

Einige grundlegende Methoden

- 2.1 Nucleinsäure ist gleich Nucleinsäure und auch wieder nicht – 15**
- 2.2 Methoden zur DNA-Präparation – 16**
 - 2.2.1 Bakterienmedien – 17
 - 2.2.2 Präparation von Plasmid-DNA – 17
 - 2.2.3 Minipräparation – 18
 - 2.2.4 Maxipräparation – 20
 - 2.2.5 Präparation von Phagen-DNA – 22
 - 2.2.6 Präparation einzelsträngiger DNA mittels Helferphagen – 25
 - 2.2.7 Präparation von genomischer DNA – 26
- 2.3 Die Reinigung von Nucleinsäuren – 27**
 - 2.3.1 Phenol-Chloroform-Extraktion – 27
 - 2.3.2 Anionenaustauschersäulen – 29
 - 2.3.3 Glasmilch/Silikat-Membranen – 31
 - 2.3.4 Cäsiumchlorid-Dichtegradient – 32
 - 2.3.5 Fällung mit PEG – 33
 - 2.3.6 Dialyse – 34
 - 2.3.7 *Magnetic beads* – 34
 - 2.3.8 Proteinbindende Filtermembranen – 35
 - 2.3.9 Alkoholfällung – 35
 - 2.3.10 Konzentratoren – 36
 - 2.3.11 Exonuclease-Phosphatase-Verdau – 36
- 2.4 Konzentrieren von Nucleinsäuren – 36**
 - 2.4.1 Alkoholfällung – 36
 - 2.4.2 Konzentratoren – 39
 - 2.4.3 *SpeedVac* – 40
 - 2.4.4 »Aussalzen« – 40
- 2.5 Konzentrationsbestimmung von Nucleinsäurelösungen – 40**
 - 2.5.1 OD-Messung mittels Absorptionsspektrometrie – 40
 - 2.5.2 Konzentrationsbestimmung mittels Agarosegel – 42

2.5.3	Dot-Quantifizierung – 42
2.5.4	Fluorometrische Bestimmung – 43
2.5.5	Nucleinsäure-Messstäbchen – 43
2.5.6	Enzymatischer Nachweis – 44

Heute, seh ich, will mir nichts gelingen.

In diesem Abschnitt sollen einige Methoden vorgestellt werden, die man in diesem Gewerbe fast täglich braucht, der Kern der Molekularbiologie sozusagen. Es ist deswegen etwas ausführlicher gehalten und die Protokolle sind etwas detaillierter, damit man's im Ernstfall auch nachkochen kann. Hier zeigt sich, was man tatsächlich drauf hat, denn es sind nicht die großen Konzepte, an denen es in der Praxis scheitert, sondern die kleinen Dinge des Alltags. An genialen Techniken mangelt es nicht in der Literatur, doch was tun, wenn die DNA nicht ausfällt, wie sie soll? Da siegt, wer mehr als nur eine Methode auf Lager hat.

Um eine Struktur in das Kapitel zu bringen, orientiert sich die Abfolge der nächsten Abschnitte an der Reihenfolge, die man auch im Labor zumeist einhalten wird, indem man die DNA erst isoliert, dann reinigt, wenn nötig konzentriert und dann die Konzentration der DNA-Lösung bestimmt. Doch zunächst ein Überblick über die in Frage kommenden Nucleinsäuren.

2.1 Nucleinsäure ist gleich Nucleinsäure und auch wieder nicht

Nucleinsäuren sind zwar, wie im vorigen Kapitel beschrieben, prinzipiell alle gleich gebaut, doch unterscheiden sie sich, je nach Herkunft, in einigen Punkten, die für die Praxis des Molekularbiologen von erheblicher Bedeutung sind. So lässt sich eine DNA von 500 Basenpaaren (bp) Länge wesentlich einfacher handhaben als eine von 500.000 bp, und genomische DNA gewinnt man völlig anders als Plasmid-DNA. Deswegen vorab ein kleiner Überblick.

Genomische DNA beinhaltet das Genom, die Sammlung aller Gene eines Organismus. Bei höheren Organismen ist die genomische DNA im Zellkern eingeschlossen. Sie besteht aus einem doppelten

Satz von Chromosomen,¹ deren Anzahl je nach Organismus unterschiedlich ist.

Jedes Chromosom ist ein einzelner DNA-Doppelstrang, der etliche Millionen Nucleotide lang ist und daher von vielen an die DNA bindenden Proteinen »in Form gehalten« werden muss. Bei der Reinigung von genomischer DNA besteht die Kunst darin, die Proteine loszuwerden, ohne die DNA allzu sehr zu zerbröseln.

Die Gesamtzahl der Basenpaare in einem Genom ist von Organismus zu Organismus unterschiedlich, sie beträgt beim Menschen ungefähr 3,2 Milliarden, bei der Fruchtfliege *Drosophila* dagegen nur ca. 180 Millionen. Man sollte meinen, dass die Größe des Genoms proportional ist zur Größe des Organismus, doch dem ist nicht so. So ist die Zahl der Basen bei den Säugern weitgehend gleich, während einige Pflanzen erheblich größere Zahlen erreichen können. Ein Teil des Genoms besteht übrigens aus *junk* – zu deutsch Abfall. Wie groß dieser Anteil allerdings ist, darüber streiten die Gelehrten noch; bis zum Beginn des Jahrtausends ging man von höchstens 10 % wirklich wichtiger Sequenzen aus, der Rest galt als Abfall. Ein guter Teil davon ist *parasitäre* DNA, repetitive Sequenzen und Transposons (sogenannte springende DNA-Elemente), die sich zum eigenen Vergnügen in unserem Genom vermehren. Im Mäusegenom schätzt man beispielsweise den Anteil der L1-Elemente, den häufigsten Transposons der Maus, auf 5–10 % des Genoms. Eine erste Analyse des menschlichen Genoms ergab sogar, dass die verschiedenen repetitiven Elemente, die wir in uns tragen, mindestens 40 %, vielleicht sogar über 50 % der gesamten DNA ausmachen (Li et al. 2001) – das wären 1,6 Milliarden Basenpaare, die höchstwahrscheinlich ohne jeden Nutzen für uns sind! Ganz so einfach scheint es allerdings nicht zu sein. 2012 wurden im Rahmen des ENCODE-Projekts² 30 Artikel publiziert, die zu dem Schluss führen, dass 80 % dieses *junk* zu regulatorischen DNA-Abschnitten gehören dürfte (siehe Maher 2012). *To be continued ...*

1 Zumindest bei Säugetieren; für den Rest der Lebewesen gelten umfangreiche Ausnahmeregelungen.

2 »Encyclopedia of DNA Elements«.

Bakterien besitzen ebenfalls eine genomische DNA, die allerdings anders aufgebaut ist als unsere. Es handelt sich um ein einzelnes, ringförmiges Chromosom, das nicht in einem Zellkern lokalisiert, sondern an einer Stelle der Zellmembran fixiert ist. Die Größe des bakteriellen Chromosoms ist wesentlich geringer als bei höheren Organismen, sie beträgt bei *Escherichia coli* (*E. coli*) nur 4,64 Millionen Basenpaare.

Der normale Experimentator kennt das bakterielle Genom nur als etwas, das ihm seine Plasmid-DNA-Präparationen verschmutzt.

Plasmide sind ebenfalls ringförmige DNA-Moleküle, die in Bakterien neben dem eigentlichen Bakterienchromosom vorliegen, aber wesentlich kleiner sind. Sie kommen in Mutter Natur sehr häufig vor und erlauben dort die Weitergabe nützlicher Gene von Bakterium zu Bakterium. Sie können sich autonom, d. h. unabhängig vom Bakterienchromosom, vermehren, da sie einen eigenen Replikationsursprung (*origin of replication*) besitzen. Darüber hinaus können sie beliebige andere Sequenzen enthalten, eine Eigenschaft, derer man sich in der Molekularbiologie so häufig und mit so großer Freude bedient, dass die Plasmide im Abschnitt noch etwas ausführlicher besprochen werden.

Bakteriophagen, meist kurz als **Phagen** bezeichnet, sind bakterienspezifische Viren, die sich auf Kosten der Bakterien vermehren. Dazu schwimmt der Phage im Kulturmedium, bis er auf ein Bakterium trifft, das er infizieren kann, um dann dessen Vermehrung lahmzulegen und es stattdessen dazu zu bringen, viele neue Phagen zu produzieren. Am Ende lysiert, d. h. zerplatzt das Bakterium und setzt die neuen Phagen ins Kulturmedium frei, wo der Spaß aufs Neue beginnt.

Phagen sind, anders als die Plasmide, kein Bestandteil des Bakteriums, sondern eigenständige (Halb-)Organismen. Ihr »Chromosom« kann sehr unterschiedlich aussehen. So besteht es beim Bakteriophagen λ aus einem linearen DNA-Doppelstrang, beim Phagen M13 dagegen aus einem ringförmigen DNA-Einzelstrang. Andere Phagen besitzen stattdessen ein Genom auf RNA-Basis. Die Größe von Phagengenomen ist relativ gering, bei λ sind es 48 kb, beim Phagen M13 sogar nur 6,4 kb.

Häufig benötigt der Phage nicht sein gesamtes Genom zum Überleben. Daher kann man, nach Deletion aller überflüssigen Genomabschnitte, im Phagen λ bis zu 13 kb große Fragmente fremder DNA einfügen und mit dem Phagen vermehren. Die Entwicklung dieser Technik war ein entscheidender Schritt für die Klonierung von Genen, weil so ganze Genome in Phagen gepackt werden konnten. Mittlerweile haben Phagen allerdings sehr an Bedeutung verloren, weil für die meisten Zwecke günstigere Vektoren zur Verfügung stehen (► Abschn. 6.2.3).

RNA entsteht, indem DNA von einer RNA-Polymerase transkribiert wird. Ein Organismus besitzt verschiedene Typen von RNA, die unterschiedliche Aufgaben erfüllen. Von Interesse für den Experimentator ist eigentlich fast nur die *messenger RNA* (mRNA), weil sie das Transkriptionsprodukt der Gene darstellt, die er untersuchen möchte. Sie besitzt üblicherweise am 5'-Ende eine 7-Methylguanosin-»Kappe« (5'-Cap) und am 3'-Ende eine Poly-Adenosin-Sequenz (der sogenannte Poly-A⁺-Schwanz); vor allem Letztere wird zur spezifischen Aufreinigung von mRNA genutzt.

Darüber hinaus existieren noch einige andere RNA-Typen, vor allem die ribosomale RNA (rRNA) und die Transfer-RNA (tRNA). Sie sind, außer für diejenigen, die gezielt daran forschen, nur lästige Verunreinigungen, die unglücklicherweise etwa 98 % der Gesamt-RNA einer Zelle ausmachen. Zum Glück kann man sie meistens ignorieren. Wenn nicht, dann wird die Arbeit etwas mühseliger.

Der Arbeit mit RNA widmet sich ► Kap. 5.

2.2 Methoden zur DNA-Präparation

Molekularbiologie ist nichts ohne DNA. Die wichtigste Frage lautet folglich: »Wie komme ich an die DNA meiner Träume heran?« Es ist ein schier unendliches Kapitel, weil alles, was Lebewesen ist oder von Lebewesen stammt, DNA enthält. So viele DNA-Quellen es gibt, so viele Protokolle zur Extraktion existieren auch (tatsächlich sind es sogar noch viel mehr). Ich will mich allerdings in diesem

Abschnitt auf drei Bereiche beschränken, die einen Großteil der Labor-Normalität abdecken dürften, nämlich die Gewinnung von Plasmid-DNA aus Bakterien, von Phagen-DNA und von genomischer DNA aus Säugerzellen.

Vorgestellt werden die gebräuchlichsten Methoden und auch die eine oder andere ungebräuchliche, ohne Anspruch auf Vollständigkeit. Es lohnt sich daher in jedem Fall, auch noch beim Kollegen vorbeizuschauen, vielleicht hat der ja schon etwas Besseres entdeckt.

2.2.1 Bakterienmedien

Plasmid-DNA wird aus Bakterien gewonnen, die reichlich Futter brauchen, um groß und stark zu werden. Grundsätzlich werden Bakterienmedien in Minimalmedien und in »reiche« (*rich*) Medien eingeteilt, die entweder flüssig verwendet werden oder durch die Zugabe von 1,5 % (w/v) Agar-Agar in Festmedien verwandelt werden können. Normalerweise verwendet der Experimentator reiche Medien, weil die Bakterien darin schneller wachsen. Am häufigsten wird sicherlich **LB-Medium** (► Anhang) eingesetzt, das sich deshalb in allen Protokollen findet.³ Es ist allerdings nicht immer das geeignetste Medium.⁴ Wer große Ausbeuten an Bakterien wünscht, beispielsweise für Plasmid-DNA-Präparationen, fährt besser mit **TB-Medium** (► Anhang), weil die Bakterien etwa viermal dichter wachsen. Auch für die Herstellung kompetenter Zellen kann ein derart gehaltvolles Medium interessant sein, weil die Bakterien länger in der Phase

optimalen Wachstums bleiben als in LB-Medium, in dem sich die Bakterien bereits bei einer OD_{595 nm} von 0,1 auf Winterschlaf einstellen (■ Abb. 2.1).

Ansonsten hängt die Wahl des Bakterienmediums von den Gewohnheiten im Labor, den Bedürfnissen der Bakterien und den Einschränkungen durch die folgende Anwendung ab. Man richtet sich am besten nach den Empfehlungen der Kollegen, ansonsten sei auf die laborüblichen Standardwerke verwiesen.

Interessanterweise kann man Bakterienmedien durchaus mehrfach verwenden, sofern sie »reich« genug bzw. ausreichend gepuffert sind. Während sich LB weniger für solche exzentrischen Versuche eignet, ist es mir gelungen, aus einer einzigen TB-Kultur dreimal erfolgreich Bakterien zu kultivieren und daraus DNA zu isolieren, indem ich nach der Zentrifugation den Kulturüberstand wieder zurück in den Kulturkolben kippte – erst beim vierten Mal wollten die Bakterien nicht mehr so recht mitspielen. Die Bakterien wachsen dabei so schnell nach, dass man sofort mit der zweiten DNA-Präp weitermachen kann, wenn man mit der ersten fertig ist.

2.2.2 Präparation von Plasmid-DNA

Plasmid-DNA-Präparationen gibt es in jeder erdenklichen Größe. Unterschied man früher nur in Mini- und Maxipräp, findet man heute auch Kits für Mega- und Gigapräparationen. Methodisch besteht kein Unterschied, wenn man einmal von den technischen Schwierigkeiten absieht, die es in normalen Labors bereitet, zwei Liter Bakteriensuppe zentrifugieren zu wollen.

Vom Grundsatz her gleichen sich alle Methoden: Im ersten Schritt stellt man ein krudes Bakterienlysats her, indem man die bakterielle Zellwand mehr oder weniger elegant knackt und die so entstandene Brühe einer ersten Reinigung unterzieht. Dabei entledigt man sich eines Großteils der bakteriellen Proteine und Membranen, wobei man gleichzeitig das bakterielle Genom los wird, weil die chromosomale DNA aufgrund ihrer Größe, Struktur und Verankerung gemeinsam mit den Zellresten abzentrifugiert wird, während die kleineren und freieren Plasmid-Moleküle im Über-

3 Hier übrigens eine hübsche Anekdote zur Bedeutung der Bezeichnung *LB Medium*: Bertani, der 1951 das Medium erstmals beschrieben hat, bezeichnet es in diesem Artikel hartnäckig einfach nur als *LB medium*. Das war den Leuten, die es tagtäglich verwendeten, offenbar zu unpersönlich, weshalb bald eine Reihe von »Erklärungen« die Runde machte, wonach das Acronym für *Luria broth*, *Lennox broth* oder *Luria-Bertani medium* stehen sollte. Bertani selbst hat 50 (!) Jahre später in einer Publikation von 2004 das Geheimnis gelüftet. Im Postscriptum verrät er, dass LB schlicht für *lysogeny broth* stand – er brauchte es nämlich für die Kultur von lysogenen Phagen.

4 Ich persönlich halte es sogar für vermessen, LB als reiches Medium zu bezeichnen. Aber ich bin wahrscheinlich voreingenommen.

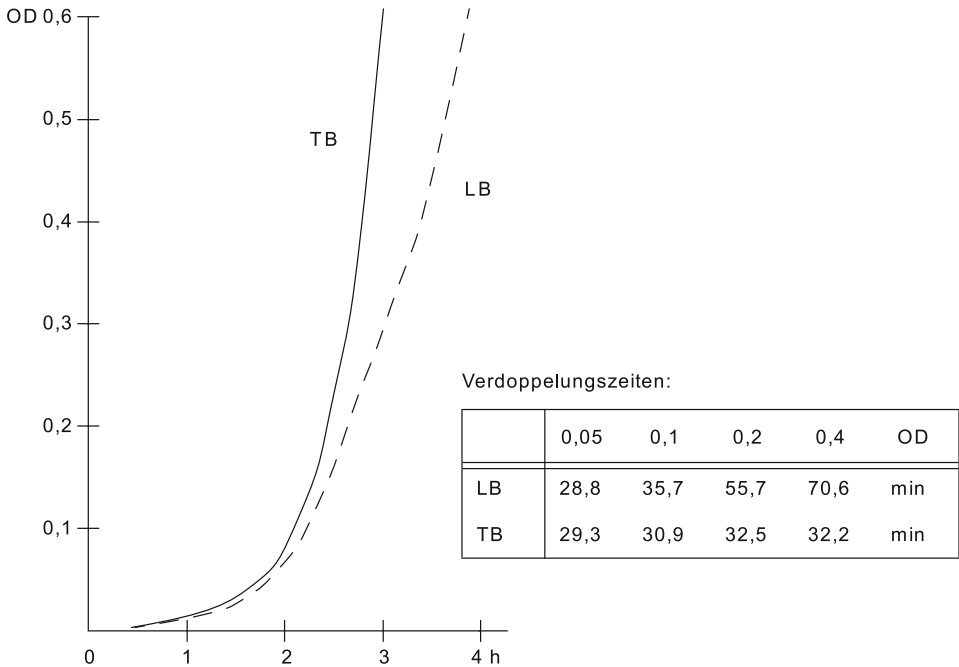


Abb. 2.1 Wachstumskurve von Bakterien in LB- bzw. TB-Medium. Die beiden Kurven zeigen das Wachstum von XL1-Blue MRF Bakterien (Stratagene) in LB- bzw. TB-Medium. Obwohl LB als »reiches« Medium bezeichnet wird, gibt es offensichtlich wesentlich reichere. Diese liefern nicht nur 3–4mal höhere Bakterienausbeuten bei Übernachtskulturen, die Bakterien fühlen sich auch während der Wachstumsphase wesentlich länger wohl, wie man an den Verdoppelungszeiten sieht

stand bleiben. Dies setzt allerdings ein sorgfältiges, sprich einigermaßen vorsichtiges Arbeiten voraus, weil sonst der Anteil an bakterieller chromosomaler DNA stark ansteigt.

