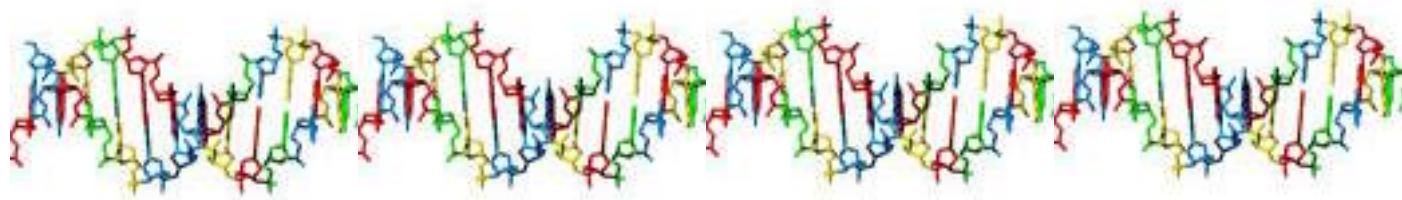


# Kurs 3 Grundpraktikum Genetik

„Isolierung menschlicher DNA,  
Restriktion und Gelelektrophorese“

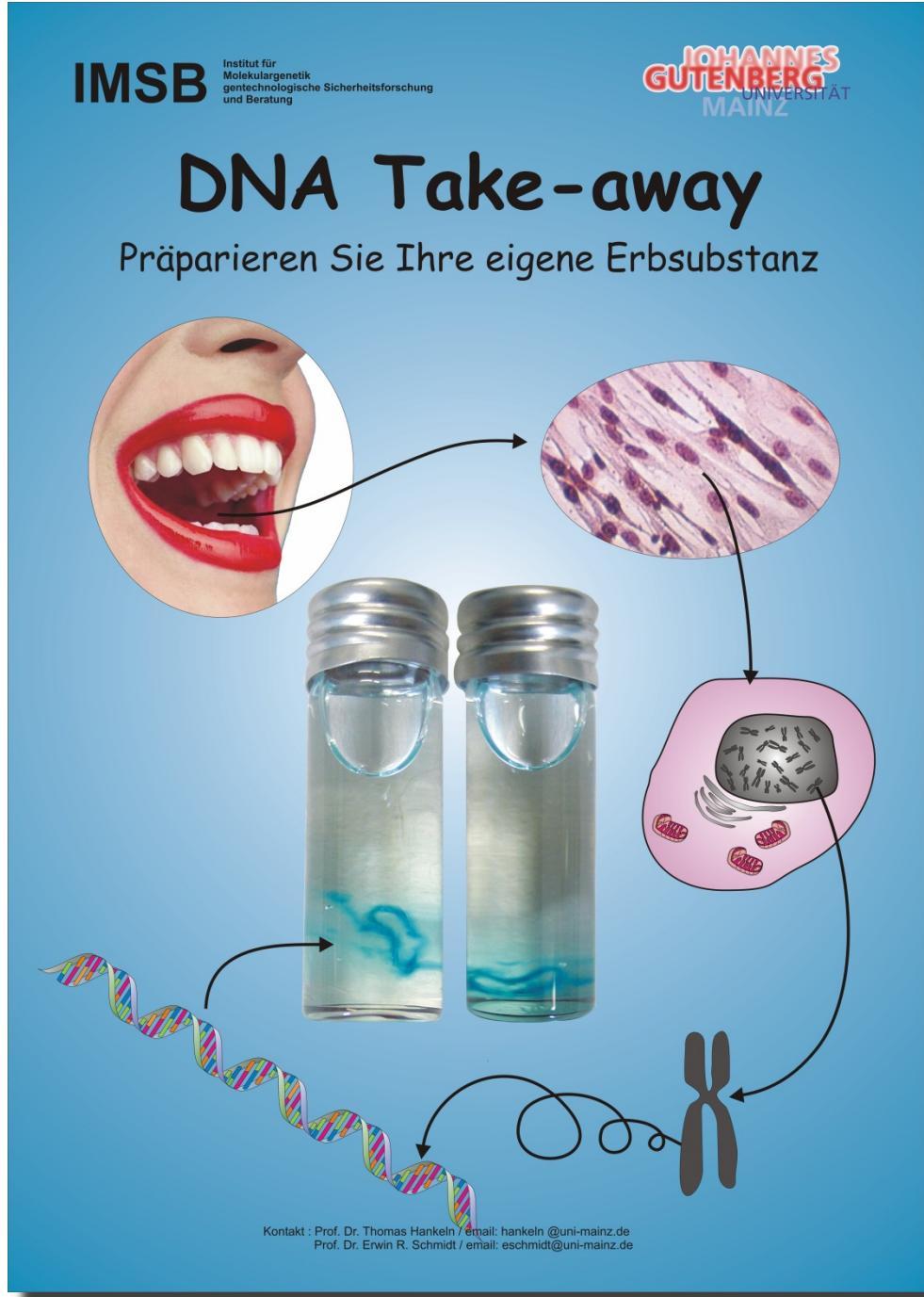


AG Hankeln (iOME)  
[hankeln@uni-mainz.de](mailto:hankeln@uni-mainz.de)

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



**Isolierung von Genom-DNA  
aus eukaryotischen Zellen**



Wissenschaftsmarkt  
Mainz

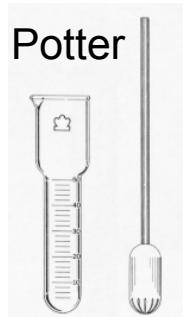
# Schritte der DNA-Isolierung

...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



Mörser



Potter



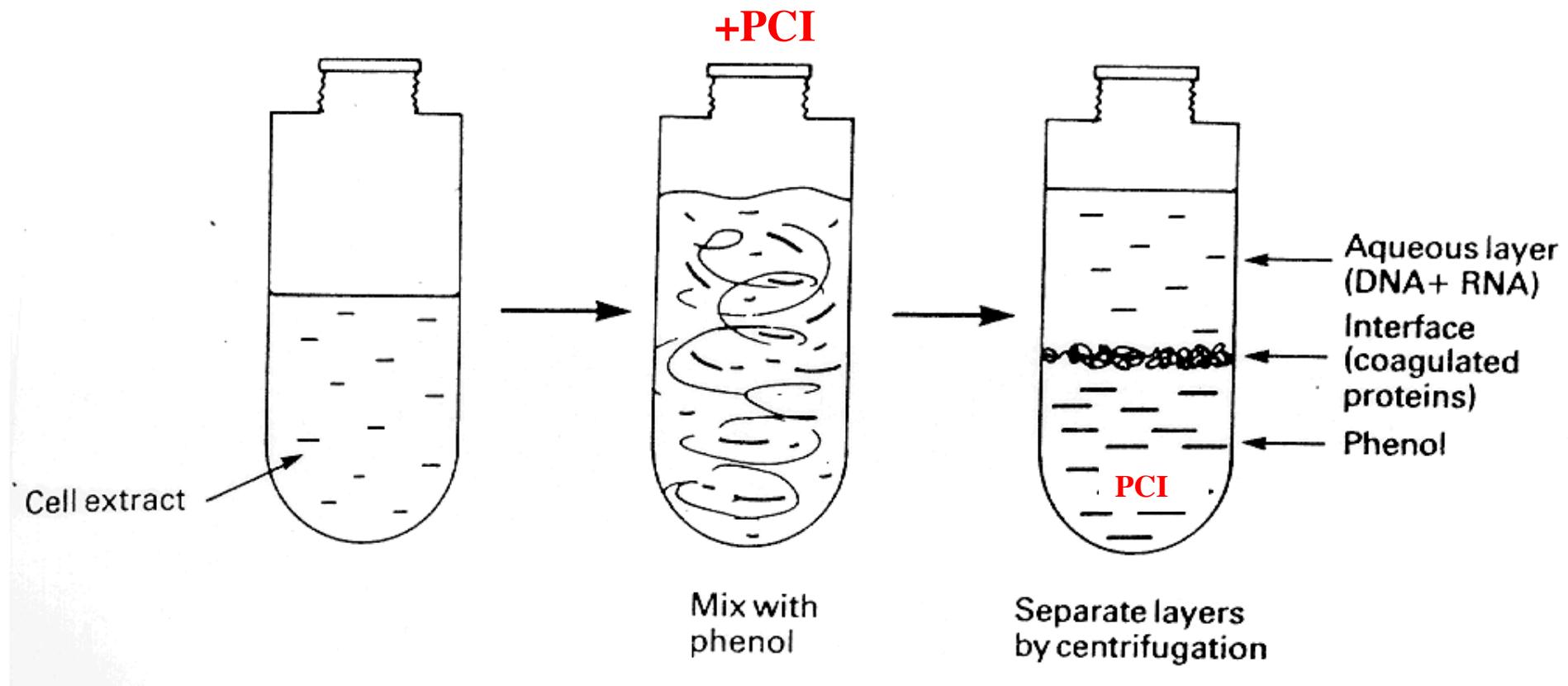
### 3. Gewebeaufschluss & Kernlyse

**Scherkräfte vermeiden! DNasen stoppen!**



- heute: nur chemisch mit Detergents (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<sup>++</sup>:
  - EDTA      Ethylenediamin-Tetraacetat
  - SSC        Standard-Salz-Citrat

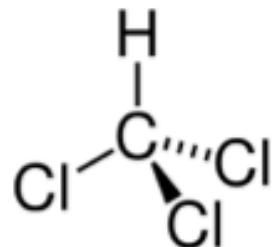
# 4. Protein-Extraktion mit organischen Lösungsmitteln



- > einmal mit Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (PCI; 25:24:1)
- > einmal zum Abschluss: reines Chloroform zur Entfernung von Phenolresten

# Organische Lösungsmittel

Chloroform



gesundheitsschädlich, reizend  
Schutzhandschuhe, Kittel, Brille  
Dekontaminieren durch Wasserspülung

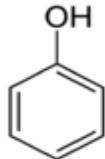


1847:  
Der Geburtshelfer  
James Young Simpson  
und Freunde...



