

Erhöhung der Ausbeute bei der Isolierung eines low-copy Plasmids mit Eppendorf Tubes® 5.0 mL im Vergleich zum 1,5 mL und 2,0 mL Format

Frauke Gotzhein¹, Natascha Weiß², Daniel Wehrhahn², Wolf Wente³

¹Universität Hamburg, Studiengang Molecular Life Sciences, Deutschland

²Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland

³Eppendorf Instrumente GmbH, Hamburg, Deutschland

Zusammenfassung

Die Isolierung von Plasmid-DNA stellt eine wichtige Methode der Molekularbiologie dar, die zum Beispiel bei der Analyse rekombinanter Klone eine Rolle spielt. Nicht selten jedoch ergibt sich aus dem begrenzten Ausgangsvolumen das Problem einer zu geringen Ausbeute an DNA. Im Folgenden wird die Isolierung von Plasmid-DNA unter Benutzung des Eppendorf Tubes® 5.0 mL im Vergleich zu Reaktionsgefäßen im Format von 1,5 mL und 2,0 mL beschrieben.

Die Ergebnisse zeigen, dass durch die Vergrößerung der Ausgangskultur auf 5,0 mL in einem größeren Gefäß

eine deutlich höhere Ausbeute an Plasmid-DNA erzielt werden kann. Gleichzeitig können alle Schritte im 5,0 mL Tube genauso einfach wie in den kleineren Gefäßen und ohne höheres Kontaminationsrisiko durchgeführt werden. Somit müssen nicht mehrere Gefäße für eine Probe eingesetzt werden, um eine ausreichend hohe Ausbeute zu erzielen. Die hier durchgeführten Experimente stehen exemplarisch für weitere Anwendungen, bei denen größere Volumina als Kulturmedium vorteilhaft sind oder in nachfolgenden Extraktionsschritten vorkommen.

Einleitung

In der Molekularbiologie gibt es zahlreiche Anwendungen, bei welchen Volumina benötigt werden, die das Fassungsvermögen der standardmäßig genutzten 1,5 mL oder 2 mL Reaktionsgefäße übersteigen. Hierzu gehört zum Beispiel die Isolierung von low-copy Plasmiden, bei der größere Mengen Bakterienkultur zum Einsatz kommen, wenn für nachfolgende Anwendungen ausreichend DNA vorhanden sein muss. Auch bei der Präzipitation von DNA mit Ethanol, bei der zur Ausgangsmenge zwei Volumina Ethanol zur Fällungsreaktion notwendig sind, kommt man schnell an die Kapazitätsgrenze der Gefäße. Vielfach wird dann nur eine entsprechend kleine Menge Probe eingesetzt, was das Risiko birgt, nicht genug DNA isolieren zu können und den Versuch wiederholen zu müssen.

Wenn eine größere Menge Material auf mehrere kleine Tubes aufgeteilt wird, erhöht sich entsprechend der Verbrauch an Gefäßen und Spitzen und Arbeitsschritte müssen mehrfach durchgeführt werden. Eine weitere Alternative

stellen konische 15 mL Gefäße aus Polypropylen dar. Diese weisen jedoch eine weitaus geringere Zentrifugationsbeständigkeit aus (ca. 8.000 – 15.000 x g) als Mikrozentrifugationsgefäße (ca. 20.000 – 30.000 x g). Eine Verlängerung der Zentrifugationsdauer kann daher erforderlich sein, da z. B. die Wiedergewinnungsrate von DNA nach der Präzipitation auch von der eingesetzten g-Zahl abhängig ist [1].

Das neue Eppendorf Tube 5.0 mL bietet die Möglichkeit, bequem mit größeren Probenmengen zu arbeiten. Alle Arbeitsschritte einer DNA-Isolierung können in diesen Gefäßen durchgeführt werden, da sie den Einsatz von Bakterienkulturen bis 5 mL ermöglichen und bei hohen g-Zahlen zentrifugiert werden können (max. 25.000 x g).

Im Folgenden wird anhand der Isolierung eines low-copy Plasmids gezeigt, welche Steigerung der Plasmid-DNA-Ausbeute durch Verwendung der Eppendorf Tubes 5.0 mL im Vergleich zu 1,5 mL und 2 mL Gefäßen erzielt werden kann.

