

Stephanie [REDACTED]  
BTA-OH  
Gruppe A, Arbeitsplatz 7  
Partner: Martin [REDACTED]

Protokoll  
über die Versuche vom  
06.09. und 04.10.02

## **„DNA-Aufbereitung“**

(am Beispiel der Zwiebel-DNA)

**Molekularbiologisches Praktikum**  
Berufskolleg Kartäuserwall  
Kartäuserwall 30, Köln

Fr. Dr. Urmoneit

## Isolation, Aufbereitung und Konzentrationsbestimmung von gen. DNA gewonnen aus der Zwiebel

### Einleitung / Theorie

In der folgenden Versuchsreihe wollen wir Desoxyribonukleinsäure (DNA) aus Zwiebelzellen extrahieren und diese dann aufbereiten = reinigen, fällen und ihre Konzentration bestimmen. Wir verwenden hierfür die Zwiebel-DNA, das ihr Genom sehr groß und noch mit bloßem Auge gut sichtbar ist. Andere DNA ist mit dem Auge nicht mehr sichtbar und man arbeitet quasi blind.

Die DNA der Zwiebelzellen befindet sich in den Nucleoli. Um an sie heranzukommen und möglichst reine DNA zu extrahieren muss man einige Barrieren überwinden: **Zellwand, Zellmembran, Kernhülle**. Dies geschieht in unserem Versuch mit herkömmlichen Haushaltsmitteln. Im Routinelabor werden natürlich spezielle Lösungen verwendet, die im Prinzip aber dieselben Inhaltsstoffe enthalten. Die Mittel werden zu folgendem Zwecke eingesetzt:

Spülmittel	chemisches Aufbrechen der Membranen = Lipidschichten
Kochsalz	erhöht die Löslichkeit von DNA
Mörser	mechanisches Aufbrechen der Zellwand
Hitze	inaktiviert DNAsen und beschleunigt das Aufbrechen
Waschmittel	enthält Proteasen, die unnütze Proteine auflösen
kaltet EtOH	fällt die in Alkohol unlösliche DNA aus

DNA lässt sich bei  $-20^{\circ}\text{C}$  im Eisfach lagern.

Die gewonnene DNA ist aber jetzt noch verschmutzt, z.B. durch Proteine bzw. Restriktionsenzyme. Sie muss nun gereinigt werden. Zur Reinigung verwendet man ein Gemisch aus **Phenol, Chloroform und Isoalkylalkohol**. Gibt man die DNA-Probe auf die Lösung, durchmischt manuell und zentrifugiert dann, so bilden sich drei Phasen aus. Die untere Phase ist die **Phenolphase**. Die mittlere Phase ist die **Interphase**. Durch organische Lösungsmittel wurden die noch vorhandenen Proteine ausgefällt und sind beim Zentrifugieren in diese Phase abgesunken. Oben befindet sich die **wässrige Phase**. In ihr sind die Nukleinsäuren gelöst. Jetzt liegt die DNA also in der wässrigen Phase vor, ist aber noch immer nicht rein. Bestandteile der Reinigungslösung können sich noch in der DNA-Lösung befinden. Das ist besonders bei **Phenolresten** problematisch, da diese bei photometrischen Untersuchungen ein ähnliches Absorptionsmaximum haben wie DNA. Man könnte daher annehmen, man hat reichlich DNA extrahiert – in Wirklichkeit befindet sich aber nur Phenol in der Lösung!

Die DNA-Probe muss nun **gefällt bzw. präzipitiert** werden. Fällung bedeutet, dass man die DNA agglomeriert und sie so konzentriert abnehmen kann. Diese Ansammlung erreicht man dadurch, dass man das aus **negativen Phosphaten** bestehende Rückrad der DNA mit **positiv geladenen Salzionen (Na-Acetat)** sättigt. Dadurch wird der DNA die Hydrathülle entzogen. Das Salz hat eine stärkere Affinität zum Phosphat als das Wasser. Ohne die **Hydrathülle** gehen die DNA-Stücke untereinander Wechselwirkungen ein und lagern sich dichter aneinander. So kommt es zur **Agglomeration**, die DNA wird aus der Salzlösung verdrängt. Da sie in Alkoholen **nicht löslich** ist, vermischt sie sich nicht mit dem **überschichteten Alkohol** (z.B. Ethanol oder 2-Butanol), sondern liegt als Agglomerat im Alkohol vor. Jetzt kann man die DNA abpipettieren und hat erreicht, dass man viel DNA in wenig Lösung vorliegen hat. Man hat die DNA konzentriert.

