

Die rekombinante DNA-Technologie 2

Der erste Schritt: die Ernte qualitativ hochwertiger Nucleinsäuren

Barbara C. Biedermann So ähnlich sich die molekularen Grundstrukturen von Desoxyribonucleinsäure und Ribonucleinsäure sind, so grundverschieden sind die biologischen Eigenschaften der beiden Moleküle in ihrem natürlichen Umfeld. DNA als Speicher der genetischen Information des Lebens ist sehr stabil. RNA als Zwischenform der Genexpression ist ausserordentlich labil. RNA wird ausserhalb einer intakten, lebendigen Zelle durch RNAsen rasch in ihre Einzelbausteine zerlegt, während DNA noch nach Jahrzehnten und sogar Jahrhunderten in intakter Form vorliegen kann. RNAsen sind ubiquitär vorkommende Enzyme, die RNA im Nu abbauen. RNAsen sind wie Radiergummis, die Genabschriften überall dort, wo sie nicht hingehören, ausradieren. Genomische DNA liegt auch nach der Isolation als doppelsträngige Nucleinsäure vor, während RNA als einzelsträngige Nucleinsäure die Tendenz hat, intra- und intermolekulare Schleifen, Haarnadeln («*hairpins*») und Knoten zu bilden. Die einzelnen Schritte der Nucleinsäureisolation sind 1) Zellyse, 2) Anrei-

cherung von DNA respektive RNA sowie Entfernung von Proteinen und schliesslich 3) Präzitation und Waschen der Nucleinsäuren. Die Zellyse erfolgt in der Regel durch eine Substanz (z.B. Guanidin-Thiocyanat), welche schnell sämtliche Zellstrukturen zerstört und auch die RNAsen denaturiert. Die RNA-Isolation erfolgt oft in Gegenwart von Phenol, wodurch die Proteine bereits im ersten Zellyseschritt gefällt und von der RNA, die sich in der wässrigen Phase anreichert, abgetrennt werden. Die Zugabe eines potenten eiweissabbauenden Enzyms (Proteinase K) baut mehr oder weniger sämtliche Proteine (auch die Histonproteine und die RNAsen) im Lysat ab. Nebenbei: alle Enzymbezeichnungen enden mit dem Kürzel «-ase». Davor steht ein Hinweis auf die spezifische Funktion des Enzyms. Bei Verdauungsenzymen steht vor «-ase» das Molekül, das verdaut wird: z.B. Proteinase, DNase, RNase etc. DNA lässt sich auch aufgrund der Grösse der chromosomalen DNA-Moleküle von den kleineren RNA-Molekülen separieren. Schliesslich kann auch die Behandlung von RNA mit RNase-freier DNase der restlosen Entfernung von genomischer DNA dienen, und umgekehrt kann DNase-freie RNase ein Nucleinsäuregemisch von kontaminierender RNA reinigen. Zur Anreicherung von Nucleinsäuren können diese in monokationischen Salzlösungen durch Zugabe von Ethanol auf Eis präzipitiert und in beliebiger Konzentration in Wasser gelöst werden. Die Intaktheit der so isolierten Nucleinsäuren wird mittels Gelelektrophorese überprüft. Die Konzentration von Nucleinsäurelösungen kann photometrisch bestimmt werden.

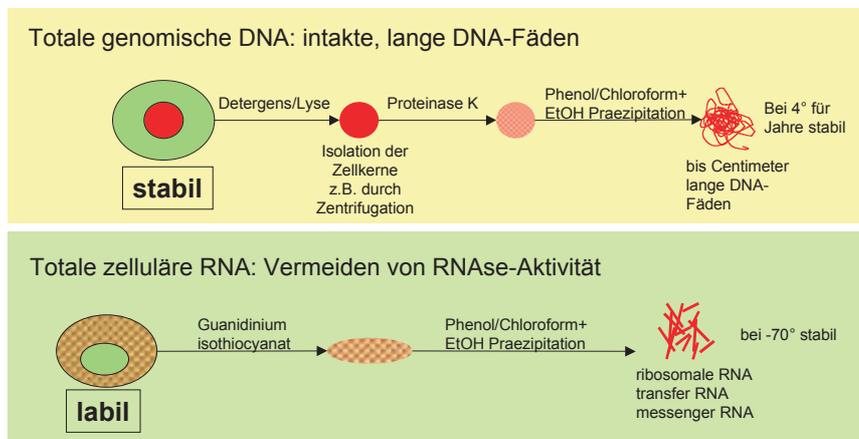


Abbildung 1. Die Isolation von Nucleinsäuren. DNA und RNA unterscheiden sich vor allem in ihrer, unter natürlichen Bedingungen, unterschiedlichen Stabilität. Diesen Unterschieden muss auch bei der präanalytischen Behandlung von entsprechendem Probenmaterial Rechnung getragen werden.

Korrespondenz:
 PD Dr. med. Barbara C. Biedermann
 Medizinische Universitätsklinik
 Kantonsspital
 CH-4101 Bruderholz
barbara.biedermann@unibas.ch