Isolation und Amplifizierung von DNA aus Pflanzen (*Diphasiastrum spp*.)

**Einleitung**

Heute ist man in der Lage, aus nur einem einzigen DNA-Strang eine beliebig große DNA-Probe herstellen. Dazu wird die DNA zunächst extrahiert und im Anschluss über die PCR in gewünschter Menge kopiert.

**Durchführung**

In diesem Versuch untersuchten wir verschiedene Individuen aus zwei verschiedenen Arten von *Diaphasiastrum* (*D. alpinum*, *D. complanatum*). Dazu verwendeten wir aus Sibirien (Baikal) stammendes getrocknetes Blattmaterial. Zu Beginn dieses Versuches wogen wir je Probe etwa 20-30 mg an der Feinwaage in Tube Strips ab. Um die dicke Wand der Pflanzenzellen zu zerstören, gaben wir eine kleine Stahlkugel in jede Probe. Durch Einsatz einer sogenannten Retschmühle mahlten wir das abgewogene Pflanzenmaterial zu einem feinen Pulver.

Anschließend stellten wir eine zuvor berechnete Menge einer Mischung aus CSPL-Puffer und Proteinase K her. Proteinase K sorgte für den Abbau von Proteinen, sowie für die Freisetzung von Nucleinsäuren. Bei dem CSPL-Puffer handelte es sich um einen sogenannten DNA-Extraktionspuffer. Diese enthalten mehrere Komponenten:

1. Eine Substanz mit Pufferwirkung, welche den pH-Wert – in diesem Fall etwa bei pH8 - stabilisiert (Bsp. TRIS-HCl)
2. Ein Salz, welches den Zellen das Wasser entzieht und so die Zelllyse erleichtert (Bsp. NaCl).
3. Ein Detergens: Detergenzien sind in der Lage Proteine und Fette der daraus bestehenden Zellmembran zu lösen (Bsp. CTAB).
4. Chelatbildner: Diese können Metallionen, wie etwa Ca2+ oder Mg2+, binden. Die DNAsen bzw. den Proteasen, welche diese Metallionen ebenfalls benötigen, werden diese somit weggefangen. Chelatbildner halten also somit die Enzymaktivitäten dieser relativ niedrig. (Bsp. EDTA)

Ebenfalls können enthalten sein:

* Mercaptoethanol, welches als starkes Reduktionsmittel Tannine und Polyphenole entfernen kann.
* Polyvinylpyrolidon, welches durch Bildung von Wasserstoffbrücken zu phenolischen Komponenten ebendiese entfernen kann.

Durch Schütteln homogenisierten wir die gemahlenen Proben und das Puffer-Proteinase-Gemisch. Dieses mussten wir nun für etwa eine bis zwei Stunde(n) bei einer Temperatur von 56°C inkubieren lassen.

Nach Ende der Inkubationszeit zentrifugierten wir die Tube Strips für etwa 10-15 min. Nun pipettierten wir in jedes zu verwendende Well einer DW-Platte RNAse A an die Innenwand. Im Anschluss nahmen wir mit einer Mehrfachpipette pro Well jeweils die gleiche Menge pro Probe an Überstand ab und pipettierten diesen, die RNAse A von der Innenwand herunterspülend, in die DW-Platte. Es erfolgte eine weitere Inkubation von 2 min bei Raumtemperatur.

Nach Ende der Inkubationszeit pipettierten wir in jedes Well außerdem RBB-Puffer (Bindungspuffer). Dieser bestand aus dem chaotropen Salz Guanidiniumthiocyanat und Ethanol.

Außerdem gaben wir magnetic beads – kleine, mit Silica beschichtete Magnetkugeln – hinzu, an die die DNA binden sollte.

