

Detektion von Kontaminationen in DNA und Protein-Proben durch photometrische Messungen

Martin Armbrecht, Eppendorf AG, Hamburg, Germany

Zusammenfassung

Eine Lösung mit dsDNA wurde mit unterschiedlichen Proteinmengen versetzt. Während die Konzentration an dsDNA konstant gehalten wurde, ist die Konzentration an beigefügtem Protein schrittweise erhöht worden. Die DNA/Protein-Gemische wurden anschließend im Eppendorf BioPhotometer® D30 gemessen. Mit der

Funktion „Purity Scan“, welche für Nukleinsäure- bzw. Proteinmessung zur Verfügung steht, wurde der Einfluss einer zunehmenden Proteinverunreinigung in einer DNA-Lösung verfolgt. Zum Vergleich wird auch gezeigt, wie sich wiederum das Absorptionsverhalten von Protein-Proben im Fall einer Kontamination verändert.

Einleitung

Die Aufreinigung von Nukleinsäuren ist eine der Hauptanwendung in einem molekularbiologischen Labor. Ein wichtiger Aspekt für Folgeanwendungen ist die Reinheit bzw. Homogenität der Probe. In der Regel werden Nukleinsäuren über käuflich erwerbliche Kits gewonnen, die es ermöglichen, die meisten anderen Zellbestandteile abzutrennen. Es kann letztendlich aber nicht ausgeschlossen werden, dass sich im Eluat noch Komponenten der Zelle wie Proteine oder andere organische Komponente befinden. Dies hängt auch unmittelbar von der Qualität des verwendeten Kits ab. Wird kein Kit für die Aufreinigung verwendet, besteht zusätzliche Kontaminationsgefahr durch die verwendeten Chemikalien, wie z.B. durch Phenol oder Ethanol aus einer Phenol/Chloroform Extraktion. Bei dieser Aufreinigungsmethode kommt hinzu, dass in der Regel nicht nur die gesuchte Nukleinsäure gewonnen wird, sondern alle in der Zelle befindlichen Nukleinsäuren. So liegt z.B. der RNA-Anteil bei einer klassischen Plasmid-Aufreinigung ohne RNase-Verdau bei 90 % [1]. Um sicherzustellen, dass möglichst wenig Kontaminationen in der gewonnenen Probe zu finden sind, ist es sinnvoll deren Reinheit zu überprüfen, wie z.B. durch spektrometrische Messungen, Fluorimetrie oder auch im Agarose-Gel. Bezogen auf den Aufwand ist sicherlich die zuerst genannte Methode am einfachsten durchzuführen.

Zur photometrischen Bestimmung der Konzentration einer Nukleinsäure-Lösung wird die Absorption bei 260 nm bestimmt. Über einen spezifischen Umrechnungsfaktor wird die Konzentration der gelösten Nukleinsäure über die gemessene Absorption berechnet. Es gelten folgende Umrechnungsfaktoren (UF) bei einer gemessenen Absorption von 1 und einer optischen Schichtdicke der Küvette von 1 cm:

dsDNA \triangleq 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$

RNA \triangleq 40 $\mu\text{g}/\text{mL}$

ssDNA \triangleq 33 $\mu\text{g}/\text{mL}$

Die Konzentration (C) der jeweiligen Nukleinsäure bestimmt man durch die Formel: $C = UF \times A$ (A=Absorption), die aus einer Umstellung des Lambert-Beerschen Gesetz resultiert:

$A = \epsilon \cdot C \cdot d \Leftrightarrow C = 1 / \epsilon \cdot A$. Die optische Schichtdicke kann bei 1 cm direkt mit dem Absorptionskoeffizienten verrechnet werden. Der Umrechnungsfaktor UF ergibt sich aus dem Kehrwert des Absorptionskoeffizienten ($1 / \epsilon = UF$).

