



DNA Gewinnung aus eigenen Wangenschleimhautzellen



Überblick

Mit diesem Kit isolieren Schüler **ihre eigene genomische DNA** und stellen tragbare DNA Halsketten her. Jeder Schüler extrahiert dabei mit einer einfachen Methode nackte DNA aus Zellen seiner bzw. ihrer Wangenschleimhaut. Im Rahmen dieses Vorgangs lysieren die Schüler eine Probe ihrer Wangenschleimhautzellen und beobachten dabei wie dünne weiße Fäden ihrer eigenen chromosomalen DNA durch Hinzufügen von Ethanol in der Lösung ausfallen. Jeder Schüler überträgt seine DNA in ein Mikrozentrifugenröhrchen und stellt aus diesem Röhrchen und einer bunten Schnur eine Halskette mit DNA Anhänger her.

Zielsetzung

- Schüler lernen die Funktion der DNA kennen.
- Schüler lernen wie DNA in den Zellen eingebunden ist.
- Schüler lernen wie DNA aus den Zellen isoliert werden kann, indem sie DNA aus ihren eigenen Wangenschleimhautzellen extrahieren.

Inhalt:

Das Kit ist für 32 Schülern ausgelegt.

Im Kit enthalten:

- 32 x Mikrozentrifugenröhrchen als Anhänger
- 32 x 15 ml Röhrchen
- 32 x Plastikbecher (ca. 30 ml)
- 40 x 3 ml Meßpipetten
- 4 x Päckchen Stickgarn
- 1 x Flasche Sportgetränk
- 3 x 25 ml Flasche mit Lösung zur Zell-Lyse
- 3 x 100 ml Ethanol 70%

Nötig, jedoch nicht im Kit enthalten:

- Tiefkühlfach oder Eisbehälter zur Kühlung des Ethanols
- Schere zum Schneiden des Garns
- Permanentmarker oder Etiketten zur Kennzeichnung der 15 ml Röhrchen
- Reaktionsgefäßständer oder Bechergläser zur aufrechten Lagerung der Röhrchen

Zeitliche Vorgaben

Für die einzelnen Schritte bei der Herstellung einer DNA Pipette in der Klasse gibt es folgende zeitliche Vorgaben:

Zeit	Maßnahmen
20 Minuten	Lehrervorbereitung
5 Minuten	Entnahme von Wangenschleimhautzellen
10-30 Minuten	optionales Pelletieren der Zellen
20 Minuten	Zugabe von Ethanol zum Zell-Lysat
10 Minuten (Minimum)	DNA Ausfällung
10-15 Minuten	DNA Übertragung in die Pipette und Herstellung der Halskette

Sicherheit

- Jede/r Schüler/in sollte nur mit seinen bzw. ihren eigenen Wangenschleimhautzellen arbeiten. Sobald die Zellen gesammelt und in das 15 ml Röhrchen übertragen worden sind, sollten die Sammelbecher in den Abfall gegeben werden.
- Weisen Sie die Schüler darauf hin, dass sie sich zu jeder Zeit an die Sicherheitsbestimmungen im Labor halten müssen. Obwohl für das Sammeln von Wangenschleimhautzellen ein Sportgetränk verwendet wird, dürfen weder die für die Maßnahme verwendeten Lösungen noch die extrahierte DNA eingenommen werden.

- Ethanol ist ein brennbarer Alkohol, der zu jeder Zeit von Hitze und Feuer fernzuhalten ist. Weisen Sie Ihre Schüler darauf hin, dass ihre DNA Kettenanhänger geringe Mengen Ethanol (0,5 ml) enthalten.

Vorbereitungen

Wichtiger Hinweis: Sorgen Sie dafür, dass die Schüler am Morgen vor der Zellentnahme keinen Kaffee trinken, da hierdurch die DNA Menge, die man erhält, geringer ausfallen könnte.