Die endgültige Reinigung der DNA, bei der man sich der RNA und der verbliebenen Proteine entledigt, findet in einem zweiten, separaten Schritt statt; die gängigen Methoden werden weiter unten beschrieben.

Obwohl prinzipiell die gleichen Methoden verwendet werden, unterscheiden sich Mini- und Maxipräparationen in der Durchführung doch erheblich, weil die Zielsetzungen sehr verschieden sind. Geht es bei einer Minipräp darum, eine große Anzahl von Ansätzen mit minimalem Aufwand in möglichst kurzer Zeit aufzuarbeiten, will man bei einer Maxipräp eine große Menge möglichst sauberer DNA erhalten; die Zeit spielt dabei eine eher untergeordnete Rolle. Daher werden Mini- und Maxipräparation hier in zwei getrennten Abschnitten besprochen.

2.2.3 Minipräparation

48 oder gar 96 Minipräps durchzuziehen ist eine äußerst nervtötende Angelegenheit, daher muss die Methode schnell und einfach sein. Hier drei Protokolle, die sich vor allem in der Art der Bakterienlyse unterscheiden. Anzahl der Handgriffe und Zeiterfordernis sind jeweils etwa gleich. Die Entscheidung für die eine oder die andere Methode ist eine Frage der persönlichen Präferenz, mitunter aber auch abhängig von der anschließenden Verwendung der DNA. Wichtig für die Ausbeute und die Qualität der DNA ist der verwendete Bakterienstamm, das verwendete Plasmid (*low-copy* oder *high-copy* Plasmid) und das Kulturmedium (minimal, reich oder sehr reich). Wenn ein Protokoll unbefriedigende Ergebnisse liefert, sollte man ein anderes ausprobieren.

Die Ausbeute für 1,5 ml Bakterienkultur beträgt etwa 2–10 µg Plasmid-DNA, sofern man es mit einem *high-copy* Plasmid zu tun hat.

Alkalische Lyse

Diese Methode ist heute der Standard, weil sich mit der so präparierten DNA fast alles anstellen lässt. Sie ist im Mini-Maßstab sehr schnell und kann große Ausbeuten liefern.

Die Alkalische Lyse ist die Grundlage fast aller kommerziellen Plasmid-DNA-Reinigungskits, aber weil die DNA bereits am Ende der Lyse ungewöhnlich sauber ist, kann man die Methode auch wie hier beschrieben mit einfachen Reinigungsmethoden kombinieren, um ein Ergebnis zu erhalten, das sich mit Säulchen-gereinigter DNA problemlos messen kann – bei sehr viel günstigeren Kosten.

Das Pellet von 1,5 ml Bakterienkultur wird in 150 µl Lösung I (50 mM Glucose/25 mM Tris/10 mM EDTA) resuspendiert, 150 µl Lösung II (0,2 N NaOH/1 % (w/v) SDS) zugegeben, gut gemischt und für 30 s inkubiert, bis die Bakterien lysiert sind – erkennbar an der leicht schleimigen Konsistenz der Lösung. Anschließend gibt man 150 µl Lösung III (3 M Kaliumacetat pH 5,2) zu und mischt nochmals gründlich. Die Flüssigkeit ist nun wieder klar, enthält aber Flocken von Kalium-SDS, das schwer löslich ist und ausfällt. Dann gibt man noch zwei Tropfen Chloroform zu – dadurch pelletiert das Kalium-SDS besser –, mischt und zentrifugiert für 2–5 min bei Raumtemperatur. Der klare Überstand (ca. 400 µl) wird anschließend ohne SDS-Flocken (!) in ein neues Gefäß überführt, 1 ml Ethanol zugegeben, das Ganze gemischt und für 10–15 min bei 4 °C und 15.000×g zentrifugiert. Das Pellet wird getrocknet und in 50–100 µl TE + 1–2 µl DNase-freie RNase A (10 mg/ml) gelöst.

Soll es *quick-and-dirty* sein, kann man die Lösung an diesem Punkt bereits für einen Restriktionsverdau verwenden. Soll die DNA garantiert sauber sein, inkubiert man für 30 min bei Raumtemperatur, um der RNase Zeit zum Arbeiten zu geben, und schließt dann eine Phenol-Chloroform-Reinigung incl. Alkoholfällung an.

Das DNA-Pellet ist nach der ersten Fällung gut sichtbar, aber davon sollte man sich nicht täuschen lassen, es besteht zu über 90 % aus RNA, Proteinen und Salzen. Trotzdem ist die Größe des Pellets meist proportional zur DNA-Menge und gibt Aufschluss

darüber, wie die Plasmidausbeute sein wird. Nach RNase-Verdau und Phenol-Chloroform-Reinigung ist es dann erheblich kleiner, weil die RNA-Menge stark abgenommen hat.

Tipps

Statt Lösung I kann man auch TE-Lösung verwenden oder, *in extremis*, einfach Wasser. Lösung II altert im Gegensatz zu den anderen Lösungen schnell und sollte idealerweise frisch angesetzt werden, hält sich aber durchaus vier Wochen. Lösung III ist eine 3 M Kaliumacetat-Lösung mit pH 5,2, die, wie Kenner wissen, bei diesem pH weit mehr Acetat bzw. Essigsäure als Kalium enthält. Am einfachsten tut man sich, indem man 60 ml 5 M Kaliumacetat, 11,5 ml Essigsäure p.a. und 28,5 ml H₂O mischt. Statt Lösung III kann man auch 3 M Natriumacetat pH 4,8 verwenden.

Bereits nach der ersten Fällung ist die DNA erstaunlich sauber und arm an Nucleasen und kann bei 4 °C problemlos über Nacht (ja sogar über's Wochenende!) gelagert werden. Wer mag, kann die RNase statt am Ende bereits am Anfang zugeben (5–10 µl RNase A (10 mg/ml) zur Lösung I) und vor der ersten Ethanol-fällung eine 10-minütige Inkubationspause einfügen; das Pellet fällt dann allerdings kleiner aus.

Eine nette Variante findet sich bei Good und Nazar (1997): Sie kratzen die Bakterien mit einem Zahnstocher, der mit einer Pinzette einen halben Zentimeter vor der Spitze gebrochen und zu einer Art Golfschläger geformt wurde, von einer Agarplatte – dieses Werkzeug eignet sich auch gut, um die Bakterien anschließend in der Lösung I zu resuspendieren. Nach der alkalischen Lyse wird die Plasmid-DNA dann mit Polyethylenglycol 8000 gefällt (► Abschn. 2.3.5).

Boiling method

Die Methode ist einfach und schnell und liefert sehr schmutzige DNA mit viel bakterieller DNA und Proteinen.

Das Pellet von 1,5 ml Bakterienkultur wird in 300 µl STET⁵ resuspendiert, 200 µg Lysozym zugegeben, gemischt und für 5 min auf Eis inkubiert. Anschließend stellt man das Tube für 1–2 min in kochendes Wasser und zentrifugiert dann für 15 min bei 15.000×g. Der Überstand wird in ein neues Tube überführt, 200 µl Isopropanol zugegeben und für 15 min bei 4 °C und 15.000×g zentrifugiert, das Pellet wird mit 70 % Ethanol gewaschen, getrocknet und anschließend in 50 µl TE + 1 µl RNase A (10 mg/ml) gelöst.

Tipp

Richtig reizvoll wird die Methode allerdings erst, wenn man nicht den Überstand überführt, sondern das Pellet mit einem sterilen Zahnstocher entfernt, auf diese Weise lässt sich die ganze Präparation in einem Tube durchführen.

Lithium-Minipräparation

Sympathisch an dieser Methode ist, dass sie noch ein bisschen schneller als die anderen ist.

Das Pellet von 1,5 ml Bakterienkultur wird in 100 µl TELT⁶ resuspendiert, dazu gibt man 100 µl Phenol/Chloroform (1 : 1), vortext kurz und zentrifugiert für 1 min bei 15.000×g. 75 µl des wässrigen Überstands werden in ein neues Tube überführt, 150 µl kaltes Ethanol zugegeben, gemischt und für 10 min bei 4 °C und 15.000×g zentrifugiert. Das Pellet wird kurz mit 70 % Ethanol gewaschen, getrocknet und anschließend in 50 µl TE + 1 µl RNase A (10 mg/ml) gelöst.

Lithiumacetat-Minipräparation

Die Autoren (Paul et al. 2008) preisen die Methode als billig, mit geringem Aufwand verbunden und von guter Qualität (d. h. arm an RNA, arm an bakterieller DNA und gut sequenzierbar), leider aber

mit 5–30 mal geringerer Plasmid-Ausbeute als bei der Alkalischen Lyse.

In der einfachsten Protokoll-Version versetzt man 1 Volumen Bakterienkultur mit 1 Volumen Lyselösung (6 M Lithiumacetat pH 4,8, 0,5 % (w/v) SDS, 2 mM EDTA), mischt vorsichtig, inkubiert für 5 min bei Raumtemperatur und zentrifugiert anschließend (10.000×g/10 min/RT). Der Überstand wird in einen neuen Tube überführt, mit 0,8 Volumen Isopropanol gemischt und nochmals zentrifugiert (10.000×g/10 min/RT). Das Pellet wird kurz mit 70 % EtOH gewaschen, getrocknet und in TE eluiert.

Durch vorherige Zugabe von DNase I (10 µg/ml Endkonz.) und MgCl₂ (10 mM Endkonz.) zur Bakterienkultur und Inkubation für mindestens 30 min lässt sich der Anteil bakterieller DNA in der Plasmid-DNA-Präparation weiter senken.

2.2.4 Maxipräparation

Wahre Maxipräparationen sind mittlerweile selbener geworden, weil man bereits mit der DNA-Menge, die man aus einer Minipräp gewinnt, die meisten Arbeiten des täglichen Lebens bestreiten kann. Wir beschränken uns im Labor zumeist auf 100 ml Kulturen in TB-Medium, das entspricht einer LB-Kultur von 500 ml und liefert eine Ausbeute von weit über 500 µg Plasmid-DNA.

Alle Protokolle beginnen damit, dass man das Bakterienmedium mit 1 ml einer möglichst frischen Übernachtskultur animpft⁷ und über Nacht bei 37 °C inkubiert, damit die Bakterien eine maximale Dichte erreichen. Die Kultur sollte in einem Erlenmeyerkolben mit Schikane (das ist eine Nase, die nach innen ragt) von ausreichendem Volumen – Richtwert: fünfmal das Medienvolumen – angesetzt werden, den man auf einem Flachbett-

5 STET: 8 % (w/v) Sucrose/5 % (w/v) Triton X-100/50 mM EDTA/50 mM Tris HCl pH 8,0; mit Filter sterilisieren und bei 4 °C lagern.

6 TELT: 50 mM Tris HCl pH 8,0/62,5 mM Na-EDTA/2,5 M LiCl/4 % (w/v) Triton X-100; Lagerung bei -20 °C.

7 Entgegen der gängigen Lehrmeinung tut es aber auch eine einzige Bakterienkolonie, die Herstellung einer Übernachtskultur kann man sich also sparen. Seltsamerweise ist es mir in den letzten Jahren immer häufiger passiert, dass die Plasmid-DNA-Ausbeute bei Kulturen, die mit Übernachtskulturen angeimpft wurden, so viel geringer war als bei Kulturen, die mit einer Kolonie angeimpft wurden, dass ich persönlich mittlerweile letzteres Vorgehen als Standard empfehle.

schüttler bei 200–400 rpm durchrüttelt, damit die Bakterien gut belüftet werden. Wenn's schäumt, ist's gut. Die Bakterien danken es mit größeren Ausbeuten.

Im Anschluss an die hier beschriebene Lyse führt man eine **Reinigung** durch, die normalerweise mittels Anionenaustauscherchromatographie, Cäsiumchloridgradientenzentrifugation oder PEG-Präzipitation erfolgt (► Abschn. 2.3). Einen Überblick über die gängigen Reinigungsmethoden gibt auch ■ Tab. 2.1.

Bakterienlyse mittels Alkalischer Lyse

Der Standard. Bei dieser Technik wird die bakterielle DNA besonders effektiv entfernt, weil DNA bei stark alkalischem pH denaturiert. Nach der Neutralisierung mit Lösung III hybridisieren die beiden Stränge der Plasmid-DNA rasch wieder, während die weit größere chromosomale DNA einzelsträngig bleibt und ausfällt.

Das Bakterienpellet einer 500 ml LB-Kultur wird in 20 ml Lösung I (► Abschn. 2.2.3) + 0,5 ml RNase A (10 mg/ml) resuspendiert. Nach Zugabe von 40 ml Lösung II mischt man gut, aber nicht zu heftig und lässt die trübe Lösung für 10 min stehen. Mit zunehmender Lyse wandelt sich die Suppe zu einer schleimigen Brühe, zu der man 30 ml Lösung III und 1 ml Chloroform zufügt und wieder gut, aber nicht zu heftig mischt und anschließend zentrifugiert (5000×g, 4 °C, 15–30 min). Vorsicht, Chloroform ist ein organisches Lösungsmittel, das viele Plastikarten auflöst. Daher nur Zentrifugenbecher aus Polyethylen, Polypropylen oder anderen chloroformresistenten Materialien verwenden. Der Überstand wird weitere 30 min bei 4 °C inkubiert, um einen möglichst vollständigen RNase-Verdau zu gewährleisten.

Tipps

Um die Ausbeute zu erhöhen, kann man nach dem Resuspendieren der Bakterien 1 ml Lysozym (25 mg/ml) zugeben und anschließend 10 min bei Raumtemperatur inkubieren. Wer keine chloroformresistenten Zentrifugenbecher besitzt, kann auch auf das Chloroform

verzichten. Allerdings pelletiert dann der Schmutz deutlich schlechter, so dass man den Überstand besser ein zweites Mal zentrifugieren sollte.

Je sauberer der Überstand nach der Zentrifugation ist, desto leichter tut man sich beim anschließenden Reinigungsschritt. Wir filtrieren ihn daher häufig durch einen großporigen Einwegfilter (Porengröße 0,8 µm), der sauber, aber nicht unbedingt steril sein muss. Faltenfilter aus Papier tun's aber auch.

Tipp

Wie Sie eine Maxipräp-Reinigung mit einem kommerziellen Minipräp-Kit (!) durchführen können, ist am Ende von ► Kap. 2.3.3 beschrieben.

Bakterienlyse mittels *boiling method*

Das Bakterienpellet einer 500 ml LB-Kultur wird in 20 ml STET-Lösung (► Abschn. 2.2.3) + 2 ml Lysozym (10 mg/ml) resuspendiert, in ein feuerfestes Glasgefäß überführt und am Bunsenbrenner erhitzt, bis es kocht (Vorsicht vor dem Siedeverzug), und danach eine weitere Minute in kochendem Wasser erhitzt. Auf Eis abkühlen und die kalte, glibberige Lösung zentrifugieren (≥ 25.000×g, 20 min), vorzugsweise in einem Ausschwingrotor. Der Überstand wird in ein neues Gefäß überführt, 0,5 ml RNase A (10 mg/ml) zugegeben und die Lösung für 30 min bei 4 °C inkubiert.

Tipps

Wenn das Lysozym nicht ordentlich arbeitet, tendiert die Ausbeute gegen null. Auch die Dauer des Erhitzens ist kritisch und variiert zwischen den Bakterienstämmen. Am besten testet man die Bedingungen für den verwendeten Bakterienstamm beim ersten Mal aus.

Bakterienlyse mittels Triton

Das Bakterienpellet einer 500 ml LB-Kultur wird in 5 ml SET-Lösung⁸ + 1,5 ml Lysozym (10 mg/ml) + 2 ml 0,5 M EDTA + 25 µl RNase A (10 mg/ml) resuspendiert und für 15 min auf Eis inkubiert. Danach gibt man 2,5 ml Lyse-Lösung⁹ zu, mischt gut, aber vorsichtig und inkubiert weitere 20 min bei 4 °C. Die hoffentlich sehr visköse Lösung zentrifugiert man anschließend für 60 min bei 40.000×g und 4 °C und dekantiert den Überstand vom gallertigen Pellet ab.

Tipps

Die Methode ist mild, aber etwas kritisch. So sollte die Lysozymlösung frisch sein. Wenn das Pellet nach der Zentrifugation nicht ausreichend fest ist und nicht vom Pellet getrennt werden kann, sollte man die Zentrifugation wiederholen, am besten bei einer höheren Geschwindigkeit, im Zweifelsfall in der Ultrazentrifuge.