Diese Messung bei 260 nm alleine sagt aber noch nichts über die Qualität bzw. Reinheit der Probe aus sondern nur über die Quantität. So gibt es viele andere organische Komponenten wie Proteine, Kohlenhydrate, bestimmte Salze oder aromatische Verbindungen, die ebenfalls wie Nukleinsäuren im UV-Bereich absorbieren (Abbildung 1). Eine bessere Aussage bezüglich der Probenqualität kann durch zusätzliche Messung der Absorption bei 230 nm (Detektion organischer Substanzen) und 280 nm (Detektion von Proteinen und Phenolen) erzielt werden. Aus den Verhältnissen der Absorption bei den Wellenlängen 260 nm zu 280 nm bzw. 260 nm zu 230 nm können klare Aussagen über die Reinheit einer Nukleinsäure-Probe getroffen werden. Für eine reine DNA-Probe gelten folgende Werte:

$$A_{260}/A_{280} = 1,8 - 2,0$$

$$A_{260}/A_{230} \geq 2,0$$

Wie in Abbildung 1 zu erkennen, werden diese Werte reduziert, sofern die Probe durch Proteine oder andere organische Substanzen verunreinigt ist. Dadurch verändert sich auch das Spektrum der DNA-Lösung. In diesem Artikel soll dies anhand eines einfachen Experimentes gezeigt werden, in dem eine Nukleinsäure mit verschiedenen Proteinmengen versetzt wird. Von jeder Probe wird anschließend ein „Purity Scan“ am BioPhotometer D30 aufgezeichnet und der Einfluss zunehmender Verunreinigung durch Proteine sichtbar gemacht.

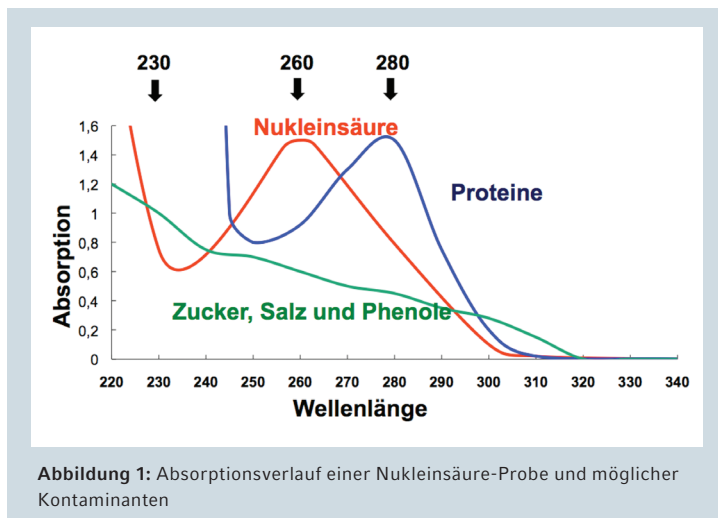
Durchführung

Material

λ -DNA (AppliChem®: A5187,1000), Eppendorf μ Cuvette™ G1.0, Eppendorf BioPhotometer D30, Wasser (AppliChem: A7398,1000), BSA-Lösung in Wasser (2 mg/mL)

100 μ g/mL DNA-Lösungen werden mit gleicher Menge einer Proteinlösung versetzt. Für die Proteinlösungen werden folgende Konzentration eingesetzt: 0 μ g/mL, 250 μ g/mL, 500 μ g/mL, 1000 μ g/mL und 2000 μ g/mL, die aus eine BSA-Stammlösung von 2000 μ g/mL erstellt wurden. Damit lag jeweils eine DNA-Endkonzentration von 50 μ g/mL vor.

Bezüglich der Aufreinigung von Proteinen gibt es im Vergleich zu Nukleinsäuren keine direkten Vorgaben hinsichtlich bestimmter Reinheitsgrade. Kontaminationen lassen sich aber einfach identifizieren, indem man das Absorptionsspektrum einer Protein-Probe betrachtet, wie in dem vorliegenden Artikel an einem Beispiel gezeigt werden soll.