1. **Lesen Sie die Schüleranleitung durch** und machen Sie sich mit dem Laborversuch vertraut. Fertigen Sie bei Bedarf für jeden Schüler in Ihrer Klasse eine Kopie der Schüleranleitung an.
2. Kühlen Sie das 70%-ige Ethanol, indem Sie es in einem Tiefkühlfach oder in einem Behälter mit Eis lagern bis es gebraucht wird.
3. Füllen Sie für jeden Schüler mit einer der dafür vorgesehenen Pipetten 2 ml des Sportgetränks in einen kleinen Plastikbecher. Verwenden Sie zur Abmessung die Teilstriche an der Pipette.
4. Schneiden Sie für jeden Schüler einen ca. 75 cm langen Faden des Stickgarns ab.
5. Richten Sie eine Station ein, wo Sie die Lösung für die Lyse der Zellen ausgeben. Für jede Flasche der Lyse-Lösung gibt es eine Pipette. Wenn es zur Ausfällung kommt, bringen Sie die kalten Ethanolflaschen zu der Station. Für die Ethanolflaschen stehen drei Pipetten zur Verfügung.

Vorgehensweise

1. Verteilen Sie folgende Materialien an jeden Schüler:

Schülerleitfaden
Kleiner Plastikbecher mit 2 ml Sportgetränk
15 ml Röhrchen
Plastikpipette
Röhrchenanhänger
Stickgarnfaden

2. Beachten Sie folgende Hinweise zur Fehlerdiagnose:
 - o Vielleicht möchten Sie das Mundausspülen mit dem Sportgetränk in Ihrer Klasse auf 1 Minute festlegen um sicherzustellen, dass alle Schüler das Sammeln ihrer Wangenschleimhautzellen in angemessener Zeit durchführen.
 - o Die Menge der gesammelten Zellen und das Resultat der DNA Ausfällung wird bei den einzelnen Schülern in der Klasse variieren. Die Schüler sollten darauf hingewiesen werden, dass diese Abweichungen in jeder Gruppe auftreten, die diese Methode anwendet und dass sie keine Auswirkung auf die Qualität der Erbinformation des einzelnen haben.

- Die DNA Proben werden sich ebenfalls darin unterscheiden, wie schnell sie nach Hinzufügen von Ethanol in der Lösung ausfallen. Deshalb empfehlen wir, die Proben so lange wie möglich während der vorgesehenen Unterrichtszeit, **mindestens jedoch 10 Minuten**, ausfallen zu lassen.
- Da die entnommenen DNA Proben unverarbeitet sind, enthalten sie Nuklease-Eiweißmoleküle, die DNA abbauen und dazu führen, dass die DNA über einen Zeitraum von Monaten in ihre Einzelteile zerfällt. Lagert man die DNA Halsketten in einem Tiefkühlfach, verlangsamt sich der Abbau.

Hintergrundinformationen

Der „genetische Code“

Die DNA kann als „genetischer Code“ bezeichnet werden, da sie Informationen besitzt, die die Merkmale eines Lebewesens festlegen, und sie wird von einer Generation zur nächsten weitergegeben. Die DNA ist mit einem Rezept oder einer Liste vergleichbar, die Anweisungen enthalten wie ein bestimmtes Lebewesen erschaffen und erhalten werden soll. Fast alle Strukturen und Funktionen von Lebewesen sind von der DNA abhängig und durch sie festgelegt. Außerdem ist die DNA Struktur unter allen Spezies einheitlich.

Die Gene (Informationssequenzen, die bestimmte Orte auf der DNA belegen und spezifische Merkmale kontrollieren) sind jedoch bei den einzelnen Lebewesen verschieden.

Hieraus entstehen klare „Blaupausen“ mit Bauplänen für die einzelnen Lebewesen. Die Gene enthalten die Information Proteine herzustellen und legen fest wie viele dieser Proteine hergestellt werden. Unsere DNA kontrolliert zum Beispiel die Pigmentierung unserer Haut. Jede menschliche Hautzelle produziert eine bestimmte Menge Melaninprotein (Pigment) gemäß den DNA Vorgaben des Melaninogens. Vererbte Abweichungen in diesem Gen sind für Unterschiede der Hautfarbe in der Bevölkerung verantwortlich.