# Organische Lösungsmittel

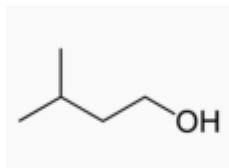
Phenol



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

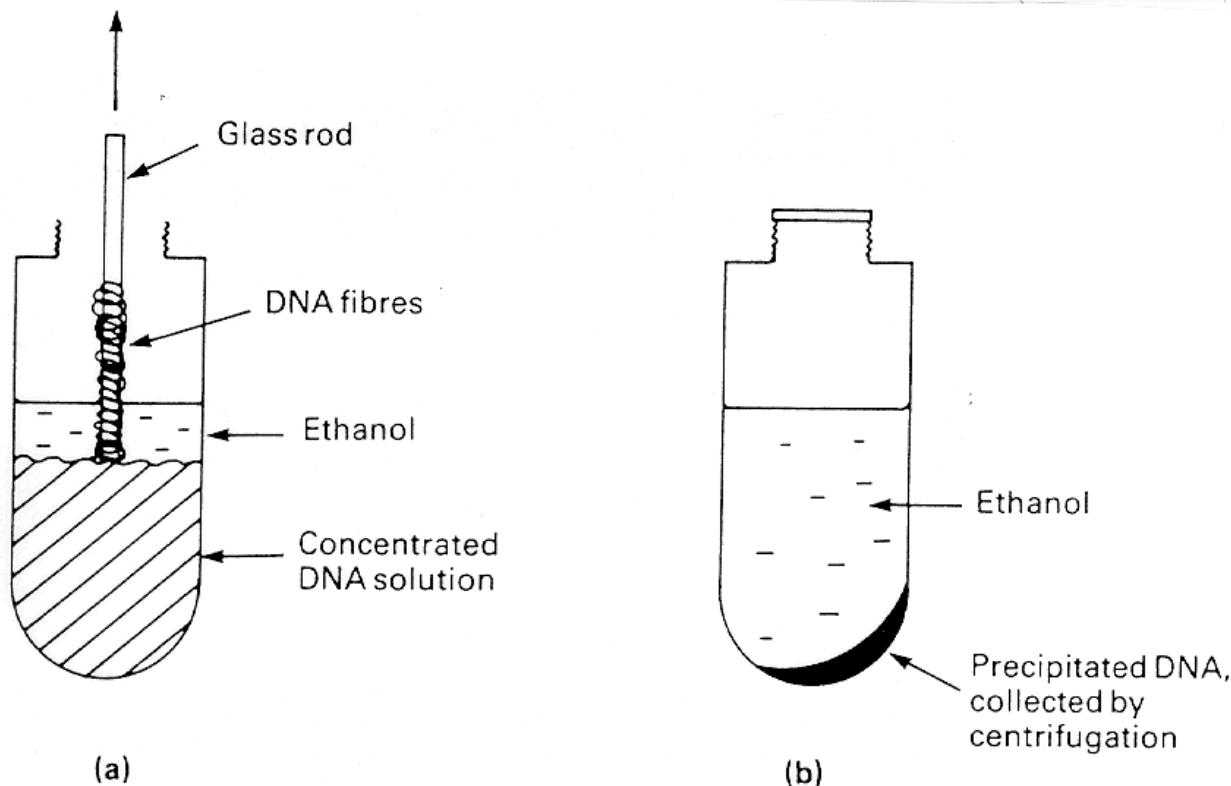


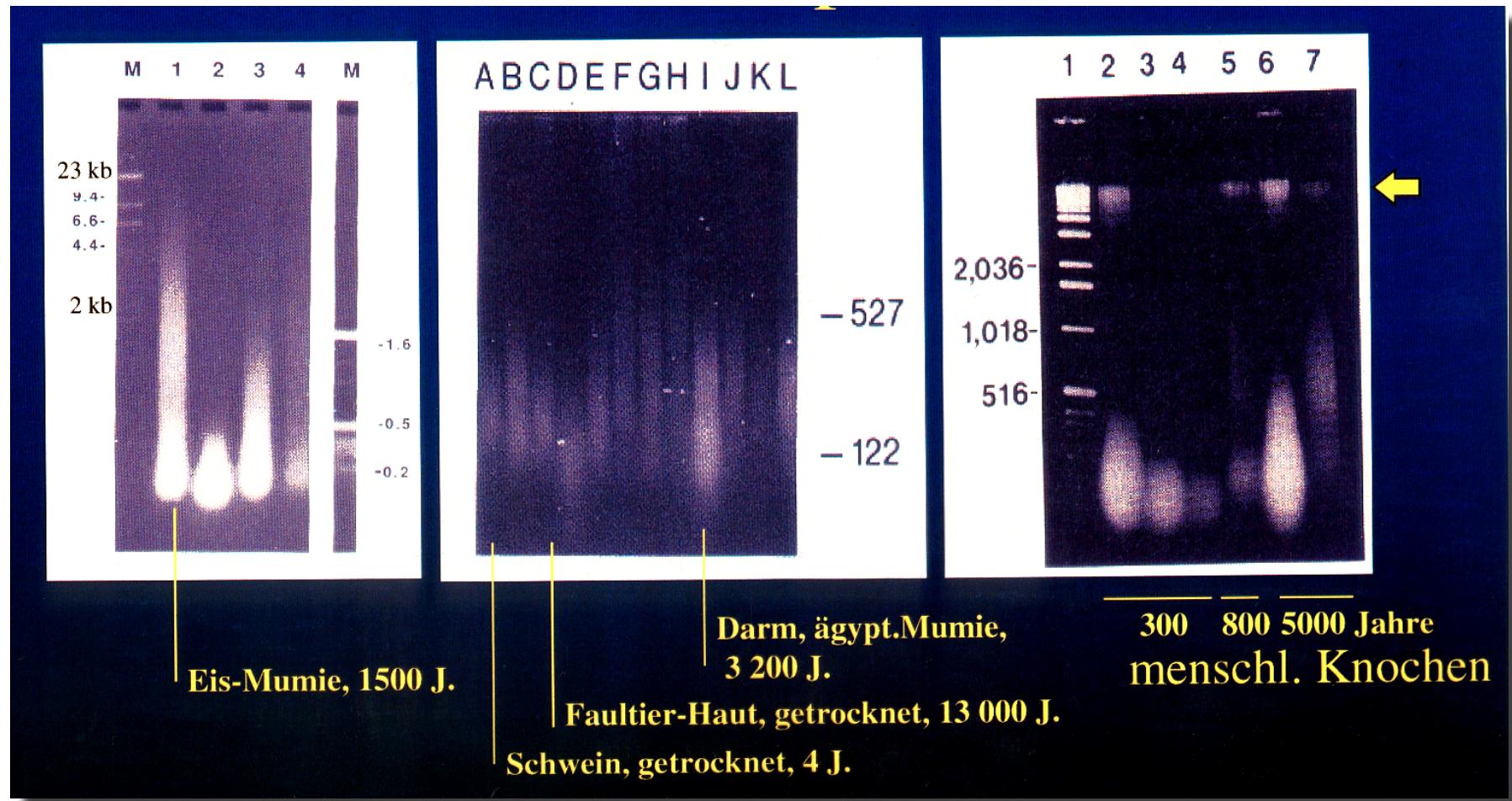
Figure 3.6 Collecting DNA by ethanol precipitation. (a) Absolute ethanol is layered on top of a concentrated solution of DNA. Fibres of DNA can be withdrawn with a glass rod. (b) For less concentrated solutions ethanol is added (at a ratio of 2.5 volumes of absolute ethanol to 1 volume of DNA solution) 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. bidest oder Puffer lösen
- gelöst kurzfristige Aufbewahrung bei 4°C, längerfristig bei -20°C.