Um nun zu messen, wie viel DNA in unserer Probe enthalten ist, bestimmen wir die **optische Dichte (OD)** unserer Probe. Anhand dieser Größe können wir die **Konzentration** bestimmen, da folgendes gilt:

1 optische Dichte = 50 µg/ml doppelsträngige DNA  
40 µg/ml einzelsträngige DNA bzw. RNA  
30 µg/ml Oligonucleotide (Primer etc.)

Um die OD zu messen, müssen wir zunächst ein Absorptionsspektrum unserer DNA-Proben erstellen und aus diesem das **Absorptionsmaximum** der DNA bestimmen. In der Literatur wird dieses mit **260 nm** angegeben. Um die Reinheit der Probe zu bestimmen, berechnet man dann noch den **Reinheitsfaktor  $R_F$** . Hierzu misst man die Probe noch bei **280 nm**. Bei diesem Wert haben die meisten Proteine ihr Absorptionsmaximum. Je größer dieser Wert ist, desto mehr Protein-Verunreinigungen enthält die Probe also noch. Der Faktor berechnet sich nun wie folgt:

$$R_F = \frac{E_{(260)}}{E_{(280)}}$$

Befindet dieser Wert **zwischen 1,8 und 2,0**, so liegt die DNA in reiner Form vor. Variiert der Wert, so ist die Probe noch verunreinigt. So kann man die erhaltenen Proben beurteilen.

## Teil 1: DNA-Isolation

### Material

Untersuchungsmaterial: Küchenzwiebel

Geräte: Glasgeräte  
allgm. Laborgeräte  
Wasserbad  
Mörser & Pistill  
Küchenmesser  
Trichter und Kaffeefilter  
Eppendorfpipette  
Eppendorfhütchen  
Zentrifugenröhrchen schmal  
Biofuge 15 von Heraeus

Chemikalien: Trishydroxymehtylaminomethan (TRIS)  $\text{H}_2\text{NC}(\text{CH}_2\text{OH})_3$  von Merck, R36/38, M= 121,14 g/mol  
Titriplex III (EDTA) von Merck, M: 372,24 g/mol  
Natriumchlorid  
Spülmittel  
Waschpulver  
Ethanol ( $\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$ ) 98% von Merck, d: 0,790 g/cm<sup>3</sup>, M: 46,07 g/mol, S 7-16, R 11

## Durchführung

- Herstellung von TE-Puffer = 10mM Tris + 0,1 mM EDTA

$$\begin{aligned} \text{Tris:} & \quad 121,1 \text{ g/mol} * 0,01 \text{ mol/l} * 0,1 \text{ l} = \mathbf{0,1211 \text{ g}} \\ \text{EDTA:} & \quad 372,2 \text{ g/mol} * 0,0001 \text{ mol/l} * 0,1 \text{ l} = \mathbf{0,00372 \text{ g}} \end{aligned}$$

- 0,1211 g Tris und 0,0037g EDTA in einen Messkolben geben und auf 100 ml auffüllen
- pH 8 einstellen
- Ethanol im Eisfach kühlen
- ein Wasserbad auf 60°C erwärmen
- 50 ml Aqua dest., 5 ml Spülmittel und ½ Teelöffel Natriumchlorid (Kochsalz) miteinander mischen
- Zwiebel klein hacken und in die Lösung geben
- 15 min bei 60°C im Wasserbad erwärmen (dadurch wird das Auflösen der Membranen gefördert, zudem werden DNAsen zerstört)
- Schockkühlung mit kaltem oder Eiswasser, damit die DNA nicht kaputtgeht
- im Mörser die Zwiebelmasse zerquetschen (nicht reiben, da die DNA sonst reißen kann!)
- durch einen Kaffeefilter filtern
- ein paar Milliliter in ein Zentrifugenröhrchen geben und mit ein paar Körnern Waschpulver mischen (Farbumschlag abwarten) und vortexen
- durch die im Waschmittel enthaltenen Proteasen werden die noch in der Lösung befindlichen Proteine abgebaut
- mit kaltem 98%igem Ethanol (EtOH) überschichten, etwa im Verhältnis 1:1
- die DNA fällt innerhalb einiger Minuten als weißer Faden aus
- ausgefällte DNA abpipettieren und in Eppendorfhütchen portionieren
- 10 min bei 4000 rpm zentrifugieren
- Überstand (SN) abpipettieren
- Pellet unter dem Abzug trocknen lassen
- DNA in 200 µl TE-Puffer resuspendieren
- bei -20°C lagern