Verpackung der DNA

Die DNA ist im Zellkern fast jeder Zelle des menschlichen Körpers enthalten. Die DNA in einer Zelle ist ungefähr 100 000 Mal so lang wie die Zelle selbst. Dennoch passt die DNA in den Zellkern hinein, der nur etwa 10% des Zellvolumens ausmacht, weil sie besonders komprimiert bzw. „gepackt“ ist.

Die Grundstruktur der DNA gleicht einer Wendeltreppe, die als Doppelhelix bezeichnet wird. Um die Länge dieses DNA Moleküls zu komprimieren, ist die Doppelhelix spiralförmig um Histonproteine gewickelt. Diese von DNA umwickelten Histonproteine sehen aus wie eine Perlenkette. Dieser Komplex aus DNA und Histonproteinen wird als Chromatin und die perlenkettenartigen Strukturen von Histonen und aufgewickelter DNA als Nukleosome bezeichnet. Um die DNA weiter zu komprimieren, faltet sich das Chromatin weiter auf, und die Nukleosome werden zu einem kompakten proteinumhüllten Faden gepackt. Der Faden spult sich auf, um sich weiter zu verkürzen in ein auseinandergezogenes Chromosom. In seinem komprimiertesten Zustand gliedert sich dieser aufgespulte Faden in Schlaufen, die einer zentralen Achse (Gerüst) entspringen und ein kondensiertes, x-förmiges Chromosom bilden. (siehe Abb.1)

Der Mensch hat 46 Chromosomen im Zellkern fast jeder Zelle. Wie oben beschrieben besteht jedes Chromosom aus einem langen durchgängigen DNA-Strang, der komprimiert und um Proteine herumgewickelt ist. Würde man die 46 Chromosomen einer menschlichen Zelle auseinanderwickeln und aneinanderlegen, hätten sie eine Länge von etwa 1,80 m! Während der Interphase (es findet keine Teilung statt) der Zellen, sind die Chromosomen dekondensiert und liegen wie ein Haufen, mit

einem Wattebausch vergleichbar, im Zellkern. Während der Mitose (Zellteilung) kondensieren die Chromosomen und werden als 46 einzelne X-förmige Strukturen erkennbar (siehe Abb.1)

