

# Extraktion hochmolekularer genomischer DNA aus Bakterien: Vergleich der Phenol-Chloroform-Extraktionsmethode mit vier kommerziellen Extraktionskits

Cornelia, Berger, BMA 17-20 A

Bildungsgang Biomedizinische Analytik HF

Next Generation Sequencing Plattform, Institut für Genetik der Universität Bern

## 1. Zusammenfassung

Mit der Next Generation Sequencing-Technologie können ganze Genome oder Teile davon in kurzer Zeit vollständig sequenziert werden. Aufgrund der Weiterentwicklung vom 2nd zum Third Generation Sequencing ist die Nachfrage nach langen und intakten DNA-Molekülen gestiegen. Hochmolekulare genomische DNA ist essenziell für das mikrobielle Multiplexing mit der single-molecule real-time Sequenzierung vom PACBIO® Sequel System.

Die Phenol-Chloroform-Extraktionsmethode ist der Goldstandard für die Isolation von hochmolekularer genomischer DNA. Auf dem Markt gibt es mittlerweile diverse kommerzielle Extraktionskits, welche einfacher und schneller in der Durchführung sind. Mit der Diplomarbeit soll eruiert werden, welches der getesteten kommerziellen Extraktionskits vergleichbare Ergebnisse wie der Goldstandard liefert und die Richtlinien von PACBIO® erfüllt. In Abhängigkeit der Bakterienart liefern die getesteten kommerziellen Extraktionskits unterschiedliche Ergebnisse, da die Extraktion von DNA teilweise schwierig ist. Überzeugen kann das DNeasy® UltraClean® Microbial Kit, welches für beide Bakterienarten gute Ergebnisse liefert.

## 2. Einleitung

Die Extraktion von Nukleinsäuren ist der Ausgangspunkt jeder molekularbiologischen Forschung bzw. Analyse und somit ein entscheidender Prozess [1], insbesondere für die Next Generation Sequencing Technologie (NGS). Damit können z.B. Mutationen in der DNA charakterisiert sowie Genexpressionen und Genkopien quantifiziert werden [2]. Beim 2nd Generation Sequencing werden kurze DNA-Fragmente von max. einigen hundert Basenpaaren (bp) Länge sequenziert. Mit dem Third Generation Sequencing, zu dem die single-molecule real-time Sequenzierung (SMRT) vom PACBIO® Sequel System gehört, können Leselängen im Bereich von mehreren Kilobasenpaaren (kb) erreicht werden [3].

### SMRT-Technologie und mikrobielles Multiplexing

Bei der SMRT-Technologie sind Quantität und Qualität der DNA sehr wichtig, weshalb nach der Extraktion eine Qualitätskontrolle durchgeführt werden muss in Bezug auf Konzentration, Reinheit, Grösse und Integrität. Essenziell ist hochmolekulare genomische DNA (HMW gDNA), bedeutet möglichst intakte und wenig fragmentierte DNA-Moleküle.

Mit dem mikrobiellen Multiplexing kann eine grosse Anzahl an Libraries gleichzeitig in einem Probendurchlauf sequenziert werden.

Tabelle 1: Quantitäts- und Qualitätsanforderungen für das mikrobielle Multiplexing

Quantitäts- und Qualitätskriterium	Anforderung
Initiale Probenkonzentration und Volumina zum Scheren	1 µg in 100 µL[4]
Reinheit	Ratio A260/A280: ~1.8 – 2.0 Ratio A260/A230: ≥2.0[5]
Grösse vor dem Scheren	≥20'000 Basenpaare (bp)[6]
Grösse nach dem Scheren	10'000 – 15'000 bp[5]
Integrität	Wenig fragmentiert

## 3. Ziel und Fragestellung

Ziel der Diplomarbeit ist die Extraktion von hochmolekularer genomischer DNA aus Bakterienzellen und die Evaluation, welches der getesteten kommerziellen Extraktionskits die Richtlinien von PACBIO®, verglichen mit dem Goldstandard, erfüllt.

### Fragestellung 1:

Welches der getesteten Extraktionskits (MagAttract® HMW DNA Kit, DNeasy® UltraClean® Microbial Kit, QIAGEN® Genomic-tip 20/G, Nanobind CBB Big DNA Kit) liefert die erforderliche Grösse und Integrität der gDNA im Vergleich mit der Phenol-Chloroform-Extraktionsmethode?

