



Phenolische DNA Aufreinigung – Hintergrund und Protokoll

(nach Sambrook und Russell, Molecular Cloning, 3. Edition, Cold Spring Harbour Laboratory Press, Cold Spring Harbour, New York, 2001)

Hintergrund

Einer der grundlegenden Prozesse in der Molekularbiologie ist die Aufreinigung von Nukleinsäuren. Während dieses Prozesses ist es häufig von Nöten, Enzyme oder andere Proteine zu deaktivieren oder zu entfernen, die aus den ursprünglichen Zellextrakten stammen oder die während der Klonierung verwendet wurden. Dieses Entfernen der Proteine kann häufig durch einfache Extraktion der wässrigen Nukleinsäure-Lösung mit Phenol, Phenol/Chloroform oder Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol durchgeführt werden.

Die am weitesten verbreitete Version dieser Aufreinigung besteht aus einer Extraktion mit Phenol/Chloroform (1:1), häufig versetzt mit 0,1 %, Hydroxychinolin, gefolgt von einem oder zwei Aufreinigungsschritten mit Chloroform. Diese zusätzliche Chloroform-Extraktion entfernt restliches Phenol aus der Lösung, das die Nukleinsäure verunreinigen könnte. Für ein ausführliches Protokoll siehe unten.

Hinweis: Eine Deproteinierung ist effizienter, wenn während des Prozesses zwei unterschiedliche organische Lösungsmittel verwendet werden.

Im Jahre 1956 publizierte Kirby die erste Verwendung von Phenol bei der Aufreinigung von Nukleinsäuren [1]. Seine Idee basierte auf den Veröffentlichungen von Grassmann und Deffner (1953), die zuvor gezeigt hatten, dass man mittels Phenol Proteine aus wässrigen Lösungen isolieren kann [2]. In seinem Paper wies Kirby nach, dass die Extraktion von Proteinen aus Säugetier-Gewebsextrakten mittels einer zwei-Phasen-Phenol/Wasser-Mischung bei Raumtemperatur zur Anreicherung der RNA in der wässrigen Phase führt. Die DNA bleibt zusammen mit den Proteinen in der Interphase. Kirby zeigte, dass sich, wenn das reine Wasser durch anionische Salze ersetzt wird, beide Moleküle, RNA wie auch DNA, in der wässrigen Phase finden. In der Nachfolge wurden dann zwar die anionischen Salze in ihrer Funktion, Nukleinsäure von Proteinen freizusetzen, ersetzt durch stark anionische Detergenzien wie SDS, der grundlegende Ansatz aber, der in dieser ersten Publikation veröffentlicht worden war, wurde kaum geändert und bildet immer noch die Basis der meisten gebräuchlichen Aufreinigungsmethoden.

Hinweis: Die Funktion des Phenols während dieses Prozesses ist höchstwahrscheinlich die eines Proteinlösungsmittels – die Extraktion der Proteine, die durch Detergenzien von der Nukleinsäure getrennt wurden.

Die Phenolextraktion von Nukleinsäuren ist hocheffizient. Bereits nach zwei oder drei Phenolextraktionen werden hoch-reine Nukleinsäure-Fractionen erhalten. Denaturierte Proteine sammeln sich an der Grenze zwischen den beiden Phasen, Fette sammeln sich in der organischen Phase. DNA oder, abhängig vom tatsächlich verwendeten Phenol, Gesamt-Nukleinsäuren reichert sich stark in der wässrigen Phase an und kann leicht von der organischen und der Zwischenphase getrennt werden. Zur Isolation von DNA wird Tris- oder TE-gesättigtes Phenol mit einem pH von etwa 7,8 verwendet. Phenol mit diesem pH-Wert unterdrückt das Abwandern der DNA in die organische Phase und unterscheidet nicht zwischen DNA und RNA, so dass es die gemeinsame Isolation beider Nukleinsäuren erlaubt. Entsprechend wird für die RNA-Aufreinigung reines Wasser als Lösungsmittel für Phenol verwendet, das damit einen pH-Wert von etwa 4,8 erhält. Bei diesem pH wird die DNA gezwungen, sich in der organischen und der Protein-Interphase anzureichern, was die DNA-Kontamination der RNA-Isolate deutlich verringert.