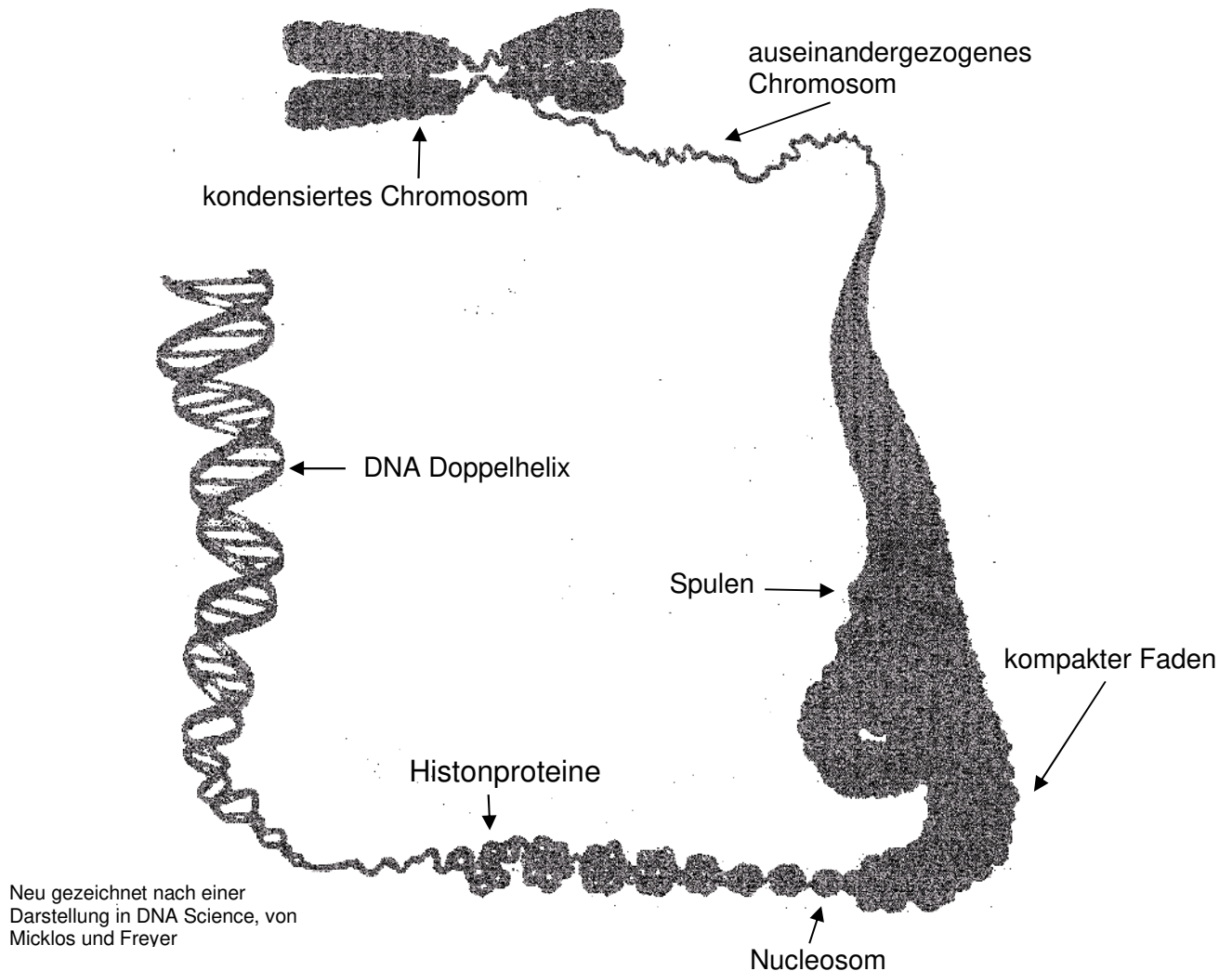


Abbildung 1. Kondensation einer DNA Doppelhelix in ein Chromosom

Chromosomale DNA einer einzelnen Zelle ist mit bloßem Auge nicht erkennbar. Wenn chromosomale DNA jedoch aus multiplen Zellen extrahiert wird, ist die große Menge leicht zu erkennen und gleicht transparenten schleimartigen Wattefäden. Diese DNA ist mit Proteinen umhüllt und befindet sich in unterschiedlichen Kondensationsphasen (siehe Abb.1). Einzelne kondensierte Chromosomen können mikroskopisch untersucht werden. Die Doppelhelix eines Chromosoms ist jedoch so dünn, dass man sie nur mit Hilfe komplizierter Methoden wie z.B. der Elektronenmikroskopie und Rasterelektronenmikroskopie erkennen kann.

DNA Extraktion aus menschlichen Wangenschleimhautzellen

Um chromosomale DNA aus menschlichen Wangenepithelzellen zu extrahieren, muss zunächst eine Probe intakter Zellen entnommen werden. Für diese Maßnahme wird ein Sportgetränk zur Mundspülung und Zellsammlung verwendet. Da Sportgetränke Salz (Natriumchlorid) in einer Konzentration enthalten, die mit dem osmotischen Milieu der Zellen kompatibel ist, nimmt das Volumen der Wangenschleimhautzellen während der Entnahme nicht dramatisch zu oder ab. Da

einfaches Wasser hypotonisch auf lebende Zellen wirkt, würden sie mit Wasser überflutet (durch Osmose) und platzen. Das salzhaltige Sportgetränk verhindert, dass die Zellen aufbrechen und ihre DNA freisetzen bevor Sie entnommen werden. Diese Methode ermöglicht das Sammeln einer großen Menge von Wangenschleimhautzellen, aus denen DNA extrahiert wird.