2.2.5 Präparation von Phagen-DNA

War der Umgang mit Phagen früher ein Klassiker, weil alle DNA-Banken in Phagenvektoren kloniert waren, sind sie mittlerweile etwas aus der Mode gekommen, weil es heute praktischere Vektoren gibt, die auch größere DNA-Fragmente aufnehmen können. Der eigentliche Schwachpunkt von Phagen aber ist die DNA-Präparation, für die es bislang kein wirklich geniales Protokoll gibt – entweder ist die Präparation arbeitsaufwendig oder liefert geringe Ausbeuten oder ziemlich unsaubere DNA.

Die Phagenpartikel gewinnt man über Plattenlysate oder Flüssigkulturen. Für ein **Plattenlysat** plattiert man eine ausreichende Anzahl von Phagen aus, um konfluente (d. h. völlig lysierte) Platten zu erhalten. Dazu mischt man die Phagenlösung

(je nach Phagentiter ca. 1–100 µl) mit 150 µl einer Bakterien-Übernachtskultur,¹⁰ inkubiert für 10 min bei 37 °C, gibt ca. 3–6 ml handwarmen, noch flüssigen Weichagar (LB mit 0,7 % Agar) zu, mischt kurz und verteilt die Flüssigkeit gleichmäßig auf einer LB-Agarplatte, die man über Nacht bei 37 °C inkubiert. Anschließend eluiert man die Phagen, indem man SM-Lösung (► Anhang) – 5 ml für eine 10-cm-Platte, 10 ml für eine 15-cm-Platte – auf die Platte pipettiert und über Nacht bei 4 °C inkubiert, vorzugsweise unter leichtem Schütteln. Das Eluat eignet sich anschließend als Phagen-Vorratslösung oder kann zur Präparation kleiner Mengen Phagen-DNA verwendet werden, allerdings nicht ganz ohne Schwierigkeiten, weil der Agar gerne Verschmutzungen enthält, die ebenfalls eluiert werden und während der Präparation meist nicht verschwinden. Dieser bislang nicht genauer charakterisierte Dreck inhibiert sehr effizient Restriktionsenzyme, so dass man häufig die zehnfache Menge an Enzym einsetzen muss, um einen befriedigenden Verdau zu erhalten, sofern es überhaupt funktioniert. Man kann das Problem umgehen, indem man den Agar durch *molecular biology grade* Agarose ersetzt, die allerdings wesentlich teurer ist.

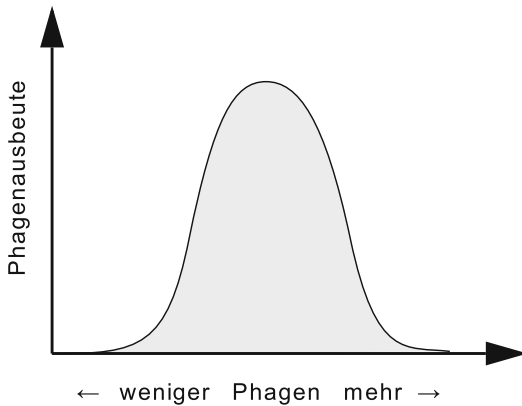
Das Problem bei **Flüssigkulturen** ist, dass man für eine optimale Ausbeute bereits beim Ansetzen der Kultur genau das richtige Verhältnis von Bakterien und Phagen erwischen muss (► Abb. 2.2). Setzt man zu viele Phagen ein, dann werden alle Bakterien lysiert, bevor sie sich ausreichend vermehrt haben. Nimmt man zu viele Bakterien, erreichen diese die stationäre Phase und stellen ihr Wachstum ein, bevor sich die Phagen ausreichend vermehrt haben. Da das optimale Verhältnis (wie immer) von den genauen Bedingungen abhängt (verwendete Phagen, Bakterien, Medien), tut man gut daran, zu Beginn der Arbeiten eine Testreihe durchzuführen.

Als Orientierungshilfe hier ein Protokoll, das einst funktionierte: 50 µl Bakterien einer Übernachtskultur (das entspricht ca. 5×10^7 Bakterien) und 10^5 Phagen (die meisten Protokolle setzen zwischen 50 und 500mal mehr Bakterien als Pha-

8 SET-Lösung: 25 % (w/v) Sucrose/50 mM Tris HCl pH 8,0/100 mM EDTA; bei 4 °C lagern.

9 Lyse-Lösung: 3 % (v/v) Triton X-100/200 mM EDTA pH 8,0/150 mM Tris HCl pH 8,0; bei 4 °C lagern.

10 Hierbei unbedingt den zu den verwendeten Phagen passenden Bakterienstamm verwenden, sonst findet keine Vermehrung der Phagen statt.



■ **Abb. 2.2** Die Ausbeute an Phagen in Abhängigkeit vom Verhältnis von Bakterien zu Phagen

gen ein) werden für 15 min bei 37 °C inkubiert und dann zu 150 ml LB-Medium gegeben, das man unter kräftigem Schütteln bei 37 °C inkubiert. Nach etwa 4–5 h trübt sich die Kultur zunehmend, um dann innerhalb einer Stunde wieder nahezu klar zu werden. Dies ist der Zeitpunkt der maximalen Phagenmenge – lässt man die Kultur weiterwachsen, wird sie sich wieder trüben, weil resistente Bakterien die Überhand gewinnen. Wenn die Kultur nicht trüb wird, hatte man zu wenig Bakterien im Ansatz, wird sie nicht klar, waren es zu wenige Phagen.

Vor Gebrauch muss man das Lysat zentrifugieren (5000×g, 4 °C, 15 min), um verbleibende lebende und die Reste lysierter Bakterien loszuwerden. Dann kann man zur DNA-Extraktion schreiten.

λ Phagen DNA Minipräparation I mittels PEG-Fällung

Eine Standardmethode.

3 ml Phagenlysat werden mit 10 µl RNase A-Lösung (► Anhang) und 1 µl DNase I (10 mg/ml) für 1 h bei 37 °C inkubiert. Danach gibt man 3 ml PEG-Lösung (20 % (w/v) Polyethylenglycol 6000/2 M NaCl in SM-Lösung, ► Anhang) zu, inkubiert für 1 h auf Eis, zentrifugiert (10.000×g, 4 °C, 20 min) und resuspendiert das Pellet in 0,5 ml SM-Lösung. Grobe Verschmutzungen werden abzentrifugiert (10.000–15.000×g, Raumtemperatur, 2 min), der Überstand mit 5 µl 10 % (w/v) SDS

und 5 µl 0,5 M EDTA pH 8,0 für 15 min bei 68 °C inkubiert. Anschließend führt man eine Phenol-Chloroform-Reinigung (► Abschn. 2.3.1) durch, fällt die DNA mit Ethanol und nimmt das getrocknete Pellet in 20–40 µl TE (► Anhang) auf.

λ Phagen DNA Minipräparation II mittels DEAE-Cellulose

Schneller als die PEG-Fällung, aber eher schmutziger. Das Protokoll lehnt sich an die Publikation von Manfioletti und Schneider (1988) an, die für die finale Reinigung allerdings Cetyl-trimethylammoniumbromid (CTAB, Sigma) verwenden, mit dem Nucleinsäuren (und saure Polysaccharide) spezifisch gefällt werden. Die Publikation ist durchaus einen Blick wert.

Zuerst wird die DEAE-Cellulose vorbereitet: 10 g DEAE-Cellulose (DE 52 Ionenaustauscher-cellulose von Whatman) in 200 ml 0,05 N HCl suspendieren, mit 400 µl 10 N NaOH neutralisieren, den Überstand abdekantieren und die Cellulose 3–4 mal im 5fachen Volumen SM-Lösung waschen. Am Ende wird die Cellulose mit 1/3 Volumen SM-Lösung suspendiert. Möchte man die Cellulose länger als eine Woche bei 4 °C lagern, sollte man gegen die bösen Mikroben 0,01 % Natriumazid zugeben (Achtung, hochgiftig) und vor Gebrauch nochmal mit SM waschen. 0,6 ml Phagenlysat und 0,6 ml suspendierte DEAE-Cellulose werden gut gemischt, zentrifugiert (10.000×g, Raumtemperatur, 5 min), der Überstand mit 120 µl Denaturierungslösung¹¹ gemischt und 1 min bei 70 °C inkubiert. Anschließend lässt man den Ansatz abkühlen, gibt 75 µl 5 M Kaliumacetat zu, inkubiert 15 min auf Eis, zentrifugiert (10.000×g, Raumtemperatur, 5 min) und fällt die DNA aus dem Überstand mit 0,8 Volumen Isopropanol. Das gewaschene und getrocknete Pellet wird in 10–50 µl TE gelöst.

λ Phagen DNA Minipräparation III mittels Zinkchlorid-Fällung

Die Methode ist weiter unten als Maxipräparation II aufgeführt, war von Santos (1991) aber eigent-

11 Denaturierungslösung: 10 mM Tris HCl pH 8,0/2,5 % (w/v) SDS/0,25 M EDTA pH 8,0.

lich zur Präparation von wenigen Millilitern Lysat gedacht. Hier die Originalversion:

Je ml Lysat (bereits DNase I- und RNase A-verdaut) 20 µl 2 M ZnCl₂ zugeben, 5 min bei 37 °C inkubieren, zentrifugieren (10.000×g, 1 min), Pellet in 500 µl TES-Puffer¹² resuspendieren, 15 min bei 60 °C inkubieren, 60 µl 3 M Kaliumacetat pH 5,2 zugeben, 10–15 min auf Eis stellen, zentrifugieren (10.000×g, 4 °C, 1 min) und die DNA mit Isopropanol aus dem Überstand fällen.

λ Phagen DNA Minipräparation IV mittels EtOH-Fällung

Zu meiner Überraschung bin ich auf eine neue Methode zur Phagen-DNA-Präparation gestoßen, die mir einen vernünftigen Eindruck macht und mit geringem technischen Aufwand durchgeführt werden kann. Die Methode lässt sich automatisieren und die so gewonnene DNA ist sequenzierbar, womit sich die Methode gut für das Screenen von Phagen-Banken eignet. Hier der Ablauf gemäß Reddy et al. 2008:

Man stellt ca. 1 ml Flüssiglysat her, gibt ein paar Tropfen Chloroform zu und zentrifugiert (5 000 rpm/10 min), um Reste an Bakterien zu präzipitieren. 75 µl vom klaren Überstand werden in ein neues Tube überführt, mit 1 Volumen 2×Alkohol-Puffer (50 % EtOH/0,03 M Na-Acetat/pH 5,5) gemischt und 20 min bei RT inkubiert. Dann werden die Phagen präzipitiert (5 000 rpm/10 min) und der Überstand verworfen. Die Phagen-Partikel werden durch die Zugabe von 50 µl Lyse-Puffer¹³ lysiert, 12,5 µl 1 N NaOH zugegeben¹⁴ und weitere 10 min bei RT inkubiert. Schließlich wird die Phagen-DNA präzipitiert durch die Zugabe von 2 Volumen kaltem EtOH und einer Zentrifugation (10.000 rpm/10 min). Das Pellet wird mit 70 % EtOH gewaschen, luftgetrocknet und in 20 µl TE gelöst. Die Autoren geben an, dass die so gereinigte DNA für eine Woche bei 4 °C gelagert werden kann – wahrscheinlich sogar noch länger, wenn man sauber gearbeitet hat.

λ Phagen DNA Maxipräparation I mittels Cäsiumchloriddichtegradient

Mit Abstand die sauberste Variante, λ-DNA zu gewinnen, doch langwierig und mühselig, außerdem funktioniert sie nicht bei kleinen Phagemengen.

In 500 ml Phagenlysat löst man 30 g NaCl, zentrifugiert (4000×g, 4 °C, 10 min), löst im Überstand anschließend 50 g Polyethylenglycol 6000 und füllt die Phagen über Nacht bei 4 °C. Nach Zentrifugation (4000×g, 4 °C, 10 min) löst man das Pellet in 5 ml SM-Lösung (► Anhang), schüttelt den Ansatz mit 5 ml Chloroform aus, zentrifugiert (6000×g, 4 °C, 10 min) und überführt die wässrige Phase in ein neues Gefäß. Der Chloroform-Schritt wird wiederholt, bis das Polyethylenglycol nahezu vollständig entfernt ist – das ist der Fall, wenn man nach der Zentrifugation keine weiße Interphase mehr sieht. Die wässrige Phase wird auf einen CsCl-Stufengradienten (drei Stufen: 1,3/1,5/1,7 g CsCl/ml SM-Lösung, ■ Abb. 2.3) aufgetragen und ultrazentrifugiert (80.000×g, 20 °C (!), 1,5 h). Die Phagen sammeln sich als weiß-blaue Bande an der Phasengrenze zwischen der 1,5 und der 1,7 g/ml-Lösung. Die Phagenbande wird abpipettiert, für 30 min in SM-Lösung dialysiert (► Abschn. 2.3.6), anschließend je 100 µl Phagenlösung 5 µl 0,5 M EDTA und 1 µl 10 % (w/v) SDS zugegeben und für 10 min bei 65 °C inkubieren. Dieser Schritt zerlegt die Phagenpartikel in DNA und Proteine; Letztere werden mit einer Phenol-Chloroform-Reinigung (► Abschn. 2.3.1) entfernt und die DNA-Lösung für mindestens 60 min in TE dialysiert. Der CsCl-Stufengradient ist etwas schwierig in der Herstellung. Am einfachsten tut man sich, indem man zuerst die Lösung mit der geringsten Dichte in den Zentrifugenbecher pipettiert und vorsichtig mit den Lösungen höherer Dichte unterschichtet, unter Zuhilfenahme einer Pasteurpipette.

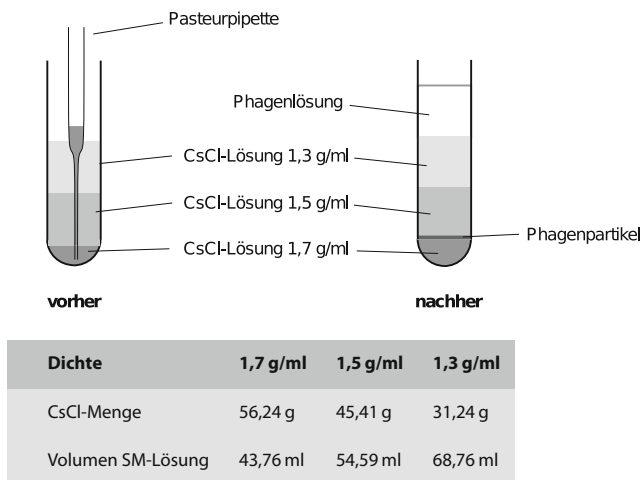
λ Phagen DNA Maxipräparation II mittels Zinkchlorid-Fällung

Die Qualität der DNA ist bei dieser Methode nicht überragend, doch ist der Arbeitsaufwand wesentlich geringer, ganz abgesehen vom Zeitgewinn. Die Methode ist von Santos (1991) übernommen.

12 TES-Puffer: 0,1 M Tris HCl pH 8,0/0,1 M EDTA/0,3 % SDS.

13 Lyse-Puffer: 4 M Guanidinium-Thiocyanat/0,5 % Natrium-N-Laurylsarcosin/25 mM Natrium-Citrat pH 7,0/ 0,1 M β-Mercaptoethanol.

14 Um eine Endkonzentration von 0,2 N NaOH zu erhalten.



■ **Abb. 2.3** Cäsiumchlorid-Stufengradient. Stufengradienten sind praktisch, weil man mit weit kürzeren Zentrifugationszeiten auskommt als bei kontinuierlichen Gradienten. Entscheidend sind möglichst scharfe Grenzen zwischen den CsCl-Lösungen. Am leichtesten tut man sich, indem man mit der Lösung geringster Dichte beginnt und mit Hilfe einer Pasteurpipette mit den Lösungen höherer Dichte vorsichtig unterschichtet. Der Gradient wird anschließend mit der Phagenlösung überschichtet. Die Herstellung der CsCl-Lösungen erfordert präzises Arbeiten. Die Tabelle gibt an, welche Mengen CsCl in welchem Volumen SM-Lösung gelöst werden müssen, um eine Lösung der angegebenen Dichte zu erhalten. Der Anteil von Cäsiumchlorid am Gesamtgewicht für eine CsCl-Lösung beliebiger Dichte errechnet sich aus der Gleichung: % (w/w) CsCl = $137,48 - 138,11/(\text{gewünschte Dichte})$

Eine 100 ml Flüssigkultur ansetzen (siehe oben). 1 h vor Ende der Lyse 25 µl DNase I (10 mg/ml) und 50 µl RNase A (► Anhang) zugeben und für 1 h bei 37 °C unter Schütteln inkubieren – das spart einem den nachträglichen Verdau. Das Lysat zentrifugieren (5000×g, 5 min), den Überstand mit 1 ml 1 M ZnCl₂ mischen, für 5 min bei 37 °C inkubieren und wieder zentrifugieren (5000×g, 5 min). Das Pellet in 3 ml H₂O sorgfältig resuspendieren und zwei Phenol-Chloroform-Reinigungen (► Abschn. 2.3.1) durchführen. Um das Zink von der DNA zu verdrängen, gibt man 0,1 Volumen 0,5 M MgCl₂ zu, inkubiert für 10 min, fällt dann mit 0,1 Volumen 3 M NaAcetat pH 4,8 und 0,8 Volumen Isopropanol und wäscht mit 70 % (v/v) Ethanol. Wenn die DNA-Ausbeute groß ist, bildet sich bei der Fällung eine DNA-Wolke. Der MgCl₂-Schritt ist bei dieser Methode wichtig, weil Zn²⁺ Restriktions- und andere Enzyme inhibiert. Wer Zeit hat, sollte die DNA anschließend noch gegen TE (► Anhang) dialysieren.

