

## DNA Extraktion aus Insekten zur Bestimmung des *Wolbachia* Befalls

### Ziele:

- Isolation genomischer DNA aus identifizierter Insekten Spezies
- Isolation von genomischer DNA aus mit *Wolbachia* infizierten *Drosophila* als positive Kontrolle
- Isolation von genomischer DNA aus nicht infizierten *Drosophila* als negative Kontrolle

Sie isolieren totale genomische DNA **zu zweit** aus:

- 2 gefangenen, identifizierten Insekten
- einer positiven Kontrolle
- einer negativen Kontrolle

### Zell Lyse und Isolation genomischer DNA:

- Nach der Durchführung des jeweiligen Schrittes in der Anleitung hacken Sie den Bullet Point jeweils ab (erhöht Sicherheit bzgl. Korrekter Durchführung).
- Geben Sie in vier Eppendorf Tubes je 180 µl ATL Puffer (Lysis Buffer) und beschriften Sie die Tubes (1-4)
- Geben Sie je 20 µl Proteinase K (zerstört aus dem Insekt austretende DNase die DNA hydrolysiert) in das Tube 1-4
- Geben Sie jeweils ein ganzes getrocknetes (ohne Ethanol) Insekt der positiven (Tube 3) respektive der negativen Kontrolle (Tube 4) in das entsprechende Tube.
- Schneiden Sie ein ca. 2mm<sup>2</sup> grosses Stück aus dem Abdomen (möglichst Ovar oder Hoden) von Test Insekt A in Tube 1 und von Test Insekt B in Tube 2. (Achten Sie auf sauberes Arbeiten, Sezierwerkzeug immer zwischen Sektion reinigen)
- Homogenisieren Sie das Gewebe in Tube 1-4 mit jeweils einem Eppendorf Homogenisier Pistill (versichern Sie sich, immer gereinigte Pistille resp. frische Pipettenspitzen zu verwenden).
- Geben Sie je 200 µl AL Puffer (Lysis Buffer) zu Tube 1-4.
- Vortexen Sie 10 Sekunden
- Inkubieren Sie die Tubes während 10 Minuten bei 56°C
- Geben Sie je 200 µl Ethanol (95-100%) zu Tube 1-4.
- Vortexen Sie 15 Sekunden
- Zentrifugieren Sie 15 Sekunden (=spin)
- Nehmen Sie vier DNeasy Mini Spin Columns („Säule“) und beschriften Sie die Tubes und die Säulen (1-4). Pipettieren Sie den Inhalt von Tube 1-4 (ohne Exoskelett Stücke am Tubeboden) auf die Säulen 1-4 (Auf korrekte Nummern achten ;)).
- Zentrifugieren Sie 1 min bei 6000 x g (8000 rpm). Die genomische DNA haftet jetzt auf der Säule
- Leeren Sie die durchzentifugierte Flüssigkeit aus und setzen Sie die Säulen zurück ins leere Tube, geben Sie je 500 µl Waschpuffer AW1 auf die Säulen
- Zentrifugieren Sie 1 min bei 6000 x g (8000 rpm)
- Leeren die durchzentifugierte Waschflüssigkeit aus und setzen Sie die Säule zurück ins leere Tube, geben Sie 500 µl Waschpuffer AW2 auf die Säule
- Zentrifugieren Sie 1 min bei 20000 x g (14000 rpm = max. speed)
- Setzen Sie die Säule auf ein neues, sauberes, nummeriertes und mit Ihrem Namen beschriftetes Eppendorf Tube
- Eluieren Sie die DNA indem sie 200 µl AE Puffer auf die Membran der Säule geben, 1 Minute bei RT inkubieren, und danach bei 6000 x g (8000 rpm) 1 Minute zentrifugieren. Die Säule können Sie danach fortwerfen. Im Tube ist nun die genomische DNA.
- Die Lösung mit der aufgereinigten, genomischen DNA muss bei -20°C bis zur PCR Analyse aufbewahrt werden.