Gereinigtes, gelöstes Phenol besitzt eine Dichte von 1,07 und bildet deshalb die untere Phase, wenn es mit Wasser oder wässrigen Lösungen gemischt wird. Normalerweise befindet sich die wässrige Phase oben.



Guter Rat ist Roth.

Technische Info

Allerdings sind die beiden Phasen manchmal schwer zu trennen oder können unter bestimmten Umständen sogar invertieren.

Hinweis: Die Phenol- und die wässrige Phase können invertieren, wenn Phenol verwendet wird, um Nukleinsäure aus Lösungen zu extrahieren, die hohe Konzentrationen an gelösten Stoffen aufweisen (z.B. >0,5 M Salz oder >10 % Zucker).

Dieses Problem kann vermieden werden, indem eine 1:1 Mischung aus Phenol und Chloroform verwendet wird, da die höhere Dichte des Chloroforms (1,47) eine klare Unterscheidung und Trennung der beiden Phasen bewirkt. Das Entnehmen der oberen Phase ist dann in den meisten Fällen sehr leicht möglich. Um ein Schäumen der organischen Phase zu vermeiden, welches das Pipettieren behindert, kann eine kleine Menge Isoamylalkohol zugegeben werden. Weiterhin inhibiert diese Mischung auch vollständig RNAsen und verhindert die Anreicherung von poly(A)-RNA in der Phenolphase.

Hinweis: Obwohl reines Phenol Proteine effizient denaturiert, inhibiert es nicht vollständig die RNase Aktivität und dient als Lösungsmittel für RNA-Moleküle mit langen poly(A)-Schwänzen [3], die somit bei der Präparation verloren gehen können.

Protokoll

Hinweis: Kontrollieren Sie das Phenol vor Gebrauch! Phenolische Lösungen sollten wasserklar und ungefärbt sein und können für etwa 1 Jahr im Kühlschrank aufbewahrt werden (dunkel und bei konstanter Temperatur). Sollte eine mehr oder weniger deutliche, rötliche oder pinkfarbene Färbung der Lösung zu sehen sein, hat der Oxidationsprozess des Phenols begonnen, und das Phenol wird die Nukleinsäuren während der Isolation angreifen und beschädigen. Verwerfen Sie das Phenol und verwenden sie eine neue Charge!

1. Überführen der Probe in ein Reaktionsgefäß. Zugabe von 1 Volumen Phenol/Chloroform oder Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol.
Hinweis: Phenol sollte zur DNA-Isolation einen pH-Wert von 7,5-8,0 und zur RNA-Isolation einen pH-Wert von 4,5-5,0 haben.
2. Kräftiges Mischen der Komponenten im Röhrchen bis sich eine Emulsion bildet.
Hinweis: Mischen wie folgt: zur Isolation von a) kleinen DNA Molekülen (<100 kb) durch Vortexen, b) mittlere DNA Moleküle (10-30 kb) durch leichtes Schütteln oder durch schnelles Kippen, c) große DNA Moleküle (>30 kb) durch Drehen auf einem Radschüttler.
3. Zentrifugation des Röhrchens bei 80 % der für die Röhrchen maximal möglichen Geschwindigkeit (normalerweise 14 000 g) für 1 min bei Raumtemperatur. Wiederholung der Zentrifugation (für bis zu 10 min), wenn sich die beiden Phasen nicht sauber unterscheiden lassen. An der Grenzschicht ist eine mehr oder weniger deutliche, helle Proteinschicht zu erkennen.
Hinweis: Normalerweise befindet sich die wässrige Phase oben. Bei besonderer Zusammensetzung der wässrigen Phase kann allerdings eine Phaseninvertierung stattfinden (siehe oben). Die organische Phase ist leicht erkennbar an der leicht gelblichen Farbe, die vom zugegebenen Hydroxychinolin stammt.
4. Pipettieren der wässrigen Phase in ein frisches Röhrchen. Verwerfen der Zwischen- und Phenol-Phasen.
Hinweis: Um die Rückgewinnungsrate zu erhöhen, kann die organische Phase noch einmal extrahiert werden: Zugabe von 1 Volumen TE (pH 7,8) zur organischen und Interphase. Gut mischen. Zentrifugation zur Phasentrennung wie in Schritt 3. Kombination dieser wässrigen Phase mit der ersten und weiter bei Schritt 5.
5. Wiederholung der Schritte 1-4 mit der wässrigen Phase bis kein Protein in der Interphase mehr zu sehen ist.
6. Zugabe von 1 Volumen Chloroform zur wässrigen Phase. Wiederholung der Schritte 2-4.
Hinweis: Wurde reines Phenol für die Extraktion verwendet, sollte 2x mit Chloroform nachgereinigt werden.
7. Rückgewinnung der Nukleinsäure durch Präzipitation mit 2 Volumina Ethanol.