## Auswertung

Die DNA war nach der Fällung gut sichtbar und ließ sich leicht in Eppendorfgläser überführen. Wir haben so 9 Gefäße mit extrahierter DNA erhalten.

## **Teil 2: Aufbereitung der DNA**

### Material

Untersuchungsmaterial: die im Versuch oben extrahierte DNA

Geräte: die oben genannten  
Mikro-Tischzentrifuge SL-BK  
Analysenwaage von Sartorius  
Quarzküvetten 103 UV, 10mm  
Photometer

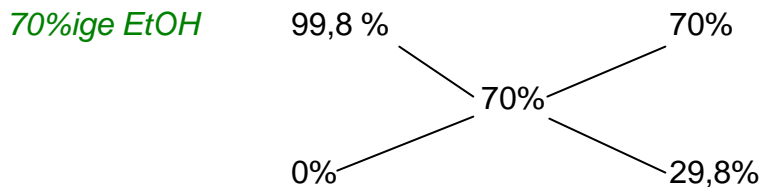
Chemikalien: Natriumacetat  $C_2H_3NaO_2$ , M: 82,03 g/mol  
 Phenol : Chloroform : Isoalkylalkohol / 25 : 24 : 1  
 Ethanol 99,8 %, p.A. von Merck  
 Isopropanol  $C_3H_8O$ , M:60,10g/mol,  $\rho$ :0,786g/cm<sup>3</sup>, R11-67, S7-26  
 di-Natriumhydrogenphosphat,  $Na_2HPO_4$ , p.A., M: 141,46 g/mol

## Durchführung

### 1. Ansetzen der Lösungen

*Na-Acetatlösung*  $c = 3 \text{ mol/L}$   
 $V = 50 \text{ ml} = 0,05 \text{ L}$   
 $M = 82,03 \text{ g/mol}$

$m = c \cdot V \cdot M$   
 $= 3 \text{ mol/L} \cdot 0,05 \text{ L} \cdot 82,03 \text{ g/mol}$   
 $= \mathbf{12,305 \text{ g}}$   $C_2H_3NaO_2$  einwiegen und auf 50 ml auffüllen, pH 5,2 einstellen



Um eine 70%ige EtOH-Lösung herzustellen, stellt man ein Mischungskreuz auf. Daraus kann man ablesen, dass man 70 Teile EtOH benötigt und 29,8 Teile Aqua dest, um 70%ige EtOH-Lösung herzustellen. Wir benötigen aber nicht 100 ml, sondern höchstens die Hälfte. Daher teilen wir die Werte und erstellen unsere Lösung wie folgt:

35 Teile EtOH + 14,9 Teile Aqua dest. = **49,9 ml**

*$Na_2HPO_4$ -Puffer*  $V = 500 \text{ ml} = 0,5 \text{ L}$   
 $c = 2 \text{ mM} = 0,002 \text{ mol/L}$   
 $M = 141,46 \text{ g/mol}$

$m = c \cdot V \cdot M$   
 $= 0,002 \text{ mol/L} \cdot 0,5 \text{ L} \cdot 141,46 \text{ g/mol}$   
 $= \mathbf{0,142 \text{ g}}$  einwiegen und auf 500 ml auffüllen, pH 8,5 einstellen

Für unsere Arbeitsgruppe wurde festgelegt, dass wir unsere Proben in folgender Reihenfolge behandeln:

- ✗ Reinigen
- ✗ Fällen
- ✗ Konzentration bestimmen

In dieser Reihenfolge sind wir nun im Einzelnen so vorgegangen:

## 2. Reinigung

- DNA auftauen
- die DNA Proben belaufen sich auf 200  $\mu$ l
- es soll 1 Volumeneinheit der Phenol-Chloroformlösung hinzugegeben werden = 200  $\mu$ l
- das Gesamtvolumen der Probe beträgt also 400  $\mu$ l
- die folgenden Arbeiten finden unter dem Abzug statt, es sollten eine Schutzbrille und Handschuhe getragen werden:
  
- die Phenol-Chloroformlösung gut durchmischen, damit sich die beiden Phasen verwirbeln und man nicht nur aus einer Phase abpipettiert
- 200  $\mu$ l Phenol-Chloroform auf die Probe pipettieren und diese verschließen
- kurz durchmischen
- Probe 5 min in der Microtischzentrifuge zentrifugieren
- es entstehen 3 Phasen: Chloroformphase (oben), Interphase (Proteine) und Phenolphase (unten)
- die obere Phase enthält die DNA
- die obere Phase in ein neues Gefäß überführen und den Vorgang solange wiederholen, bis keine Proteine (Interphase) mehr vorhanden sind
- nun muss die Probe gefällt werden, um die Verunreinigungen herauszubekommen

## 3. Ethanolfällung

- das Volumen der DNA-Probe wird bestimmt = 100  $\mu$ l
- es wird hinzugegeben: 0,1 Volumen Na-Acetat  
2,5 Volumen EtOH absolut

das entspricht **10  $\mu$ l Na-Acetat und  
250  $\mu$ l EtOH absolut**

- die oben angegebenen Mengen der Stoffe werden auf die gereinigten Proben pipettiert
- gut durchmischen
- 30 min bei  $-20^{\circ}\text{C}$  im Eisfach fällen
- 20 min bei 13.000 rpm zentrifugieren
- mit kaltem 70%igen EtOH waschen = EtOH drauf und direkt noch einmal 5 min bei 13.000 rpm zentrifugieren
- SN verwerfen
- Pellet unter dem Abzug trocknen lassen
- Pellet in 20-50  $\mu$ l TE-Puffer resuspendieren

## 4. Isopropanolfällung

- eine weitere gereinigte Probe wird mit dieser Fällung behandelt = 100  $\mu$ l
- es wird hinzugegeben: 0,1 Volumen Na-Acetat  
0,6 Volumen Isopropanol

das entspricht **10  $\mu$ l Na-Acetat und  
60  $\mu$ l Isopropanol**

- die oben genannten Mengen werden auf die Probe pipettiert

- Probe gut durchmischen
- 30 min bei Raumtemperatur (RT) fällen
- ab hier die Schritte wie in der EtOH-Fällung fortsetzen

## 5. Konzentrationsbestimmung

- ❖ Absorptionsspektrum erstellen:
  - hierzu erst das Photometer vorheizen
  - als Referenzwert dient eine Quarzküvette mit 2mM di-Natriumhydrogenphosphatpuffer
  - gegen diese wird ein Spektrum einer ungereinigten und einer gereinigten DNA-Probe gemessen
  - liegen die Werte außerhalb des Messbereichs (>3,000), so muss die Probe mit Puffer verdünnt werden
  - aus dem Absorptionsspektrum sollte sich das Maximum ablesen lassen
- ❖ Konzentration und Reinheit bestimmen
  - hierzu werden die Proben beim Absorptionsmaximum und noch einmal 20 nm darüber gemessen
  - die abgelesene optische Dichte (OD) wird in die Konzentration umgerechnet
  - aus dem Verhältnis der beiden Messwerte zueinander ( $E_{280\text{nm}}/E_{260\text{nm}}$ ) wird der Reinheitsfaktor  $R_F$  ermittelt
  - die Proben werden beurteilt

### Ergebnisse

Bei den Absorptionsspektren hat jede Gruppe ein anderes Spektrum gemessen, damit man die Wirkung der einzelnen Arbeitsschritte beurteilen kann. Die Daten der Gruppe 5 sind meine eigenen Ergebnisse:

Absorptionsspektren der Gruppen					
Wellenlänge [nm]	ungereinigt [Gr.1]	ungereinigt [Gr.2]	gereinigt + EtOH [Gr. 3]	gereinigt + EtOH [Gr.4]	nur gereinigt [Gr.5]
200	1,244	0,016	0,544	1,699	2,545
205	-	-	-	-	2,950
210	1,086	-	0,478	1,430	3,000
220	0,838	0,028	0,285	0,731	3,000
225	-	-	-	-	1,712
230	0,717	0,028	0,050	0,541	1,720
235	-	-	-	-	1,074
240	0,694	0,012	0,018	0,465	0,895
250	0,775	0,012	0,023	0,494	1,305
260	0,891	0,013	0,063	0,596	2,717
270	1,015	0,013	0,079	0,725	-
280	1,094	0,010	0,028	0,839	1,209
290	0,127	0,008	0,002	0,903	-
300	-	-	-	-	0,058

Tabelle 1: Versuchsergebnisse der Spektrenmessungen

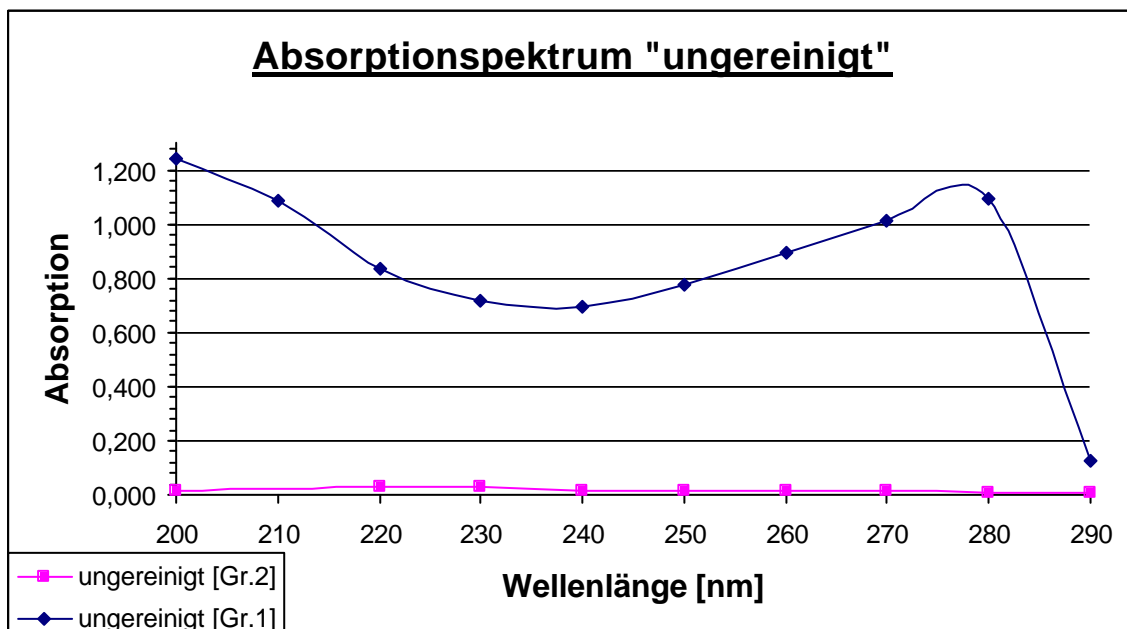
Bei der Bestimmung der OD kamen die Gruppen zu folgenden Ergebnissen:

Gruppe	Probe	OD 260 nm	OD 280 nm
1	ungereinigt	0,891	1,094
	gereinigt	0,811	1,012
	gereinigt + EtOH	0,827	1,028
	gereinigt + Iso	1,305	1,608
2	Werte bei 220 nm gemessen; nicht vergleichbar, da zu weit von Absorptionsmaximum entfernt		
3	ungereinigt	0,215	0,093
	gereinigt	3,000	0,774
	gereinigt + EtOH	0,079	0,002
	gereinigt + Iso	0,039	0,000
4	ungereinigt	0,709	0,916
	gereinigt	0,596	0,839
	gereinigt + EtOH	0,592	0,835
	gereinigt + Iso	0,677	0,892
5	ungereinigt	0,071	0,051
	gereinigt	2,717	1,209
	gereinigt + EtOH	0,000	0,000
	gereinigt + Iso	0,000	0,000