2.2.6 Präparation einzelsträngiger DNA mittels Helferphagen

Aus Plasmiden mit M13-Replikationsursprung (so genannten Phagemiden) kann man durch Transfektion der Bakterien mit einem Helferphagen einzelsträngige DNA gewinnen. Manchmal ist diese Eigenschaft ganz nützlich, weil sich einzelsträngige DNA beispielsweise weit besser sequenzieren lässt als doppelsträngige. Helferphagen (z. B. M13KO7, R408) erhält man bei Promega, Stratagene oder Clontech. Sie enthalten alle Informationen, um nicht nur sich selbst zu vermehren, sondern auch die Einzelstrangvermehrung und Verpackung der Plasmid-DNA zu veranlassen.

Die Herstellung der einzelsträngigen DNA ist eigentlich ganz einfach: Man kultiviert seine plasmidhaltigen Bakterien in einem geeigneten Medium, bis sie eine OD_{595 nm} von 0,1 erreicht haben, gibt dann Helferphagen mit einer *multipli-*

city of infection (MOI) von 20 zu (auf gut Deutsch: 20mal mehr Phagen als Bakterien, wobei 1 OD_{595 nm} etwa 3×10^8 Bakterien/ml entspricht) und inkubiert die Kultur für weitere 4 h oder über Nacht. Man erhält auf diese Weise ein Phagenlysats, das man ähnlich weiterverarbeiten kann wie ein λ -Lysat, beispielsweise mit einer Polyethylenglycolfällung (► Abschn. 2.3.5) und einer Phenol-Chloroform-Reinigung (► Abschn. 2.3.1).

2.2.7 Präparation von genomischer DNA

Genomische DNA ist extrem lang – die drei Milliarden Basenpaare, die ein Säuger genom hat, verteilen sich auf etwa 20 Chromosomen, das macht eine durchschnittliche Länge von 150 Millionen Basenpaaren je Chromosom (zur Erinnerung: Ein Chromosom ist **ein** DNA-Doppelstrang und besteht aus ganzen **zwei** Molekülen!). Die Schwierigkeit besteht darin, derart gigantische Moleküle aufzureinigen, ohne sie in allzu kleine Stückchen zu zerhackeln. Mit den Standardmethoden ist das nicht ganz einfach, man kann sich daher als erfolgreich betrachten, wenn man am Ende Stücke von 200.000 Basen Länge erhält.

Genomische DNA gewinnt man üblicherweise aus Gewebe, Blutzellen oder kultivierten Zellen. Am mühseligsten ist dabei die Verwendung von Gewebe. Gut eignet sich vor allem Leber, weil viele Leberzellen polyploid sind und die DNA-Ausbeute deswegen höher ist. Allerdings sollte man darauf achten, bei der Präparation die Gallenblase zu entfernen, weil diese reich an Nucleasen ist.

Das Gewebe wird zunächst gewogen, dann in flüssigem Stickstoff tiefgefroren (Schutzbrille nicht vergessen) und in einem mit flüssigem Stickstoff vorgekühlten Mörser zu einem feinen Pulver zerkleinert. Man tut sich dabei leichter, wenn man bereits das frische Gewebe in kleine Stücke zerlegt und diese getrennt tiefgefriert, weil auch die schwabbeligste Leber bei -70°C bis -196°C steinhart wird und große Stücke häufig nur mit dem Hammer zerkleinert werden können. Auch sollte man nicht vergessen, den Stößel ebenfalls vorzukühlen. Es ist außerdem ganz hilfreich, sich aus

dicker Aluminiumfolie eine Abdeckung für den Mörser zu basteln, weil die Gewebestücke sonst bei der kleinsten Gewaltanwendung munter durch die Gegend spritzen. Das Pulver wird anschließend in Proteinase K-Puffer¹⁵ – 1,2 ml Puffer je 100 mg Gewebe – klümpchenfrei gelöst. Man erhält auf diese Weise eine ziemlich unappetitliche, schleimige Lösung. Die Gewebebrühe wird über Nacht bei 50°C gemischt bzw. geschüttelt, die Konsistenz ist danach etwas flüssiger. Man gibt dann ein gleiches Volumen Phenol-Chloroform-Lösung (► Anhang) zu, mischt sorgfältig und zentrifugiert für 15 min bei $2000\text{--}5000\times g$. Der Überstand wird in ein neues Gefäß überführt, wobei man die Interphase vermeiden sollte, und nochmals mit Phenol-Chloroform-Lösung ausgeschüttelt, zentrifugiert und in ein neues Gefäß überführt. Man gibt 0,1 Volumen 5 M LiCl und 2 Volumen Ethanol zu und mischt vorsichtig, aber sorgfältig. Sofern im Ansatz eine ausreichende Menge an DNA vorhanden ist, wird dabei ein medusenartiges, wolkiges Objekt entstehen – das ist die ausfallende langkettige DNA, die im Laufe des Mischens zunehmend kompakter wird. Die durchsichtige, klebrige DNA-Wolke fischt man mit einer zu einer kleinen Häkelnadel zurechtgeschmolzenen Pasteurpipette heraus und wäscht sie sorgfältig in 70 % Ethanol, um Phenol- und Salzreste zu entfernen. Die Wolke wird dabei weiß und wesentlich kleiner. Anschließend entfernt man die gesamte Flüssigkeit und trocknet die DNA an der Luft. Sie wird dann in TE gelöst – ein langsamer Vorgang, dem man ein bis zwei Tage Zeit lassen sollte. Durch vorsichtige Bewegung bei Raumtemperatur oder 65°C beschleunigt man den Prozess.

Mit kultivierten Zellen tut man sich wesentlich leichter. Nachdem sie mit PBS gewaschen und pelletiert wurden, resuspendiert man sie in einem geeigneten Volumen Proteinase K-Puffer – bei kleineren Mengen reichen $300\ \mu\text{l}$ aus, bei mehr als 3×10^7 Zellen sollte man 1 ml Puffer je 10^8 Zellen rechnen. Anschließend weiterbearbeiten wie oben beschrieben.

15 Proteinase K-Puffer: 100 mM NaCl/10 mM Tris HCl pH 8,0/50 mM EDTA pH 8,0/0,5 % SDS/ 20 $\mu\text{g/ml}$ RNase A/0,1 mg/ml Proteinase K.

Die Präparation von genomischer DNA aus **Blutproben** ist etwas kritischer, weil einerseits die anfallenden DNA-Mengen nicht so groß sind, andererseits Kontaminationen mit Häm auftreten können, das beispielsweise PCR-Reaktionen hemmt. Vorsicht auch bei der Wahl des Antikoagulans: EDTA und Citrat eignen sich gut, während Heparin Schwierigkeiten machen kann.

Für die Aufreinigung von DNA aus Blut existiert – vermutlich wegen des hohen Bedarfs in der klinischen Diagnose – eine ganze Reihe guter Kits (z. B. von Pharmacia, Qiagen, Promega), mit denen man sich das Leben erleichtern kann.

Bei größeren Präparationen empfiehlt sich eine vorherige Isolierung der Lymphocyten: Dazu 2 Volumen Ficoll-Paque (Pharmacia; Ficoll-Paque ist eine wässrige Lösung mit einer Dichte von 1,077 g/ml, die aus 5,7 g Ficoll 400 und 9 g Natriumdiatrizoat mit Calcium-EDTA je 100 ml besteht) in einem Zentrifugenbecher vorsichtig mit 1 Volumen Blut überschichten und für 30 min bei 250×g zentrifugieren. Die Lymphocyten sammeln sich an der Grenzschicht zwischen Blutplasma und Ficoll und können mit einer Pasteurpipette abgenommen werden, während die Erythrocyten am Becherboden sedimentieren.

Tipps

Sorgfältig durchgeführt, erhält man mit dieser Methode DNA-Fragmente von ca. 50–100 kb Länge. Wer Wert auf möglichst lange DNA-Fragmente legt, sollte nach der Phenol-Chloroform-Reinigung statt einer Ethanol-fällung eine Dialyse durchführen (► Abschn. 2.3.6). Dabei wird mindestens zweimal für insgesamt wenigstens 24 h gegen ein hundertfaches Volumen TE-Lösung dialysiert.

Gefrorenes Gewebe kann bei –70 °C beliebig lang aufbewahrt werden. Man sollte allerdings daran denken, dass man das Gewebe aus dem Gefäß, in dem man es gelagert hat, auch wieder herausbekommen muss. Da das Gewebe vor dem Zermörsern nicht auftauen darf, hilft meist nur der

panische Griff zum Hammer, um an das im Gefäß solide verklebte Leberstückchen heranzukommen. Am besten friert man daher die Gewebestücke einzeln in flüssigem Stickstoff ein und gibt sie erst anschließend in das (vorgekühlte) Lagergefäß. Oder man friert das Material gleich in kleinen Plastiksäckchen ein.

2.3 Die Reinigung von Nucleinsäuren

Die Reinigung von Nucleinsäuren ist eine der Standardtätigkeiten des arbeitsamen und erfolgreichen Experimentators. Jeder, der nicht den lieben langen Tag vor dem Computer sitzt, wird ständig etwas zu reinigen haben und häufig vor der Frage stehen, welche Methode im jeweiligen Fall die geeignete ist.

■ Tabelle 2.1 soll hier als Orientierungshilfe dienen und den Überblick erleichtern. Die Liste erhebt allerdings keinen Anspruch auf Vollständigkeit.

2.3.1 Phenol-Chloroform-Extraktion

Häufig enthalten Nucleinsäurelösungen unerwünschte Verschmutzungen, zumeist handelt es sich dabei um Proteine. Eine klassische Methode der Reinigung ist die Phenol-Chloroform-Extraktion, bei der die Nucleinsäurelösung nacheinander mit einem Volumen Phenol (pH 8,0), einem Volumen Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol-Gemisch (25:24:1, v/v) und einem Volumen Chloroform ausgeschüttelt wird (■ Abb. 2.4). Dazwischen wird jeweils zentrifugiert und die obere, wässrige Phase (unter Vermeidung der Interphase) in ein neues Gefäß überführt. Auf diese Weise werden die Verschmutzungen denaturiert und sammeln sich in der organischen Phase beziehungsweise an der Grenzschicht zwischen den beiden Phasen an, während die Nucleinsäuren in der wässrigen Phase bleiben. Durch eine anschließende Alkoholfällung entfernt man verbleibende Phenolreste aus der Lösung.

Statt mit einer Alkoholfällung kann man Reste von Phenol, Chloroform oder anderen organischen Lösungsmitteln auch mit **Ether** entfernen. Dazu gibt man zur DNA-Lösung ein gleiches Volumen an Diethylether, mischt die beiden Lösungen gut

■ **Tabelle 2.1** DNA-Reinigungsmethoden. Die Wahl der geeigneten Reinigungsmethode hängt sehr stark davon ab, mit welcher DNA-Menge man es zu tun hat, woher die DNA kommt (d. h. welche Verunreinigungen entfernt werden müssen) und was man anschließend damit zu tun gedenkt

Methode geeignet für	große DNA-Mengen (Maxi-Präp)	kleine DNA-Mengen (Mini-Präp)	minimale DNA-Mengen (z. B. Versuchsansätze)
Phenol-Chloroform-Extraktion (► Abschn. 2.3.1)	+	+	+
Anionenaustauschersäule (► Abschn. 2.3.2)	+	(+)	—
Silikat-Membran (► Abschn. 2.3.3)	(+)	+	(+)
Cäsiumchlorid-Dichtegradient (► Abschn. 2.3.4)	+	—	—
PEG-Fällung (► Abschn. 2.3.5)	+	(+)	(PCR)
Dialyse (► Abschn. 2.3.6)	+	(+)	(+)
<i>magnetic beads</i> (► Abschn. 2.3.7)	—	(+)	+
Alkoholfällung (► Abschn. 2.3.9, 2.4.1)	+	+	—
Konzentratoren (► Abschn. 2.3.10, 2.4.2)	—	+	+
Proteinbindende Filtermembranen (► Abschn. 2.3.8)	—	—	+
Ausschütteln mit Butanol (► Abschn. 2.3.9, 2.4.1)	—	—	(entsalzen)
Exonuclease-Phosphatase-Verdau (► Abschn. 2.3.11)	—	—	(PCR)

und zentrifugiert für wenige Sekunden, um eine vollständige Trennung der Phasen zu erhalten. Die (obere) Etherphase wird mit der Pipette entfernt, die wässrige Phase ein zweites Mal mit Ether ausgeschüttelt und danach die Etherreste für 15 min an der Luft oder, bei größeren Volumina für 15 min unter Vakuum abgedampft. Die Methode ist allerdings weniger stark verbreitet, da Ether betäubend wirkt, sehr leicht entzündlich ist und noch dazu schwerer als Luft und sich daher auf Knöchelhöhe ansammeln kann, während einem die frische Luft um die Nase streicht. Man sollte daher nur unter einem gut funktionierenden Abzug arbeiten.

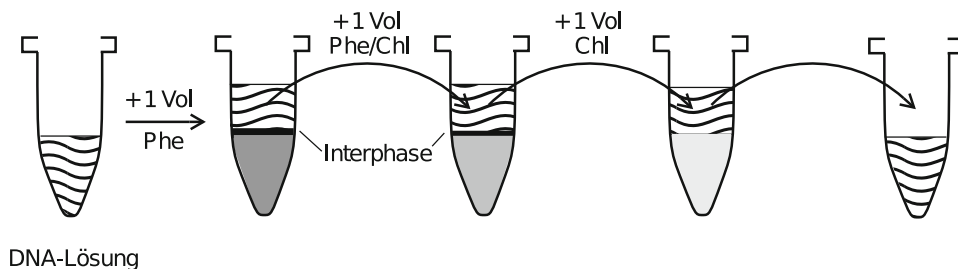
Achtung Nicht jeder Zentrifugenbecher ist resistent gegen organische Lösungsmittel wie Phenol und Chloroform. Polystyrol und Polycarbonat beispielsweise, zwei wegen ihrer Durchsichtigkeit beliebte Materialien, lösen sich (böswartigerweise relativ langsam) auf und brechen dann während

der Zentrifugation. Das Beseitigen des stinkenden, ätzenden Drecks aus Rotor und Zentrifuge gehört zu den nachhaltigsten Eindrücken im Leben eines Experimentators.

Tipps

Das Protokoll lässt sich vereinfachen, indem man den ersten Schritt, die Reinigung mit Phenol, wegfallen lässt. Auch der **Isoamylalkohol** ist erlässlich; offenbar verhindert er die Bildung von Schaum an der Oberfläche, was allerdings ein eher seltenes Phänomen ist, eine 1 : 1 Phenol-Chloroform-Mischung tut daher den gleichen Dienst.

Obwohl sich die Verschmutzungen in der Interphase ansammeln und dort häufig gut sichtbar sind, ist



■ **Abb. 2.4** Phenol-Chloroform-Extraktion

es meist mühsam, die wässrige Phase abzupipettieren, ohne diesen Schmutz mitzunehmen. Häufig sind die Verluste dabei relativ groß. Eppendorf bietet für diesen Zweck ein interessantes Produkt namens Phase Lock Gel™ an, ein zähes Gel, bereits in Tubes verschiedener Größen vorpipettiert, das weder mit der phenolischen noch mit der wässrigen Phase reagiert und nach der Zentrifugation eine dicke, stabile Schicht zwischen den beiden Phasen bildet, die einem ein leichtes Abpipettieren ermöglicht. Wem das zu teuer ist und wer ein wenig Experimentieren nicht scheut, der kann allerdings auch Silikonvakuumfett für Zentrifugen verwenden. Die richtige Menge muss man durch Ausprobieren ermitteln.

Gefahrenhinweis Phenol ist ätzend und ziemlich giftig. Bei Hautkontakt kommt es neben den Verbrennungen der Haut auch zur Aufnahme von Phenol, die zu Schädigungen von Nervensystem, Leber und Nieren und bei größeren Mengen sogar zum Tod führen kann. Phenoldämpfe führen zu Reizungen der Augen und der Atemwege, zu Übelkeit, Erbrechen und Schlimmerem. Beim Umgang mit Phenol ist daher größte Vorsicht und die Beachtung der Sicherheitsrichtlinien (Handschuhe, Schutzbrille, Abzug usw.) dringend geboten. Bei Hautkontakt gut mit Wasser und Seife abwaschen, bei Spritzern ins Auge intensiv mit Wasser auswaschen und anschließend einen Arzt aufsuchen. Die früher übliche Praxis, sich aus festem Phenol durch stundenlanges Äquilibriumieren mit Tris-Base-Lösung selbst Phenollösungen anzufertigen, ist angesichts des Gefahrenpotentials unsinnig, bei nicht sachgemäßer Entsorgung der dabei anfallenden Abfälle kriminell und angesichts der Zeit, die der Vorgang in Anspruch nimmt, unwirtschaftlich. Tun Sie sich

und Ihrer Umwelt etwas Gutes und kaufen Sie fertige Phenollösungen, auch wenn sie (auf dem Papier) etwas teurer sind.

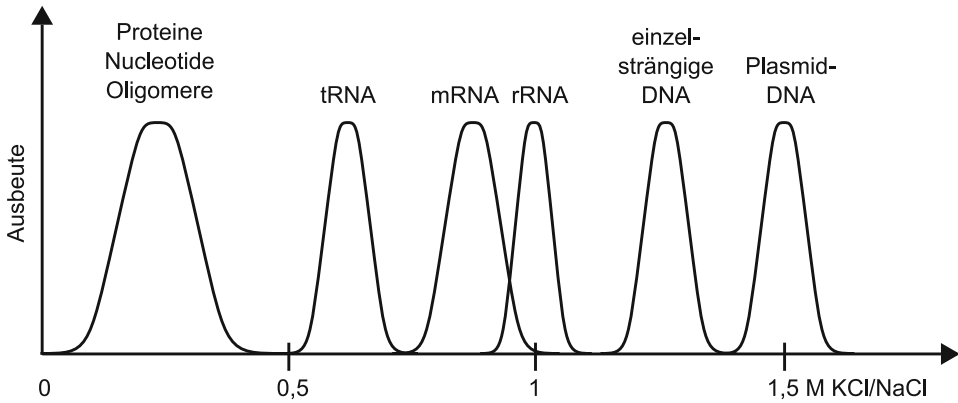
Vorteil Billig und erprobt, funktioniert zuverlässig. Keine Probleme mit begrenzten Bindungskapazitäten, wie man sie mit Säulchen hat.

