzw. 5-Methyl-Cytosin).

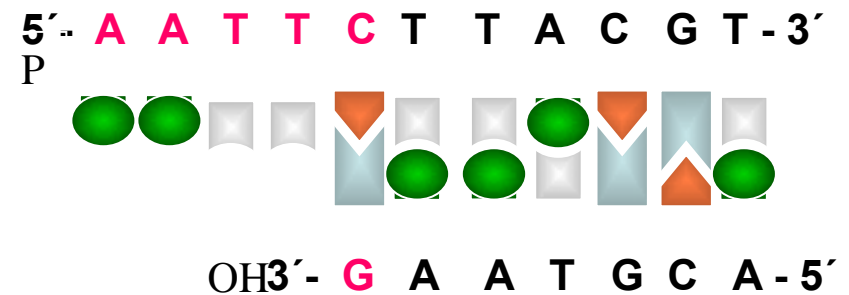
Typ II-Restriktionsendonukleasen erkennen und schneiden die DNA sequenzspezifisch!



x Eco RI



P





rebase.neb.com

A T				C G			
Pos. no.	Recognition sequence	Restriction endo-nuclease	Number of recognition sites on pBR 322	Pos. no.	Recognition sequence	Restriction endo-nuclease	Number of recognition sites on pBR 322
1	A A T T	<i>Tsp</i> EI	188 8	68	A C G T	<i>Mae</i> II	143 10
2	A A A T T T	—	16 0	69	A A C G T T	—	7 4
3	G A A T T C	<i>Eco</i> RI	5 1	70	G A C G T C	<i>Aat</i> II	10 1
4	(G) A A T T (C)	<i>Fsi</i> I	58 1	71	G A C G T C	<i>Ssp</i> 5230 I	10 1
5	C A A T T G	<i>Mun</i> I	8 0	72	C A C G T G	<i>Bbr</i> P I	3 0
6	T A A T T A	—	— —	73	(C) A C G T (G)	<i>Bsa</i> AI	14 1
7	T T A A T T A A	<i>Pac</i> I	0 0	74	T A C G T A	<i>Sna</i> B I	1 0
8	G A T C	<i>Dpn</i> I	116 22	75	G C G C	<i>Cfo</i> I	215 31

- + Inhibition des Schnitts bei Methylierung
- 0 Schneiden unbeeinflusst von Methylierung
- M Schneiden erfordert Methylierung

Technische Details...

- Nomenklatur: Eco RI *E. coli* Stamm R, Enzym 1
 Hinf I *Haemophilus influenzae*, Serotyp f, E1
- Aktivität: 1 U = Menge Enzym, die 1 µg λ-DNA in einer
 Stunde vollständig spaltet
- Assay: DNA
 + Enzym (< 1/10 des Assay-Volumens)
 + Salze (Mg⁺⁺, high/medium/low NaCl, pH ca.7)
 Inkubation meist bei 37°C (Enterobakterien!)
 Ausnahmen: z. B. Sma I (25°C) und Taq I (65°C)
- Inaktivierung: EDTA-Zugabe u./o. 65°C-Inkubation
 alternativ: Phenol/Chloroform-Extraktion

**Technische Säulen
der Molekulargenetik....**



Größenauftrennung von DNA- Restriktionsfragmenten durch Gel-Elektrophorese

DNA a go go!

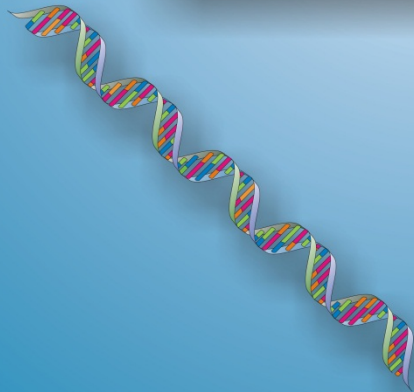
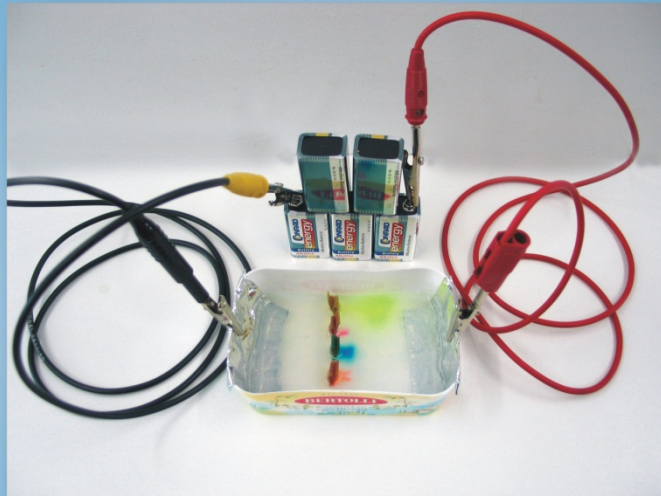
IMSB

Institut für
Molekulargenetik
gentechnologische Sicherheitsforschung
und Beratung

**JOHANNES
GUTENBERG**
UNIVERSITÄT
MAINZ

DNA à Go Go

Lassen Sie die Moleküle im
elektrischen Feld tanzen



Kontakt : Prof. Dr. Thomas Hankeln / email: hankeln@uni-mainz.de
Prof. Dr. Erwin R. Schmidt / email: eschmidt@uni-mainz.de

Wissenschaftsmarkt
Mainz

Elektrophorese



„Bewegung geladener Moleküle in einem elektrischen Feld durch eine Matrix hindurch“

„Molekularsieb-Effekt“: Kleine Moleküle laufen schnell, große Moleküle langsam.



Proteine und Nukleinsäuren sind auftrennbar

- Beide Makromoleküle besitzen ionisierbare Gruppen.
- Ladung ist abhängig vom pH-Wert des Elektrophorese-Laufpuffers (meist pH 6-9).

Proteine:

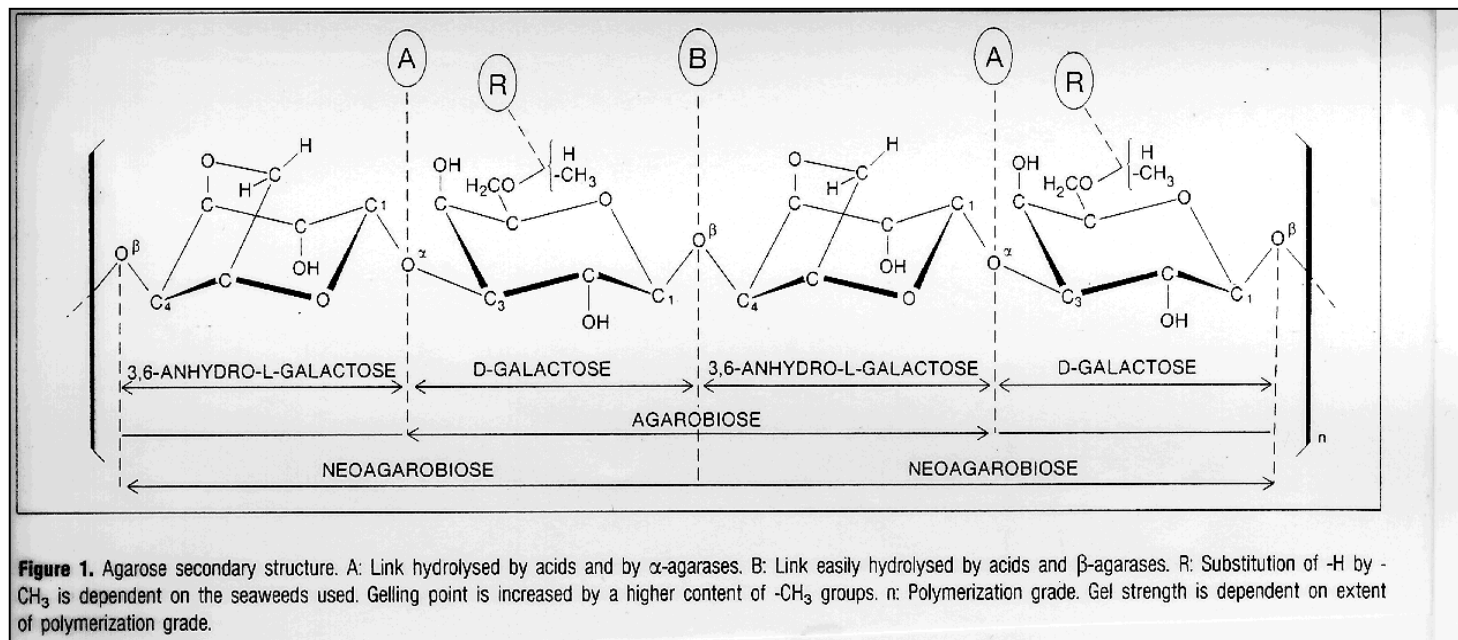
- bei pH 6-9 Asp / Glu > negativ
Lys / Arg > positiv
His / Cys > pos. oder neg.

Nukleinsäuren:

- bei pH 6-9 Phosphatgruppen (negativ) sind Hauptladungsträger.
Funktionelle Gruppen an Basen sind zumeist ungeladen, da pK-Werte < 3 oder > 9.

Agarose

- gewonnen aus Seegras und best. Rotalgen
- entdeckt in Japan
- 1859 in westl. Welt als Gelose
- 1882 R. Koch > Mikrobiologie
- 1971 für Elektrophorese verwendet
- Dimer aus D-Galactose und 3,6-anhydro-L-Galactose



Herstellung eines Agarose-Gels

- festes Pulver in Puffer aufkochen, geliert beim Abkühlen ab etwa 44 °C

- Porengröße und damit Trenneigenschaften hängen von der Agarosekonzentration ab.

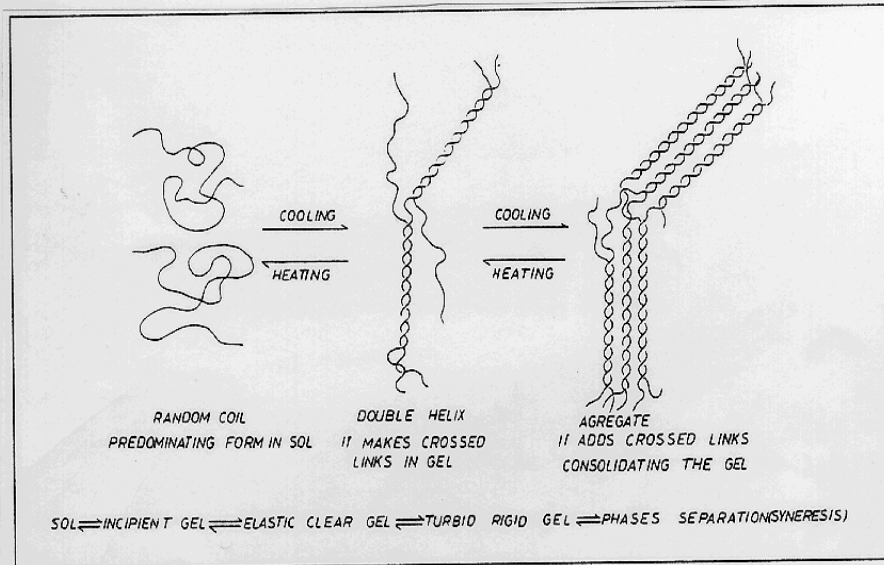


Figure 2. Agarose gelification (tertiary structure).

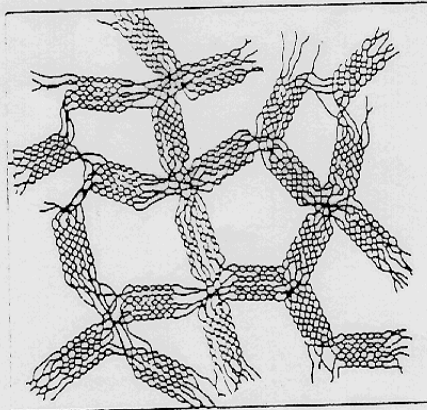


Figure 3. (Arnot *et al.*; 1974) Agarose gel network (quaternary structure). The aggregates in agarose gels may actually contain 10–10000 helices rather than the smaller number shown here.