Sobald die intakten Zellen gesammelt wurden, muss die Zellmembran, die die Zellen und ihren Zellkern umgibt, aufgebrochen werden. Diese Membran schützt Zelle, Organellen und DNA und grenzt sie von ihrer Umgebung ab. Die Zellmembranen und Kernmembranen bestehen aus zwei Phospholipidschichten, die als Phospholipid-Doppelschicht bezeichnet werden. Das Aufbrechen der Zellmembranen wird als Zell-Lyse bezeichnet. Bei diesem Vorgang werden die Zellmembranen und Kernmembranen mit einer Lösung (Lysepuffer) gesprengt. Diese Lösung löst die Phospholipide in den Zellmembranen auf, indem sie wasserlösliche Verbindungen mit ihnen eingeht. Sobald die Zellmembranen abgebaut sind, fließt der Zellinhalt aus und bildet eine Suppe aus aufgelösten Membranen, Zellproteinen, DNA und anderen Bestandteilen. Diese „Suppe“ wird als Zell-Lysat bezeichnet.

Die DNA ist in dem Zell-Lysat aufgelöst. Das heißt, sie ist mit dem Lysat verbunden und unsichtbar (wie ein Teelöffel Zucker in einer Tasse Wasser). Die DNA ist jedoch nicht löslich in Ethanol (ein Alkohol), was bedeutet, dass sie nicht mit der Flüssigkeit verbunden werden kann (wie ein Teelöffel Sand in einer Tasse Wasser). Deshalb kann die DNA in dem Zell-Lysat sichtbar gemacht werden, indem man das Zell-Lysat mit Ethanol überschichtet.

Sobald das Ethanol auf das Zell-Lysat trifft, flockt die DNA in der Lösung aus und bildet eine durchsichtige Wolke aus dünnen zähen Fäden, dort wo das Ethanol auf das Zell-Lysat trifft. Mit **kalttem Ethanol** funktioniert die DNA Ausfällung am besten. Die DNA ist negativ geladen aufgrund der Phosphationen auf ihrem Hauptstrang. Positive Natriumionen aus dem Salz des Sportgetränks werden von der negativ geladenen DNA angezogen und ihre Ladung wird dadurch neutralisiert. Diese Neutralisation verhindert, dass sich die DNA Stränge gegenseitig abstoßen und bewirkt, dass sie bei ihrer Ausfällung verklumpen.

Es ist wichtig daran zu denken, dass die extrahierte DNA aus menschlichen Wangenschleimhautzellen eine gewaltige Sammlung von Chromosomen (viele DNA-Stränge) darstellt, die aus einer großen Anzahl von Zellen isoliert wurden und zusammenklumpen. Diese DNA ist aufgefaltet und kondensiert um Proteinmoleküle herum und gilt als unverarbeitet, da sie noch nicht von den Zellproteinen getrennt wurde, die während der Ausfällung an ihr haften. Die DNA Doppelhelix wird von den Proteinmolekülen verdeckt und befindet sich auf molekularer Ebene. Daher ist die Helix mit bloßem Auge und sogar mit einem gewöhnlichen Mikroskop nicht sichtbar.

Bedeutung der DNA Extraktion

Die DNA Extraktion in diesem Versuch erfolgte nach denselben Richtlinien wie in Verfahren, mit denen Wissenschaftler DNA unterschiedlicher Herkunft isolieren. Die DNA Extraktion ist ein wichtiges Verfahren, das weltweit in Forschungslaboratorien angewendet wird und die erste Maßnahme bei umfangreichen Experimenten darstellt. Durch die Extraktion und Untersuchung von DNA können Wissenschaftler herausfinden wie die DNA Anweisungen für alle Lebensvorgänge verschlüsselt. Die DNA Extraktion ist für die Untersuchung von Erbinformationen von Bedeutung sowie für die potentielle Behandlung von Krankheiten durch die Herstellung von DNA Molekülen zur Genterapie. Extrahierte DNA kann auch dazu dienen DNA Fingerabdrücke herzustellen, um Erbkrankheiten zu erkennen, Kriminalfälle zu lösen, Opfer von Naturkatastrophen und Kriegen zu identifizieren und eine Vaterschaft oder Mutterschaft festzustellen.

Wissenschaftler können die DNA geschickt genetisch verändern um robuste, krankheitsresistente, genetisch modifizierte Pflanzen und Tiere zu erschaffen. Eine DNA Extraktion ist auch notwendig um den DNA Code verschiedener Organismen zu entschlüsseln und zu vergleichen (wie bei dem „Human Genome Project“)