

Vergleichende Untersuchungen zu DNA-Extraktionsmethoden für pflanzliche und tierische Gewebe

Verschiedene kommerziell erhältliche Kits und übliche nichtkommerzielle Extraktionsverfahren wurden von uns hinsichtlich der Effizienz (DNA-Ausbeute) sowie der Qualität an verschiedenen Arten der Bromeliaceae sowie unterschiedlichen Tiergruppen getestet.

Das Probenmaterial – Pflanzliche Proben

Die Familie der Bromeliaceae wurde als Testgruppe ausgewählt, da die Blätter häufig einen hohen Wasser- sowie Polysaccharidgehalt aufweisen. Effizienz und Qualität der Aufreinigungsmethoden konnten daher gut unter den einzelnen Proben verglichen werden.

Die Bromeliaceae-Proben wurden vor der Extraktion mit unterschiedlichen Konservierungsmethoden fixiert: Trocknung mit Silicagel-Trockenperlen, die Fixierung mit CTAB-Puffer (gesättigte CTAB-Salz-Lösung), Trocknung durch Pressung sowie Tiefrieren bei minus 20°C. Die DNA-Extraktion wurde ca. 1 Monat nach der Fixation vorgenommen, mit Ausnahme des Herbarmaterials, das nach ca. 3 Monaten in die Extraktion eingesetzt wurde.

Die DNA-Extraktionsverfahren

Ausgewählte kommerzielle Kitsysteme:

-Qiagen DNeasy® Plant Mini Kit (Säulenaufreinigung); Cat. No. 69106

-LGC sbeadex® Plant maxi (Magnetic Beads) Cat. No 41254

-DNA Diamond™ Kit (Aufreinigung mit Aktivkohle); Vertrieb: ABT Llc. Russia, 656049 Barnaul, NikitinaStr. 111

Ausgewählte nichtkommerzielle Extraktionsverfahren:

-modifiziertes CTAB Protokoll (Doyle, J.J.& Doyle, J. L. (1987): A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. Phytochem. Bull. 19: 11-15.) mit nachgeschaltetem Reinigungsschritt zur Entfernung von Polysacchariden

-CTAB-Extraktion mit anschließender DNA-Aufreinigung im Cäsiumchlorid-Ethidiumbromid-Dichtegradienten mit nachgeschalteter Dialyse (DNA-Extraktion im großen Maßstab; man erhält ca. 1 ml DNA-Lösung)

Die Ergebnisse

Die Quantität und Qualität der aufgereinigten DNA wurde im Gelbild (1% Agarose) beurteilt, zusätzlich wurde die Reinheitsmessung (260/280 nm-Ratio) mit einem Spektral-Photometer zur Bewertung hinzugezogen.

Für die mit **Silica-Trockenperlen und bei -20°C** konservierten Proben wurde die Aufreinigung mit dem **DNA Diamond™ Kit** präferiert (gute Ausbeute bei guten Reinheitswerten und geringste DNA-Scherung.) Ebenfalls gute Ergebnisse lieferte die **modifizierte CTAB-Methode** (größte Konzentration in ng/µl möglich; erfordert allerdings auch mehr Materialeinsatz, und gute Reinheitswerte).

Die in **CTAB-Puffer** konservierten Proben wurden am besten mit der **modifizierten CTAB-Methode** extrahiert.

Die DNA aus dem **Herbarmaterial** wurde am effektivsten mit der **sbeadex Plant Maxi™ Methode** extrahiert, ebenfalls gute Ergebnisse lieferte wiederum die **modifizierte CTAB-Methode**.

Zusammenfassung

Generell ist die CTAB-Methode nach Doyle und Doyle als nichtkommerzielles Extraktionssystem zu empfehlen, da sie die meisten Variablen bezüglich Modifikationen, Materialeinsatz, Inkubationszeiten erlaubt.

Bei den kommerziellen DNA-Extraktions-Kits stellte sich das Aktivkohle-Aufreinigungssystem „DNA Diamond™“ als kostengünstige und in der Handhabung einfache Alternative zu den bestehenden kommerziellen Kits heraus (ist allerdings für CTAB-konservierte Proben nicht anwendbar).