# Stabilität von ‚Ancient DNA‘

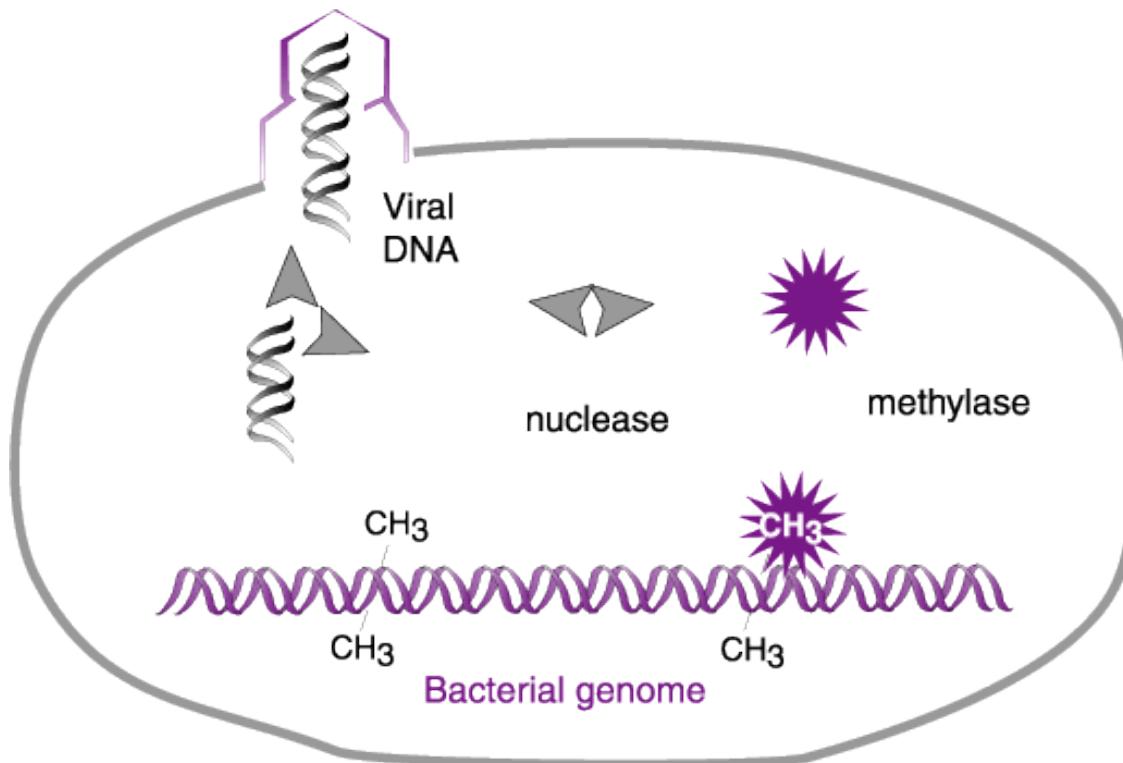


**Technische Säulen  
der Molekulargenetik....**



**Schneiden von DNA  
mit Restriktions-  
endonukleasen**

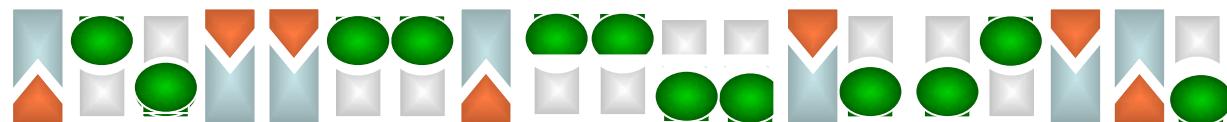
# Restriktions/Modifikationsenzyme schützen Bakterien vor eindringender fremder DNA



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!

5'-G A T C C A A G A A T T C T T A C G T -3'

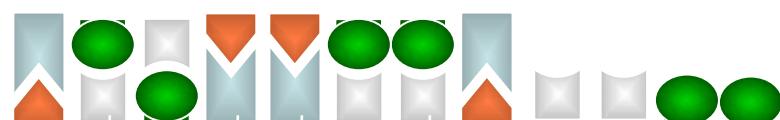


3'-C T A G G T T C T T A A G A A T G C A -5'



x Eco RI

5'-G A T C C A A G -3'OH



3'-C T A G G T T C T T A A -5'

5'-A A T T C T T A C G T -3'



OH3'-G A A T G C A -5'



[rebase.neb.com](http://rebase.neb.com)

A T						C G					
Pos. no.	Recognition sequence	Restriction endo- nuclease	Number of recogni- tion sites on pBR $\lambda$	322		Pos. no.	Recognition sequence	Restriction endo- nuclease	Number of recogni- tion sites on pBR $\lambda$	322	
1	A A T T	<i>Tsp EI</i>	188	8		68	A↓C G T	<i>Mae II</i>	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 RI</i>	5	1		70	G A C G T↓C	<i>Aat II</i>	10	1	
4	(G)↓A A T T (C)	<i>Fsi I</i>	58	1		71	G A C G T↓C	<i>Ssp 5230 I</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 P I</i>	3	0	
6	T A A T T A	—				73	(C) A C↓G T (G) (T)	<i>Bsa AI</i>	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 B I</i>	1	0	
8	G A T C	<i>Dpn I</i>	116	22		75	G C G I 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 ug λ-DNA in einer Stunde vollständig spaltet
- Assay:            DNA
  - + Enzym (< 1/10 des Assay-Volumens)
  - + Salze (Mg<sup>++</sup>, 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....**



# **Größenauf trennung von DNA- Restriktionsfragmenten durch Gel-Elektrophorese**

**DNA a go go!**

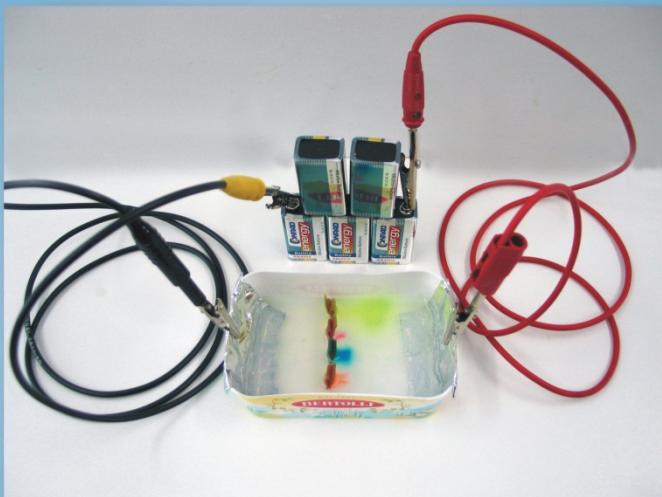
**IMSB**

Institut für  
Molekulargenetik  
genetecnologische Sicherheitsforschung  
und Beratung

**JOHANNES  
GUTENBERG**  
UNIVERSITÄT  
MAINZ

# DNA à Go Go

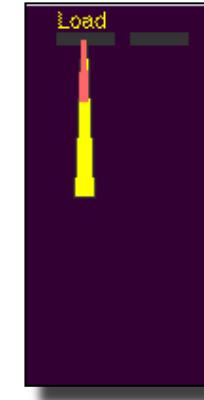
Lassen Sie die Moleküle im  
elektrischen Feld tanzen



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:

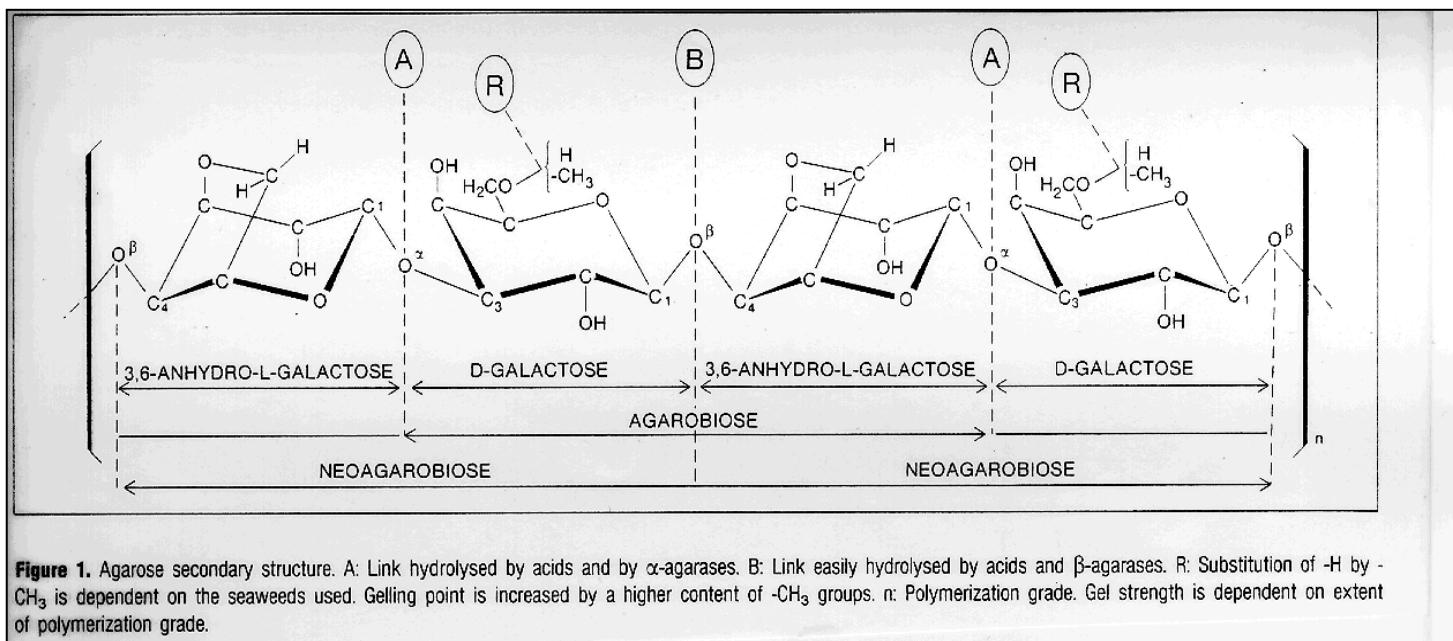
- bei pH 6-9 Asp / Glu > negativ  
Lys / Arg > positiv  
His / Cys > pos. oder neg.

## 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, giert beim Abkühlen ab etwa 44 °C

- Porengröße und damit Trenneigenschaften hängen von der Agarosekonzentration ab.

