

Methodensammlung der Bund/Länder-Arbeitsgemeinschaft Gentechnik	
<b>Extraktion von Virus-DNA</b>	<b>AM013</b>
Erstellt vom Unterausschuss Methodenentwicklung der LAG, März 2003	
Status: verabschiedet	

## 1. Zweck und Anwendungsbereich

Diese Methode beschreibt ein Routineverfahren zum Extrahieren von Virus-DNA aus Flüssigkeiten auf Basis des QIAamp® DNA Mini Kits der Firma QIAGEN. Mit dieser Methode kann Virus-DNA (getestet für Vacciniaviren) aus Flüssigkeiten (zum Beispiel: Wischprobe) extrahiert werden. Die extrahierte DNA ist nach diesem Prozess direkt für PCR (Polymerase Ketten Reaktion) Anwendungen benutzbar.

## 2. Kurzbeschreibung

Nach einem Verdau der viralen Hüllproteine mit Proteinase K, wird die reigewordene DNA während eines Zentrifugationsschrittes an eine Silikagelmembran einer Spinnsäule gebunden (Festphasenextraktion). Die gebundene DNA wird in der Folge in zwei Schritten von kontaminierenden Stoffen gereinigt und mit einem kleinen Volumen Extraktionspuffer eluiert. Da bei den meisten zu untersuchenden Proben, wenn überhaupt, mit nur geringsten Mengen an Viren zu rechnen ist, wird zu Beginn 1µg einer sogenannten „Carrier“-DNA (Sonicated Hering Sperm DNA) hinzugefügt, um die DNA-Extraktionsverluste durch unspezifische feste Bindungen zu verringern.

## 3. Material

### 3.1 Geräte

Kunststoff- und Glasmaterialien müssen vor der Verwendung sterilisiert werden. Die Verwendung von aerosolgeschützten Pipettenspitzen dient als Schutz vor Kontamination.

- Mikrozentrifuge
- Vortex-Mischgerät
- Thermomixer (z.B. *Comfort* der Firma Eppendorf mit Wechselblock für 1,5 ml)
- Eppendorfröhrchen
- Sterile Werkbank
- diverse Kolbenhubpipetten
- Latexhandschuhe
- Plastikverbrauchsmaterial
- aerosolgeschützte Pipettenspitzen (diverse)
- diverse Reaktionsgefäße (Eppendorfröhrchen)

### 3.2 Reagenzien

Es sind grundsätzlich analysenreine, für die Zellkultur und die Molekularbiologie geeignete Reagenzien zu verwenden.

- **QIAamp® DNA Mini Kit (QIAGEN)**
- Ethanol
- steriles bidestilliertes Wasser
- 1M Tris-HCl pH 7,6
- 0,5 M EDTA pH 8,0
- Sonicated Hering Sperm DNA

### 3.3 Lösungen

- **0,1 mg/ml Sonicated Hering Sperm DNA in TE-Puffer**
- **TE-Puffer:** 10 mM Tris-HCl pH 7,6; 1 mM EDTA  
Herstellung: (40 ml) 400µl 1M Tris-HCL pH 7,6 80µl 0,5 M EDTA pH 8,0 auf 40ml mit sterilem bidestilliertem Wasser ergänzen (in graduiertem 50ml Reaktionsgefäß mit verschraubbarem Deckel)

### 4. Durchführung

- Proben auf Raumtemperatur bringen
- Themomixer auf 56°C vorheizen
- pro Probe wird ein 1,5ml Reaktionsgefäß vorbereitet (klar beschriftet)
- 20µl Proteinase K Lösung (QIAamp® DNA Mini Kit) zu jedem Reaktionsgefäß pipettieren
- 10µl Sonicated Hering Sperm DNA-Lösung zu jedem Reaktionsgefäß pipettieren
- 200µl jeder Probe in das jeweilige vorbereitete Reaktionsgefäß geben und durch Pipettieren mit den zwei vorgelegten Lösungen mischen
- 200µl des Puffers AL (QIAamp® DNA Mini Kit) zugeben, das Reaktionsgefäß verschließen und während 15 Sekunden mit dem Vortex-Mischgerät mischen
- 10 Minuten bei 56°C im Thermomixer inkubieren
- 5 Sekunden bei 8000 rpm zentrifugieren (um Flüssigkeit aus dem Deckel des Reaktionsgefäßes zu entfernen und beim Öffnen Kontaminationen zu vermeiden)
- 200µl Ethanol zugeben, das Reaktionsgefäß verschließen und während 15 Sekunden mit dem Vortex-Mischgerät mischen
- 5 Sekunden bei 8000 rpm zentrifugieren
- Gemisch vorsichtig auf eine zuvor beschriftete Spinnsäule mit 2ml Auffangröhrchen (QIAamp® DNA Mini Kit) geben, Säule mit Deckel verschließen
- Spinnsäule zusammen mit dem 2ml Auffangröhrchen (QIAamp® DNA Mini Kit) während 1 Minute bei 6000 x g (8'000 rpm) zentrifugieren.
- Spinnsäule in ein neues 2ml Auffangröhrchen (QIAamp® DNA Mini Kit) stellen, vorheriges 2ml Auffangröhrchen inklusive Flüssigkeit verwerfen, Deckel der Spinnsäule vorsichtig öffnen und 500µl des Puffers AW1 (QIAamp® DNA Mini Kit) zugeben