Tabelle 2: Ergebnisse der OD-Bestimmung

### Auswertung

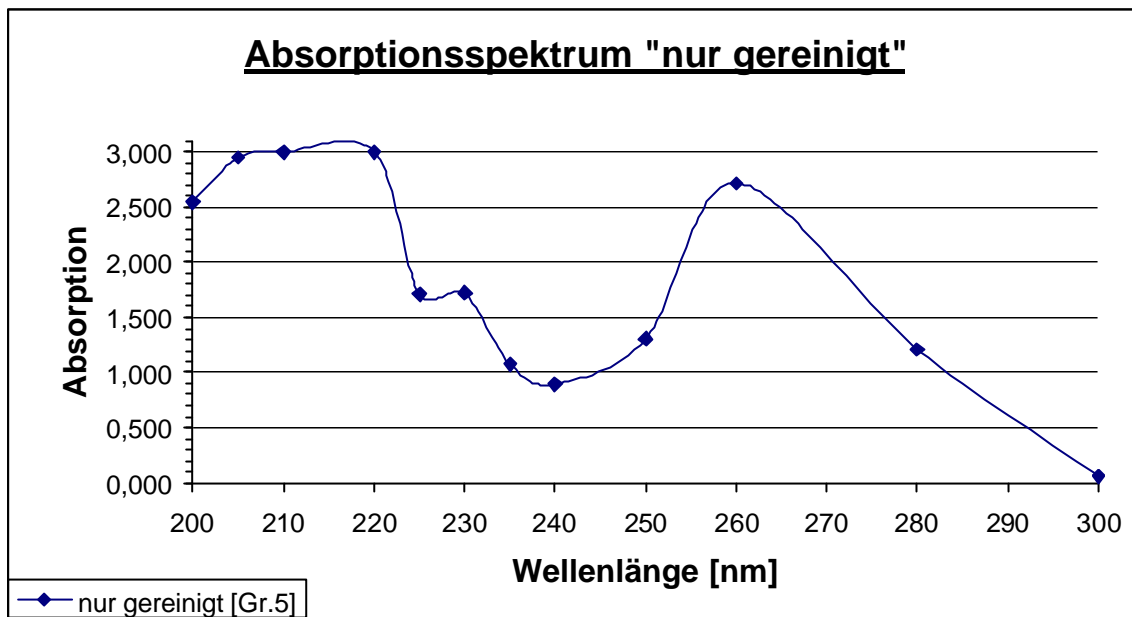
Die Absorptionsspektren der einzelnen Gruppen variieren sehr stark. Im Einzelnen sehen die Ergebnisse graphisch so aus:



Graph 1: Absorptionsmaximum ungereinigter DNA

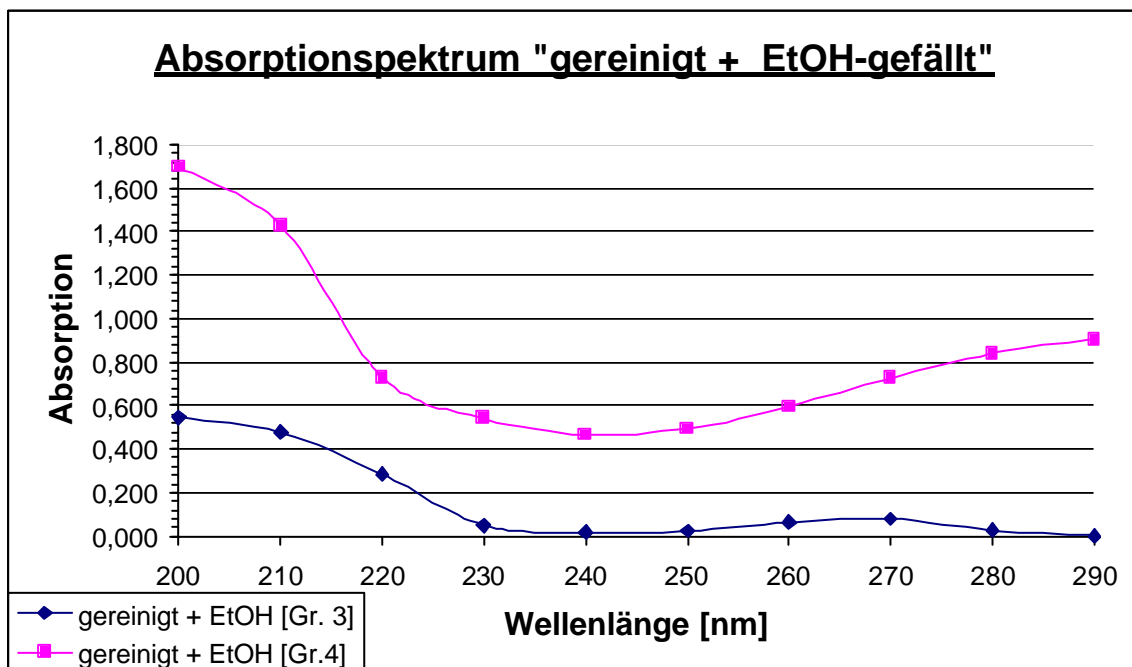
Der blaue Graph zeigt, dass die Probe noch stark mit Proteinen verunreinigt ist. Hier liegt das Maximum über dem der DNA. Der anfängliche Peak bis etwa 230 nm tritt bei allen Proben auf. Hierbei könnte es sich vielleicht über eine Verunreinigung des Puffers

handeln. Der pinkfarbene Graph lässt sich fast nicht auswerten, da die gemessenen Werte so minimal klein sind. Aber hier kann man bereits einen Peak bei 260 – 270 nm erkennen. Die Proteinverunreinigung ist nicht so stark.



Graph 2: Absorptionsmaximum einer gereinigten, jedoch nicht gefällten DNA -Probe

In diesem Graph sieht man deutlich, dass kaum noch Proteine vorhanden sind. Der Graph hat den typischen Anfangspeak bis 230 nm, dann ein weiteres Maximum bei 260 nm. Man kann aber nicht davon ausgehen, dass es sich hierbei um DNA handelt, da die Probe direkt nach der Phenol-Chloroform-Reinigung gemessen wurde. Und bekanntlich hat Phenol ebenfalls ein Absorptionsmaximum bei 260 nm.



Graph 3: Absorptionsmaximum gereinigter und gefällter DNA

Die letzten beiden Graphen sehen wieder sehr unterschiedlich aus, obwohl das Gleiche gemessen wurde. Der blaue Graph sieht so aus, wie es sein sollte: den Anfangspeak kann man vernachlässigen, dann folgt der DNA-Peak bei 260-270 nm, danach fällt der

Graph ab. Der pinkfarbene Graph hingegen scheint immer noch verunreinigt zu sein: im Anfangsbereich steigt und fällt er zwar wie der andere auch, nach den 260 nm steigt er aber immer weiter bis auf etwa 290 nm, wo er sein Maximum erreicht. Dies könnte auf eine Verunreinigung durch Restproteine geschehen sein, bestimmt aber auch durch weitere Verunreinigungen.

Die Konzentrationen und die entsprechenden Reinheitsfaktoren der einzelnen Gruppen lassen sich folgender Tabelle entnehmen:

Gruppe	Probe	OD 260 nm	Verdünnung	Konzentration [µg/ml]	OD 280 nm	R <sub>F</sub>
1	ungereinigt	0,891	1:10	445,5	1,094	1,2
	gereinigt	0,811	1:100	4055	1,012	1,2
	gereinigt + EtOH	0,827	1:100	4135	1,028	1,2
	gereinigt + Iso	1,305	1:100	6525	1,608	1,2
3	ungereinigt	0,215	1:1	10,75	0,093	0,4
	gereinigt	3,000	1:1	150,00	0,774	0,3
	gereinigt + EtOH	0,079	1:1	3,95	0,002	0,0
	gereinigt + Iso	0,039	1:1	1,95	0,000	0,0
4	ungereinigt	0,709	1:10	354,50	0,916	1,3
	gereinigt	0,596	1:100	2980,00	0,839	1,4
	gereinigt + EtOH	0,592	1:100	2960,00	0,835	1,4
	gereinigt + Iso	0,677	1:100	3385,00	0,892	1,3
5	ungereinigt	0,071	1:10	35,50	0,051	0,7
	gereinigt	2,717	1:100	13585,00	1,209	0,4
	gereinigt + EtOH	0,000	1:1	0,00	0,000	-
	gereinigt + Iso	0,000	1:1	0,00	0,000	-