Die Endkonzentration der Proteinlösungen betrug jeweils 0,125, 250, 500 und 1000 μ g/mL.

4 μ L des DNA/Protein-Mix werden auf die Eppendorf μ Cuvette aufgetragen, und mittels der Methode dsDNA_1mm im BioPhotometer D30 gemessen. In den Parametern wurde, um die Veränderung des Absorptionsspektrums mit zunehmender Proteinkonzentration darzustellen, der „Purity Scan“ aktiviert.

Ergebnisse und Diskussion

Die hergestellten DNA/Protein-Gemische wurden mit aufsteigendem Proteingehalt nacheinander gemessen. Die so aufgenommenen Vergleichsspektren sind in Abbildung 2 dargestellt.

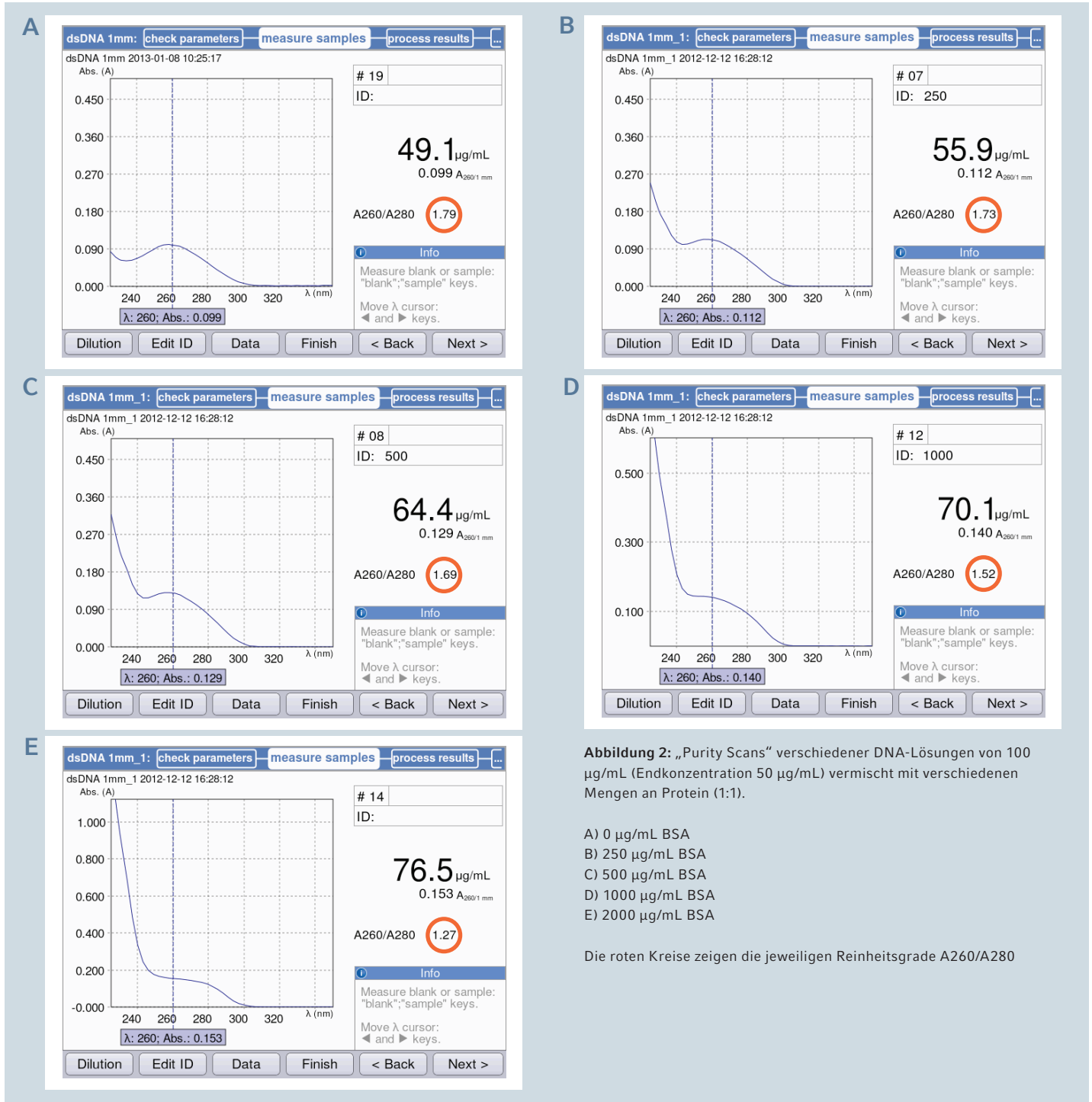


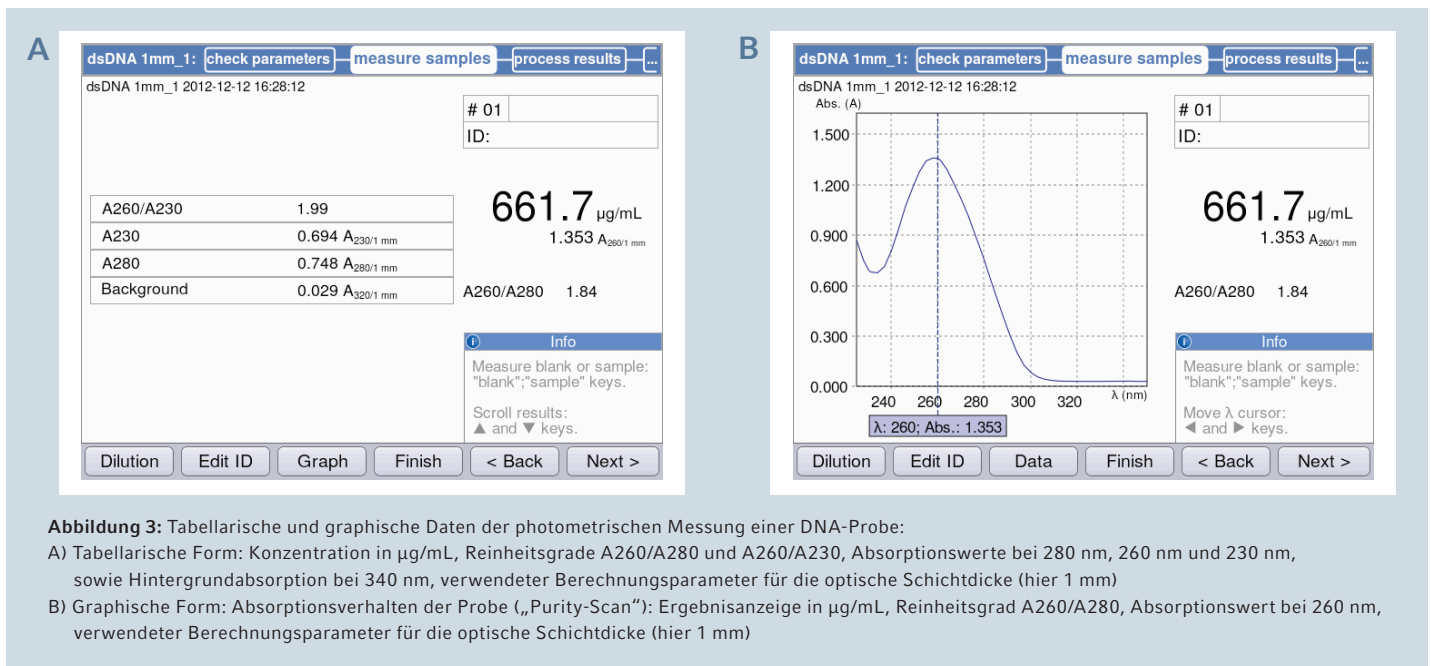
Abbildung 2 zeigt deutlich, dass mit zunehmender Proteinmenge die aufgenommenen Spektren immer mehr von dem typischen Absorptionsspektrum einer DNA-Lösung abweichen.