### Referenzen

- [1] Dairawan, M., & Shetty, P. J. (2020). The Evolution of DNA Extraction Methods. American Journal of Biomedical Science & Research, 8(1), 39-45. Abgerufen von <https://biomedgrid.com/pdf/AJBSR.MS.ID.001234.pdf>
- [2] Lu, Y., Shen, S., Warren, W., & Walter, R. (2016). Next Generation Sequencing in Aquatic Models. Next Generation Sequencing – Advances, Applications and Challenges, 2016. Abgerufen von <https://www.intechopen.com/books/next-generation-sequencing-advances-applications-and-challenges/next-generation-sequencing-in-aquatic-models>
- [3] Uniklinik RWTH Aachen. (Abgerufen am 28.04.2020). Third Generation Sequencing – Nanopore Sequenzierung. Abgerufen von <https://www.ukaachen.de/kliniken-institute/institut-fuer-humangenetik/forschung/third-generation-sequencing-nanopore-sequenzierung.html>
- [4] PACBIO®. (2020). Procedure & Checklist – Preparing Multiplexed Microbial Libraries Using SMRTbell® Express Template Prep Kit 2.0. Abgerufen von <https://www.pacb.com/wp-content/uploads/Procedure-Checklist-%E2%80%93-Preparing-Multiplexed-Microbial-Libraries-Using-SMRTbell-Express-Template-Prep-Kit-2.0.pdf>
- [5] PACIFIC BIOSCIENCES®. (2019). Multiplexed Microbial Library Preparation Using SMRTbell Express Template Prep Kit 2.0. Sequel System v6.0 / Sequel Chemistry 3.0 / SMRT Link v8.0 / Sequel II System v8.0 / Sequel II Chemistry 2.0 / SMRT Link v8.0 (Präsentation). Abgerufen von <https://www.pacb.com/wp-content/uploads/SMRTbell-Express-TPK-2.0-Overview-Multiplexed-Microbial-Library-Prep-Customer-Training.pdf>
- [6] PACIFIC BIOSCIENCES®. (2019). SMRT Technology & Sequel System Overview: Sequel System v6.0 / Sequel Chemistry v3.0 / SMRT Link v8.0. (Präsentation).

### Abbildungen

Hintergrundbild Serlo. (abgerufen am 03.06.2020). DNA – Was ist das?. Abgerufen von <https://de.serlo.org/biologie/genetik-gentechnik/molekulargenetik/dna-ist>

Abb. 1 Berger, C. (2020). Arbeitsablauf zur Extraktion von HMW gDNA. Bern: medi

Abb. 2 Berger, C. (2020). Durchschnittliche Fragmentlänge der gDNA in bp, gemessen mit der Pulsfeld-Kapillarelektrophorese mit dem FEMTO Pulse®, isoliert von *Enterobacter cloacae* und *Staphylococcus pseudintermedius*. Bern: medi

### Tabellen

Tabelle 1 Basierend auf den Referenzen [4], [5] und [6]

Tabelle 2 Berger, C. (2020). Integrität der gDNA, gemessen mit der Pulsfeld-Kapillarelektrophorese mit dem FEMTO Pulse®, isoliert von *Enterobacter cloacae* und *Staphylococcus pseudintermedius*. Bern: medi

## 4. Material, Methodik, Vorgehen

Der Arbeitsablauf war immer derselbe und ist in Abbildung 1 dargestellt.