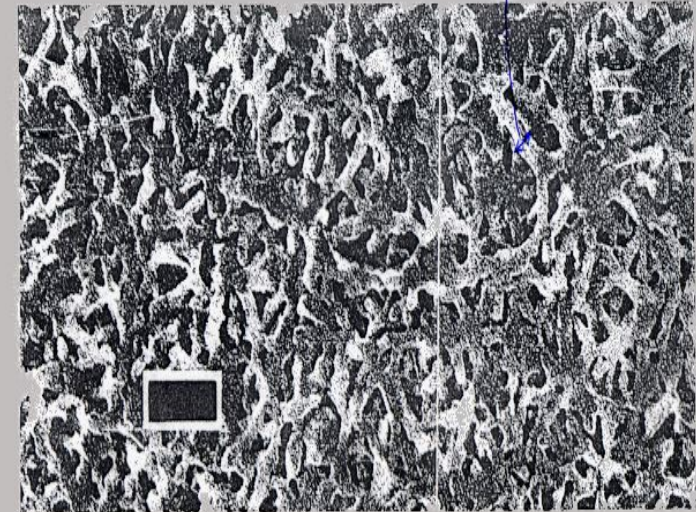
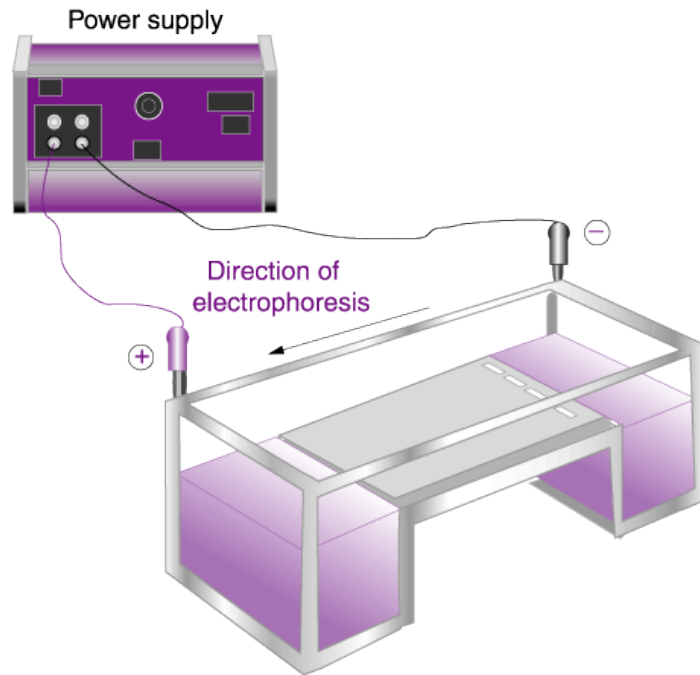
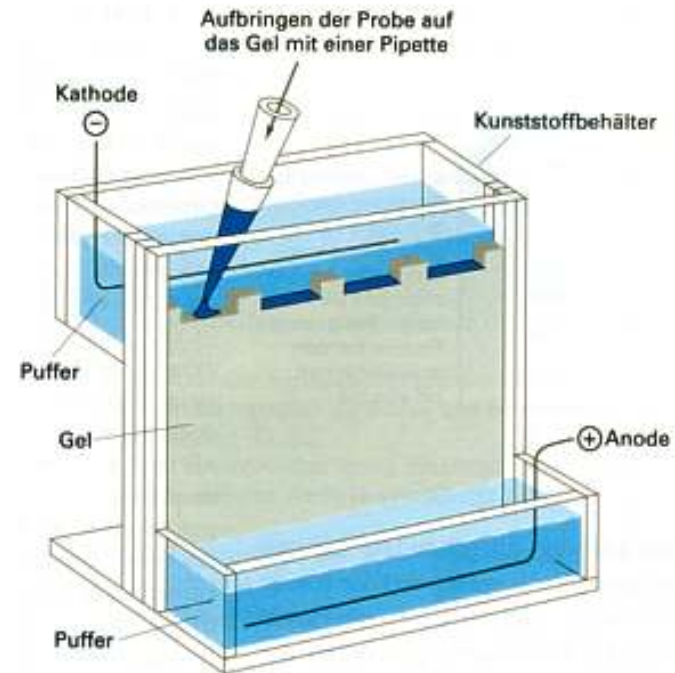


Figure 8.10 Electron micrograph of a portion of a 2% agarose gel. 1 μm \times 0.5 μm overall; small black rectangle is 1000 Å \times 500 Å. Individual gel fibres are about 100 Å wide. Courtesy of Sue Whytock and John Finch.

Horizontale vs. vertikale Elektrophorese

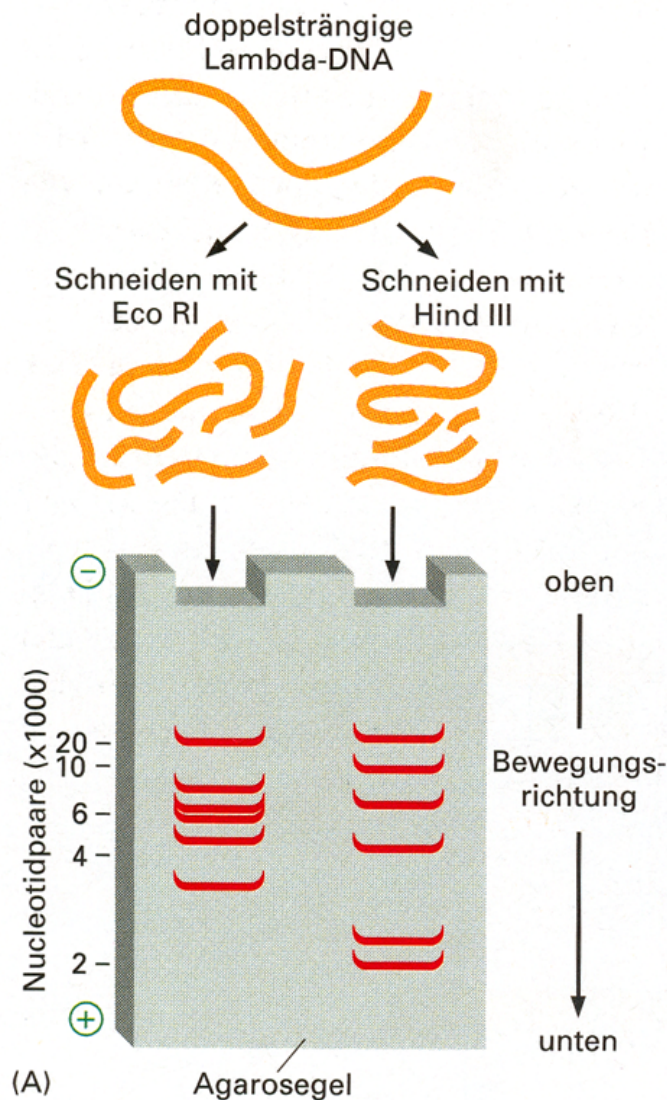


- einfachste Herstellung
- höherer Agaroseverbrauch
- ungünstige Temperaturverteilung > unscharfe Trennung im unteren MW-Bereich



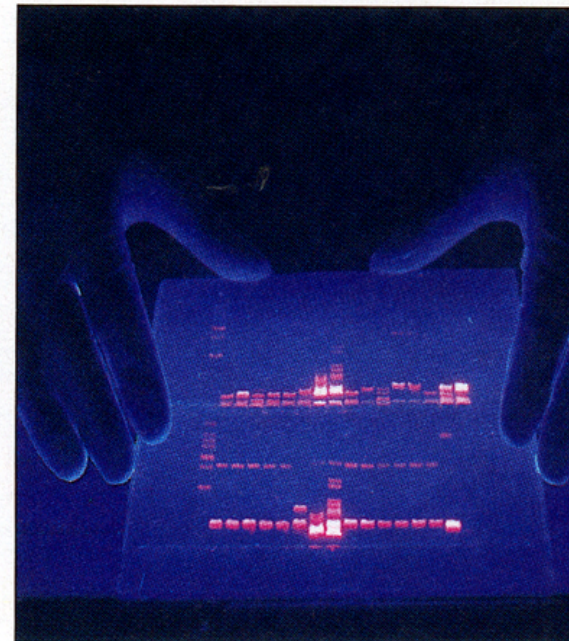
- Auftragsvolumen flexibler
- Auftrennung im unteren MW-Bereich schärfer