Tabelle 3: Auswertung der Messergebnisse

Die Konzentrationen schwanken sehr stark, vor allem wenn man den Verdünnungsfaktor herausrechnet. Es lässt sich aber eine Tendenz abzeichnen: in den ungereinigten Proben ist die Konzentration der DNA am geringsten. Die mit Phenol gereinigten Proben haben eine weitaus höhere Konzentration. Bei uns (Gr. 5) war das besonders extrem. Hier tritt allerdings das oben beschriebene Problem mit dem Absorptionsmaximum des Phenols auf. Bei den Gruppen 1 und 4 ist jeweils die Ausbeute nach der Isopropanolfällung am höchsten. Die Werte schwanken im Verhältnis zur gereinigten DNA nicht so extrem. Gruppe 3 hat eine sehr geringe Ausbeute. Hier scheint ein Fehler unterlaufen zu sein. Bei uns war nach den Fällungen nur noch eine negative Extinktion zu messen. Es war also keine DNA mehr in den Proben enthalten.

#### Fehlerdiskussion

Bei der Arbeit mit DNA und RNA arbeitet man im µl und µg-Bereich. Minimalste Fehler führen dazu, dass die Proben kaputtgehen, die DNA verloren geht. Zudem muss man sehr sorgfältig sämtliche Vorschriften beachten (Temperaturen, pH-Werte, Mengenangaben) und sehr sorgfältig pipettieren. Schludert man an einer Stelle, ist meist der ganze Versuch hinfällig. Da wir hier das erste Mal mit diesem für uns neuen Medium gearbeitet haben gehe ich davon aus, dass uns bestimmt zahlreiche kleinere Fehler unterlaufen sind.

#### Literaturangaben

- / -

## Summary

In this series of test, we learned to know how to work with DNA. We learned to extract the DNA from the cells of an onion with a few simple utilities of every household. After this we learned how to clean and to concentrate this DNA. And after all we determined the concentration and the purity of our DNA-samples.

### 1<sup>st</sup> step: DNA-extraction

To extract intact DNA from a cell you have to overcome some natural barriers: the cell wall, the cell membrane and the membrane of the kernel of the cell. With the help of sodium, detergences, heat and proteases, you can get the DNA out of the kernel. But this DNA is still very ugly, because of proteins and other components of the inside of the cells.

### 2<sup>nd</sup> step: cleaning of the DNA

The DNA has to be cleaned from all these pollutions by using organic solutions, included in a mixture of Phenol and 2-Propanol. This mixture causes the division of our DNA-solution into nucleotides – swimming in the upper liquid phase – and proteins and enzymes – swimming in the lower phenolic phase.

### 3<sup>rd</sup> step: precipitation of the cleaned DNA

For th eprecipitation we test out the differences between two alcohols: ethanol and 2-propanol. The princip of the precipitation is to remove the watercoat of the DNA by satisfy the negative phasphats of the DNA with positive sodium-ions. So the DNA is no longer soluble in water and will be pushed away from the DNA solution. When you extrashift the sodiumsolution with very cold alcohol, the DNA will precipitate in the alcohol.

### 4<sup>th</sup> step: determination of the samples

To determine the concentration and the purity of the DNA-solution, we use the spectrophotometer. First we have to make a graph of the absorption of DNA to find out the maximum of their absorption. After this you have to evaluate the absorption at 260 nm and 280 nm. The optical density multiplied by 50 delivers us the concentration of DNA in µg/ml. The proportion between the optical density of 280 to 260 nm delivers us the degree of purity.