Material und Methoden

Minipräparation von Plasmid-DNA262

Kompetente *E. coli* Bakterien wurden im Eppendorf Eporator® mit dem low-copy Plasmid pBR322 transformiert und danach kultiviert. Von der Übernachtskultur wurde jeweils das Maximalvolumen für die Eppendorf Gefäße im 1,5 mL, 2,0 mL und 5,0 mL Format eingesetzt und damit in jeweils dreifachen Ansätzen mit dem QIAprep® Spin Miniprep Kit (Qiagen® GmbH) die Minipräparation durchgeführt. Für alle Proben wurden die gleichen Mengen an Reagenzien eingesetzt.

Ergebnisse und Diskussion

Die Mittelwerte der Dreifachbestimmung der Plasmid-DNA aus den verschiedenen Gefäßgrößen sind in Abbildung 1 dargestellt. Die gemittelte DNA pro Gefäßtyp beträgt ca. 35,3 µg (5,0 mL Tube), 10,9 µg (2,0 mL Tube) und 6,6 µg (1,5 mL Tube). Es ist eine proportionale Steigerung der Ausbeute an isolierter Plasmid-DNA mit zunehmendem Ausgangsvolumen an Bakterienkultur zu sehen, wenn man die kleineren Gefäßgrößen (1,5 mL und 2,0 mL) mit dem Eppendorf Tube 5.0 mL vergleicht.

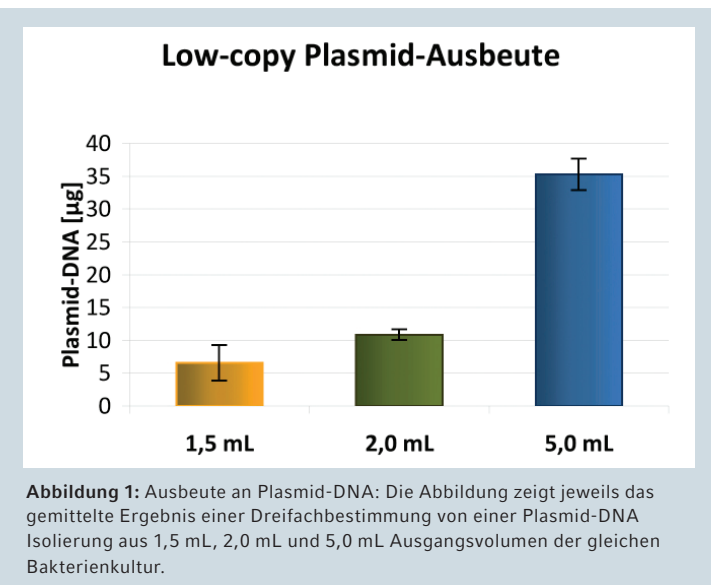
Abbildung 2 zeigt das Agarosegel, auf dem die unverdaute DNA aufgetragen wurde. Die untere dominante Bande enthält die „supercoiled“ Plasmid-DNA, die sichtbar macht, dass die Plasmid-Isolierung zu einer guten Ausbeute an unversehrter DNA geführt hat. Die zusätzlich sichtbaren schwächeren Banden, die darüber liegen, stellen weitere Konformationen des Plasmids dar. Sie lassen den Unterschied in der Ausbeute zwischen den kleinen Gefäßstypen (1,5 und 2,0 mL) und dem 5,0 mL Tube besonders deutlich erkennen.

Die Ergebnisse haben bestätigt, dass sich durch die Wahl eines größeren Ausgangsvolumens die Ausbeute erheblich steigern lässt. Trotz der größeren Menge anfänglich genutzter Bakterienkultur war keine Abänderung des Protokolls nötig und es ließen sich alle Teilschritte der Lyse und der Präzipitation in dem handlichen Eppendorf Tube 5.0 mL durchführen. Der Einsatz mit Eppendorf Zentrifugen und Thermomixern ist durch entsprechendes Zubehör sichergestellt. Die Handhabung ist vergleichbar mit den 1,5 mL und 2,0 mL Eppendorf Tubes. Dabei ist ein großer Vorteil, dass genau wie bei den kleineren Gefäßen kontaminationsfrei pipettiert werden kann, da trotz des größeren Volumens der Pipettenkonus nicht in das Gefäß eintaucht.