Größensortierung von DNA-Restriktionsfragmenten



Gel ist hier mit Ethidiumbromid
Gefärbt: EtBr interkaliert in DNA

> ergibt im UV-Licht eine
orange-rote Fluoreszenz



Ethidiumbromid



Mutagen

- Nachweis von ss/ds DNA/RNA
- bindet sequenzunspezifisch
- Färbelösung 5 ug/ml
- Nachweisgrenze: 10-50 ng für dsDNA
- leuchtet orange-rot bei UV-Belichtung; Anregung: 360nm
Emission: 590nm
- **Einlagerung von Farbstoff entspricht der Masse des Moleküls!**

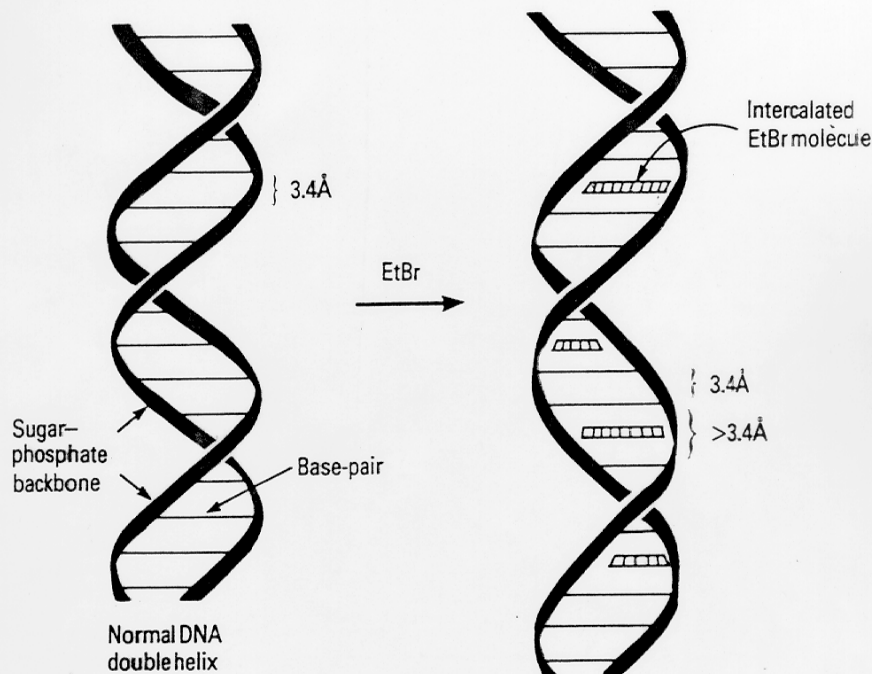
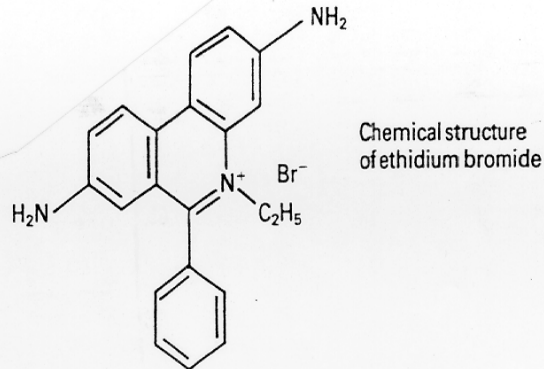
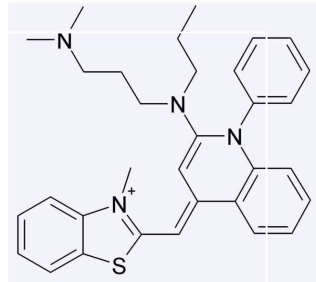
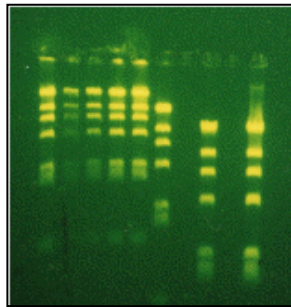


Figure 3.11 Partial unwinding of the DNA double helix by EtBr intercalation between adjacent base pairs. The normal DNA molecule shown on the left is partially unwound by taking up four EtBr molecules, resulting in the 'stretched' structure on the right.

Die ungefährliche Alternative...

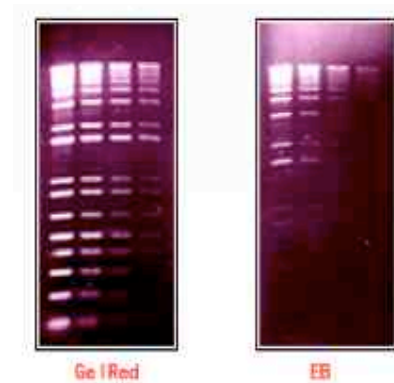
SYBR Green

Zipper et. al (2004) Nucleic Acids Research 32: e103



- 1995 Fa. Molecular Probes
- interkaliert und „bindet“
- AbsMax bei 494 nm (blau), Emission 524 nm (grün)
- Detektionsgrenze 10 pg!!
- höhere Sensitivität wegen positiver Ladung?