Nachteil Stinkt, ätzt, gesundheitsgefährdend. Organische Lösungsmittel müssen aufwendig entsorgt werden. Die Phenol-Chloroform-Extraktion wird daher nur noch selten eingesetzt.

2.3.2 Anionenaustauschersäulen

Wegen des dabei anfallenden Sondermülls hat man in den letzten Jahren sowohl die Phenol-Chloroform-Reinigung für kleine Ansätze als auch die Cäsiumchloridgradientenzentrifugation für die Reinigung von Plasmid-DNA-Maxipräparationen zunehmend durch schnellere, sauberere und nicht zuletzt für die Industrie gewinnbringendere Reinigungsmethoden ersetzt. Prinzipiell kann man zwei Methoden unterscheiden: Anionenaustauscher und Glasmilch (siehe unten).

Anionenaustauscher bestehen aus einer Matrix, beispielsweise Cellulose oder Dextran, die positiv geladene Gruppen besitzt. Das Rückgrat der Nucleinsäuren dagegen enthält Phosphatgruppen, die oberhalb von pH 2 negativ geladen sind. Aus diesem Grund binden Nucleinsäuren hervorragend an Anionenaustauscher. Da die Stärke der Bindung für DNA, RNA und Proteine unterschiedlich ist und außerdem vom pH und der Ionenstärke des Puffers abhängen, eignet sich die Methode sehr gut zum Aufreinigen selbst sehr kruder DNA-Präparationen.



■ **Abb. 2.5** Typisches Elutionsmuster einer kommerziellen Anionenaustauschersäule bei pH 7,0. Die Reinigung von DNA über Anionenaustauschersäulen ist relativ einfach aufgrund der hohen Bindungsstärke der DNA an die Säulenmatrix. Aber auch andere Nucleinsäuren lassen sich damit trennen, wenn Wasch- und Elutionspuffer eine geeignete Ionenstärke besitzen. Das Elutionsmuster ist übrigens pH-abhängig, daher liegt der pH des Elutionspuffers üblicherweise im Bereich von 8,5, um die Salzkonzentration möglichst niedrig zu halten. (nach Qiagen)

Prinzipiell wird die DNA-Präparation auf eine gewisse Salzkonzentration gebracht und dann auf die Anionenaustauscher-Säule gegeben. Die stark geladenen Nucleinsäuren binden an das Säulenmaterial, während die weit weniger stark negativ geladenen Proteine unter diesen Bedingungen durchlaufen. Mit einem Puffer höherer Ionenstärke wird anschließend die RNA von der Säule gewaschen und schließlich die DNA mit einem Puffer noch höherer Ionenstärke oder von niedrigerem pH eluiert. Um das Salz loszuwerden, fällt man anschließend die DNA mit Alkohol (Isopropanol oder Ethanol) aus. Die Zusammensetzung der Puffer unterscheidet sich je nach Säulenmaterial etwas, so dass man sich an die Angaben der Säulenhersteller halten sollte. Meist muss man die Puffer sowieso kaufen, weil die Hersteller die Zusammensetzung nicht verraten; Macherey-Nagel gehört hier zu den rühmlichen Ausnahmen, auch Qiagen macht in den letzten Jahren weniger Geheimnisse darum (■ Abb. 2.5).

Probleme Leider hat auch die DNA-Aufreinigung mittels *Säulen* gelegentlich etwas Mystisches. Sie funktioniert meistens, aber eben nicht immer. Daher nicht verzagen, wenn der Labornachbar verkündet, er habe »noch nie Probleme damit gehabt«. Die wahrscheinlichste Ursache des Problems liegt darin, dass in der Ausgangslösung, zumeist

ein Bakterienlysat, keine DNA enthalten ist. Dies überprüft man am besten, indem man ein Aliquot der Ausgangslösung mit Ethanol fällt und das Pellet nach einem Verdau mit DNase-freier RNase (► Anhang) (sonst wird man später nur einen großen RNA-Fleck sehen) auf ein Agarosegel aufträgt. Die zweite Möglichkeit ist der klassische »Viel hilft viel«-Fehler. Anionenaustauscher haben nur eine bestimmte Bindungskapazität. Gibt man zu große Mengen Bakterienlysat auf die Säule, so kann Nicht-DNA (vor allem bakterielle RNA, die ca. 90 % der Nucleinsäuren im Lysat ausmacht) die Bindungsstellen absättigen und so die DNA-Ausbeute senken. Eine dritte Möglichkeit wäre, dass die Puffer nicht ganz in Ordnung sind. Ist beispielsweise die Ionenkonzentration des Waschpuffers zu hoch, so wird die DNA bereits beim Waschschrift eluiert, die Ausbeute sinkt. (Dies kann übrigens auch mit den herstellereigenen Puffern passieren, wie ich aus eigener Erfahrung weiß, daher: Keinen falschen Respekt vor Kits.)

Tipps

Auch wenn es die Hersteller nicht gerne verraten: Ionenaustauscher-Säulen können mehrfach verwendet werden. Daher am besten Säulen von Herstellern beziehen, die

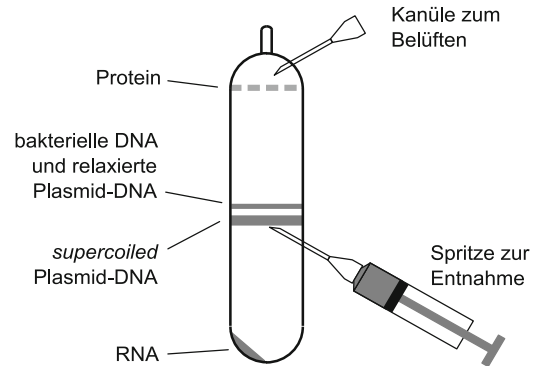
die Zusammensetzung ihrer Puffer verraten, damit diese nicht zum limitierenden Faktor werden. Man sollte dabei allerdings bedenken, dass die Elution der DNA nie vollständig ist und man dadurch DNA-Kontaminationen von früheren Aufreinigungen erhält. Am besten verwendet man eine Säule immer nur für die Aufreinigung einer bestimmten DNA. Autoklavieren der Säulen ist weniger empfehlenswert, da sowohl das Säulenmaterial als auch die Plastikteile darunter leiden – und DNA durch Autoklavieren zwar zerbröselt, aber nicht völlig zerstört wird.

Leider wurde die Kapazität der Säulen in den letzten Jahren offenbar gesenkt – konnte man früher aus einer Maxipräp-Säule über 800 µg Plasmid-DNA gewinnen, tut man sich heute häufig schwer, die nominellen 500 µg zu erreichen. Auch hier kann man sich damit behelfen, dass man das Bakterienlysat nach der Passage über die Säule auffängt und nach der Elution ein zweites Mal aufrägt. Die Ausbeute lässt sich so mit wenig Aufwand um 60–70 % erhöhen.

2.3.3 Glasmilch/Silikat-Membranen

Glasmilch (ursprünglich eine milchig wirkende Suspension von kleinen Glaskügelchen, daher der Name) ist eine ganz andere Art von Anionenaustauscher. Silikate (um nichts anderes handelt es sich nämlich bei Glas) binden in der Gegenwart hoher Konzentrationen chaotroper Salze spezifisch DNA, die nach dem Waschen problemlos mit H₂O oder TE-Puffer (► Anhang) eluiert und direkt weiterverwendet werden kann.

Obwohl diese Methode vor allem zur Aufreinigung kleiner DNA-Mengen aus Agarosegelen verwendet wird und deshalb dort ausführlicher beschrieben ist (► Abschn. 3.2.2), eignet sie sich auch für die Reinigung von DNA aus Lösungen. Viele Kits zur Präparation von Plasmid-DNA im kleinen Maßstab, zur Reinigung von PCR-Ansätzen oder zur Entfernung von Enzymen aus Reaktions-



■ Abb. 2.6 Kontinuierlicher CsCl-Dichtegradient

ansätzen funktionieren mittlerweile nach diesem Prinzip. Der einfacheren Handhabung wegen werden dabei kaum noch Glaskügelchen verwendet, sondern Silikat-Membranen.

Tipp

Auch Silikat-Säulchen lassen sich hervorragend wiederverwenden. Das Problem ist das gleiche wie bei Anionenaustauscher-Säulen – fünf bis zehn Prozent der DNA bleiben an die Matrix gebunden und kontaminieren spätere Präparationen. Neuerdings bietet AppliChem unter dem Namen MaxXbond ein **Regenerationssystem für DNA-Bindungssäulen** an, das angeblich diese DNA-Reste vollständig entfernt. Einem totalen Recycling der Säulchen stünde damit nichts mehr im Weg.

Eine andere Form des »missbräuchlichen Recyclings« von Minipräp-Säulchen ist dieses ungewöhnliches Maxipräp-Protokoll, das ich hiermit auf den Namen **Mini-Maxi-Präp** taufe, die Kombination einer Maxipräp mit der Pökel-DNA-Methode (► Abschn. 6.6). Benötigt wird dafür ein handelsübliches Plasmid-Minipräp-Kit mit Silikatmembran-Säulchen. Von einer Übernachtskultur (50 ml TB-Kultur oder 200 ml LB-Kultur) eine Alkalische Lyse (► Abschn. 2.3.3) durchführen (mit 5 ml Lsg. I, 10 ml Lsg. II, 7,5 ml Lsg. III). Den

klaren Überstand mit 15 ml Isopropanol mischen und zentrifugieren. Den Überstand komplett entfernen und das Pellet in ca. 300 µl TE-Puffer lösen (das Endvolumen sollte unter 500 µl liegen). Alles in ein 2 ml Gefäß überführen, 5 µl DNase-freie RNase zugeben und 30 min bei RT inkubieren.¹⁶ 3 Volumen Guanidiniumthiocyanat (6 M) zugeben¹⁷ und mischen. Diese Lösung enthält große Mengen Plasmid-DNA und kleine RNA-Fragmente in chaotropem Salz und ist über lange Zeiträume bei Raumtemperatur lagerbar. Bei Bedarf ein Aliquot (ca. 100–200 µl) auf ein Silikatmembran-Säulchen geben und die DNA gemäß Herstellerangaben reinigen. Das Säulchen kann beliebig wiederverwendet werden, enthält aber noch Reste der Plasmid-DNA, daher nach Gebrauch am besten beschriften und bis zur nächsten Plasmid-Reinigung zur DNA-Lösung stellen. Übrigens: Sollte der betreffende Klon einmal verloren gehen, kann das Säulchen mit 20 µl TE-Puffer nochmals eluiert werden; das so gewonnene Material reicht problemlos aus, um eine oder mehrere Transformationen damit durchzuführen.

2.3.4 Cäsiumchlorid-Dichtegradient

Die klassische, wenngleich mittlerweile stark aus der Mode gekommene Methode zur Reinigung großer Mengen von DNA ist die Cäsiumchlorid-Dichtegradienten-Zentrifugation. Cäsiumchlorid (CsCl) hat eine bemerkenswerte Eigenschaft: Zentrifugiert man eine CsCl-Lösung lange genug bei ausreichend hoher Geschwindigkeit, so stellt sich am Boden des Zentrifugationsröhrchens eine höhere Konzentration des schweren Salzes ein, während

die Konzentration nach oben hin abnimmt, man erhält dadurch einen kontinuierlichen Dichtegradienten. Da sich Proteine, RNA und DNA in ihrer Dichte unterscheiden, kann man diesen Gradienten zur DNA-Reinigung nutzen (■ Abb. 2.6).

Damit nicht genug: Man kann sogar Plasmid-DNA von bakterieller DNA trennen – indem man **Ethidiumbromid** hinzugibt. Ethidiumbromid interkaliert zwischen den Basen der DNA und verwandelt diese in einen DNA-Ethidiumbromid-Komplex, der eine geringere Dichte als DNA besitzt. Plasmid-DNA steht, als zirkuläre DNA mit zusätzlichen Windungen (*supercoiled* DNA), regelrecht unter Spannung und kann dadurch weniger Ethidiumbromid einbauen. Die Dichte der Plasmid-DNA ist dadurch höher als die von linearisierter DNA und die beiden DNA-Typen können in einem CsCl-Dichtegradienten voneinander getrennt werden – im UV-Licht liegt dann die Bande mit der bakteriellen DNA knapp über der Plasmid-DNA-Bande.

CsCl-Dichtegradienten werden auch zur Reinigung genomischer DNA aus Bakterien oder Pflanzen von Proteinen, RNA und anderen Kontaminationen verwendet, man sieht dann allerdings nur eine DNA-Bande.

Tipp

Keinesfalls vergessen, bei **Raumtemperatur** zu zentrifugieren! Cäsiumchlorid fällt bei niedrigen Temperaturen leicht aus, was angesichts der hohen Zentrifugationsgeschwindigkeiten schnell zum Ultrazentrifugen-GAU führen kann. Der Sicherheitsbeauftragte Ihres Instituts kann Ihnen vermutlich nette Bilder dazu zeigen.

- 16 Dieser Schritt ist sehr wichtig. Eventuell bei den ersten Versuchen je ein Aliquot vor und nach RNase-Verdau auf ein Gel auftragen und kontrollieren, dass die RNA weitgehend verdaut ist. Unverdaute RNA bindet später an die Silikat-Membran und wird mit der DNA zusammen aufgereinigt.
- 17 Oft enthalten die Kits eine Extra-Lösung mit chaotropem Salz für zusätzliche Reinigungsschritte – man erkennt sie allerdings gelegentlich nur am Gefahrenhinweis auf der Flasche, weil die Hersteller die Zusammensetzung ihrer Lösungen nicht preisgeben. Wenn vorhanden, diese verwenden.

Vorteil Man sieht, mit wieviel DNA man es zu tun hat. Die DNA ist sehr sauber und man kann fast beliebig große Mengen aufreinigen (keine Kapazitätsgrenzen wie bei Säulen). Einzige Methode, bei der auf *supercoiled* Plasmid-DNA selektiert wird, welche sich besser für Transfektionen von eukaryontischen Zellen eignet als relaxierte Plasmid-DNA.

Die DNA enthält garantiert keine RNA (was bei anderen Methoden nicht sichergestellt ist).

Nachteile Die Zentrifugation dauert lange (über 14 h bei 350.000×g) und ist arbeitsintensiv. Außerdem ist Ethidiumbromid als Mutagen verschrien, das bedeutet: Handschuhe (aus Nitril), Sicherheitskleidung, Sonderabfall. Ganz abgesehen davon, dass man nur mit einiger Erfahrung und Sorgfalt vermeiden kann, das halbe Labor zu verkleckern. Wer kann, greift daher lieber auf Anionenaustauschersäulen zurück.

2.3.5 Fällung mit PEG

Eine wenig giftige Methode der Reinigung ist die Fällung von DNA mit **Polyethylenglycol (PEG)**. Leider ist die PEG-Fällung selbst zu ihren Hochzeiten ziemlich unterschätzt worden und mittlerweile eher aus der Mode gekommen – zu unrecht, wie ich meine.

Klassischerweise werden PEG-Fällungen häufig im Zusammenhang mit **Phagen-DNA-Präparationen** verwendet (allerdings werden dann nicht die DNA, sondern die Phagen ausgefällt), doch finden sich auch Protokolle, um auf diese Weise **PCR-Produkte** von überschüssigen Primern und Nucleotiden zu reinigen. Hier ein Beispiel:

50 µl PCR-Ansatz und 50 µl PEG-Lösung (20 % PEG 8000, 2,5 M NaCl) mischen, für 15 min bei 37 °C inkubieren, dann bei Raumtemperatur zentrifugieren (15 min, 15.000 rpm), Überstand entfernen, zweimal mit 125 µl kaltem EtOH (80 %) waschen und kurz zentrifugieren, das Pellet trocknen und anschließend in 25 µl TE lösen. Derart gereinigte PCR-Produkte werden gern für Sequenzierungen eingesetzt.

Aber auch für die **Plasmid-DNA-Minipräp** finden sich Protokolle: Alkalische Lyse (► Abschn. 2.2.3) mit 1,5–3 ml Bakterienkultur¹⁸ durchführen. Nucleinsäuren aus dem Lysat fallen durch Zugabe von 2 Volumen EtOH, mischen, zentrifugieren (2 min, 13.000 rpm, RT), Pellet mit 70 % EtOH waschen

und lufttrocknen, in 50 µl TE-Puffer lösen. DNase-freie RNase zugeben und 30 min bei 37 °C inkubieren. Zentrifugieren (10 min, 13.000 rpm, 4 °C), Überstand in einen neuen Tube überführen und 1 Volumen PEG-Lösung (13 % PEG, 1,6 M NaCl) zugeben, mischen. 1 h auf Eis inkubieren, dann zentrifugieren (15 min, 13.000 rpm, 4 °C). Pellet mit 70 % EtOH waschen, lufttrocknen und in TE-Puffer lösen.

Durch diese Protokolle neugierig geworden, habe ich mich ein wenig genauer mit der Methode auseinandergesetzt und war erstaunt.