Durch Einsatz des 5 mL Tubes kann die sonst notwendige Aufteilung der Probe auf mehrere kleine Gefäße vermieden werden. Das vermindert die Menge benötigter Verbrauchsmaterialien, spart Kosten für Reagenzien und reduziert den Arbeitsaufwand.

Analyse der DNA

Die Menge der isolierten DNA wurde mit dem Eppendorf BioPhotometer® plus bestimmt. Weiterhin wurden die entsprechenden Proben gepoolt und jeweils 3 µL der Plasmid-DNA zur Kontrolle auf ein Agarosegel aufgetragen.



Fazit

Wie hier gezeigt wurde, stellt das Eppendorf Tube 5.0 mL eine sehr gute Alternative für die Isolierung von Plasmid-DNA mit einer höheren Menge an Ausgangsmaterial dar. Die bequeme Handhabung bietet Vorteile, wenn Probenvolumina im Bereich von 2 - 5 mL verarbeitet werden, so dass sich das Gefäß als nützliches Bindeglied zwischen den bisherigen Standard-Gefäßgrößen von 2,0 mL und 15 mL anbietet.

Literatur

[1] Eppendorf Application Note 234: Bessere Wiedergewinnungsraten und verkürzte Zentrifugationszeiten durch Zentrifugation bei 30.000 x g (www.eppendorf.de)

Bestellinformationen

Bezeichnung	Best.-Nr.
Eppendorf Tubes® 5.0 mL, Eppendorf Quality, 200 Gefäße	0030 119.401
Eppendorf Tubes® 5.0 mL, PCR clean, 200 Gefäße	0030 119.460
Eppendorf Tubes® 5.0 mL, Sterile, 200 Gefäße	0030 119.487
Eppendorf Tubes® 5.0 mL, Eppendorf Biopur®, 50 Gefäße (einzeln verpackt)	0030 119.479
Eppendorf Protein LoBind Tubes 5.0 mL, PCR clean, 100 Gefäße	0030 108.302
Eppendorf DNA LoBind Tubes 5.0 mL, PCR clean, 200 Gefäße	0030 108.310
Tube Clip 5.0 mL, 10 Stück, zur Fixierung des Deckels	0030 119.509
Starter Pack Eppendorf Tubes® 5.0 mL, PCR clean, 400 Gefäße, 2 Racks (je 16Plätze), weiß, 8 Stück Universaladapter für Rotore mit Bohrung für 15 mL konische Gefäße	0030 119.380
Eppendorf Safe-Lock Tubes 1,5 mL, Eppendorf Quality, 1000 Gefäße	0030 120.086
Eppendorf Safe-Lock Tubes 1,5 mL, PCR clean, 1000 Gefäße	0030 123.328
Eppendorf Safe-Lock Tubes 2,0 mL, Eppendorf Quality, 1000 Gefäße	0030 120.094
Eppendorf Safe-Lock Tubes 2,0 mL, PCR clean, 1000 Gefäße	0030 123.344
Eppendorf Eporator®, für Bakterien und Hefen, 230 V/50-60 Hz	4309 000.019
Eppendorf BioPhotometer® plus, 230 V/50-60 Hz	6132 000.008

Your local distributor: www.eppendorf.com/contact

Eppendorf Vertrieb Deutschland GmbH · 50389 Wesseling-Berzdorf · Deutschland · E-mail: eppendorf@eppendorf.de · www.eppendorf.de

Eppendorf Austria GmbH · 1210 Wien · Österreich · E-mail: eppendorf@eppendorf.at · www.eppendorf.at

Vaudaux-Eppendorf AG · Schweiz · E-mail: vaudaux@vaudaux.ch · www.eppendorf.ch

www.eppendorf.com

QIAGEN® und QIAprep® sind eingetragene Marken der Qiagen GmbH, Germany

Eppendorf®, das Eppendorf Logo, Biopur®, Eppendorf Tubes®, Eppendorf Eporator® und Eppendorf BioPhotometer® sind eingetragene Marken der Eppendorf AG, Hamburg, Germany.

Alle Rechte vorbehalten, einschließlich der Grafiken und Abbildungen. Copyright © 2013 by Eppendorf AG.