



Vergleich von DNA-Extraktionsmethoden im Hinblick auf Wirksamkeit und Wiederfindung - "manuell" versus "Spex 2050 Genomax®"

SPEX Sample Prep / C3 Prozess- und Analysetechnik GmbH

Die Möglichkeit, biologisches Gewebe effektiv zu homogenisieren und Zellen zu lysieren, ist unerlässlich, um Nukleinsäuren in ausreichender Qualität und Menge für DNA- und RNA-Studien zu gewinnen. Darüber hinaus erfordern viele Proben eine Homogenisierung oder Partikelgrößenreduzierung, um repräsentative Proben zu erstellen, normalerweise aufgrund ihrer allgemein heterogenen Natur oder ihres heterogenen Zustands bei Anlieferung an das Labor. Homogenität ist der Zustand einer einheitlichen Zusammensetzung der gesamten Probe, während Heterogenität in einem oder mehreren Merkmalen keine Einheitlichkeit aufweist.

Labor- oder Analyseproben müssen in eine Form gebracht werden, die eine Extraktion, Verarbeitung oder enzymatische Verdauung für weitere Tests ermöglicht. Bei biologischen Proben kann eine Homogenisierung die Verarbeitung beschleunigen, indem das biologische Gewebe zerstört und die Zellen lysiert werden, wodurch die Extraktion von genetischem Material ermöglicht wird. Die gebräuchlichste Methode zum Erhalten einer homogenen Probe ist das Mahlen oder Zerkleinern, was zu einer Erhöhung der Genauigkeit und einer Verringerung der Unsicherheit führt.

In vielen Labors sind manuelle oder halbautomatische Methoden zur Gewebeverarbeitung gebräuchlich, die zeitaufwändig sein können und zu Proben führen, die nicht vollständig homogenisiert sind. Die Implementierung einer automatisierten Homogenisierung und Verarbeitung ermöglicht einen höheren Probendurchsatz sowie eine schnellere und verbesserte Gewinnung von DNA/RNA aus biologischen Materialien.

Diese Studie wird die Effizienz der Verwendung eines automatisierten Homogenisierungsverfahrens inklusive Zeitersparnis sowie einer Verbesserung bei der Gewinnung und Extraktion von genetischem Material demonstrieren. In früheren Studien mit dem Spex Geno/Grinder® wurde festgestellt, dass die Pestizidextraktion aus Agrar- und Umweltprodukten die Ausbeute stark erhöht, während die Verarbeitungszeit für die Probenvorbereitung erheblich verkürzt wurde.

In dieser neuen Studie (einem gemeinsamen Projekt von Spex und HoppeSyler Inc., Kanada) wurde die manuelle Probenvorbereitung dem automatisierten Spex 2050 Genomax gegenübergestellt, um biologische Gewebe zur Isolierung genomischer DNA (gDNA) aufzuschließen. Die isolierte gDNA wurde dann für nachgelagerte Anwendungen verwendet, um die Wirksamkeit von manuellen gegenüber automatisierten Homogenisatoren für den Einsatz in der analytischen und molekularbiologischen Forschung zu bestimmen.

Material und Methoden

Der Arbeitsablauf konzentrierte sich auf 3 Prozesse:

1. Gewebekomogenisierung
2. DNA-Extraktion
3. DNA-Isolierung

Gewebekomogenisierung

60mg frisches Gewebe wurden zu 500µl DNA-Bindungspuffer und 20µl Proteinase K (20mg/ml) aus dem Spex DNAmix „Animal Genomic DNA Isolation Kit“ hinzugegeben. Die Homogenisierung und Verarbeitung der Gewebe wurde gemäß Herstellerprotokoll durchgeführt. Die Proben wurden anschließend für 15 Minuten bei 55°C unter leichtem Schütteln bei 700 U/min inkubiert. Nach dem Proteinase-K-Verdau wurden 20µl RNase A zum Lysat hinzu pipettiert und die Probe fünf Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Abschließend wurde 200µl Ethanol (95%) zugegeben und das Lysat mittels Vortexer fünf Sekunden lang gemischt.

DNA-Extraktion und Waschen der Säule

Nach dem Vortexen wurden 700µl des Lysats auf die mit dem DNAmix-Kit gelieferte Silika-Zentrifugationssäule geladen und bei 13.000 x g für eine Minute bei Raumtemperatur zentrifugiert, der Durchfluss wurde verworfen. 500µl Waschpuffer A (mit zugesetztem Ethanol) aus dem Kit wurden auf die Säule gegeben und diese erneut drei Minuten lang zentrifugiert. Der resultierende Durchfluss wurde verworfen.