So wird die Dauer der Inkubation der DNA mit PEG oft als sehr wichtig angesehen. Allgemein wird behauptet, dass eine einstündige Inkubation nur 50 % Ausbeute liefere, während eine vollständige Fällung der DNA eine Übernacht-Inkubation erfordere. In eigenen Tests¹⁹ konnte ich das nicht bestätigen; bei Plasmid-DNA-Minipräps lieferten Inkubationen zwischen 15 min und 4 h weitgehend gleiche Ausbeuten, während die Ergebnisse bei Übernacht-Inkubationen eher schlechter waren. Die PEG-Fällung ist also erheblich schneller als ihr Ruf.

In einem klitzekleinen Artikel gehen Hartley und Bowen (1996) sogar noch weiter, verzichten ganz auf eine Inkubation²⁰ und kommen trotzdem auf eine geschätzte Ausbeute von 75 %. Viel interessanter ist allerdings, dass die Autoren zeigen, dass die PEG-Fällung einen größenselektiven Effekt aufweist. Während mit 10 % PEG nur Fragmente ab 200 bp Länge gefällt werden, liegt die Untergrenze für 8,3 % PEG schon bei ca. 300 bp Länge und für 6,7 % PEG bei ca. 650 bp. Mit 5 % PEG und weniger lassen sich gar keine Nucleinsäuren mehr fällen.

Eigene Versuche haben dies bestätigt; so sind Plasmid-DNA-Präparationen mit PEG-Fällung praktisch RNA-frei, wenn bei der Alkalischen Lyse RNase A zugegeben wird.

Vorteil Die Methode ist robust und billig.

Nachteil Es gibt schnellere Methoden.

18 Die Ausbeute lässt sich deutlich steigern, wenn man die Bakterien nicht in LB, sondern reichhaltigeren Medien wie z. B. TB züchtet (► Abschn. 2.2.1).

19 Plasmid-DNA wurde mit NaCl (0,8 M Endkonz.) und PEG-8000 (6,5 % Endkonz.) gefällt.

20 10 % MgCl₂ (Endkonz.) und 6,7–10 % PEG-8000 (Endkonz.), Zentrifugation für 10 min bei Raumtemperatur.

Tipp

Polyethylenglycol ist ein Polymer, das in den unterschiedlichsten Molmassen angeboten wird. Für molekularbiologische Zwecke eignen sich PEG-6000 und PEG-8000, kleinere PEGs (z. B. PEG-1000) dagegen nicht.

2.3.6 Dialyse

Es gibt auch noch die Möglichkeit, DNA zu dialysieren. Diese Methode eignet sich vor allem dazu, kleine Moleküle schonend loszuwerden, beispielsweise Salze und Phenolreste bei der Präparation von genomischer DNA.

Dialyseschläuche werden trocken und am laufenden Meter geliefert und müssen erst vorgequollen und gewaschen werden. Die schnellste Variante besteht darin, ein Stück Schlauch für zehn Minuten in H₂O zu kochen. Der Schlauch wird danach am unteren Ende abgeklemmt, die DNA-Lösung hineinpipettiert und schließlich das obere Ende abgeklemmt. Man hängt dann den gefüllten Schlauch in 1 l TE-Puffer und dialysiert bei 4 °C für 2–16 h, je nach Volumen der DNA-Lösung. Der Puffer wird währenddessen gerührt, bei größeren DNA-Volumina sollte man alle paar Stunden den Puffer wechseln. Man sollte bei allen Arbeitsschritten Handschuhe verwenden, um Kontaminationen mit Nucleasen zu vermeiden.

Vorteil Die schonendste Methode, Verunreinigungen durch kleine Moleküle loszuwerden.

Nachteil Dauert gnadenlos lange. Für kleine Volumina kaum geeignet, weil man ziemlich viel Material im Schlauch verliert.

Tipp

Für kleine Volumina ist mittlerweile die Mikrodialyse gebräuchlich. Viele Hersteller bieten verschiedenste Systeme mit unterschiedlichen Ausschlussgrößen für Volumina von 10

bis 5000 µl an, bei denen der Materialverlust entsprechend gering ist. Man kann sich aber auch selbst behelfen. Ein flottes kleines Protokoll lautet: 25 ml H₂O oder Puffer in eine Petrischale füllen und eine Dialysefiltermembran mit 0,025 µm Porengröße (gibt es z. B. bei Millipore in verschiedenen Durchmessern) auf die Oberfläche der Flüssigkeit legen. 5–100 µl DNA-Lösung auf den Filter pipettieren und nach ca. 30 min wieder abnehmen.

2.3.7 Magnetic beads

Magnetische Kügelchen (neudeutsch *magnetic beads*) sind eigentlich keine eigene Methode zur Reinigung von Nucleinsäuren, sondern eine technische Spielerei, die nur deshalb erwähnenswert ist, weil sie für die Automatisierung von Labormethoden von großer Bedeutung ist. Es handelt sich dabei um kleine paramagnetische Kügelchen, die mit verschiedensten Materialien beschichtet werden, welche ihnen die gewünschten Eigenschaften vermitteln. Für die Automatisierung eignet sich die Technik so gut, weil sich die Kügelchen prinzipiell im Versuchsansatz frei bewegen können, was wichtig für Bindungs- und Waschschritte ist. Führt man jedoch einen Magneten an das Reaktionsgefäß, z. B. seitlich an ein Eppendorf-Gefäß, kleben die Kügelchen fest an der Wand und die Flüssigkeit im Gefäß kann vollständig entfernt werden, ohne dabei Kügelchen mitzupipettieren. Auf diese Weise kann auch ein Roboter zahlreiche Inkubations- und Waschschritte nacheinander ohne nennenswerten Materialverlust durchführen.

Besonders im Bereich der Proteinreinigung lässt sich diese Technik gut nutzen, weil dort die Affinitätschromatographie eine etablierte Methode ist, man denke nur an die Aufreinigung von Proteinen mit His-tag mittels Nickel-Chelat-Säulen; dies lässt sich in der Variante mit magnetischen Agarosekügelchen sehr gut im kleinen Maßstab durchführen. Auch im Nucleinsäure-Bereich findet die Technik schon länger Verwendung, z. B. zur Reinigung von

Biotin-markierten cDNAs mittels Streptavidin-gekoppelten Kügelchen.

Aber auch die Aufreinigung von DNAs unterschiedlichster Provenienz lässt sich damit durchführen. Roche verwendet beispielsweise glasbeschichtete Kügelchen, um so DNA-Reinigungen nach dem Glasmilch-Prinzip durchzuführen, und bietet unter der Bezeichnung MagNA Pure gleich ein ganzes System zur automatisierten Nucleinsäure-Aufreinigung an, das auch noch mit deren Real-Time PCR System kombiniert werden kann.

Invitrogen bietet unter der Bezeichnung **ChargeSwitch® Technology** (CST) Kügelchen an, die ihre Ladung in Abhängigkeit vom pH ändern. Bei niedrigem pH sind die Kügelchen positiv geladen, was die Bindung der DNA und die Waschschritte ermöglicht, während ab pH 8,5 das Material seine Ladung verliert und die DNA eluiert werden kann. Wie bei der Glasmilch-Methode kann die eluierte DNA direkt weiterverwendet werden.

Tipp

Auch wenn die modernen Silikat-Matrix-Kits im normalen Laborbetrieb ein wenig einfacher in der Handhabung sein dürften, besitzen die magnetischen Kügelchen einen nicht zu unterschätzenden Vorteil, der seit dem Ende der guten alten Glasmilch verloren gegangen schien – die Möglichkeit, die eingesetzten Mengen an Matrix zu reduzieren! Wenn man geringe Mengen an Material aufreinigen möchte, ist eines der größten Probleme der mitunter erhebliche Verlust an DNA, weil ein Teil des Materials immer an der Matrix gebunden bleibt. Dieser Verlust lässt sich minimieren, indem man weniger Kügelchen einsetzt.

ansatz entfernen möchte, für den gibt es jetzt eine interessante Alternative zur üblichen Phenol-Chloroform-Extraktion. Es handelt sich gewissermaßen um ein Nebenprodukt aus der Welt der Filtermembranen, nämlich um eine Membran mit hoher Affinität zu Proteinen, die nur wenig DNA bindet (Micropure-EZ von Amicon). Speziell hitzestabile Enzyme, die sich nur schwer inaktivieren lassen (z. B. Restriktionsenzyme, Polymerasen oder Phosphatasen), kann man auf diese Weise sehr schnell und ohne großen Arbeitsaufwand loswerden.

2.3.9 Alkoholfällung

Die Alkoholfällung ist *die* klassische Methode zum Konzentrieren von DNA und deswegen ausführlich in ► Abschn. 2.4.1 beschrieben. Ein Nebeneffekt, an den nur wenige denken, ist, dass viele Substanzen, an denen man nicht interessiert ist, in der Gegenwart von Alkohol deutlich schlechter präzipitieren als DNA, weshalb sich die Alkoholfällung nicht nur zum *Konzentrieren*, sondern auch gut zum *Reinigen* von Nucleinsäuren eignet.

Mittels Flüssigchromatographie lässt sich das übrigens herrlich zeigen: Belädt man eine Anionentauschersäule mit dem Überstand einer Alkalischen Lyse und eluiert anschließend mit einem Salzgradienten, lassen sich bei 260 nm ungeheure Mengen an Verunreinigungen nachweisen. Fällt man das Lysat mit EtOH oder Isopropanol und wiederholt den Versuch, bleiben nur noch die Peaks von RNA und DNA übrig.

Auch der Praxistest zeigt: Plasmid-DNA-Minipräps, die man nach der Alkalischen Lyse mit Alkohol fällt, liefern bereits erstaunlich saubere DNA, die sich hervorragend mittels Restriktionsverdau analysieren lässt und so arm an Nucleasen ist, dass sie bei 4 °C problemlos einen Tag und länger gelagert werden kann.²¹

2.3.8 Proteinbindende Filtermembranen

Wer seine DNA mit irgendeinem Enzym traktiert hat und nach erfolgreicher Inkubation eigentlich nur das Enzym wieder aus dem Reaktions-

21 Wir haben es zum Spaß ausprobiert und diverse Plasmid-DNA-Präps, die wir durch EtOH- bzw. Isoprop-Fällung aus einem Alkalischen Lysat gewonnen haben, einem Härte-test unterzogen. Mit erstaunlichem Ergebnis: Weder nach Inkubation für 1 h bei 37 °C noch nach Übernacht-Inkubation bei Raumtemperatur ließ sich irgendein Abbau der Plasmid-DNA nachweisen!

Das **Entsalzen** einer DNA-Lösung durch **Ausschütteln mit Butanol** ist gewissermaßen ein Spezialfall der Alkoholfällung und unter ► Abschn. 2.4.1 genauer beschrieben.

2.3.10 Konzentratoren

Konzentratoren werden, wie bereits der Name vermuten lässt, primär zur Erhöhung der DNA-Konzentration in Lösungen eingesetzt. Es handelt sich um Membranen mit so geringer Porengröße, dass niedermolekulare Substanzen passieren können, während große Moleküle wie DNA zurückgehalten werden. Dies lässt sich auch zum **Entfernen kleinemolekularer Verunreinigungen** (z. B. Nucleotide und Primer in PCR-Ansätzen) und zum **Entsalzen** von DNA-Lösungen nutzen: Erhöht man das Volumen der DNA-Lösung auf das Zehnfache und reduziert es anschließend wieder auf ein Zehntel, sind Volumen und DNA-Menge unverändert, während die Konzentration an niedermolekularen Substanzen auf ein Zehntel reduziert wurde.

Mehr zu Konzentratoren finden Sie im ► Abschn. 2.4.2.

2.3.11 Exonuclease-Phosphatase-Verdau

Richtig, im strengen Sinne handelt es sich bei dieser Methode nicht um eine Reinigung. Diese Methode befreit PCR-Ansätze von den großen Mengen an Primern und Nucleotiden, die sich nach der PCR noch im Ansatz finden. Die sind meist kein Problem, außer man versucht, PCR-Produkte direkt zu sequenzieren. Dann konkurrieren die PCR-Primer nämlich mit den Sequenzierprimern und die PCR-Nucleotide verfälschen die Nucleotidkonzentrationen, die man für die Sequenzierung benötigt. Die Konsequenz sind schlechtere Sequenzen.

Der Ansatz, das Problem zu lösen, ist denkbar einfach (Werle et al. 1994): Man gibt zum PCR-Ansatz etwas **Exonuclease I**, die einzelsträngige DNA wie Primer verdaut, und etwas **shrimp alkaline phosphatase** (SAP), mit der die verbliebenen dNTPs hydrolysiert werden. Beide Enzyme sind hitzeempfindlich und können nach erfolg-

reicher Arbeit durch eine Inkubation von 15 min bei 80 °C inaktiviert werden, um die folgende Sequenzierreaktion, bei der ja ebenfalls Primer und Nucleotide zum Einsatz kommen, nicht zu beeinträchtigen.

Die Enzymkombination kann man mittlerweile als Kit bei USB kaufen (ExoSAP-IT™).

Vorteil Geringer Arbeitsaufwand, kein Materialverlust. Vor allem bei kürzeren PCR-Produkten interessant, weil hier der Verlust bei einer Säulchen-Reinigung recht groß sein kann.

2.4 Konzentrieren von Nucleinsäuren

Ein Charakteristikum von DNA ist, dass sie meist in der falschen Konzentration vorliegt. Kein Problem, wenn die Konzentration zu hoch ist, ein großes Problem dagegen, wenn das Gegenteil der Fall ist, und das tritt praktisch immer dann ein, wenn man DNA aufreinigt. Ein weiteres typisches Problem ist, dass die DNA-Lösung hohe Konzentrationen an Salz enthält oder ein Salz, das bei der späteren Verwendung stört. Die beliebteste Lösung ist in beiden Fällen die Alkoholfällung, sie taucht beispielsweise in fast jedem Protokoll zur DNA-Präparation auf. Erstaunlich ist dabei vor allem die Zahl der Varianten, die man dort findet.

Alternativ dazu kann man Nucleinsäuren auch mit kommerziellen Konzentratoren entsalzen und/oder konzentrieren bzw. durch Aussalzen fällen oder in der *SpeedVac* (das ist eine Vakuumzentrifuge, ► Abschn. 2.4.3) einengen. DNA kann auch mit Polyethylenglykol (PEG) gefällt werden (► Abschn. 2.3.5), allerdings ist das wegen der schlechten Ausbeute nur für die Reinigung großer DNA-Mengen interessant.

2.4.1 Alkoholfällung

Das Prinzip der Alkoholfällung ist einfach: Man versetzt eine Nucleinsäure-Lösung mit einem monovalenten, d.h. einfach geladenen Salz und gibt Alkohol dazu (die Frage, wie das funktioniert, ist dagegen nur schwer zu erklären und bringt einen in der Praxis nicht viel weiter). Die Nucleinsäure

fällt, wenn man gut gemischt hat, praktisch spontan aus und muss nur noch durch Zentrifugation pelletiert und durch Waschen mit 70 % Ethanol von Salz- und Alkoholresten gereinigt werden. Ein angenehmer Nebeneffekt der Methode ist, dass neben dem Salz auch viele andere kleine, wasserlösliche Substanzen im Überstand gelöst bleiben, so dass man einen gewissen Reinigungseffekt erzielt.

Weil's so einfach ist, existieren dementsprechend viele Varianten für diese Methode. Da wären:

Die Salze

- **Natriumacetat** ist das Standardsalz des Experimentators. Die Konzentration in der DNA-Lösung (*Endkonzentration*), d. h. vor Zugabe des Alkohols, sollte 0,3 M betragen. Man verwendet dazu eine 3 M NaAcetat-Lösung mit pH 4,8–5,2.
- **Natriumchlorid** (Endkonzentration 0,2 M) wird verwendet, wenn die DNA-Lösung SDS enthält, weil dieses in 70 % Ethanol löslich bleibt und so mit dem Überstand verschwindet.
- **Ammoniumacetat** (Endkonzentration 2–2,5 M) wird verwendet, wenn die Lösung Nucleotide (dNTPs) oder Oligonucleotide (bis 30 Basen Länge) enthält, die nicht kopräzipitieren sollen. Es sollte nicht verwendet werden, wenn die DNA anschließend phosphoryliert wird, weil die T4 Polynucleotid-Kinase durch Ammonium-Ionen gehemmt wird.
- **Lithiumchlorid** (Endkonzentration 0,8 M) ist gut löslich in Ethanol, so dass die gefällte Nucleinsäure weniger Salz enthält. Nicht zu verwenden für RNA, die für zellfreie Translation oder reverse Transkription verwendet werden soll, weil Chloridionen die Initiation der Proteinsynthese in den meisten zellfreien Systemen und auch die Aktivität von RNA-abhängigen DNA-Polymerasen inhibieren. LiCl (ohne EtOH) kann auch zur Fällung großer RNAs verwendet werden (siehe unten).
- **Kaliumchlorid** funktioniert ebenfalls, fällt allerdings in Gegenwart von Isopropanol in großen Mengen aus.
- **Kaliumacetat** wird gerne bei der Plasmid-DNA-Präparation mittels Alkalischer Lyse benutzt, weil Kalium mit dem dort verwendeten Natriumdodecylsulfat (SDS) ein fast unlösliches

Präzipitat bildet und man auf diese Weise das SDS auf elegante Weise fast quantitativ los wird.