Guter Rat ist Roth.

Technische Info

Referenzen

- [1] Kirby (1956) Biochem. J. 64:405
[2] Grassmann und Deffner (1953) Hoppe-Seylor's Z. Physiol. Chem. 293: 89-98
[3] Brawerman et al. (1972) Biochemistry 11:637-41

Kurzanleitung für die bench

Phenol-Chloroform-Extraktion

- 1 Vol. Phenol-Chloroform (1:1) oder reines Phenol (pH 7,5-8,0) zur Probe geben
- Vortexen (ca. 3 Sekunden)
- Zentrifugation 2 min. bei 14.000 rpm (Tischzentrifuge)
- Obere (hydrophile) Phase mit DNA vollständig (!) in ein neues Reaktionsgefäß überführen. Zwischenschicht dabei unberührt lassen. Untere Phase verwerfen*.

Reextraktion der hydrophilen Phase mit Chloroform (2x)

- 1 Vol. Chloroform zur Probe geben
- Vortexen (ca. 3 Sekunden)
- Zentrifugation 2 min. bei 14000 rpm (Tischzentrifuge)
- Obere (hydrophile) Phase mit DNA vollständig (!) in ein neues Reaktionsgefäß überführen. Zwischenschicht dabei unberührt lassen. Untere Phase verwerfen*.
- 1 Vol. Chloroform zur Probe geben
- Vortexen (ca. 3 Sekunden)
- Zentrifugation 2 min. bei 14000 rpm (Tischzentrifuge)
- Obere (hydrophile) Phase mit DNA vollständig (!) in ein neues Reaktionsgefäß überführen. Zwischenschicht dabei unberührt lassen. Untere Phase verwerfen*.

Fällen der DNA

- *Optional:* + 1µl Roti®-PinkDNA (Best.-Nr. HP54) zur Sichtbarmachung des Pellets (bei geringen DNA-Mengen dringend empfohlen!)
- + 1/10 Vol. 3 M Na-acetat
+ 2 Vol. 100 % Ethanol (p.a.)
- Inkubation mindestens 1 h bei -20 °C (optional: mindestens 20 min. bei -80 °C)
- Zentrifugation 15 min. bei 14.000 rpm (Tischzentrifuge)
- Überstand abpipettieren und verwerfen*
- Pellet mit 70% Ethanol spülen
- Zentrifugation 3 min. bei 14.000 rpm (Tischzentrifuge)
- Überstand abpipettieren und verwerfen*
- Zentrifugation 10 sec. bei 14.000 rpm (Tischzentrifuge)
- Rest-Ethanol vollständig abpipettieren*
- Reaktionsgefäß offen und Luftzug-geschützt stehen lassen und Pellet ca. 5 min. lufttrocknen lassen
- Pellet in gewünschter Menge Flüssigkeit 5 min. bei Raumtemperatur lösen (10 mM Tris Puffer (pH ca. 8), verdünnter Roti®-Stock 100x TE Puffer, Wasser für die Molekularbiologie (Best.-Nr. T143))
- DNA (eventuell in Aliquots) zur Lagerung bei -20 °C einfrieren

* Zur Sicherheit sollte das verworfene Material zunächst aufbewahrt und erst nach erfolgreicher Isolation verworfen werden.

s.s. 03.2016