DNA-Isolierung und Elution

Die Säule wurde eine weitere Minute zentrifugiert und das Sammelröhrchen anschließend verworfen. Zur Säule wurden 100µl EB- oder TE-Puffer (pH 8,0) hinzugefügt und diese drei Minuten lang bei Raumtemperatur lagernd inkubiert. Im Anschluss wurde erneut eine Minute lang zentrifugiert. Das Eluat, welches die gereinigte gDNA enthielt, wurde zur Analyse und qPCR gesammelt.

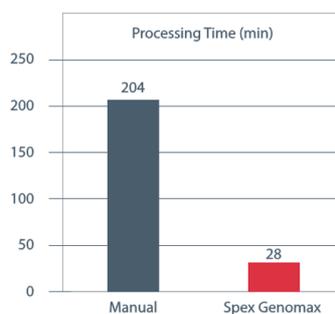


Abbildung 1: Zeitbedarf für gDNA-Homogenisierung, Vergleich zwischen manueller und automatisierter Aufreinigung mittel SPEX Genomax

Manuell versus Genomax: Isolierung und Rückgewinnung von Nukleinsäuren

Im ersten Teil der Studie wurden zum Vergleich des manuellen und automatisierten Verfahrens Proben verschiedener tierischer Gewebe (Rinderlende, Hühnerbrust und Mausherz) verarbeitet, um daraus gDNA zu homogenisieren, zu extrahieren und zu isolieren. Proben, die mit manueller Homogenisierung verarbeitet wurden, zeigten im Durchschnitt Verarbeitungszeiten von über 200 Minuten im Vergleich zu weniger als 30 Minuten Verarbeitungszeit mit dem Spex Genomax (Abbildung 1). Die Verarbeitungszeit wird mit den automatisierten Genomax-Methoden um über 86 % verkürzt.

Drei Arten von tierischem Gewebe (Rinderlende, Hähnchenbrust und Mausherz) wurden hinsichtlich der Qualität und Quantität des gewonnenen genetischen Materials verglichen. Rinderlende und Hühnerbrust repräsentieren tierisches Muskelgewebe unterschiedlicher Dichte. Mausherz stellt faseriges tierisches Organgewebe dar, das schwer zu homogenisieren ist. Dichte und faserige Gewebe sind am schwierigsten zu homogenisieren und produzieren die geringsten Mengen an gewinnbarer gDNA. Nach der Verarbeitung mit manuellen Methoden und dem Genomax wurde die gDNA isoliert und mittels UV/VIS-Spektroskopie auf Konzentration getestet (Abbildung 2).

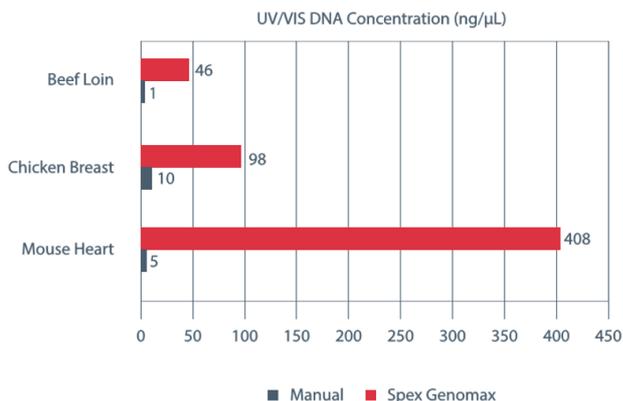


Abbildung 2: DNA-Gewinnung aus verschiedenen tierischen Geweben mit manuellen Methoden und dem SPEX Genomax

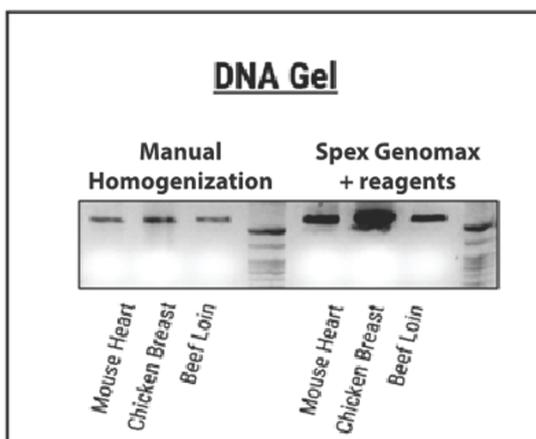


Abbildung 3: Gelelektrophorese von DNA, manuelle bzw. Aufreinigung mittels SPEX Genomax

Manuelle Methoden führten häufig zu einer unvollständigen Extraktion und Isolierung von DNA, während die automatische Homogenisierung mit dem Genomax eine vollständige Homogenisierung und effiziente Extraktionen ergab, wie in den Elektrophorese-Gelen zu sehen ist (Abbildung 3).