GelRed

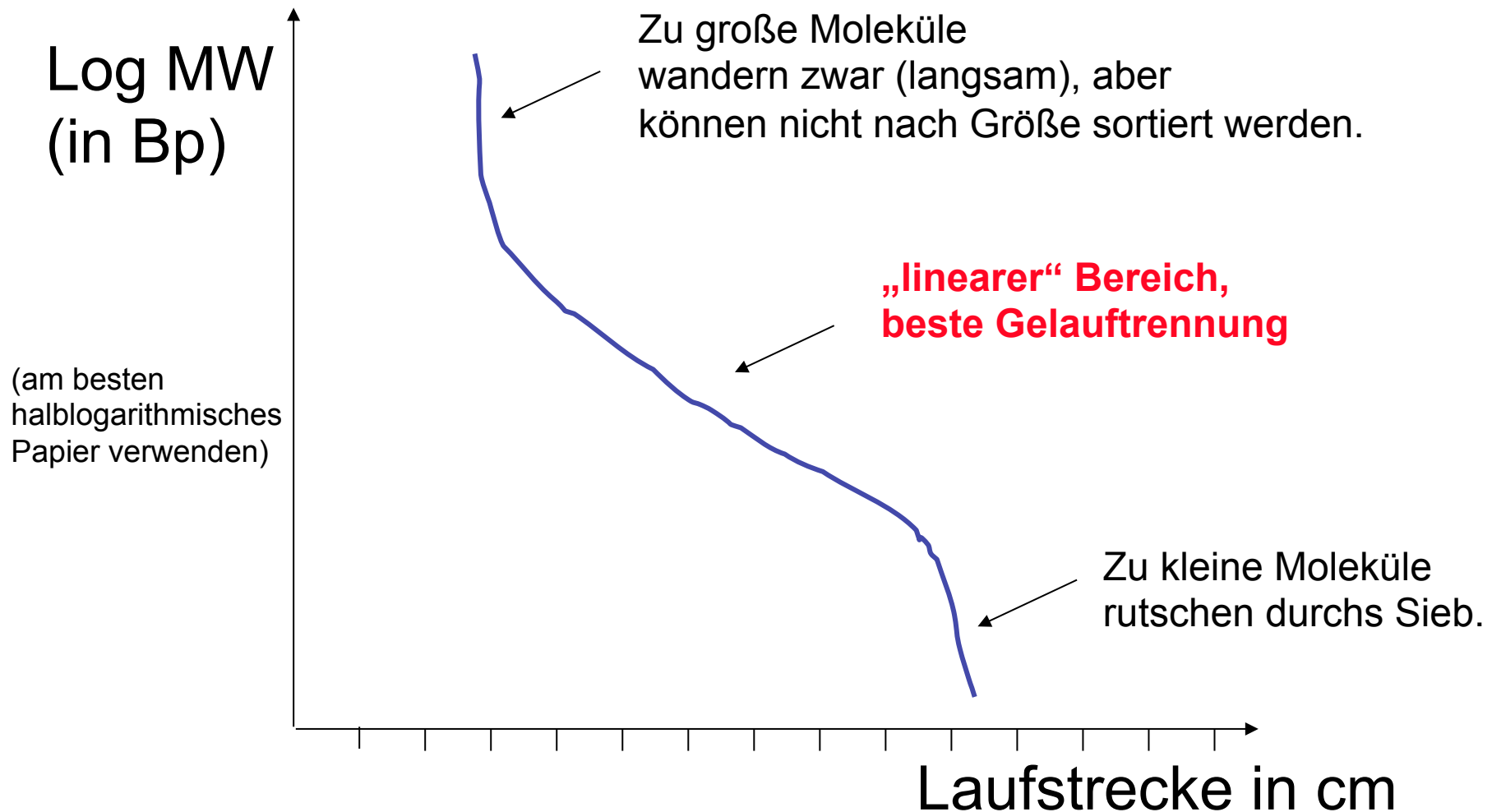


- Fa. Biotium
- sensitiver als SybrGreen
- AbsMax bei 300 nm (UV), Emission 600 nm (rot)
- nicht-mutagen, ungiftig

Die Wanderungsgeschwindigkeit doppelsträngiger DNA ist abhängig von...

- Molekulargewicht: **ds lineare DNA wandert umgekehrt proportional zum Logarithmus ihres Molekulargewichts (in Bp angegeben, nicht Da!).**
- Matrixdichte: DNA-Fragmente definierter Größe laufen in Gelen unterschiedlicher Konzentration unterschiedlich schnell.
- Konformation: Zirkuläre (Plasmid-)DNA läuft anders als lineare.
- Feldstärke: Höhere Feldstärke steigert Laufgeschwindigkeit; optimal sind ca. 5 V pro cm Elektrodenabstand.

Die Molekulargewichtsbestimmung von DNA erfolgt anhand einer Eichkurve...

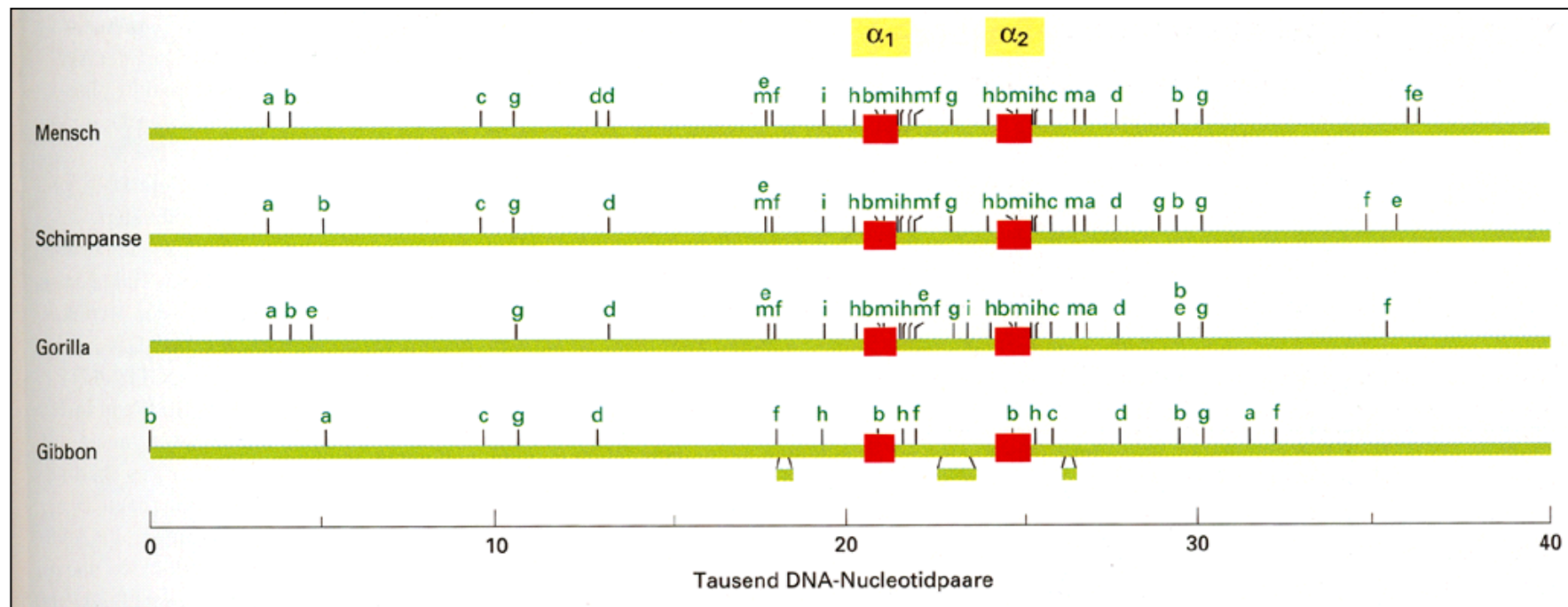


Und die Anwendungen dieser Techniken?

Hier nur wenige ausgewählte Beispiele...