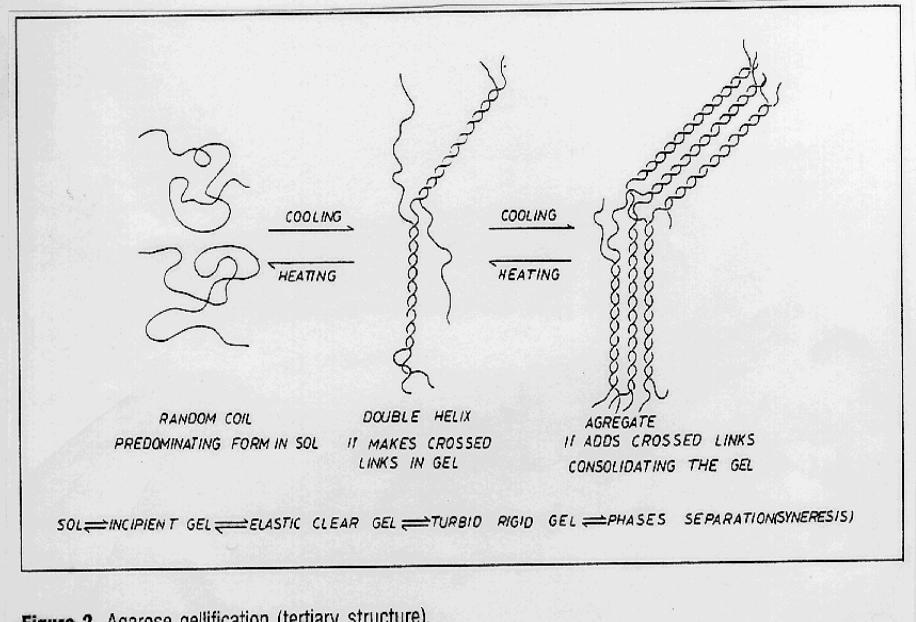


Figure 2. Agarose gellification (tertiary structure).

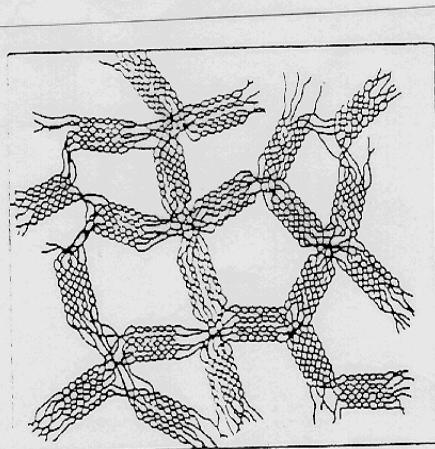


Figure 3. (Arnot *et al.*; 1974) Agarose gel network (quaternary structure). The aggregates in agarose gels may actually contain 10–10000 helices rather than the smaller number shown here.

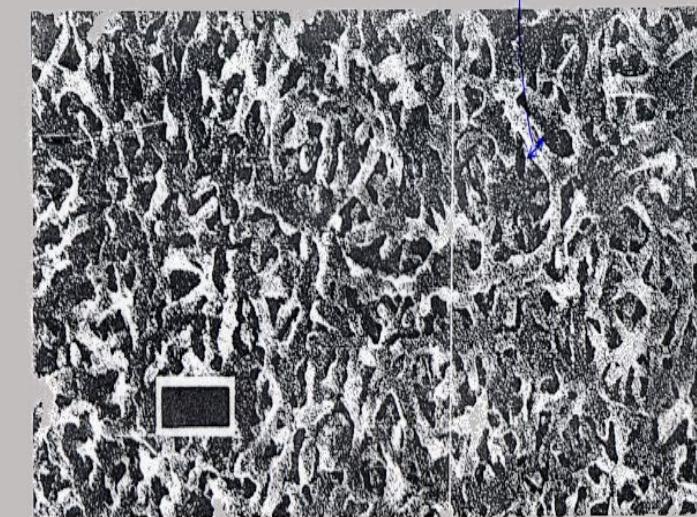
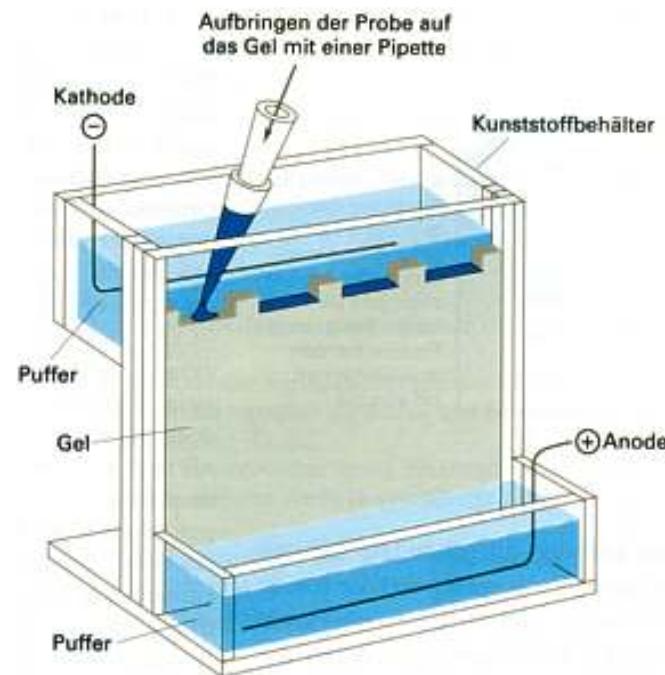
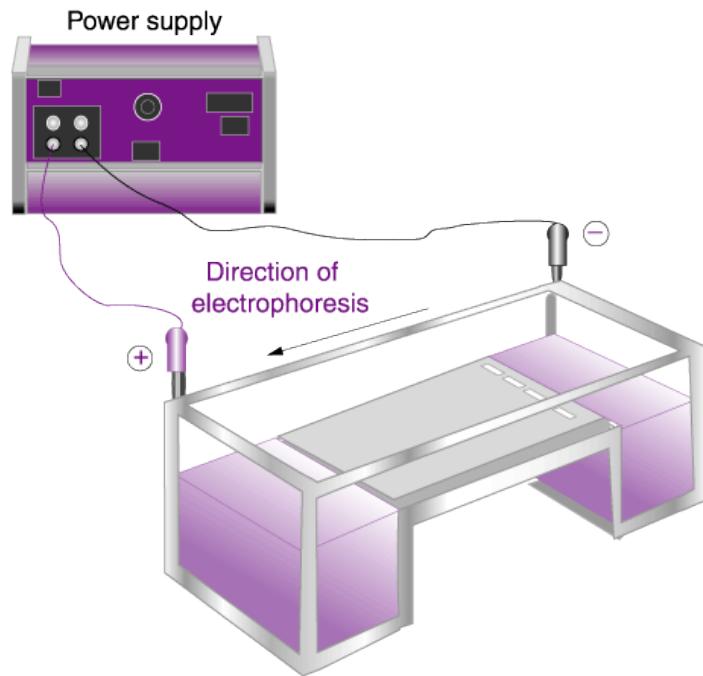


Figure 8.10 Electron micrograph of a portion of a 2% agarose gel. 1  $\mu\text{m} \times 0.5 \mu\text{m}$  overall; small black rectangle is 1000 Å  $\times$  500 Å. Individual gel fibers are about 100 Å wide. Courtesy of Sue Whytock and John Finch.

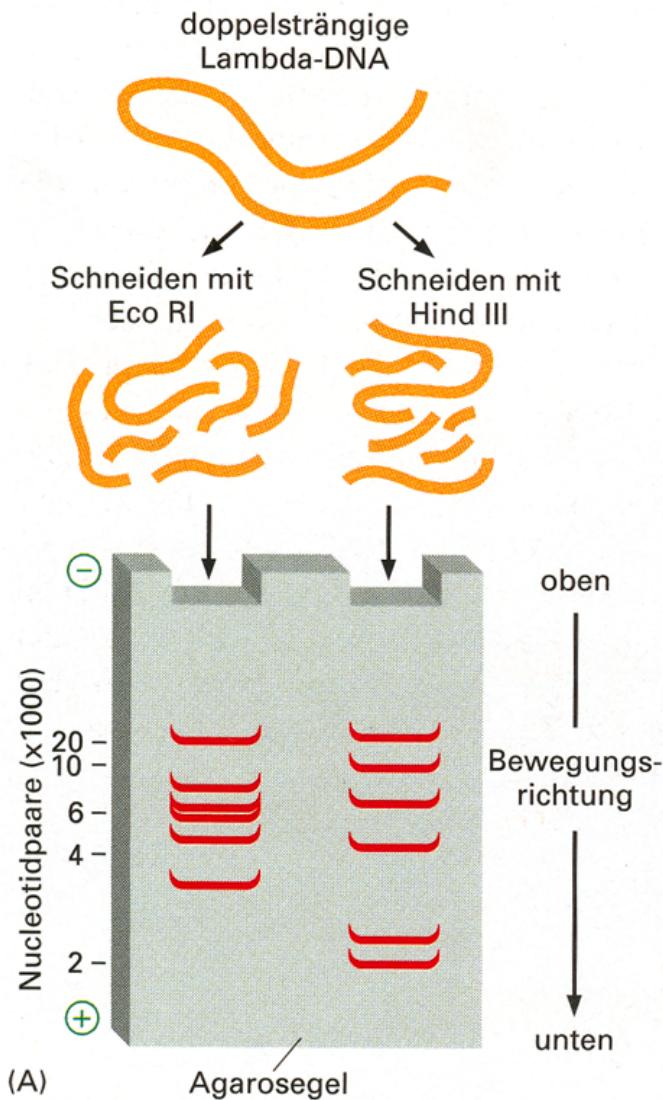
# Horizontale vs. vertikale Elektrophorese