Die Alkohole

- Als Standardalkohol für Fällungen wird **Ethanol** (EtOH) verwendet. Das EtOH kann anschließend leicht entfernt werden, weil es rasch verdampft. Für die Fällung benötigt man allerdings eine recht hohe Konzentration von ca. 70 Volumen-% (das entspricht dem 2,5fachen Volumen der zu fällenden DNA-Lösung). Das bereitet häufig Probleme bei der Zentrifugation, weil man einen entsprechend großen Zentrifugenbecher benötigt. Ein weiteres Problem sind die hohen Kosten, da reines Ethanol der Brantweinsteuer unterliegt. Allerdings sind auch einige vergällte Ethanole für die Fällung geeignet und kosten nur etwa 1/5 von reinem EtOH. So bietet Roth ein Aceton-vergälltes Ethanol an, das für Nucleinsäurefällungen geeignet ist. Viele Institute besitzen auch Gönner, über die sie vergällten Ethanol zu niedrigen Kosten beziehen. Bei einem derzeitigen Preis von ca. 40–60 € je Liter EtOH p. a. rentiert es sich häufig, diesen auf seine Eignung zu testen. Das Geld ist in den heutigen Zeiten zu knapp, um es für DNA-Fällungen zu verschwenden.
- **Isopropanol** fällt Nucleinsäuren weit effektiver als Ethanol. So reichen 0,6–0,8 Volumen Isopropanol bei Raumtemperatur für eine quantitative Fällung aus. Dies ist vor allem bei großen Volumina sehr interessant. Allerdings lassen sich Reste von Isopropanol weniger leicht als Ethanol entfernen, so dass das DNA-Pellet auf alle Fälle mit 70 % (v/v) Ethanol nachgewaschen werden sollte.
- **Butanol** ist ebenfalls geeignet zum Fällen von DNA, funktioniert allerdings völlig anders: Butanol ist kaum mit Wasser mischbar, es bilden sich daher zwei Phasen. Allerdings kann die Butanolphase in geringen Mengen Wasser (bis zu 19 Gewichts-%) und Salze lösen. Dies kann man zum Entsalzen kleiner Volumina nutzen: Man versetzt ein Volumen DNA-Lösung mit zehn Volumen Butanol (1- und 2-Butanol tun den gleichen Dienst) und mischt den Ansatz etwa 1–5 min, bis die wässrige Phase verschwunden ist. Anschließend zentrifugiert man, wäscht mit

70 % Ethanol nach und nimmt das getrocknete (häufig nicht sichtbare) Pellet in H₂O auf.

Die Nucleinsäure-Konzentration

Während Nucleinsäuren bei höheren Konzentrationen (> 250 ng/μl) sehr schnell ausfallen, tut man sich bei deutlich niedrigeren Konzentrationen etwas schwer. Bei Konzentrationen zwischen 1 und 250 ng/μl kann man die Ausbeute erhöhen, indem man den Ansatz in den Gefrierschrank stellt (siehe unten).

Ein beliebter Trick ist die Zugabe eines sogenannten **Carrier**. Es handelt sich dabei um Substanzen, die ein ähnliches Präzipitationsverhalten wie DNA besitzen, sich aber in den späteren Anwendungen neutral verhalten und so nicht stören. Deshalb kann man den jeweiligen Carrier in einer für die Präzipitation optimalen Konzentration einsetzen und selbst geringe Mengen an Nucleinsäuren werden dann mit hoher Effizienz co-präzipitiert.

Weil die Anforderungen recht simpel sind, ist die Palette an Substanzen, die in Frage kommen, entsprechend groß. Der einfachste Carrier ist **tRNA**, durch die man die Nucleinsäurekonzentration im Ansatz erhöhen kann, z. B. auf 100 ng/μl – sofern eine die Anwesenheit von RNA in der Lösung später nicht stört. Eine verbreitete Alternative ist **Glykogen**, das gibt's z. B. bei Roche oder Sigma und funktioniert genauso. Ungewöhnlicher ist die Verwendung von **linearem Polyacrylamid** (Gaillard und Strauss 1989), das man leicht mit »Bordmitteln« herstellen kann, weil die notwendigen Substanzen die gleichen sind wie für die Herstellung von Polyacrylamid-Gelen (man lässt nur das Bis-Acrylamid weg, damit keine Quervernetzung stattfindet). Interessant am Polyacrylamid ist, dass kleine DNA-Fragmente (< 20 bp) mit diesem Carrier nur schlecht gefällt werden; so lassen sich beispielsweise bei Markierungsreaktionen die Sonde von den markierten Nucleotiden trennen.

Kleine Pellets sind meist schlecht sichtbar und erst ab Mengen von 2 μg überhaupt mit bloßem Auge zu erkennen. Da hilft ein anderer Carrier von Novagen (Pellet Paint™ Co-Precipitant), dessen Besonderheit darin liegt, dass er mit einem Farbstoff gekoppelt ist und daher **das Pellet deutlich färbt**. Für manch einen könnte das Produkt daher auch

für normale DNA-Fällungen interessant sein. Doch ein wenig Vorsicht ist angebracht: Die ursprüngliche Version enthält einen Fluoreszenzfarbstoff, der bei Methoden, die mit UV-Licht arbeiten, für hohen Hintergrund bzw. Störsignale sorgt (z. B. bei automatischen Sequenzierern). Für diesen Zweck eignet sich besser die zweite, nicht-fluoreszierende Variante Pellet Paint™ NF. Alternativ kann man die DNA auch mit Dextranblau kopräzipitieren. Dazu verwendet man 5 μl *Blaumarker* (0,5% Dextranblau/0,1 M NaCl/20 mM EDTA/20 mM Tris pH 7,8); allerdings braucht man auch noch einen Carrier (z. B. Heringssperma-DNA) für den Fällungsansatz. Die Fällung und die Löslichkeit lässt sich so gut verfolgen.

Die Temperatur

Wie bereits erwähnt ist bei Nucleinsäure-Konzentrationen ab 250 ng/μl die Fällung ein schneller Prozess. Entgegen einer weit verbreiteten Meinung ist es in solchen Fällen nicht notwendig, bei –20 °C zu fällen, im Gegenteil, die Präzipitation läuft um so schneller und effektiver ab, je höher die Temperatur ist. Es reicht daher vollkommen aus, den Ansatz für 5 min bei Raumtemperatur stehen zu lassen und anschließend zu zentrifugieren. Nur bei Konzentrationen zwischen 1 und 250 ng/μl empfiehlt es sich, die DNA-Salz-Alkohol-Mischung vor der Zentrifugation für 30 min bis 24 h auf –20 °C zu stellen (je niedriger die Konzentration, umso länger), um Ausbeuten von 80–100 % zu erhalten.

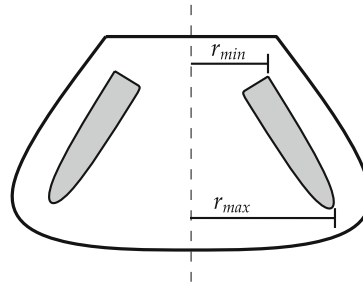
Die Zentrifugation

Es hat sich eingebürgert, die Zentrifugation bei 4 °C durchzuführen, obwohl die Ursprünge dieser Gewohnheit im Dunkeln liegen. Vielleicht soll so bei sehr unsauberen DNA-Präparationen die Nucleaseaktivität reduziert werden – angesichts der meist furchtbar übertriebenen Zentrifugationszeiten von 30 min und mehr könnte das sogar Sinn machen. Tatsache ist, dass die Zentrifugation genauso gut bei Raumtemperatur durchgeführt werden kann, die Anschaffung einer teuren Kühltzentrifuge kann man sich daher sparen.

Kleine Volumina (bis 1,5 ml) werden für 5–15 min in einer Tischzentrifuge bei 12.000×g zentrifugiert. Bei höheren DNA-Konzentrationen (ab

$$rpm = \sqrt{\frac{RCF}{11,17 \times r}} \times 1000$$

$$RCF = 11,17 \times r \times \left(\frac{rpm}{1000}\right)^2$$



■ **Abb. 2.7** Zusammenhang zwischen Umdrehungszahl und Zentrifugalkraft. *rpm* = Umdrehungen pro Minute (*rounds per minute*), *RCF* = relative Zentrifugalkraft (*relative centrifugal force*) in Erdbeschleunigung (*g*), *r* = Radius in cm. Der Radius variiert je nach der Position eines Partikels im Tube, meist orientiert man sich daher am maximalen Radius r_{max} , den man in den Rotorhandbüchern findet

250 ng/μl), wie man sie beispielsweise bei Plasmid-Maxipräparationen erwartet, fällt die DNA spontan aus und aggregiert häufig zu Wolken. In diesem Fall ist eine Zentrifugation bei 3000–5000×*g*, wie sie eine mittelgroße Zentrifuge erreicht, schon ausreichend. Bei niedrigen DNA-Konzentrationen (10–250 ng/μl) dagegen ist es besser, die Zeit und die Geschwindigkeit zu erhöhen, beispielsweise auf 30 min Zentrifugation bei 10.000×*g*. Hat man es mit sehr niedrigen Konzentrationen zu tun, hilft häufig nur Beten, oder aber man besitzt eine Ultrazentrifuge und folgt dem Protokoll von Shapiro (1981), der bei Konzentrationen bis zu 10 pg DNA/μl nach 24 h Fällung auf –20 °C durch Ultrazentrifugation im Bereich von 100.000×*g* Ausbeuten von 80 % erzielte (■ Abb. 2.7).

2.4.2 Konzentratoren

Konzentratoren werden vor allem in der Proteinbiochemie genutzt, finden aber auch in der Nucleinsäurewelt zunehmend Verwendung. Klassiker sind die Produkte der Firma Amicon (jetzt Millipore), doch bieten auch andere Firmen (z. B. Pall Filtren) vergleichbare Produkte an.

Es handelt sich dabei um kleine Einheiten mit einem Filter, durch den die zu konzentrierende Lösung mittels Zentrifugation hindurchgepresst wird. Die DNA wird vom Filter zurückgehalten und kann in einem zweiten, sehr kurzen Zentrifugationsschritt zurückgewonnen werden. Die Firmen bieten verschiedene Einheiten mit einem

Fassungsvermögen von 0,5 bis 15 ml Ausgangslösung und Filter mit Ausschlussgrenzen von 1 bis 100 kD an.

Mit Konzentratoren kann man jedoch nicht nur DNA konzentrieren, je nach Ausschlussgröße der Filter (*molecular weight cut-off*) lassen sich damit auch ganz andere Aufgaben erledigen (■ Tab. 2.2). So kann man kleine Moleküle wie Salze oder nicht eingebaute Nucleotide nach einer Markierungsreaktion aus einer Lösung entfernen, weil diese von den Filtern nicht zurückgehalten werden. Man verdünnt dazu seine Lösung so lang mit H₂O oder Puffer, bis die Konzentration der ungeliebten Substanz auf ein akzeptables Niveau gesunken ist, und zentrifugiert anschließend, bis die DNA wieder ausreichend konzentriert ist. Führt man das Spiel mehrmals nacheinander durch, wird man die unerwünschte Substanz nahezu vollständig los. Auch PCR-Ansätze lassen sich so von Primern, Nucleotiden und Polymerase befreien.

Lästig ist dabei, dass sich die Ausschlussgröße der Filter an Proteinen orientiert, die meist kleiner und von anderer Gestalt sind als Nucleinsäuren. Im Zweifelsfall sollte man daher den Hersteller mit der Frage belästigen, welche Filter für welche Fragmentlängen geeignet sind. Glücklicherweise entdecken die Firmen die Molekularbiologen als Zielgruppe und bieten zunehmend maßgeschneiderte Produkte für deren Zwecke an, beispielsweise zur PCR-Reinigung. Man büßt auf diese Weise zwar unter Umständen interessante Informationen zu Ausschlussgröße und Bindungsverhalten der Membranen ein, die man dann mühsam beim

Hersteller erfragen muss, doch erspart es einem das Gefühl, sich auf fremdem Terrain zu bewegen. Ausgangsvolumina zwischen 100 µl und 20 ml. Eignung für DNA muss noch gecheckt werden.

Vorteil Die Verwendung von Konzentratoren ist wenig arbeitsaufwendig und im kleinen Maßstab recht schnell – eine Zentrifugation dauert, je nach Einheit und Filter, 10–60 min. Die Salzkonzentration erhöht sich dabei nicht.

Nachteil Die Konzentratoren eignen sich weniger für Lösungen mit höheren Nucleinsäurekonzentrationen, da die Filterporen sehr schnell verstopfen und dann selbst stundenlanges Zentrifugieren nicht mehr weiterhilft. Außerdem sind sie recht teuer.

Tipp

Die Einheiten können zum Teil mehrfach verwendet werden (beispielsweise Einheiten mit omega-Membranen von Pall Filtron) – sofern der Filter nicht gerissen oder verstopft ist.

2.4.3 SpeedVac

Kleine Volumina können in einer sogenannten *SpeedVac* eingetrocknet werden. Es handelt sich dabei um eine Tischzentrifuge, an die ein Vakuum angelegt werden kann. Das Vakuum führt zu einer Siedepunktniedrigung des Lösungsmittels (meist Wasser oder Ethanol) und damit zu einem raschen Verdampfen der Flüssigkeit. Um zu verhindern, dass austretende Gasblasen die DNA-Lösung in der gesamten Apparatur verteilen, zentrifugiert man gleichzeitig und verhindert so ein Schäumen. Weil der Flüssigkeit durch das Verdampfen Wärme entzogen wird, sollte eine ordentliche *SpeedVac* beheizbar sein, weil einem sonst der Ansatz im Tube gefriert statt einzutrocknen.

Geringe Flüssigkeitsreste können auf diese Weise in sehr kurzer Zeit entfernt werden. Je größer allerdings die Flüssigkeitsmenge ist, desto mehr Zeit benötigt man, so dass man das Verfahren nur bei kleineren Volumina (< 500 µl, besser noch < 50 µl) anwenden sollte.

Man verwendet die *SpeedVac* gerne nach Fällungen, um Ethanolreste aus dem Pellet zu entfernen. Allerdings ist dabei etwas Vorsicht geboten, weil vor allem größere Pellets leicht *überetrocknet* werden können und sich anschließend nur noch schwer lösen.

Nachteil Da nur das Lösungsmittel verdampft, kommt es zu einer Anreicherung an Salzen in der Lösung, die unter Umständen bei der weiteren Bearbeitung stören können.

2.4.4 »Aussalzen«

Das Fällern mit Hilfe hoher Salzkonzentrationen (*Aussalzen*) wird für RNA verwendet. Hochmolekulare RNA (mRNA, rRNA) ist, im Gegensatz zu kleinen RNAs (tRNA, 5S RNA), in Lösungen von hoher Ionenstärke nicht löslich und kann deshalb durch Zugabe von **Lithiumchlorid** spezifisch gefällt und so von kleinerer RNA oder von DNA getrennt werden.

Plasmid-DNA Minipräparationen können von RNA gereinigt werden, indem man zu 100 µl DNA-Lösung 300 µl eiskaltes 4 M LiCl zugibt, das Gemisch für 30 min auf Eis stellt und anschließend für 10 min bei 12.000×g zentrifugiert. Aus dem Überstand wird dann durch Zugabe von 600 µl Iso-propanol die DNA gefällt und das Pellet mit 70 % Ethanol gewaschen.

2.5 Konzentrationsbestimmung von Nucleinsäurelösungen

Die letzte im Bunde der Techniken, um die keiner herumkommt, ist die Konzentrationsbestimmung. Auch hier hat man die Qual der Wahl.

2.5.1 OD-Messung mittels Absorptionsspektrometrie

Die Konzentrationsbestimmung über die Messung der **optischen Dichte** (OD) bei einer Wellenlänge von 260 nm ist schnell und einfach und daher

■ **Tabelle 2.2** Ausschlussgröße von Amicon-Konzentratoren. Die Ausschlussgröße (MWCO, *molecular weight cut-off* oder NMWL, *nominal molecular weight limit*) der Filtermembranen gibt die Proteinmasse (in kDa) an, bei der 80–90 % der Proteine zurückgehalten werden. Die Tabelle erlaubt eine Umrechnung in Nucleotide (nach Amicon)

Microcon	Ausschlussgröße	ssDNA (in nt)	dsDNA (in bp)
3	3 kDa	10	10
10	10 kDa	30	20
30	30 kDa	60	50
50	50 kDa	125	100
100	100 kDa	300	125

sehr beliebt. Man braucht dazu eine Quarzküvette, ein Photometer mit UV-Lampe und los geht's. Die Nucleinsäurekonzentration errechnet sich aus der OD bei 260 nm, der Verdünnung und einem für DNA, RNA bzw. Oligonucleotide spezifischen Multiplikationsfaktor (■ Abb. 2.8). Aus dem Verhältnis der OD_{260 nm} und der OD_{280 nm} erhält man außerdem eine Aussage über Proteinkontaminationen in der Lösung.

Das Problem ist, dass man recht große Mengen an DNA bzw. RNA zur Verfügung haben muss, da das Photometer nur in einem Bereich zwischen 0,1 und 1 OD wirklich zuverlässig misst, das entspricht einer Nucleinsäuremenge von 5–50 µg je ml. Zwar kann man mit Halbmikro- und Ultramikroküvetten das Messvolumen verringern und damit die benötigte DNA- bzw. RNA-Menge im allerbesten Fall auf bis zu 100 ng reduzieren, doch stößt man hier an die Grenzen des Messbaren – sei es, weil das Photometer nicht mitspielt, sei es, weil der Messfehler zu groß wird, oder aber es fehlt das nötige Kleingeld für diese recht teuren und selten benutzten Küvetten. Ganz zu schweigen davon, dass die Küvetten mit dem kleinsten Messvolumen furchtbar schlecht zu handhaben sind.^{22,23}

Außerdem macht die OD-Messung nur Sinn, wenn man sich sicher ist, nur DNA bzw. RNA in der Präparation zu haben. Da die beiden Nucleinsäuretypen nicht voneinander unterschieden werden können, ist es nutzlos, in einer kruden Plasmid-DNA-Präparation die DNA-Konzentration photometrisch bestimmen zu wollen, da der RNA-Anteil etwa 90 % beträgt.