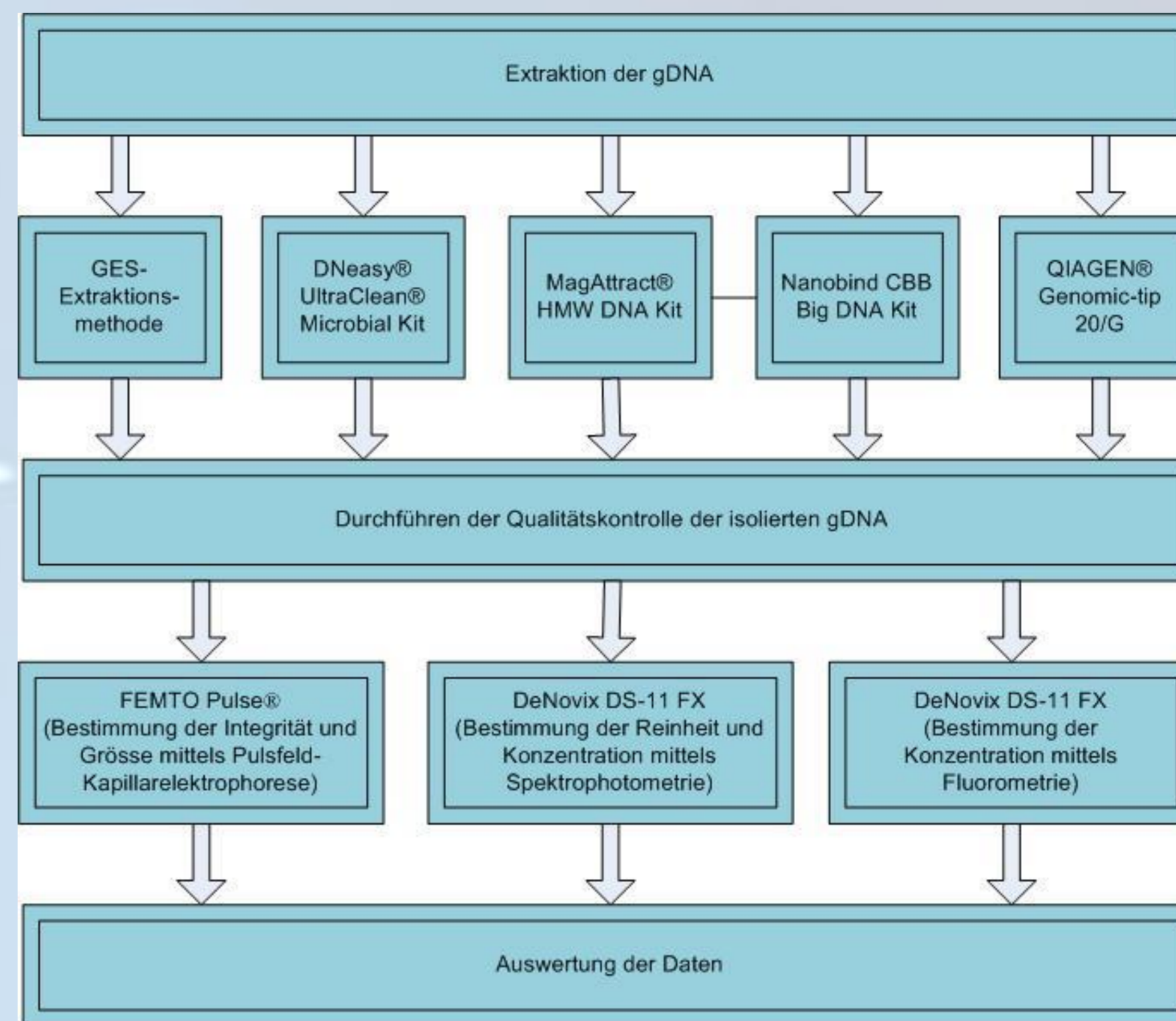


Abb. 1: Arbeitsablauf zur Extraktion von HMW gDNA.

### Stichprobe

Die Stichprobe betrug n = 2  
1 gram-positives Bakterium (*Staphylococcus pseudintermedius*)  
1 gram-negatives Bakterium (*Enterobacter cloacae*)

### Material

- Beim DNeasy® UltraClean® Microbial Kit wurden die mitgelieferten Tubes verwendet.
- Bei allen anderen Extraktionsmethoden wurden DNA LoBind Tubes von Eppendorf verwendet.
- Zum Pipettieren wurden normale Spitzen von Gilson verwendet.