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

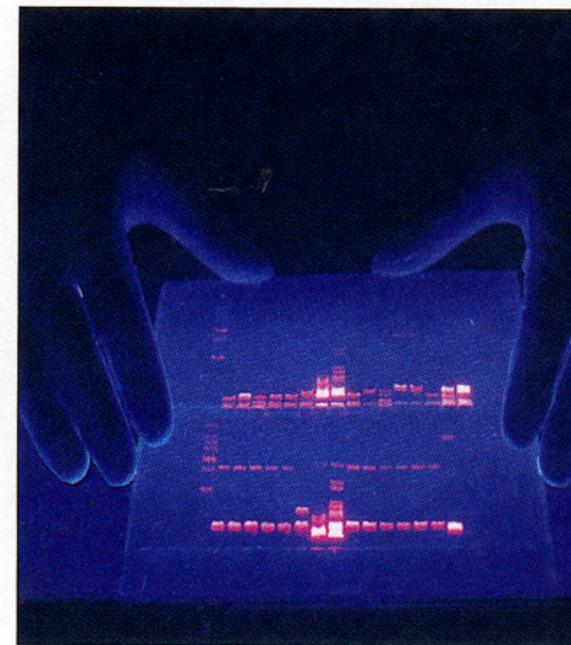
- Auftragsvolumen flexibler
- Auftrennung im unteren MW-Bereich schärfer

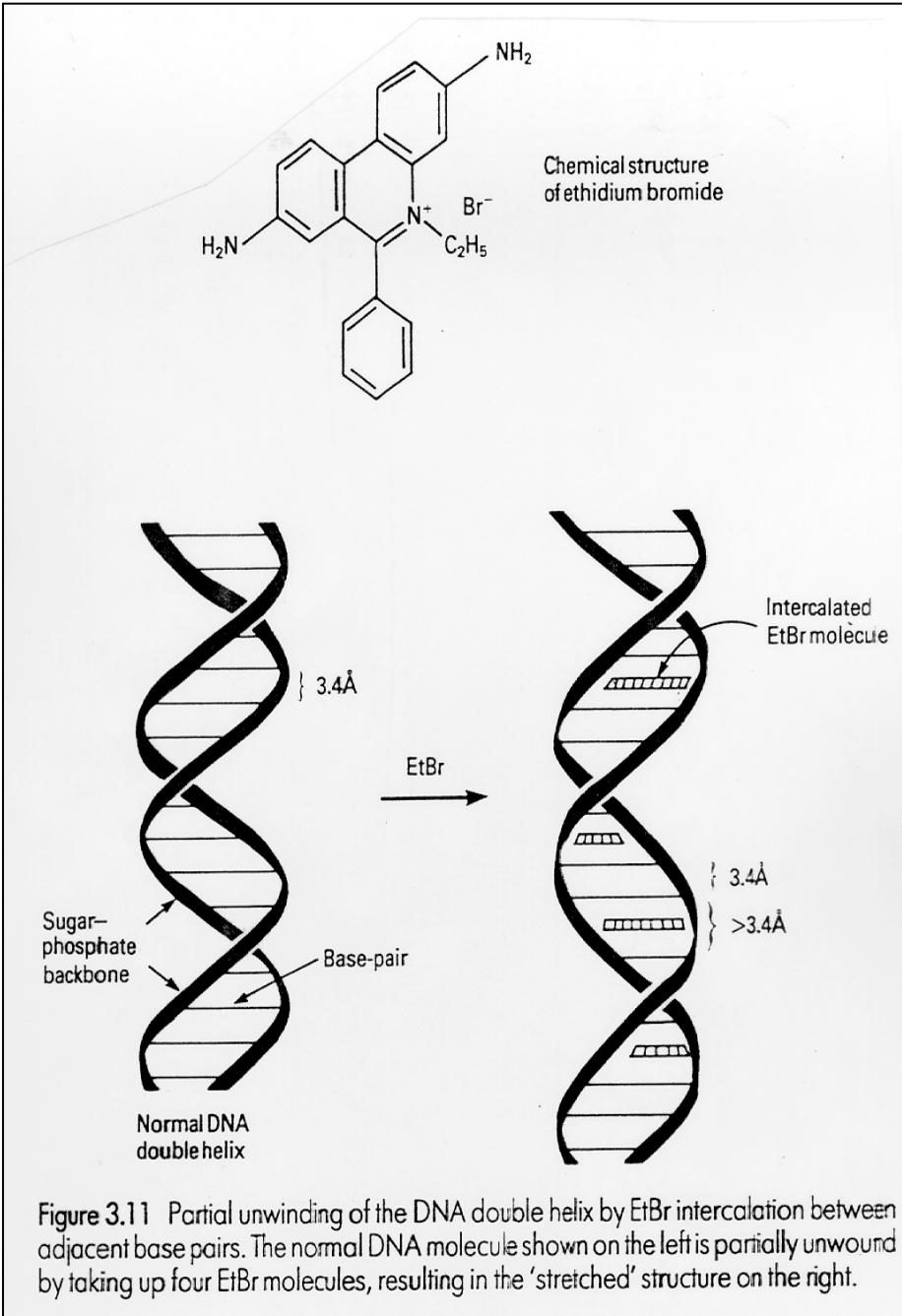
# Größensorтировung von DNA-Restriktionsfragmenten



Gel ist hier mit Ethidiumbromid  
Gefärbt: EtBr interkaliert in DNA

> ergibt im UV-Licht eine  
orange-rote Fluoreszenz





# Ethidiumbromid



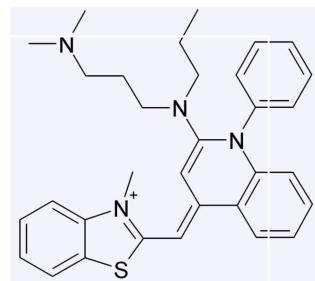
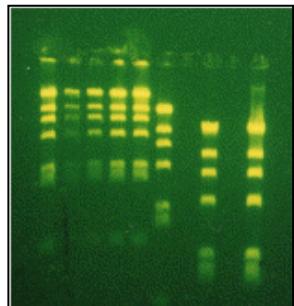
## Mutagen

- Nachweis von ss/ds DNA/RNA
- bindet sequenzunspezifisch
- Färbelösung 5 µg/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!**

Die ungefährliche Alternative...