Außerdem befüllten wir weitere 5 DW-Platten sowie 2 LW-Platten:

* LW-Platte 1: Spitzen-Comb
* DW-Platte 1: CSPW1-Puffer (Waschpuffer)
* DW-Platte 2: CSPW2-Puffer (Waschpuffer)
* DW-Platte 3: SPM-Puffer (Waschpuffer)
* DW-Platte 4: SPM-Puffer (Waschpuffer)
* DW-Platte 5: ddH2O
* LW-Platte 2: Elutionspuffer

Bei den CSPW-Puffern und dem SPM-Puffer (pH5-7) handelte es sich um sogenannte Hochsalzpuffer, welche notwendig waren, um die DNA von den noch vorhandenen Verunreinigungen zu befreien. Bekannte Inhaltsstoffe waren unter anderem Natriumperchlorat und Ethanol. Da die genaue Zusammensetzung der Puffer zum Verwendungszeitpunkt Firmengeheimnis und uns daher nicht genau bekannt war, ließen sich zu diesen leider keine belegbaren genaueren Informationen finden.

Bei dem Elutionspuffer handelt es sich dagegen um einen Niedrigsalzpuffer, in dem die DNA am Ende von den magnetic beads abgelöst wird.

Um die DNA zu extrahieren, stellten wir die Platten in einen Roboter. Dabei mussten wir beachten, dass wir die Platten in der im gegebenen Dokument beschriebenen Reihenfolge an die richtige Position setzten.

Nach abgeschlossener DNA-Extraktion bestimmten wir die erhaltene Konzentration der DNA mittels eines Photometers und setzten anschließend eine entsprechende Verdünnung an.

Im Folgenden bereiteten wir für die PCR einen sogenannten „Mastermix“ vor, welcher alle für die PCR benötigten „Zutaten“ enthielt:

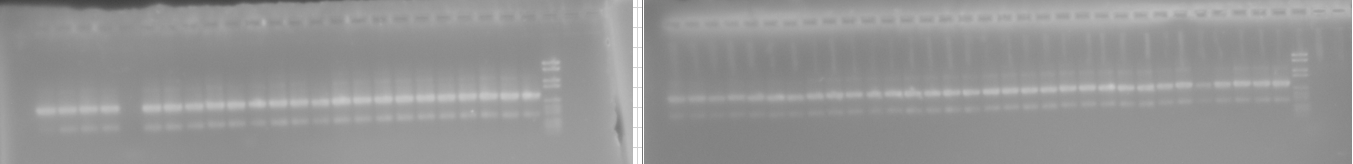
* DNA
* H2O
* PCR-Puffer
* Primer (forward/ reverse) mit einer Annealing-Temperatur von 50 °C
* MgCl2
* dNTPs
* DNA-Polymerase

Nach dem Erstellen des Mastermixes packten wir diesen in einen Thermocycler, welcher sämtliche für die ausreichende Amplifikation der DNA notwendigen Schritte in einem entsprechenden Zyklus immer wieder wiederholt:

1. Das Auftrennen der Doppelstränge fand bei 95 °C statt. Dabei kam es, bedingt durch die hohe Temperatur, zum Lösen der Wasserstoffbrückenbindungen zwischen den jeweiligen komplementären Basenpaaren.
2. Das Anlagern der Primer (Annealing) an ein passendes komplementäres Stück auf den erhaltenen DNA-Einzelsträngen fand bei 59 °C statt. (Jeden Zyklus reduzierten wir die Temperatur um 1 °C, bis wir eine Temperatur von 54 °C erreichten, welche für alle nachfolgenden Zyklen beibehalten wurde.)
3. Der Prozess der DNA-Amplifikation fand bei 72 °C statt. Dabei wurden jeweils zu den Einzelsträngen komplementäre Stränge durch die bei dieser Temperatur sehr aktiven DNA-Polymerase gebildet, sodass wir erneut Doppelstränge erhielten.

Zum Schluss überprüften wir via Gelelektrophorese, ob die PCR erfolgreich war und wir somit ein entsprechendes Produkt erhielten. Dazu stellten wir zunächst ein Agarosegel aus Wasser und Agarose her, füllten dieses in den Chromatographen und ließen es trocknen. In die gebildeten Taschen füllten wir dann die angefärbten Produkte der PCR. In eine weitere Tasche wurde ein Marker gefüllt. Unter Einsatz elektrischer Spannung (DNA hat eine negative Ladung) und entsprechender Laufzeit erhielten wir dann ein Ergebnis.

