

Versuchsanleitung:

DNA ISOLATION & FÄRBUNG von Mundschleimhautzellen (Quick & Dirty)

Material: siehe auch  Bildmaterial: FGenFinger 1 & 2 (www.genie-konzept.de)

a) Trinkwasser ohne Kohlensäure	<input type="checkbox"/>	h) Spiritus eiskalt aus dem Gefrierfach	<input type="checkbox"/>
b) Waschmittelpulver	<input type="checkbox"/>	i) 1x Petrischale	<input type="checkbox"/>
c) Kochsalz (NaCl)	<input type="checkbox"/>	j) 1x Holzspieß	<input type="checkbox"/>
d) Azur (B) Lösung (0,002%)	<input type="checkbox"/>	k) 1x Pasteur-Pipette	<input type="checkbox"/>
e) 1x 50 ml Gefäß (verschießbar)	<input type="checkbox"/>	l) 1x Plastikteelöffel	<input type="checkbox"/>
f) ca. 2 ml Spülmittel-Konzentrat	<input type="checkbox"/>	m) Spatel	<input type="checkbox"/>
g) 1x 0,2 Liter Plastikbecher	<input type="checkbox"/>	n) Handschuhe	<input type="checkbox"/>

!! Wichtig: Zwei Stunden vor dem Versuch den Spiritus (Alkohol) ins Gefrierfach stellen !

Durchführung: siehe auch  Bildmaterial: FGenFinger 1 & 2



- In das **50 ml Gefäß** **3 ml Spülmittelkonzentrat** einfüllen. (Abb.2 & 3)
- Anschließend **3 kleine Körnchen** (nicht mehr!) **Feinwaschmittel** hinzugeben. (Abb.4 & 5)
- In den **Plastikbecher 100 ml Trinkwasser** (oder Leitungswasser) einfüllen. (Abb.6)
- Einen gestrichenen **Teelöffel Kochsalz** in das Mineralwasser einrühren, bis sich das Salz gelöst hat. (es entsteht eine ca. 0,9%ige Kochsalzlösung). (Abb.7 - 9)
- Einen größeren **Schluck des Salzwassers in den Mund aufnehmen** und **2 Minuten** lang den Mundraum **sehr kräftig** ausspülen. Während der Spülzeit mit der Zunge am Gaumen entlang reiben. → Salzwasser nicht schlucken!! (Abb. 10 & 11)
- Nach ca. 120 Sekunden **25 - 30 ml des Salzwassergemisches aus dem Mund vorsichtig** in das mit Spül- und Waschmittel gefüllte **50 ml Gefäß** überführen. **Wichtig:** Übermäßige Schaumbildung vermeiden! (Abb. 12 - 14).
- Mit dem **Holzspieß** das Spül- und Waschmittel gut im ganzen Reagenzglas verteilen (Schaumbildung vermeiden!). Das **Gemisch** für **2 Min. ruhig stehen** lassen. (Abb. 15 & 16)
- Abb. 18 anschauen!** Den eisgekühlten **Spirit** vorsichtig **über** das Gemisch **schichten** und dieses für ca. 5 Minuten stehen lassen (ab und zu leicht schwenken). (Abb. 17-19)
- Mit dem **Holzspieß** die DNA (weiße bis durchsichtige Fäden) aufnehmen. (Abb. 20-23)



2. DNA FÄRBUNG – HANDSCHUHE tragen!



- Mit Hilfe des Holzspießes (und des Plastiklöffels) die „**DNA Klumpen**“ fischen und in die **Petrischale** überführen (mit dem Plastiklöffel abstreifen). Zwei bis drei Versuchsgruppen sollten Ihre DNA Klumpen in einer Petrischale sammeln (Mengenerhöhung). (Abb.24-27).
- Handschuhe tragen! Wenig Azur (B) Lösung** (0,02%) dazugeben (nur Boden wird benetzt) und die Probe in dieser Lösung für ca. 2 Minuten belassen (Einwirkzeit). (Abb.28 & 29) Der DNA Farbnachweis ist dann positiv, wenn sich die blauen „DNA-Klümpchen/Fäden“ nicht mehr entfärben lassen.
- Optional: Die **Petrischale** leicht anschrägen und die Azur B Lösung mit der Pipette vorsichtig absaugen. (Abb.30). **Vorsicht: Nicht zu viel „DNA“ absaugen!**



Aufgabe: Notieren Sie Ihre Beobachtungen auf dem Arbeitsblatt **GenFinger 5** und beantworten Sie die weiteren Fragen zum Versuch DNA ISOLATION und FÄRBUNG.

Beobachtungen zum Versuch DNA Isolation und DNA Färbung

Deutungsfragen DNA Isolation und DNA Färbung

1. Erläutern Sie die Funktion der Spülmittelzugabe. (Was wird durch das Spülmittel beseitigt?)

2. Erläutern Sie die Funktion der Feinwaschmittelzugabe. (Was wird durch das Waschmittel beseitigt?)

3. Wieso fällt die DNA bei Salzzugabe und bei der Übersichtung mit eiskaltem Alkohol aus?

Bei einem hohem Salzgehalt in der Lösung wird ein Teil der DNA-Hydrathülle aufgelöst, da sich Na^+ Ionen an die DNA anlagern. Die DNA bleibt aber zunächst noch löslich. Erst durch die Zugabe von eiskaltem Ethanol wird die restliche Hydrathülle zerstört (vereinfacht dargestellt) und die DNA fällt aus.

4. Ordnen Sie den unten beschriebenen Versuchsschritten 1. - 4. die Nummern der passenden Versuchsschritte Ihres Versuchs zur DNA Isolation zu (AB GenFinger 4). Notieren Sie diese Nummern in der ganz rechten Tabellenspalte (siehe Pfeil).

Zusatzinfo DNA Isolation: In der Forschung gibt es viele Methoden zur DNA Isolation. Die Isolation von DNA aus zellulärem Material umfasst meist vier Arbeitsschritte :		DNA Isolation (GeniE)
1. Mechanische Zerstörung	Das Ausgangsmaterial (Gewebe / Zellen) wird zunächst mechanisch zerstört.	
2. Lyse	Durch die Lyse werden die Zell-, Kern- und Organellmembranen aufgelöst.	
3. Beseitigung von Proteinen	Durch Proteinasen wird die DNA von Histonen befreit. Auch alle weiteren Proteine des Zytoplasmas werden beseitigt, insbesondere die DNasen (Enzyme, die DNA zerschneiden). Übrig bleibt eine DNA-haltige Lösung, die noch viele Verunreinigungen aufweist.	
4. Isolation der „reinen“ DNA	Die „reine“ DNA wird meist mittels Bindung an eine feste Phase isoliert und so von den Verunreinigungen getrennt. Anionen-Austausch-Chromatographie: Die Bindung der DNA an eine feste Phase funktioniert aufgrund der (1) _____ Ladung der DNA und der (2) _____ geladenen Membran des Selektionsröhrchens. Während der ersten Zentrifugation bleibt die DNA aufgrund ihrer Ladung an der Membran hängen. Die restlichen Bestandteile landen im Auffangröhrchen. Durch Zugabe einer konzentrierten Salzlösung ins Selektionsröhrchen und einer zweiten Zentrifugation wird die DNA von der Membran getrennt, da die Cl^- -Ionen die DNA von der Membran verdrängen. Die DNA wird in einem frischen Auffangröhrchen aufgenommen und durch Alkoholzugabe ausgefällt. Dieses Verfahren benötigt keine toxischen Substanzen und isoliert DNA-Stücke bis zu einer Größe von 150 kb (Kilobasen).	