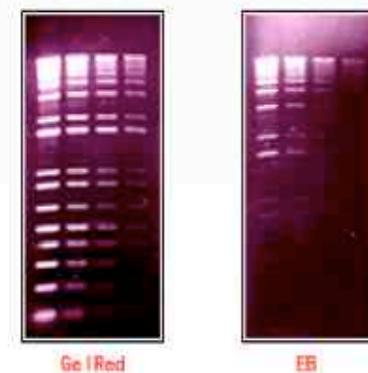
# SYBR Green

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

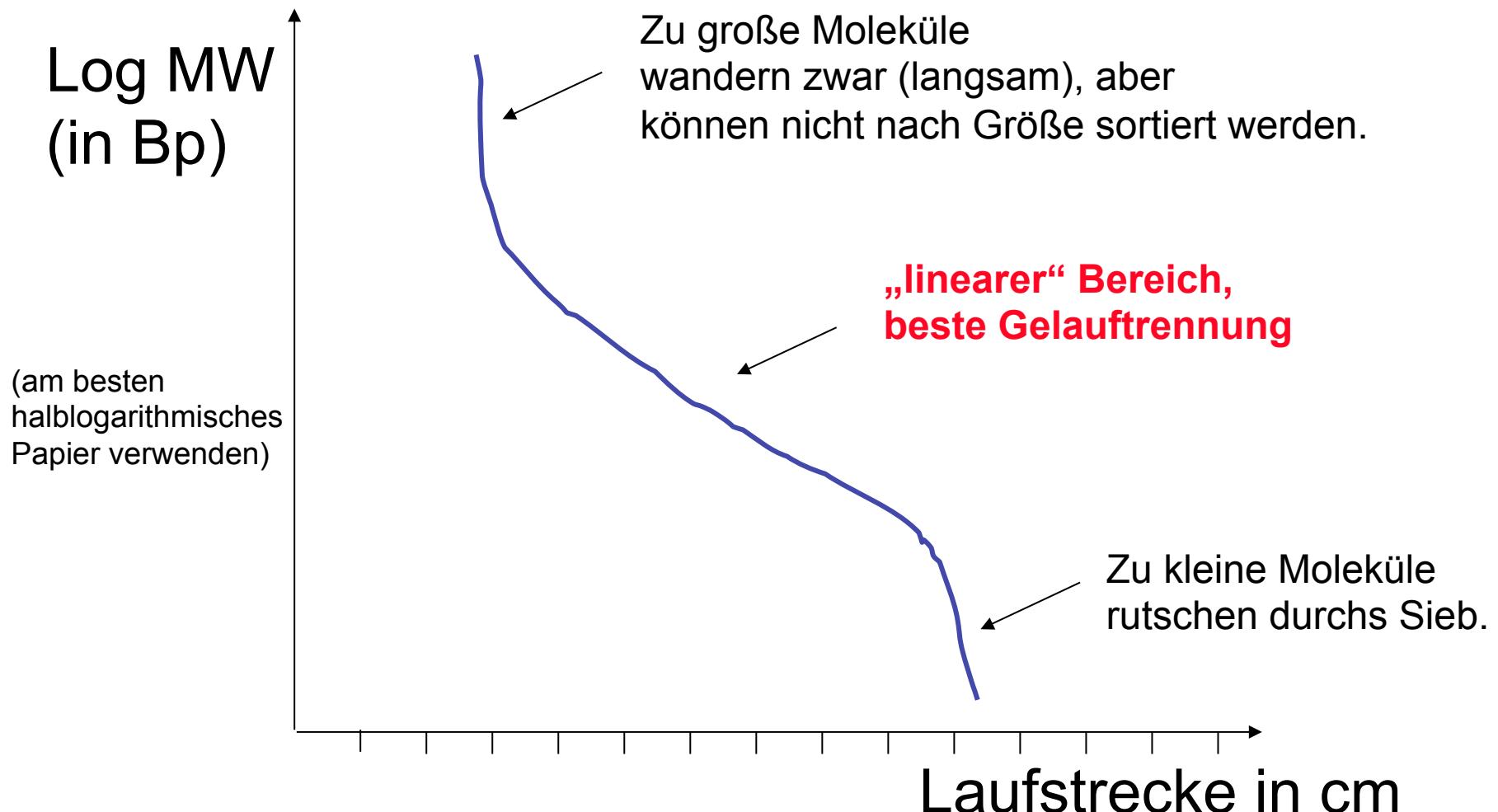


- Fa. Biotium
- sensitiver als SybrGreen
- AbsMax bei 300 nm (UV), Emission 600 nm (rot)
- nicht-mutagen, ungiftig

# 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...

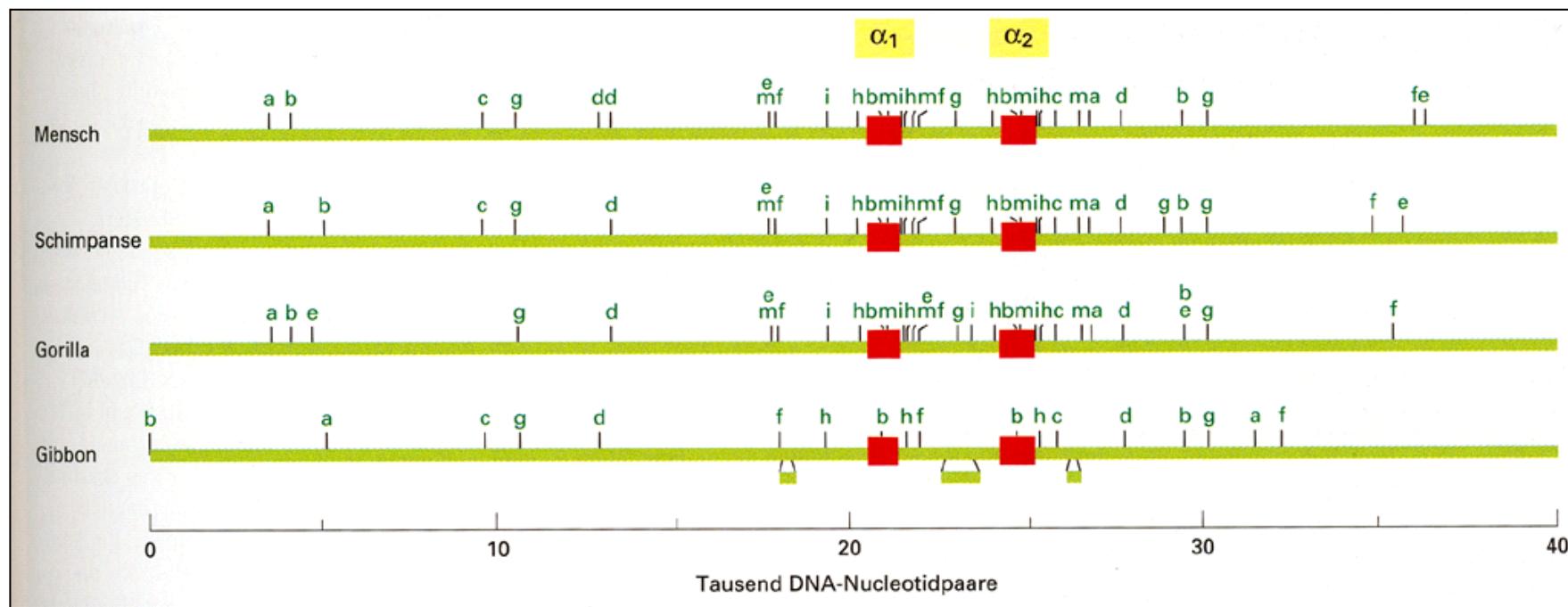


# **Und die Anwendungen dieser Techniken?**

Hier nur wenige ausgewählte Beispiele...

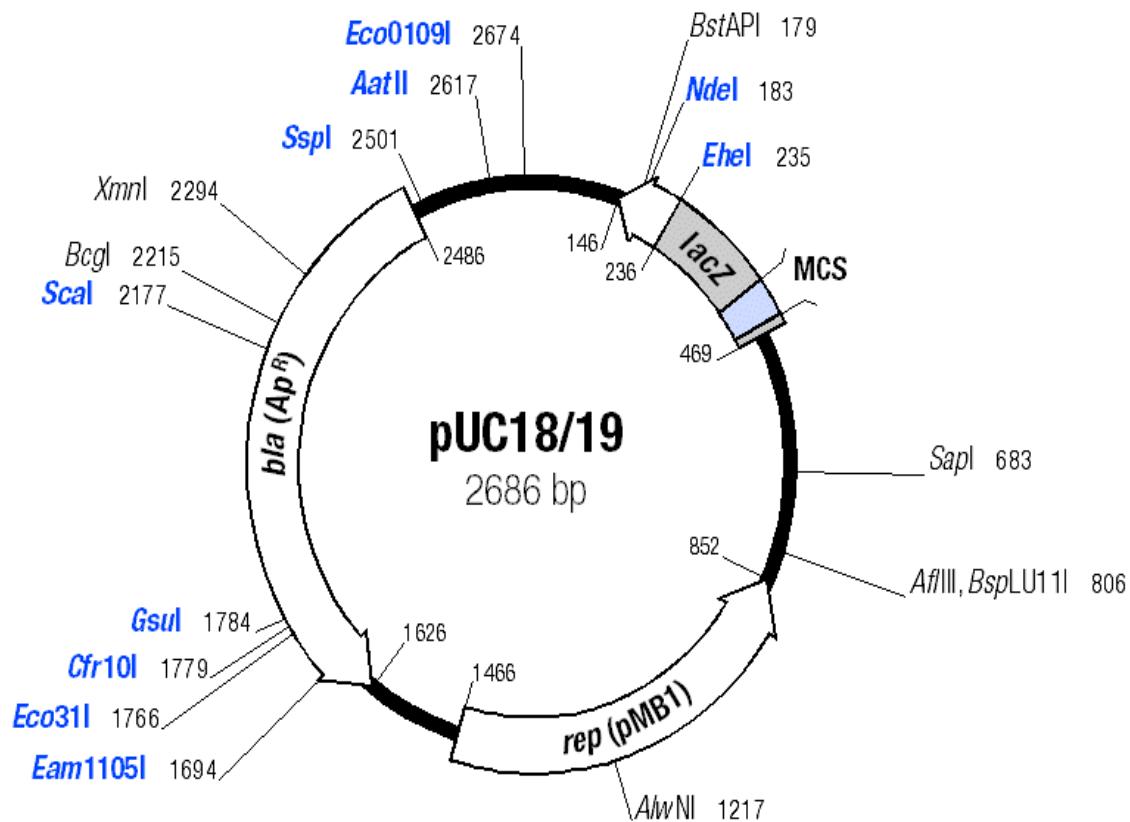
# Restriktionsschnittstellen dienen als „Marker“ auf der DNA

z. B. zur Kartierung von Genomen

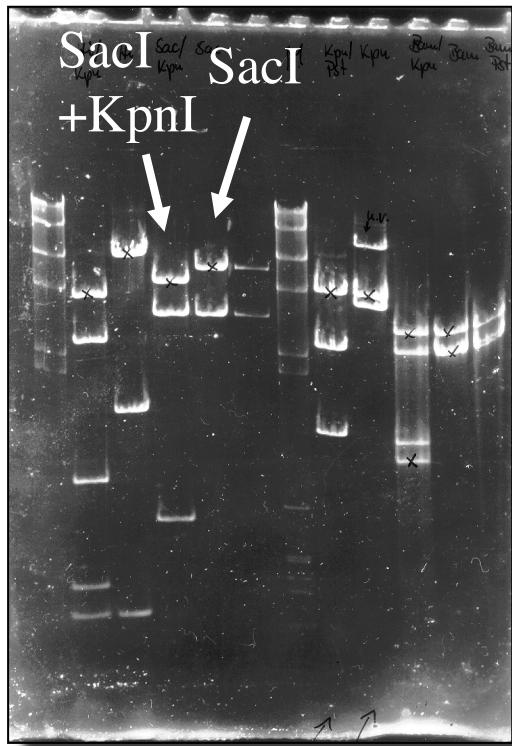


Restriktionsschnittstellen-Karte des alpha-Globin-Genortes  
in verschiedenen Primaten-Spezies