**Ergebnis**



. Abb.1: Auftrennung der DNA von *Diphasiastrum complanatum/ alpinum* via Gelelektrophorese

**Diskussion und Fehlerbetrachtung**

Am Ende des Versuches konnten wir erkennen, dass wir von allen bearbeiteten Individuenproben in der Gelelektrophorese eine entsprechende Bande erhielten und somit für uns ersichtlich war, dass die PCR erfolgreich war. Bei zwei Taschen, welche jeweils eine Probe mit *D. complanatum* enthielten, war kein/ ein deutlich reduziert sichtbares Bandenmuster erkenntlich. In diesen Fällen lag der Fehler bei der unzureichend genauen manuellen Befüllung der jeweiligen Tasche.

Die vervielfältigte DNA müsste im Anschluss noch sequenziert werden, um einen Rückschluss auf die Basenzusammensetzung der amplifizierten DNA-Abschnitte zu bekommen. Da dieser Teil jedoch kein Bestandteil dieses Praktikums war, konnten wir innerhalb dieses Protokolls leider keine Aussage über eventuelle Unterschiede der amplifizierten DNA-Abschnitte der jeweiligen *Diaphasiastrum*-Art treffen.

Eine mögliche Schwierigkeit bei der generellen Reinigung der DNA können Polysaccharide darstellen, da sie eine den Nucleinsäuren ähnliche Struktur besitzen. In Folge dessen können sie mit Enzymen wie beispielsweise der DNA-Polymerase interferieren und bei der PCR inhibitorisch wirken.

**Fazit**

In diesem Praktikumsteil gelang uns eine erfolgreiche Isolierung und Amplifizierung der DNA genannter Bärlapparten.

**Literatur**

* <https://www.researchgate.net/post/what_is_the_role_of_PVP_in_CTAB_buffer>
* <https://www.spektrum.de/lexikon/biologie/detergentien/17631>
* <https://www.springer.com/cda/content/document/cda_downloaddocument/9783642346354-c1.pdf?SGWID=0-0-45-1434306-p175274473>
* <https://sciencing.com/components-lysis-buffers-8148370.html>
* <https://books.google.de/books?id=suJmDwAAQBAJ&pg=PA201&lpg=PA201&dq=lysepuffer+detergens+salz&source=bl&ots=mQukEe2vGR&sig=Y1vzAAdrHlWfdIc1hPFPh7S4Vh0&hl=de&sa=X&ved=2ahUKEwjxuJ2RvubfAhXEKewKHTQfDccQ6AEwAnoECAcQAQ#v=onepage&q=lysepuffer%20detergens%20salz&f=false>
* <https://www.omegabiotek.com/wp-content/uploads/2018/11/RBB-1000-SDS-RBB-Buffer.pdf>
* <https://www.geneon.net/products/enzymes-and-fine-chemicals-for-mol-bio/proteinase-k-de/>
* <https://www.omegabiotek.com/wp-content/uploads/2018/11/CSPW1-650-SDS-CSPW1-Wash-Buffer.pdf>
* <https://www.omegabiotek.com/wp-content/uploads/2018/11/CSPW2-200-SDS-CSPW2-Buffer.pdf>
* <https://www.omegabiotek.com/wp-content/uploads/2018/11/SPM-300-SDS-SPM-Buffer.pdf>
* <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4752943/>
* <http://www.lci-koeln.de/deutsch/veroeffentlichungen/lci-focus/die-polymerasekettenreaktion-pcr->
* <https://webcache.googleusercontent.com/search?q=cache:YycttbiqVB4J:https://www.springer.com/cda/content/document/cda_downloaddocument/9783642346354-c1.pdf%3FSGWID%3D0-0-45-1434306-p175274473+&cd=3&hl=de&ct=clnk&gl=de>
* Skript zum Praktikum: Isolation und Sequenzierung von DNA aus Pflanzen (*Diphasiastrum spp*.); M. Schnittler, A. Klahr, 2018