

## Methoden

### Isolierung von Nukleinsäuren

#### Protokoll zur Isolierung von genomischer DNA aus Bakterien

Das Protokoll von Macherey&Nagel stellt eine einfache, sichere und zuverlässige Methode für die Isolation von reiner hochmolekularer genomischer DNA direkt aus Übernachtskulturen oder auch anderen Proben dar. Diese simple Aufreinigung beruht auf einem patentierten Harz, welches hoch spezifisch DNA bindet und erst nach Waschschrritten durch eine Salzkonzentration innerhalb der Puffer wieder abgibt. Der Umgang mit toxischen Stoffen wie Chloroform und Phenol entfällt.

Die benötigten Puffer wurden nach Herstellerangaben vor der Anwendung angesetzt:

Puffer B3:

B2 Puffer 5min bei 70°C vorheizen

ein Volumen B2 Puffer in 4 Volumen B1 Puffer, es ist auch möglich, Puffer B1<sup>3</sup> und B2 komplett zu mischen, wenn der Puffer B3<sup>4</sup> in den nächsten 3 Monaten verbraucht wird

160 µl B1 und 40 µl B2 Puffer und durch Auf- und Abpipettieren mischen

Puffer B5:

B5 Puffer mit 96 %igem Ethanol wie angegeben mischen

49 ml 96 %iges Ethanol

Das Probenmaterial (1 ml einer Übernachtskultur) abzentrifugieren (7500 rpm, 10 min) und in 180 µl T1 Puffer gründlich resuspendieren. 25 µl der Proteinase K Stammlösung werden zugegeben, sofort gemischt und 20 bis 30 min bei 56 °C in einem Schüttelwasserbad inkubiert, wobei alle 5min gründlich gemischt werden sollte (Vortex). Im Anschluß an diese Inkubation werden 200 µl des Puffers B3 zu jedem Ansatz zugegeben und für 10 min bei 70 °C inkubiert. Hiernach werden 210 µl des Ethanols zugegeben und gleichfalls gut gemischt. Nun wird das NucleoSpin-Filter-Tube in ein 2 ml Zentrifugengefäß eingesetzt und die Probe in das obere Reservoir pipettiert. Es folgt ein erster Zentrifugationsschritt für 60 sec bei 6000 xg in einer Standard-Tischzentrifuge (Eppendorf 3210). Der Durchlauf wird verworfen und das Filter-Tube in das bereits benutzte Auffanggefäß erneut eingesetzt. 500 µl B5 Waschpuffer wird in das obere Reservoir pipettiert und wie oben zentrifugiert. Dieser Schritt wird wiederholt, und für die vollständige Entfernung des Puffers erfolgt nochmals für 2min ein Zentrifugationsschritt ohne Puffer. Das Auffanggefäß wird verworfen und das Filter-Tube in ein sauberes 1,5ml Reaktionsgefäß eingesetzt. Zur Elution der Nukleinsäure wird ein

<sup>3</sup> Enthält Guanidin-Hydrochlorid, Handschuhe tragen, es ist giftig!

auf 70 °C vorgewärmter Elutionspuffer verwendet. Die Elutionseffizienz wird durch 1minütiges Inkubieren bei 60 bis 70°C und Erhöhung des Elutionsvolumens verbessert. Der Elutionspuffer wird in das Filter-Tube geben und ca. 1min bei 6000 xg bei Raumtemperatur zentrifugiert. Die Probe kann sofort eingesetzt werden. 70 µl Elutionspuffer Tris-HCl, pH 8,0, 5 mM (Erhöhung der Effizienz durch Inkubation der Probe in der Schleudersäule).

### **Protokoll zur Isolierung von PCR-Produkten aus dem Amplifikationsansatz**

Hierfür wurde das *High Pure PCR Product Purification Kit* verwendet, da hier die höchsten Ausbeuten erreicht wurden bei gleichzeitig einfacher und schneller Handhabung. Diese Methode beruht darauf, dass Nukleinsäuren in der Gegenwart eines chaotropen Salzes an Glasfaser- oder Silica-Oberflächen innerhalb weniger Sekunden binden. Diese Bindungsreaktion entsteht aufgrund der Zerstörung der geordneten Struktur der Wassermoleküle und ihrer Wechselwirkung mit den gelösten Nukleinsäuren. Die Absorption an das Glasfaservlies wird gefördert und ist derart spezifisch, dass nur Nukleinsäuren spezifisch gebunden werden und die DNA nach der Durchführung eines einfachen Waschvorganges frei von Verunreinigungen (z.B. Primer, freie Nukleotide, Salze und Polymerase) isoliert werden kann. Die DNA-Probe wird in einer "Niedrigsalz"-Lösung oder Wasser eluiert. In dieser Arbeit wurde als Elutionspuffer Tris-HCl (5 mM, pH 8,0) verwendet, da damit weitere enzymatische Reaktionen – wie bei der Verwendung von EDTA-haltigen Puffersystemen – nicht beeinflusst werden.

---

<sup>4</sup> Bei Raumtemperatur aufbewahren

Für einen 100 µl Reaktionsansatz werden 500 µl Bindungspuffer in einem 1,5 ml Reagiergefäß vorgelegt und mit dem Amplifikationsansatz gründlich gemischt. Dieser Ansatz wird in das obere Reservoir der Tube-Auffangkonstruktion pipettiert und für 30 sec bei Maximum Speed in einer Standardtischzentrifuge (13.000 xg) zentrifugiert. Der Durchlauf wird anschließend verworfen. Es folgen zwei Waschschrte mit abnehmendem Volumen (erstens 500 µl, zweitens 200 µl) bei maximaler Geschwindigkeit für 30 Sekunden. Ein anschließender Zentrifugationsschritt entfernt dann noch mögliche Waschpufferreste. Das Auffanggefäß wird verworfen und die Schleudersäule in ein 1,5 ml Reagiergefäß für den Elutionsschritt eingesetzt. Der 70 µl Elutionspuffer (5 mM Tris-HCl, pH 8,0) wurde hier auf das Glasfaservlies aufpipettiert und für annähernd 10min inkubiert; anschließend dann für 30 sec bei 13.000 xg zentrifugiert.