# Restriktionskarte eines Plasmids



# Restriktionskartierung von Genomen: how to...



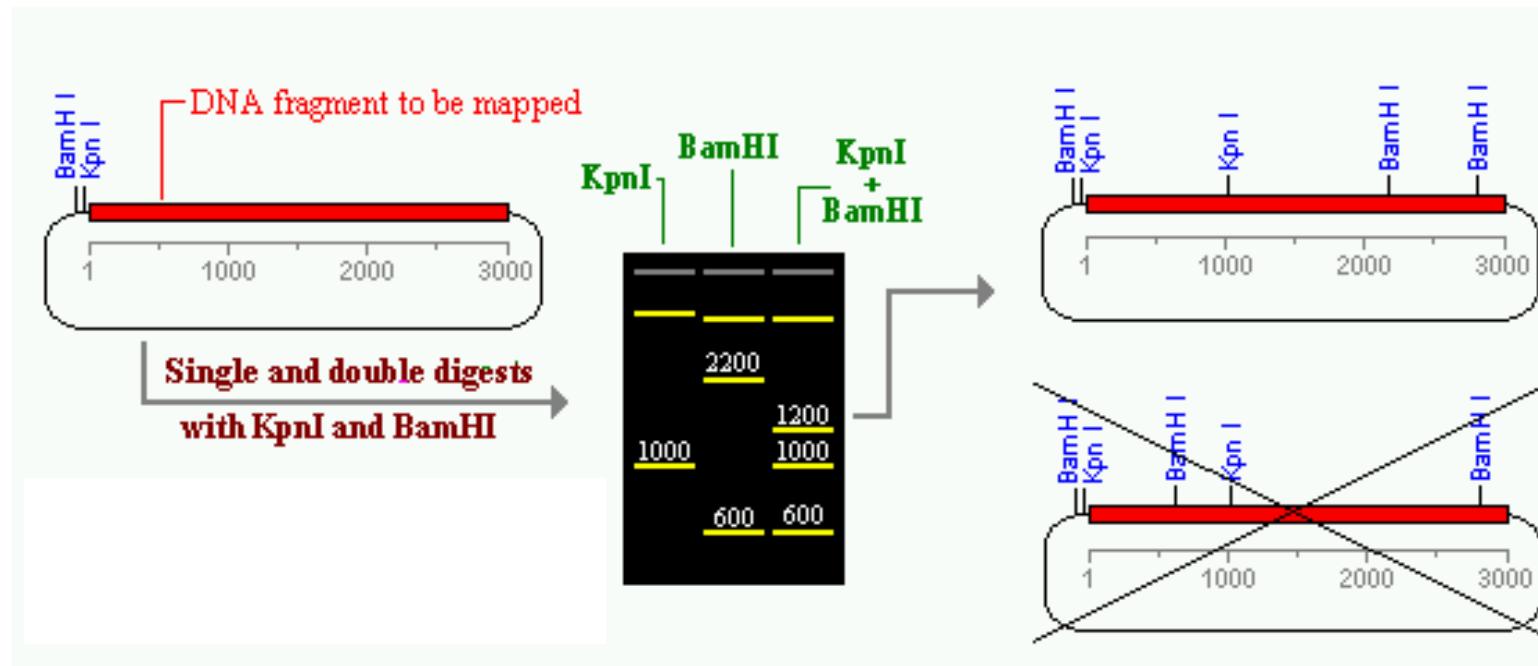
## Strategie:

„Einfach-“ und „Doppelverdaus“  
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

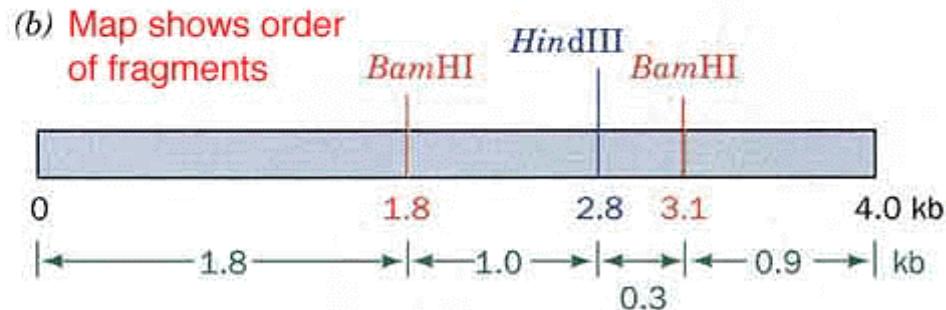
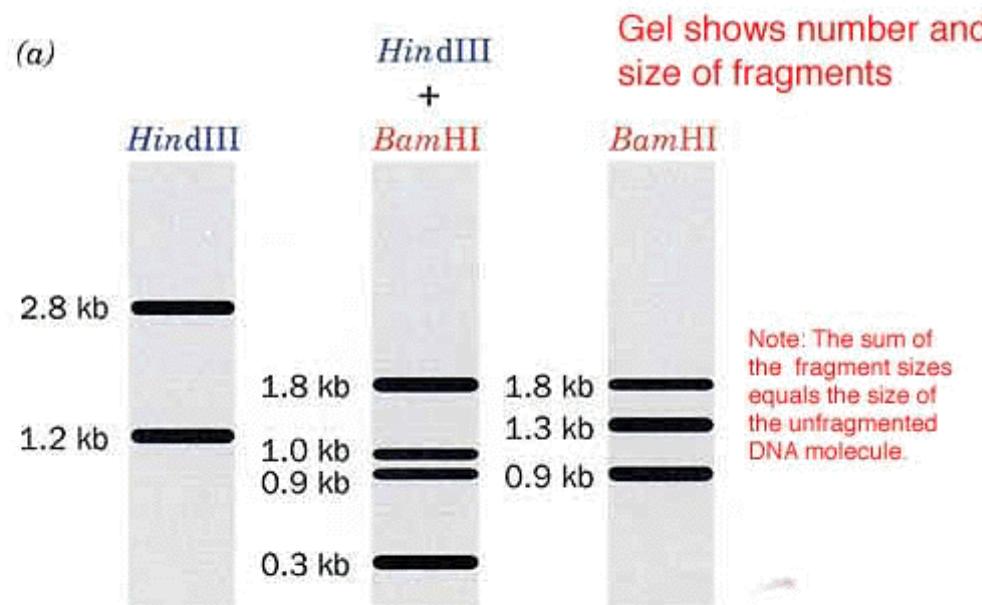
# Restriktionskartierung von Genomen

...zum Beispiel für ein Plasmid:



# Restriktionskartierung

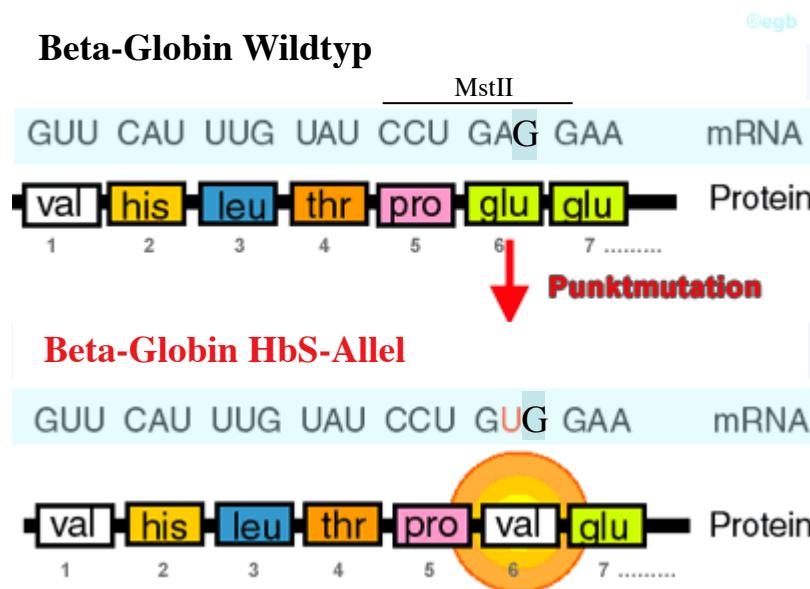
Ein weiteres Beispiel für ein lineares DNA-Molekül...