- Spinnsäule verschließen und mit Auffangröhrchen während 1 Minute bei 6000 x g (8'000 rpm) zentrifugieren.
- Spinnsäule in ein neues 2ml Auffangröhrchen (QIAamp® DNA Mini Kit) stellen, vorheriges 2ml Auffangröhrchen inklusiv Flüssigkeit verwerfen, Deckel der Spinnsäule vorsichtig öffnen und 500µl des Puffers AW2 (QIAamp® DNA Mini Kit) zugeben
- Spinnsäule verschließen und mit Auffangröhrchen während 3 Minuten bei 20000 x g (13500 rpm) zentrifugieren
- Spinnsäule vorsichtig in ein neues, beschriftetes 1,5ml Reaktionsgefäß stellen, vorheriges 2ml Auffangröhrchen inklusive Flüssigkeit verwerfen, Deckel der Spinnsäule vorsichtig öffnen und 50µl des Puffers AE (QIAamp® DNA Mini Kit) zugeben (Puffer muss direkt auf die Membran in der Mitte der Spinnsäule getropft werden), 1 Minute stehen lassen
- Spinnsäule verschließen und mit dem 1,5ml Reaktionsgefäß während 1 Minute bei 6000 x g (8000 rpm) zentrifugieren
- Spinnsäule aus Reaktionsgefäß entfernen und wegwerfen, Reaktionsgefäß mit DNA-Extrakt verschließen und bei -20°C aufbewahren

#### 4.1 Hinweise zur Qualitätssicherung

In jeder Extraktionsreihe müssen folgende Kontrollen mitgeführt werden:

- eine **Negativkontrolle** zum Feststellen von Kreuzkontaminationen: Anstatt einer Probe wird 200µl eines nicht kontaminierten Puffers (zum Beispiel PBS) durch das Extraktionsprotokoll geführt.
- eine **Positivkontrolle** zum Überprüfen der Funktionsfähigkeit des Extraktionsverfahrens (z.B. eine schon gemessene Probe, welche *Vaccinia Viren* enthält).

Wenn die Kontrollen nicht das gewünschte Resultat ergeben, müssen die Resultate dieser Versuchsreihe verworfen und die Untersuchung, allenfalls nach Durchführung geeigneter Maßnahmen wiederholt werden.

#### 5. Ringversuch

Im Jahr 2002 wurde diese Methode durch den Unterausschuss „Methodenentwicklung“ des LAG in einem Ringversuch validiert, an dem insgesamt 6 bundesdeutsche und ein Schweizer Überwachungslabor teilnahmen.

Alle 7 Laboratorien wendeten die vorliegende Methode „**mit Erfolg**“ an.

Jeder Teilnehmer sollte fünf codierte Proben mit verschiedenen Mengen an rekombinanten und Wildtyp-Vacciniaviren auf das Vorhandensein von viraler DNA hin untersuchen. Die Isolierung und Darstellung der viralen DNA wurde von allen beteiligten Laboren erfolgreich durchgeführt.

Diese Methode beruht auf einer Standard Arbeitsanweisung (SOP) des kantonalen Laboratoriums Basel-Stadt (SOP P221), deren Entwicklung finanziell durch das Schweizer Bundesamt für Umwelt, Wald und Landschaften (BUWAL) unterstützt wurde.

## **6. Literatur**

**Offizielle Anleitung zum Gebrauch des QIAamp® DNA Mini Kits der Firma QIAGEN**  
(Januar 1999)

**Ausubel F.M., Brent R., Kingston R.E., Moore D.D., Seidman J.G., Smith J.A. and Struhl K.**

(1992) Short protocols in molecular biology, second edition, *Published by Green Publishing Associates and John Wiley & Sons*, New York, ISBN 0-471-57735-9.