Generell lässt sich die Reinheit einer DNA-Lösung relativ einfach über die in Abbildung 1 erwähnten Reinheitsverhältnisse beschreiben. Betrachtet man ausschließlich die Reinheitsgrade, kann die Abweichung von den Kontrollwerten auch andere Ursachen haben. So ist, wenn man zum Beispiel die Werte A260/A280 in Abbildung 2A und 2C betrachtet, eine Kontamination der Probe nicht unmittelbar zu erkennen, da die Abweichung beider Werte nicht klar genug ist (1,79 zu 1,69). Die Kontamination wird erst deutlich, wenn die Scans beider Proben miteinander verglichen werden.

Ein verminderter Reinheitsgrad kann eventuell auch darauf zurückzuführen sein, dass die Probe in Wasser statt in Puffer aufgelöst ist. Da Wasser keine Puffer-Eigenschaft

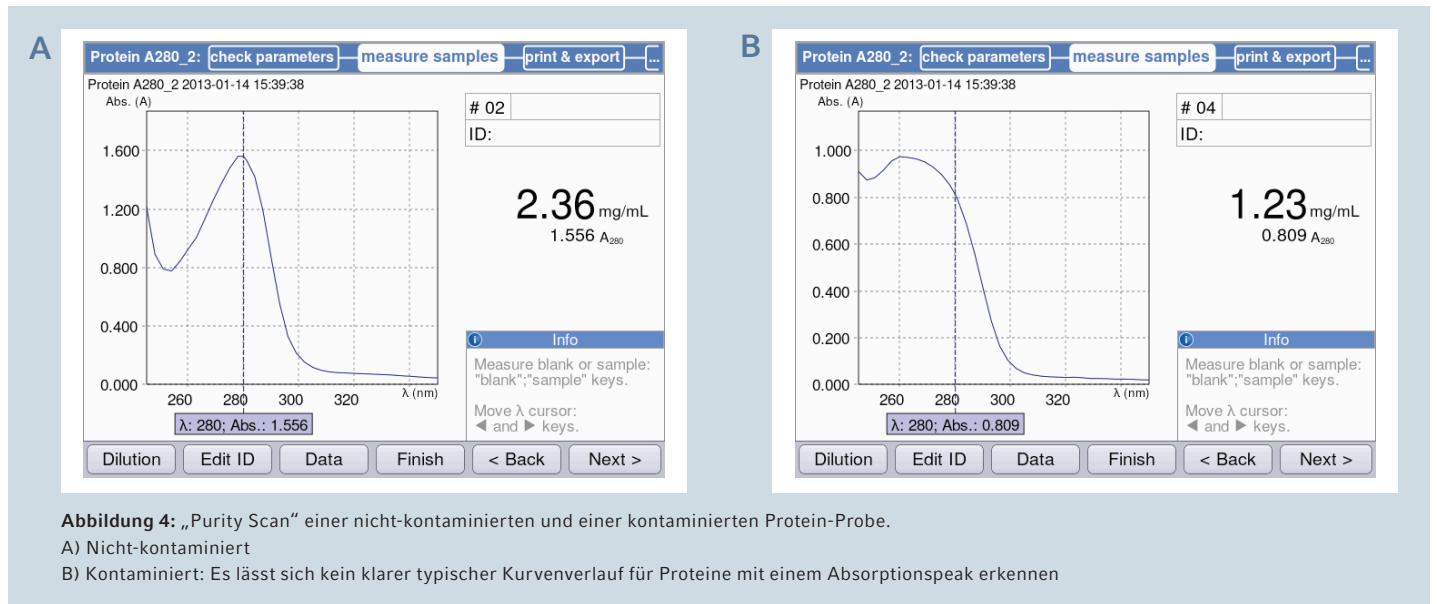
aufweist, hat dies auch Einfluss auf die Struktur des zu messenden Moleküls und somit auf das Absorptionsverhalten einer Probe [1].