# Restriktionsschnittstellen sind „Marker“ in der Gendiagnostik

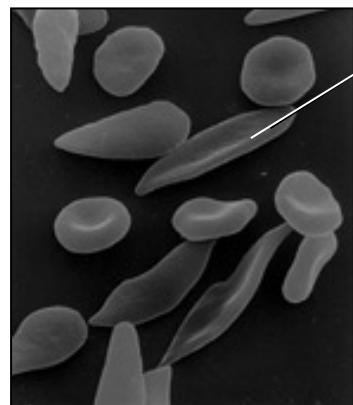
**Beispiel: Sichelzellanämie**

Mutation in Kodon 6 der  $\beta$ -Globin-Kette



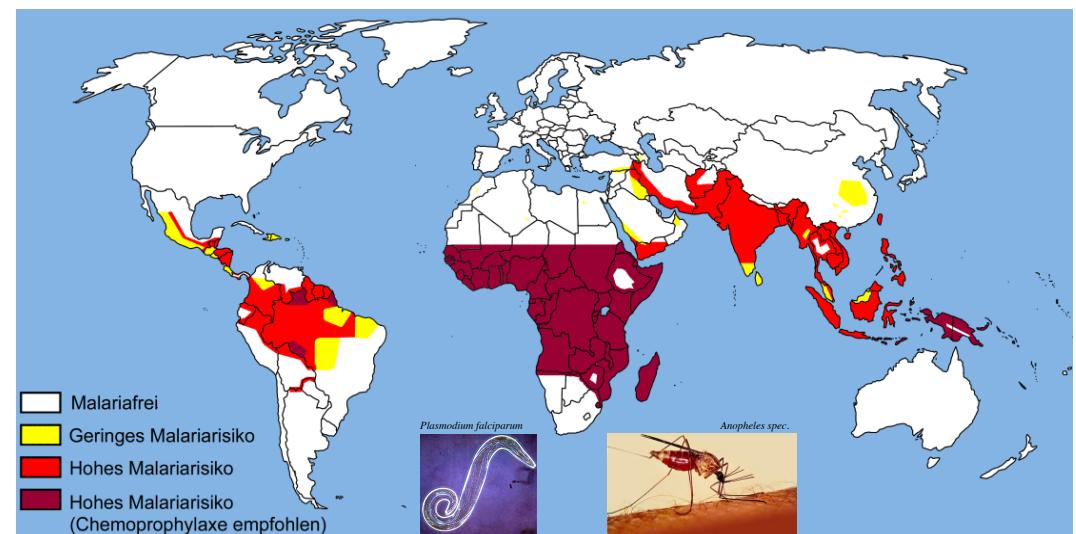
# Restriktionsschnittstellen sind „Marker“ in der Gendiagnostik

## Beispiel: Sichelzellanämie



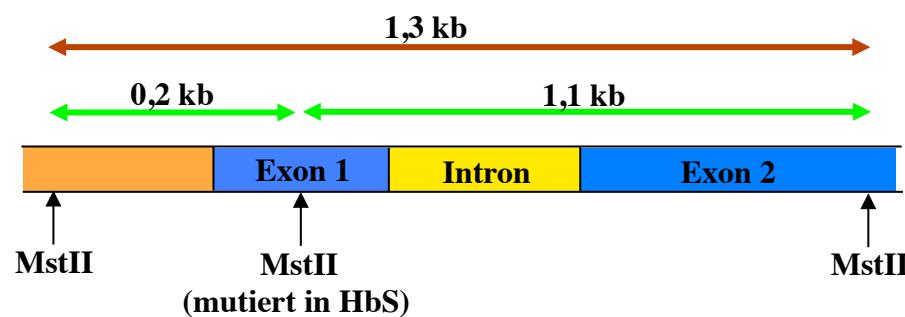
Deoxy-HbS kristallisiert  
in Erythrozyten  
> Hämolyse, Gefäßverschluss  
> Homozygot oft vor  
30. Lebensjahr letal

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

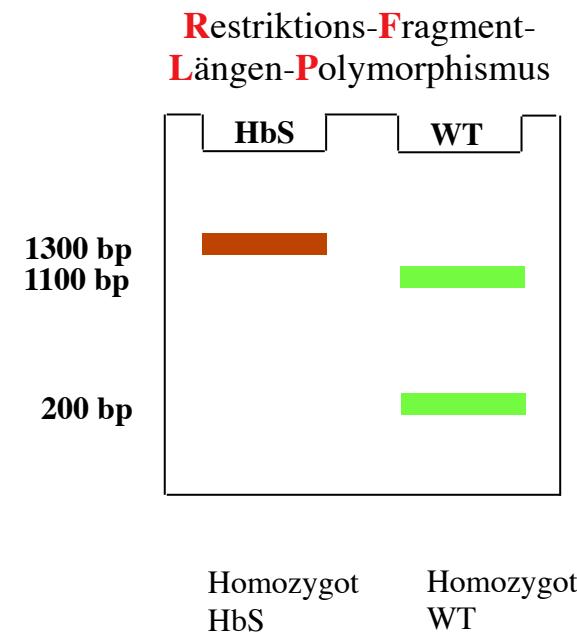


# Restriktionsschnittstellen sind „Marker“ in der Gendiagnostik

Beispiel: Sichelzellanämie

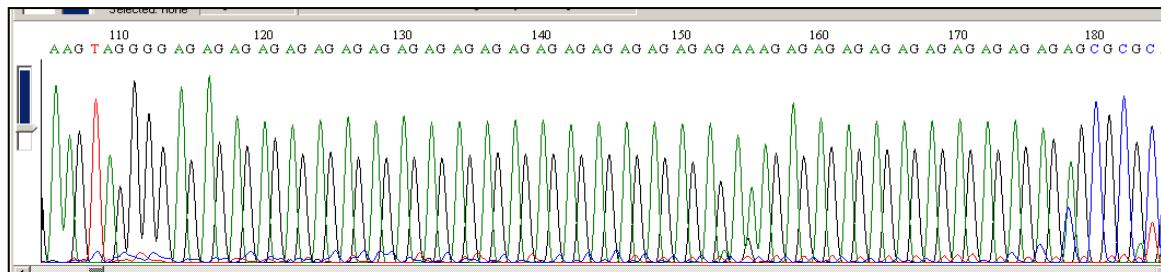


MstII CCTNAGG



# Forensische Diagnostik:

## Bestimmung der Längenpolymorphismen von Mikrosatelliten-DNA



„Mikrosatellit“ (syn. simple sequence):  
liegen überall verstreut in Eukaryoten-Genomen

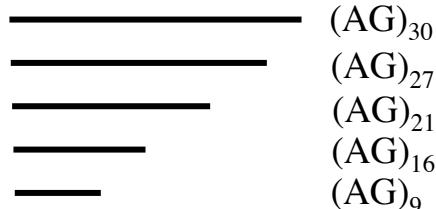
1. Isolierung eines spezifischen  
μSat-Locus durch PCR



2. Längenbestimmung durch  
Gelelektrophorese oder  
DNA-Sequenzierung

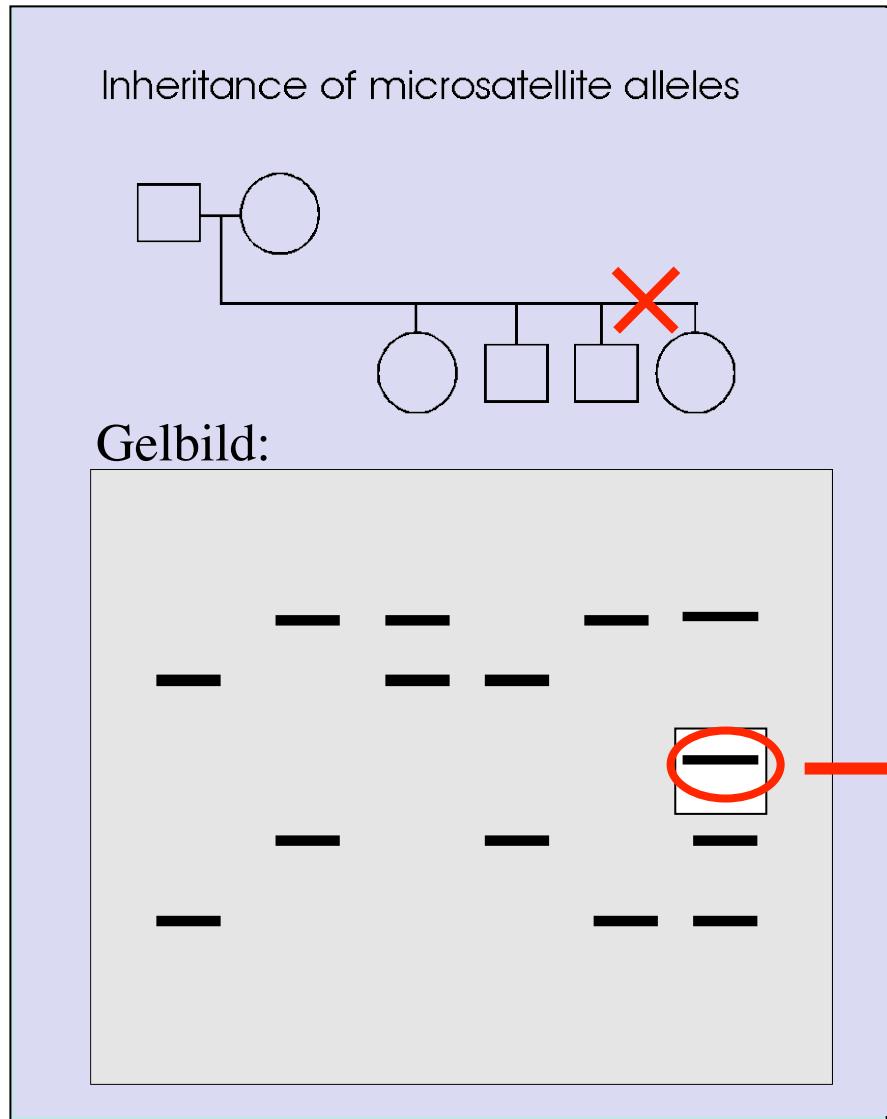
Hohe Mutationsrate durch Polymerase-Stottern bei der Replikation („slippage“)  
erzeugt in der Population viele Allele unterschiedlicher Länge:

z. B.



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