In einer weiteren Analyse zu dieser ersten Studie wurden 30 mg Mausherz unter Verwendung eines handelsüblichen manuellen Homogenisators im Vergleich zum Spex Genomax homogenisiert. Das Mausherz wurde mit dem manuellen Homogenisator gemäß den Empfehlungen des Herstellers homogenisiert, während das Gewebe im Genomax mit drei Homogenisierungszyklen bei 1.500 U/min für 1 Minute pro Zyklus mit einer Pause von 20 Sekunden zwischen den Zyklen homogenisiert wurde. Die DNA wurde mit den Spex DNAmix-Kits isoliert und für die qPCR-Analyse unter Verwendung von Primern vorbereitet, die den Maus-Ost β -Promotor oder den Hic1-Gen-Locus umfassen. Jede Analyse wurde doppelt durchgeführt. Es wurde eine 35-fache Ausbeutesteigerung beim Genomax im Vergleich zur manuellen Homogenisierung festgestellt.

Tatsächlich erzeugten die Genomax-Proben bei jeder Probengröße (0,25 μ l bis 1 μ l isolierte gDNA) stärkere Signale als die mit dem Homogenisator isolierte gDNA bei einer eingesetzten Probenmenge von 1 μ l (Abbildung 4).

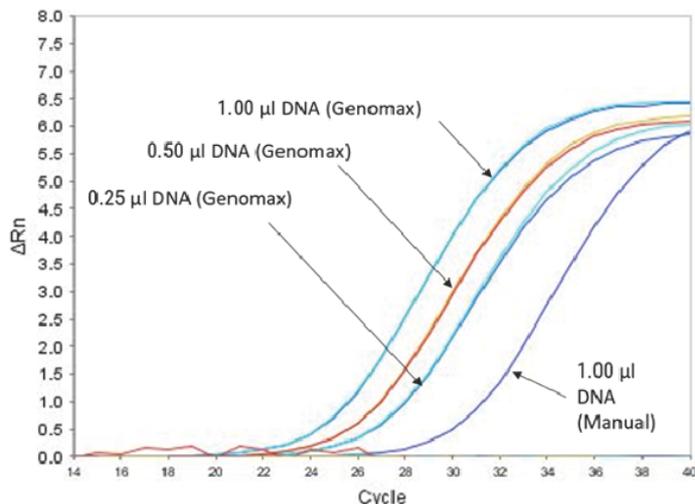


Abbildung 4: Replikation des β -Promotors für den Transport von organischen gelösten Stoffen aus der Maus. Chromosom 9, 65330248 - 65330323 (75 Basenpaare) nach Genomax- bzw. manueller Aufreinigung

Die Amplifikation von Zielgenen bei Verwendung kleinerer Mengen an gDNA (0,25 μ L und 0,5 μ L) erwies sich mit dem Genomax als erfolgreich, während die durch manuelle Aufreinigung isolierte gDNA kein Signal erzeugte (Abbildung 5).

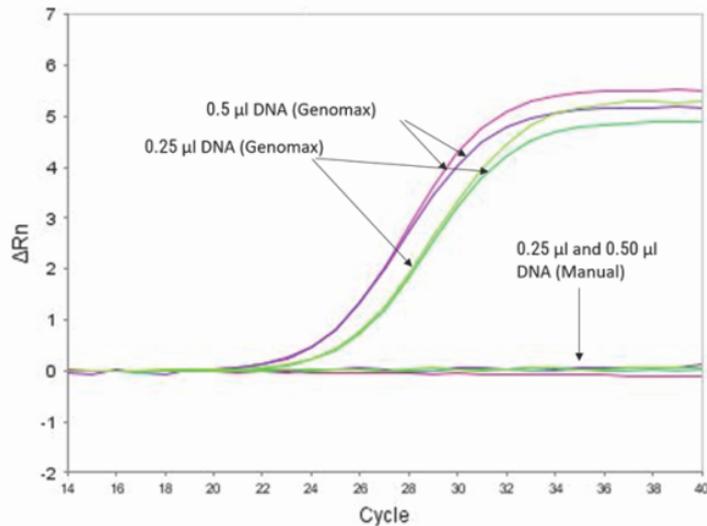


Abbildung 5: Amplifikation nach Genomax- bzw. manueller Aufreinigung eines geringen Probenvolumens von qDNA aus Mäusen, die in Krebs-1-Genlocus hypermethyliert sind. Chromosom 11, 75058091 – 75058200 (109 Basenpaare).

Zusammenfassung

Die Automatisierung der Homogenisierung und Zellyse erhöht die Effizienz des Prozesses sowohl in Bezug auf die Zeit als auch auf die resultierende gDNA-Extraktion. In Qualität, Quantität und amplifizierter Menge der Ziel-gDNA ist die Verwendung des SPEX Genomax manuellen Verfahren deutlich überlegen, insbesondere in Kombination mit den Spex DNAmx-Extraktionskits. Insgesamt wird die Zeit zur Verarbeitung der Proben mit dem Genomax stark auf weniger als eine halbe Stunde reduziert und es werden mehr replizierbare Kopien des genetischen Materials bei geringeren Probenvolumina erzielt.