## 5. Ergebnisse/ Resultate

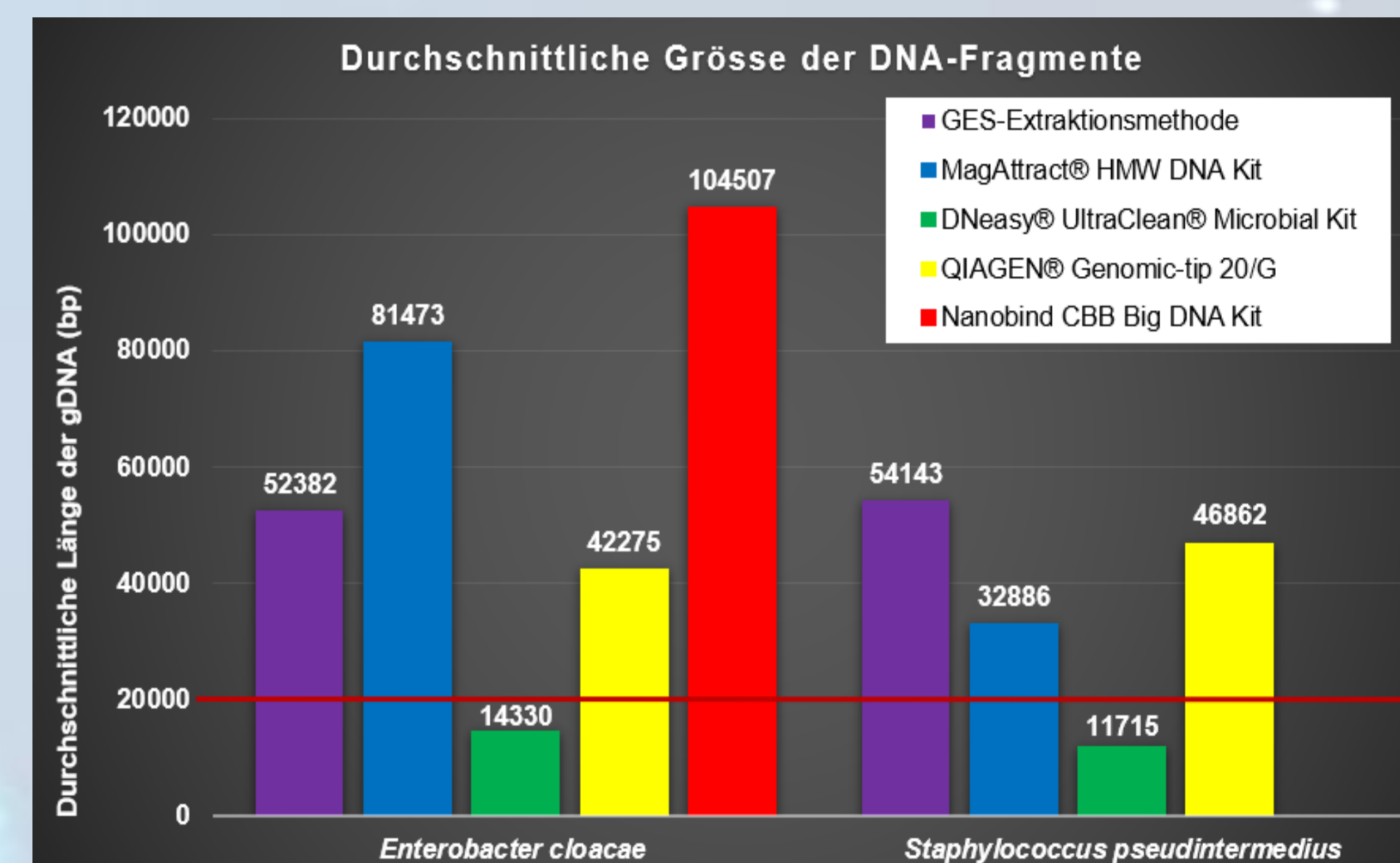


Abb. 2: Durchschnittliche Fragmentlänge der gDNA in bp, gemessen mit der Pulsfeld-Kapillarelektrophorese mit dem FEMTO Pulse®, isoliert von *Enterobacter cloacae* und *Staphylococcus pseudintermedius*.

Tabelle 2: Integrität der gDNA, gemessen mit der Pulsfeld-Kapillarelektrophorese mit dem FEMTO Pulse®, isoliert von *Enterobacter cloacae* und *Staphylococcus pseudintermedius*.

Extraktionsmethode/-kit	<i>Enterobacter cloacae</i>	<i>Staphylococcus pseudintermedius</i>
GES-Extraktionsmethode	wenig fragmentierte gDNA	wenig fragmentierte gDNA
DNeasy® UltraClean® Microbial Kit	gDNA nicht fragmentiert	gDNA nicht fragmentiert
MagAttract® HMW DNA Kit	stark fragmentierte gDNA	stark fragmentierte gDNA
Nanobind CBB Big DNA Kit	wenig fragmentierte gDNA	Nicht beurteilbar
QIAGEN® Genomic-tip 20/G	wenig fragmentierte gDNA	wenig fragmentierte gDNA

## 6. Diskussion

- Die Phenol-Chloroform-Extraktionsmethode (Goldstandard) erfüllt für beide Bakterienarten die Richtlinien von PACBIO®.
- Von den vier kommerziellen Extraktionskits erfüllen bei beiden Bakterienarten nur das DNeasy® UltraClean® Microbial Kit und das QIAGEN® Genomic-tip 20/G die Richtlinien.
- Das MagAttract® HMW DNA Kit erfüllt die Richtlinien nur in Bezug auf die Grösse. Die Integrität ist aufgrund der starken Fragmentierung der gDNA mangelhaft.
- Das Nanobind CBB Big DNA Kit erfüllt nur beim gram-negativen Bakterium (*Enterobacter cloacae*) die Richtlinien von PACBIO®. Beim gram-positiven Bakterium (*Staphylococcus pseudintermedius*) sind diese nicht erfüllt.

Die Fragmentierung der gDNA kann, in Abhängigkeit des Extraktionsprotokolls, aufgrund der Zentrifugations- und/oder Inkubationsschritte auf dem Thermomixer bei hohen rpm-Geschwindigkeiten zustande kommen. Auch die vielen manuellen Arbeitsschritte können einen Einfluss auf die Integrität haben.

Bei der Extraktion mit dem DNeasy® UltraClean® Microbial Kit wird die gDNA wegen der säulenbasierten Methode bereits geschert, was in einer sehr guten Integrität resultiert.

**Fazit:** Das DNeasy® UltraClean® Microbial Kit liefert, neben der Phenol-Chloroform-Extraktionsmethode, die besten Ergebnisse für beide Bakterienarten in Bezug auf Grösse und Integrität der gDNA und erfüllt somit die Richtlinien von PACBIO® für das mikrobielle Multiplexing.