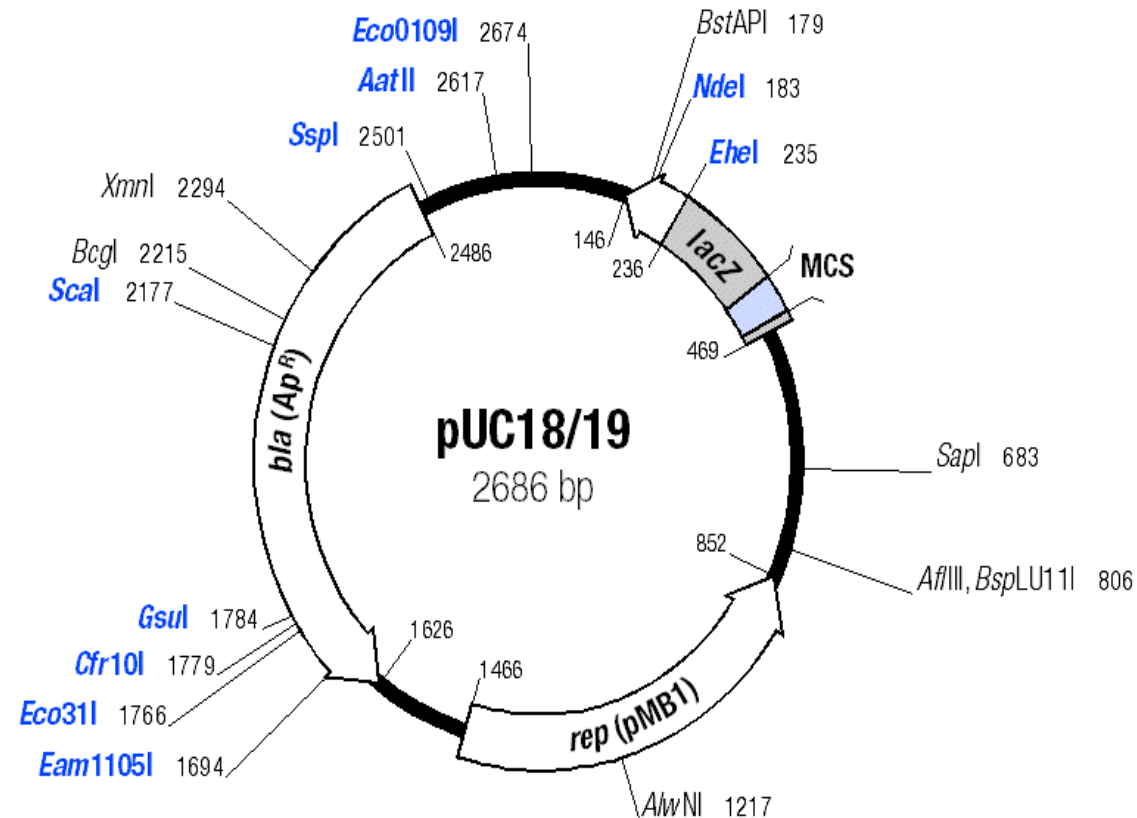
Restriktionsschnittstellen dienen als „Marker“ auf der DNA

z. B. zur Kartierung von Genomen

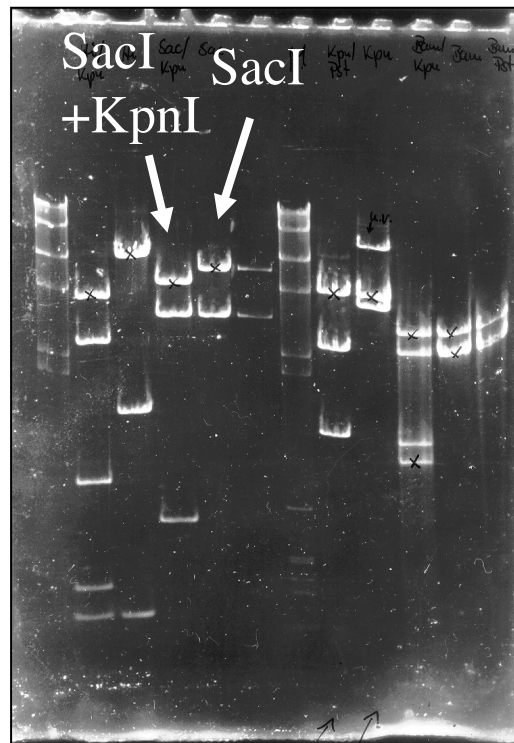


Restriktionsschnittstellen-Karte des alpha-Globin-Genortes in verschiedenen Primaten-Spezies

Restriktionskarte eines Plasmids



Restriktionskartierung von Genomen: how to...



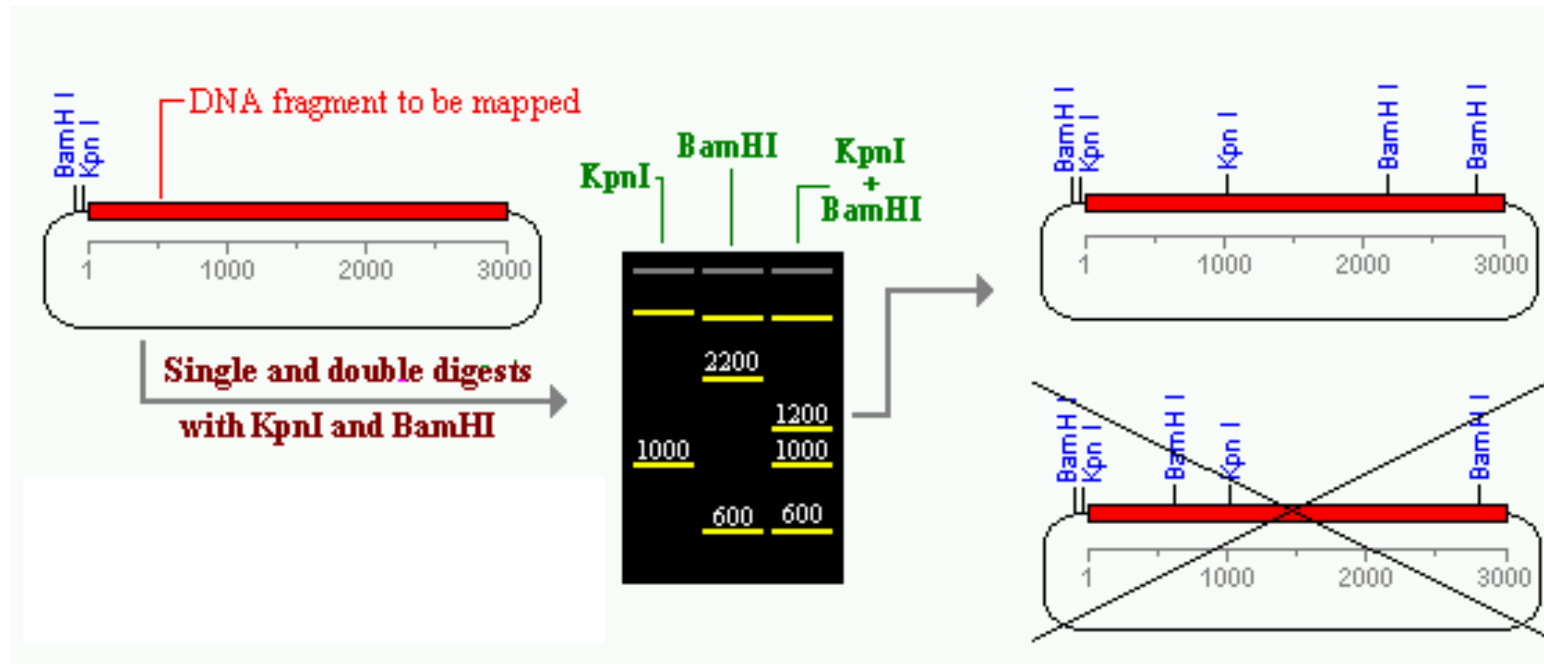
Strategie:

„Einfach-“ und „Doppelterverdaus“
der DNA mit Restriktionsenzymen
zur Kartierung einer unbekannten DNA