Aus diesem Grund kann das BioPhotometer D30 einen „Purity Scan“ aufnehmen, der das Absorptionsverhalten einer Probe graphisch darstellt und somit eine schnelle und einfache visuelle Kontrolle ermöglicht. Darüber hinaus werden tabellarisch alle wichtigen Rohdaten einer DNA-Probe angezeigt (Abbildung 3). In der tabellarischen Form werden optional zusätzlich der Reinheitsgrad A260/A230, die Absorption bei den Wellenlängen 280 und 230 sowie der Wert für die Hintergrundabsorption der Probe bei 340 nm angegeben. Beide Formen der Darstellung ergänzen sich somit perfekt, um die Qualität einer DNA-Probe beurteilen zu können.



Die „Purity-Scan“-Funktion steht darüber hinaus auch bei der Methode „Protein direct“ zur Verfügung. Hier können Proteinkonzentrationen über die direkte Absorptionsmessung bei 280 nm bestimmt werden. Im Vergleich zur DNA-Bestimmung stehen hier keine Standard-Daten bezüglich bestimmter Reinheitsverhältnisse zur Verfügung. In diesem

Fall lassen sich daher Kontaminationen am besten über einen „Purity Scan“ identifizieren (s. Abbildung 4). Im Fall einer Proteinaufreinigung kann man damit am Absorptionsverhalten der Probe einfach und schnell erkennen, ob noch weitere Schritte zur Reinigung notwendig sind.



Fazit

Protein und DNA-Proben lassen sich einfach und schnell am Eppendorf BioPhotometer D30 quantifizieren. Die Ergebnisse sind so übersichtlich dargestellt, dass alle Informationen bezüglich Quantität und Quantität der Probe

werden. Zusätzlich besteht die Möglichkeit, anhand eines optionalen „Purity-Scans“ die ermittelten Daten durch diese Form der optischen Kontrolle abzusichern.

Literatur

[1] Mülhardt, C. Der Experimentator, Spektrum – Akademischer Verlag, Berlin (2003)

Bestellinformationen	Best.-Nr. International	Best.-Nr. Nordamerika
Beschreibung Eppendorf BioPhotometer® D30, 230 V/50 – 60 Hz, weitere Netzanschlussvarianten erhältlich	6133 000.001	
120 V/50-60 Hz, Netzstecker Nordamerika	6133 000.010	6133000010
Eppendorf µCuvette™ G1.0 & BioPhotometer D30 Eppendorf Mikrovolumen-Messzelle und BioPhotometer D30 > 230V/50-60Hz, Netzstecker Europa > 120V/50-60Hz, Netzstecker Nordamerika	6133 000.907	
	6133 000.908	6133000940
Eppendorf µCuvette™ G1.0 Eppendorf Mikrovolumen-Messzelle für Eppendorf BioPhotometer® und Eppendorf BioSpectrometer®	6138 000.018	6138000018
Thermodrucker DPU 414 inkl. Netzteil und Druckerlabel 230 V, EU 115 V/100 V, USA JP 230 V	6131 011.006	
	6131 010.000	952010140
	6131 012.002	
Thermopapier 5 Rollen	0013 021.566	952010409

Your local distributor: www.eppendorf.com/contact

Eppendorf AG · 22331 Hamburg · Germany
 eppendorf@eppendorf.com · www.eppendorf.com

www.eppendorf.com

AppliChem ist eine eingetragene Marke der AppliChem GmbH, Darmstadt.
 Eppendorf®, das Eppendorf Logo, Eppendorf BioPhotometer® und Eppendorf BioSpectrometer® sind eingetragene Marken der Eppendorf AG, Hamburg, Germany.
 Eppendorf µCuvette™ ist eine Marke der Eppendorf AG, Hamburg, Germany. Alle Rechte vorbehalten, einschließlich Grafiken und Bilder. Copyright © 2013 by Eppendorf AG.