Ein weiteres Problem an der OD-Messung ist, dass daran etwas nicht stimmt. Zwar sind sich alle Methodenbücher darin einig, dass man die Konzentration aus der OD₂₆₀ errechnet und die Reinheit der Präparation anhand des Verhältnisses OD₂₆₀/OD₂₈₀ überprüft – eine proteinfreie Nucleinsäurelösung weist demnach ein Verhältnis von 1,8–2,0 auf – doch zeigt die Erfahrung, dass mitunter selbst hochreine Präparationen nicht über ein Verhältnis von 1,5 kommen. Eine interessante Publikation (Wilfinger et al. 1997) könnte der Schlüssel zu diesem Problem sein. Dort wird gezeigt, dass, abhängig von pH und Salzgehalt des bei den Messungen verwendeten Wassers, ein und diesel-

ist mit den Photometern, die üblicherweise im Labor herumstehen, aber einen etwas anderen Aufbau besitzt als normale Küvetten. Der Lichtstrahl passiert hier nicht direkt die Kammer mit der Flüssigkeit, sondern wird durch ein System von Spiegeln und Lichtleitern in den Deckel geleitet, in dem die Probe sitzt. Weil die Schichtdicke der Messkammer auf 1 mm bzw. 0,2 mm reduziert wurde, kommt man mit 3–5 µl bzw. 0,7–4 µl Probe je Messung aus, die man (laut Hersteller) im Bedarfsfall auch wiedergewinnen kann. Schönes Detail: Weil nur der Deckel mit Probe beladen wird, bleibt die Küvette während der ganzen Messreihe im Gerät.

-
- 22 Eine Alternative zum klassischen UV-Photometer ist ein **NanoDrop**-Spektrophotometer (Thermo Scientific), das für die Messung nur 1 µl Lösung benötigt und im Bereich zwischen 2 und 3700 ng/µl misst. Das Gerät kann auch für Proteinbestimmungen eingesetzt werden.
- 23 Seit ca. 2008 existiert eine weitere interessante Alternative, die TrayCell von Hellma. Es handelt sich dabei um eine *Faseroptische Ultra-Mikro-Messzelle*, die kompatibel

Konzentration:

$$c \left[\frac{\mu\text{g}}{\text{ml}} \right] = OD_{260} \times V \times F \left[\frac{\mu\text{g}}{\text{ml}} \right]$$

Molarität für dsDNA:

$$c \left[\frac{\mu\text{mol}}{\text{ml}} \right] = \frac{OD_{260} \times V \times F}{M_W \times L} \left[\frac{\mu\text{mol}}{\text{ml}} \right] = \frac{OD_{260} \times V}{13,2 \times L} \left[\frac{\mu\text{mol}}{\text{ml}} \right]$$

und für Oligonucleotide:

$$c \left[\frac{\mu\text{mol}}{\text{ml}} \right] = \frac{OD_{260} \times V \times F}{M_W \times L} \left[\frac{\mu\text{mol}}{\text{ml}} \right] = \frac{OD_{260} \times V}{16,5 \times L} \left[\frac{\mu\text{mol}}{\text{ml}} \right]$$

Abb. 2.8 Bestimmung der Konzentration und der Molarität von Nucleinsäurelösungen. dsDNA = doppelsträngige DNA, ssDNA = einzelsträngige DNA, c = Konzentration der Ausgangslösung, F = Multiplikationsfaktor (50 für dsDNA, 40 für RNA, 33 für ssDNA, 20 für Oligonucleotide), L = Länge in bp, M_W = Molekulargewicht je Base (330 g/mol) bzw. Basenpaar (660 g/mol), V = Verdünnungsfaktor.

Rechenbeispiel: Sie besitzen 30 μl einer DNA-Lösung (Plasmid von 4,3 kb Länge), deren Konzentration bestimmt werden soll. 1 μl wird 1 : 200 verdünnt und gemessen; die Absorption beträgt 0,43 OD. Die Konzentration der Ausgangslösung beträgt folglich $c = 0,43 \times 200 \times 50 \mu\text{g/ml} = 4,3 \mu\text{g}/\mu\text{l}$, die Molarität $c = 0,43 \times 200 / (13,2 \times 4,3) \mu\text{mol/ml} = 1,5 \text{ nmol/ml}$. (Tipp: Wenn Sie die Länge statt in bp in kb einsetzen, erhalten Sie für die dritte Formel das Ergebnis in pmol/ μl , was für die tägliche Arbeit praktischer ist.) Alternativ können Sie das Berechnen auch dem Internet überlassen. Eine entsprechende Seite finden Sie z. B. unter <http://www.promega.com/biomath/>

be Nucleinsäurepräparation $OD_{260/280}$ -Verhältnisse von 1,5 bis 2,2 und eine errechnete Konzentration von 0,55 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ bis 0,7 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ aufweisen kann – ein Unterschied von immerhin gut 25 %. Auch der Nachweis von Proteinkontaminationen anhand des OD-Verhältnisses kann völlig unterschiedlich ausfallen, von deutlich messbar bis nicht nachweisbar. Die Autoren empfehlen, für reproduzierbarere Ergebnisse die $OD_{260/280}$ -Messungen in einem 1–3 mM Na_2HPO_4 -Puffer pH 8,5 durchzuführen.

Tipp

Alle Nucleinsäuren absorbieren bei 260 nm Wellenlänge, von der ausgewachsenen DNA über Oligonucleotide bis hin zu den monomeren Nucleotiden. Es wird daher von wenig Erfolg gekrönt sein, Mischlösungen wie z. B. einen PCR-Ansatz messen zu wollen, um so zu ermitteln, wie viel DNA während der Amplifikation synthetisiert wurde.

Dessen Nachweisgrenze liegt bei etwa 5 ng DNA pro Bande. Trägt man ein Aliquot seiner Lösung gemeinsam mit einer Verdünnungsreihe von DNA bekannter Konzentration auf das Gel, kann man anschließend durch Vergleich der Bandenintensitäten die DNA-Konzentration abschätzen (Abb. 2.9). Eine alltägliche Variante der Verdünnungsreihe ist der DNA-Größenmarker, den man mit aufs Agarosegel aufträgt. Da man (normalerweise) die Fragmentlängen und die aufgetragene Menge kennt, kann man dessen Banden auch als Mengenmarker verwenden.

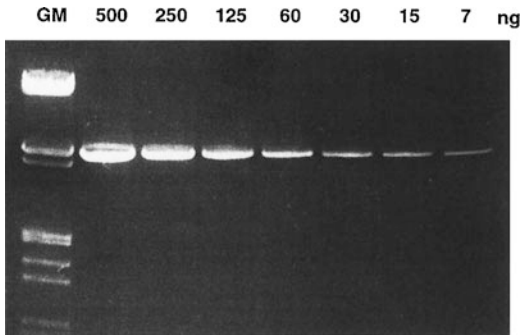
Der Aufwand ist bei dieser Methode deutlich größer als bei der photometrischen Bestimmung und das Ergebnis mit einiger Unsicherheit behaftet. Trotzdem ist es bei kleinen DNA-Mengen häufig die einzige Möglichkeit, eine Idee von den Größenordnungen zu bekommen, in denen man sich bewegt, ohne die gesamte DNA für die Messung opfern zu müssen. Auch bei größeren DNA-Mengen kann es nützlich sein, nach der Konzentrationsbestimmung mittels Photometer die tatsächlichen Mengen über ein Agarosegel zu überprüfen.

2.5.2 Konzentrationsbestimmung mittels Agarosegel

Eine Möglichkeit, geringe Mengen an Nucleinsäuren zu quantifizieren, eröffnet das Agarosegel.

2.5.3 Dot-Quantifizierung

Sozusagen eine abgekürzte Version der Konzentrationsbestimmung mittels Agarosegel. Auch hierzu



■ **Abb. 2.9** Konzentrationsbestimmung mittels Agarosegel. Die Quantifizierung mittels Agarosegel ist (vor allem mit Bildern von CCD-Kameras) nicht sonderlich exakt, man überschätzt sich leicht um Faktor 2. Besser bestimmt man die Konzentration, sofern möglich, mit dem Photometer und überprüft den Wert anschließend mit Hilfe eines Agarosegels, um sich vor bösen Überraschungen zu schützen, die einem auch bei photometrischen Bestimmungen drohen. GM = Größenmarker

benötigt man eine Reihe von DNA-Lösungen verschiedener Konzentrationen, z. B. 0–20 µg/ml. Je 4 µl DNA-Lösung und 4 µl Ethidiumbromidlösung (1 µg/ml) werden gemischt, das Gleiche macht man mit 4 µl der DNA-Lösung, deren Konzentration man bestimmen möchte. Anschließend legt man eine Plastikfolie auf den UV-Lichtkasten und pipettiert die Lösungen Tröpfchen für Tröpfchen nebeneinander. Das Kunstwerk wird fotografiert und die Konzentration durch Vergleich mit den Standards geschätzt.

Nachteil Eine sehr ungenaue Methode.

2.5.4 Fluorometrische Bestimmung

Eine weniger bekannte Alternative ist die Konzentrationsbestimmung mit Hilfe von Fluoreszenzfarbstoffen, die Licht einer bestimmten Wellenlänge aufnehmen und als Licht einer anderen Wellenlänge wieder abgeben können. Sie ist einfach und wesentlich sensitiver als spektrophotometrische Bestimmungen. Die DNA wird dazu mit **Hoechst 33258** (z. B. von Sigma), einem DNA-spezifischen Fluoreszenzfarbstoff, der nur geringe Affinität zu RNA und Proteinen besitzt, gemischt und in einem

Fluorometer gemessen. Die Anregung erfolgt bei 365 nm Wellenlänge, gemessen wird bei 460 nm. Ein speziell für diesen Zweck ausgelegtes Gerät findet man bei Hoefer. Der Preis liegt mit ca. 2400 € in der Größenordnung eines Photometers. Dazu kommt ein Satz spezieller Fluorometerküvetten, die vier klare Seiten besitzen müssen. Für die Messung von DNA-Lösungen mit Konzentrationen zwischen 5 und 500 ng/ml reicht eine Farbstoffkonzentration von 0,1 µg/ml aus, mit 1 µg/ml kann man sogar Konzentrationen bis 15 µg/ml bestimmen, doch leidet bei der höheren Farbstoffkonzentration die Sensitivität im Bereich geringer DNA-Konzentrationen. Mit einem speziellen Adapter kann man bereits 1 ng DNA in 3 µl Volumen nachweisen. Allerdings hat der Farbstoff eine höhere Affinität zu AT-reichen Sequenzen als zu GC-reichen. Eine Beschreibung der Methode findet sich bei Labarca und Paigen (1980).

Eine Hoechst 33258-Vorratslösung (1 mg/ml (w/v) in H₂O) ist bei 4 °C ca. sechs Monate haltbar. Für die Gebrauchslösung wird die Vorratslösung 1:1000 oder 1:10.000 mit TNE-Puffer (10 mM Tris HCl pH 7,4/200 mM NaCl/1 mM EDTA) verdünnt.

Le Pecq (1971) beschreibt, dass auch Ethidiumbromid als Fluoreszenzfarbstoff verwendet werden kann, doch ist die Empfindlichkeit um den Faktor 20 geringer als bei Hoechst 33258.

Natürlich gibt es Ähnliches auch als Kit zu kaufen, z. B. bei Molecular Probes (Quant-iT™). Gemessen wird hier in der Mikrotiterplatte (Anregungsmaximum bei 510 nm, Emissionsmaximum bei 527 nm). Über den verwendeten Farbstoff schweigt sich Molecular Probes natürlich aus. Auch für die Messung von RNA existiert eine Kit-Variante.

2.5.5 Nucleinsäure-Messstäbchen

Invitrogen bietet ein DNA DipStick™ Kit an, mit dem die Konzentration von DNA-, RNA- und Oligonucleotid-Lösungen anhand von 1 µl Lösung bestimmt werden kann. Die Nucleinsäurelösung wird dazu auf einen Teststreifen pipettiert, der Streifen mit den im Kit enthaltenen Lösungen angefärbt und die Intensität des entstandenen

Farbflecks anschließend mit einem Standard verglichen. Größter Vorteil der Methode ist, dass sie mit 1 µl Lösung auskommt und trotzdem recht schnell ist. Die Sensitivität ist mit einer Untergrenze von 100 ng/ml allerdings nur mittelmäßig, und die Quantifizierung ist etwas subjektiv, aber ausreichend gut, um sicherzustellen, dass man sich mit seiner Konzentration in der richtigen Größenordnung befindet.

Sollten die Teststreifen vor den Lösungen ausgehen, kann man stattdessen auch Nitrocellulose-Streifen verwenden.

2.5.6 Enzymatischer Nachweis

Eine weitere Methode, mit der sich kleine bis kleinste Mengen an DNA quantifizieren lassen, wird von Promega angeboten (DNAQuant™ DNA quantitation system). Der Nachweis läuft über eine klassische gekoppelte enzymatische Reaktion, wie man sie aus den Biochemie-Praktika kennt, und wie so häufig in der Biochemie läuft die Reaktion scheinbar »verkehrt herum«: In einem ersten Schritt wird die DNA in Gegenwart von T4-DNA-Polymerase und Pyrophosphat abgebaut (Pyrophosphorylierung), die entstandenen dNTPs in einem zweiten Schritt mit Nucleosiddiphosphatkinase und ADP in ATP und dNDPs umgesetzt (Transphosphorylierung) und das entstandene ATP in einer dritten Reaktion mit Hilfe von Luciferase und einem luminogenen Substrat in Licht umgesetzt, das man mit einem handelsüblichen Luminometer misst. Da die Lichtproduktion proportional zur umgesetzten DNA-Menge ist, lässt sich mit einem DNA-Mengenstandard leicht die eingesetzte DNA-Menge ermitteln. Auf diese Weise lassen sich DNA-Mengen zwischen 20 pg und 1 ng bzw. DNA-Konzentrationen von 10 bis 500 pg/µl messen. Um zuverlässige Ergebnisse zu erhalten, darf die DNA nicht über 6000 bp lang sein und muss freie Enden besitzen, damit die Polymerase Zugang zur DNA erhält. Plasmide und chromosomale DNA müssen daher zuvor durch Restriktionsverdau linearisiert bzw. verkürzt werden. Aufgrund der Spezifität der T4-DNA-Polymerase ist einzelsträngige DNA mit dieser Methode nicht messbar (es

sei denn, es kommt zur Dimer- oder Haarnadelbildung), genauso wenig wie RNA.

Die Methode eignet sich überall dort, wo die Notwendigkeit einer präzisen Quantifizierung kleiner DNA-Mengen den im Vergleich zu anderen Nachweismethoden hohen Arbeitsaufwand rechtfertigt. Das Prinzip lässt sich übrigens auch für den **Nachweis von Mutationen oder Genen** verwenden. Promega vertreibt ein Kit (READIT™) zum Nachweis von SNPs (*single nucleotide polymorphisms*) und anderen Mutationen, das auf der Hybridisierung eines Oligonucleotids mit der gesuchten Sequenz beruht. Nur wenn das 3'-Ende des Oligos vollständig mit der Template-DNA hybridisiert, kann DNA abgebaut und Licht produziert werden. Auch **Hybridisierungen** zum Nachweis definierter DNA-Sequenzen lassen sich durch diese Methode ersetzen.

Literatur

- Birnboim HC, Doly J (1979) A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucl. Acids Res.* 7, 1513–1523
- Cantor CR, Warshaw MM, Schapiro H (1970) Oligonucleotide Interactions. III. Circular Dichroism Studies of the Conformation of Deoxyoligonucleotides. *Biopolymers* 9, 1059–1077
- Gaillard C, Strauss F (1989) Ethanol precipitation of DNA with linear polyacrylamide as carrier. *Nucl. Acids Res.* 18, 378
- Good L, Nazar RN (1997) Plasmid mini-preparations from culture streaks. *BioTechniques* 22, 404–406
- Hartley JL, Bowen H (1996) PEG precipitation for selective removal of small DNA fragments. *Focus J.* 18, 27
- Labarca C, Paigen K (1980) A simple, rapid, and sensitive DNA assay procedure. *Anal. Biochem.* 102, 344–352
- Le Pecq JB (1971) Use of ethidium bromide for separation and determination of nucleic acids of various conformational forms and measurement of their associated enzymes. In Glick D (Hrsg.): *Methods of Biochemical Analysis*, Vol. 20, S. 41–86, Wiley
- Li W-H et al. (2001) Evolutionary analysis of the human genome. *Nature* 409, 847–849
- Maher B (2012) ENCODE: The human encyclopaedia. *Nature* 489, 46–48. doi:10.1038/489046a
- Manfioletti G, Schneider C (1988) A new and fast method for preparing high quality lambda DNA suitable for sequencing. *Nucl. Acids Res.* 16, 2873–2884
- Paul B et al. (2008) A non-alkaline method for isolating sequencing-ready plasmids. *Analytical Biochemistry* 377, 218–222
- Reddy PS et al. (2008) A high-throughput, low-cost method for the preparation of »sequencing-ready« phage DNA template. *Analyt. Biochem.* 376, 258–261

- Santos MA (1991) An improved method for the small scale preparation of bacteriophage DNA based on phage precipitation by zinc chloride. *Nucl. Acids Res.* 19, 5442
- Shapiro, DJ (1981) Quantitative ethanol precipitation of nanogram quantities of DNA and RNA. *Anal. Biochem.* 110, 229–231
- Werle E et al. (1994) Convenient single-step, one tube purification of PCR products for direct sequencing. *Nucl. Acids Res.* 22, 4354–4355
- Wilfinger WW, Mackey K, Chomczynski P (1997) Effect of pH and ionic strength on the spectrophotometric assessment of nucleic acid purity. *BioTechniques* 22, 474–481

Der Experimentator Molekularbiologie / Genomics

Mülhardt, C.

2013, XII, 303 S. 65 Abb., Softcover

ISBN: 978-3-642-34635-4