Hier: die KpnI-Schnittstelle schneidet
die größte SacI-Bande und muss daher
innerhalb dieses SacI-Fragments liegen

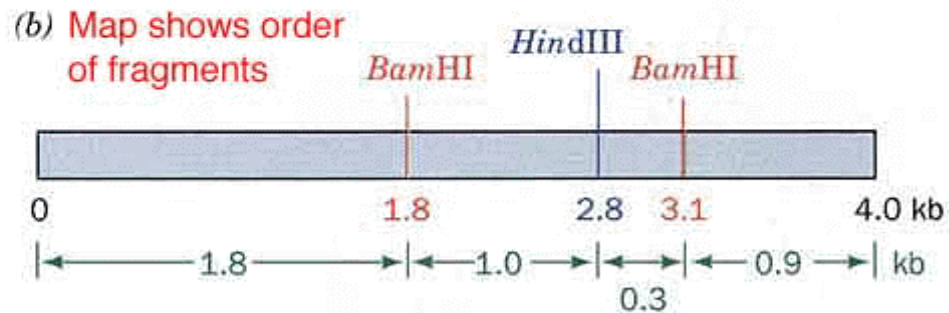
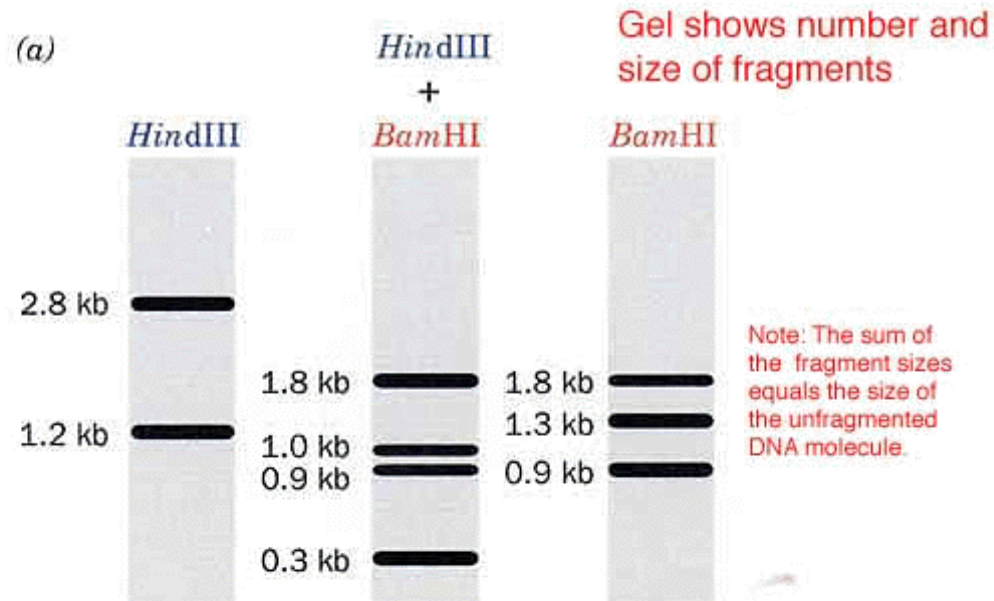
Restriktionskartierung von Genomen

...zum Beispiel für ein Plasmid:



Restriktionskartierung

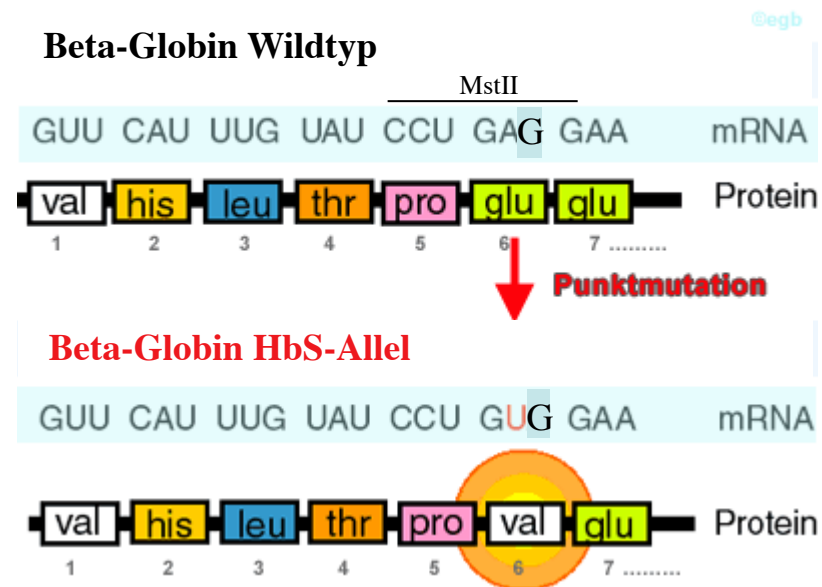
Ein weiteres Beispiel für ein lineares DNA-Molekül...



Restriktionsschnittstellen sind „Marker“ in der Gendiagnostik

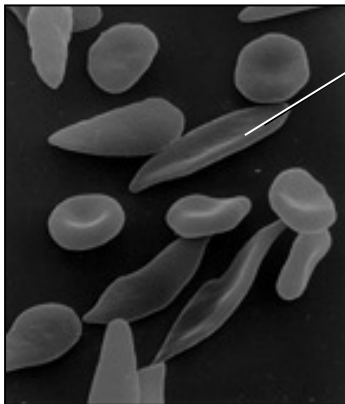
Beispiel: Sichelzellanämie

Mutation in Kodon 6 der β -Globin-Kette



Restriktionsschnittstellen sind „Marker“ in der Gendiagnostik

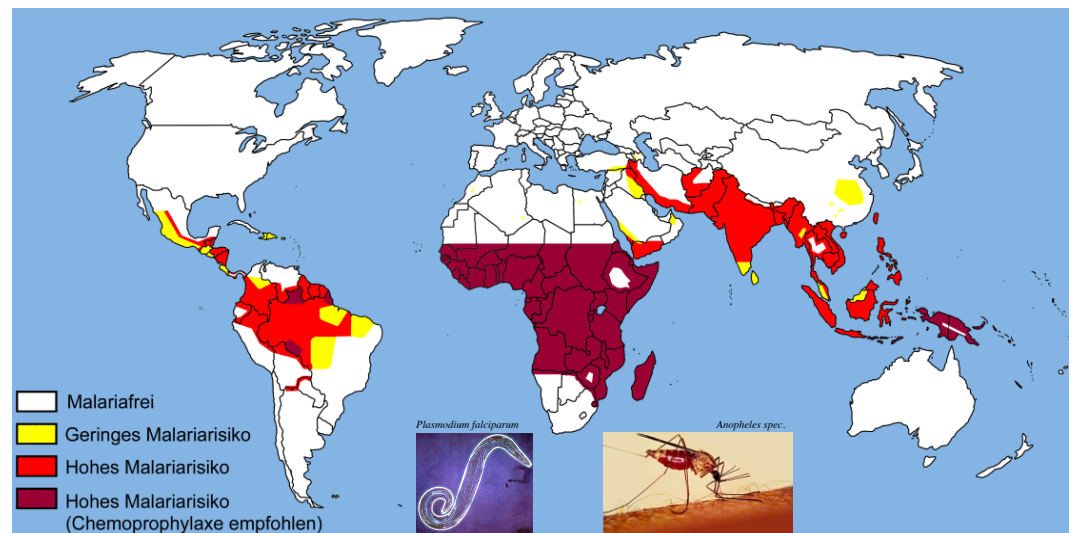
Beispiel: Sichelzellanämie



Deoxy-HbS kristallisiert
in Erythrozyten

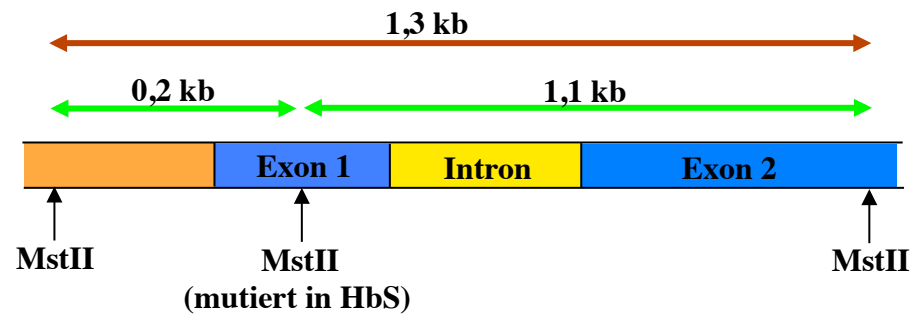
- > Hämolyse, Gefäßverschluss
- > Homozygot oft vor
30. Lebensjahr letal

Heterozygotenvorteil in Ländern mit
hohem Malaria-Risiko → *Plasmodium*
kommt in Sichelzellen „nicht zurecht“.

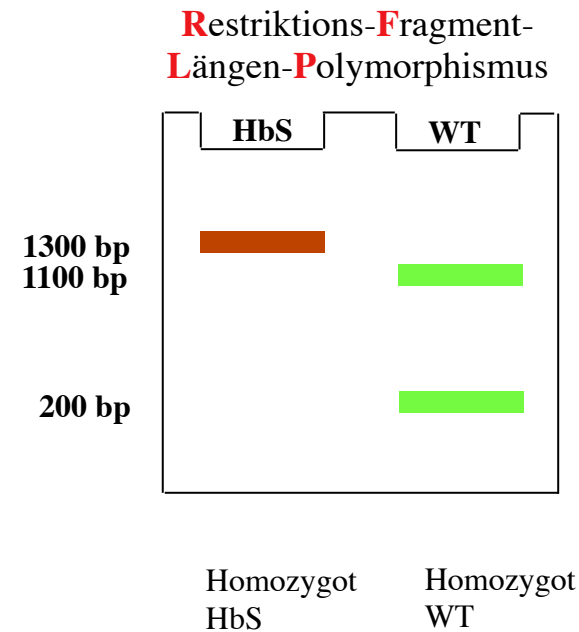


Restriktionsschnittstellen sind „Marker“ in der Gendiagnostik

Beispiel: Sichelzellanämie




MstII CCTNAGG



Bestimmung der Längenpolymorphismen von Mikrosatelliten-DNA



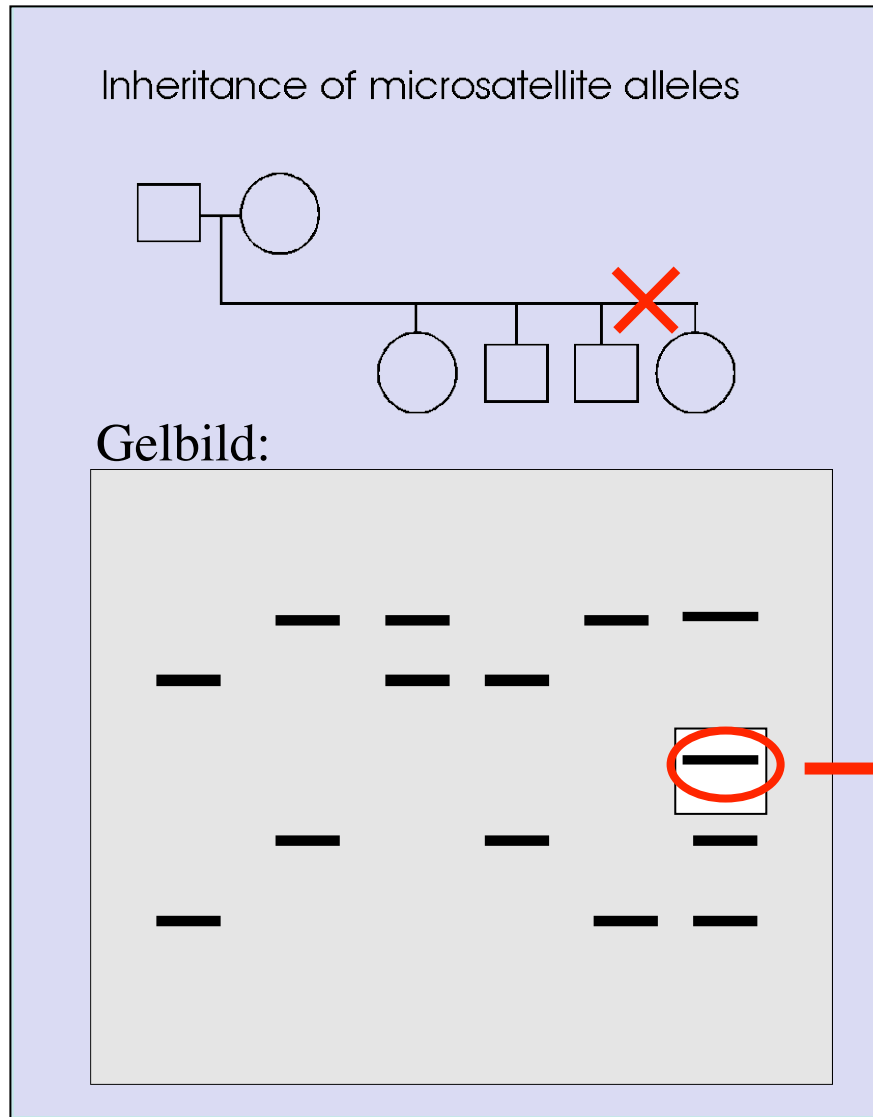
z. B.



(AG)₃₀
(AG)₂₇
(AG)₂₁
(AG)₁₆
(AG)₉

Bestimmung der Längenunterschiede
erlaubt Festlegung des Individuums!!!
("DNA-Fingerprinting")

Nutzung: z. B. Vaterschaftsanalyse



Allelherkunft unklar:

1. Anderer Vater?
2. Neu-Mutation in väterlicher Keimbahn?

> Weitere Loci typisieren, um sicheres Ergebnis zu erhalten!

Virale Gendiagnose