Bei der DNA-Extraktion von Herbarmaterial konnte von den kommerziellen Kits der sbeadex® Plant Maxi Kit überzeugen. Ein ebenfalls erhältlicher sbeadex® Plant Mini Kit erlaubt die Extraktion aus Kleinstmengen an Herbarmaterial bis zu 2 mg. Bei einer Austestung dieses Kits mit Herbarmaterial unterschiedlicher Pflanzengruppen und einem Einsatz von 5 mg ergaben sich bei einer PCR mit Barcoding-Primern (rbcl) gute Ergebnisse.

Die CTAB-DNA-Extraktion mit anschließender Aufreinigung im Cäsiumchlorid-Ethidiumbromid-Dichtegradienten und nachgeschalteter Dialyse stellt besondere Anforderungen an Laborausstattung (Ultrazentrifuge) und Zeitplanung und ist daher nur für spezielle Anwendungen (DNA-Extraktion im großen Maßstab) geeignet.

Das Probenmaterial – Tierische Proben

Es wurden verschiedene DNA-Extraktionssysteme an Geweben diverser Spezies von Invertebraten und Vertebraten getestet:

-Vertebraten-Muskelgewebe, tiefgefroren und in 96%igem Ethanol fixiert (Haushuhn, Kabeljau, Hausmaus, Kaulquappen, Fledermaus)

-Vertebraten-Haut und Schwanzknochen, tiefgefroren und in 96%igem Ethanol fixiert (Hausmaus, Flughäute Fledermaus)

-Invertebraten-Muskelgewebe, in 96%igem Ethanol fixiert (Muskelgewebe Posthornschncke und Muskelgewebe aus Extremitäten (Beine) von Arthropoden (Flußflohkrebs, Dornschncke, Gartenwolfspinne.)

Die DNA-Extraktionsverfahren

Ausgewählte kommerzielle Kitsysteme:

-Qiagen DNeasy® Blood & Tissue Kit; Cat. No. 69506

-Macherey & Nagel Nucleospin® Tissue Kit; Cat. No. 740952.10

-E.Z.N.A™ Insect DNA Isolation Kit; Product No. D0926-00

Ausgewählte nichtkommerzielle Extraktionsverfahren:

-modifiziertes CTAB-Extraktions-Protokoll für Tiere (Doyle, J.J.& Doyle, J. L. (1987): A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. Phytochem. Bull. 19: 11-15.)

-CCDB-DNA Extractions- Protokoll/Extraktion über Säulen mit Glasfibrermembranen (1µm) im 96 well-Format (Ivanova NV, deWaard J, Hebert PDN (2006) An inexpensive, automation-friendly protocol for recovering high-quality DNA. Molecular Ecology Notes, 6, 998-1002.)

Die Ergebnisse

Die Effizienz und Qualität der aufgereinigten DNA wurde im Gelbild (1% Agarose) beurteilt.

Die DNA-Isolation von Mollusken-Muskelgewebe und Vertebraten -Haut, -Knochen und -Muskelgewebe wurde aufgrund der hohen Effizienz mit der modifizierten CTAB-Methode präferiert.

Die besten Ergebnisse der DNA-Isolation von Arthropoden-Extremitäten wurden mit dem Qiagen DNeasy® Blood Tissue Kit festgestellt (schmale Banden hochmolekularer DNA, wenig degradierte DNA).

Als weitere (Hochdurchsatz-)Methode bietet sich die Säulen-Extraktion in einer speziellen 96-Wellplatte mit Glasfibrermembranen nach dem Protokoll des CCDB (Canadian Centre for DNA Barcoding) an. Diese Methode funktioniert gut mit Vertebraten-Gewebe (z. B. Muskel, Haut, Fischflossen) als auch mit Mollusken-Muskelgewebe, wobei nur geringste Mengen an Gewebe eingesetzt werden müssen. Für Insektenbeine werden spezielle Glasfibrermembranplatten mit „Schredder“-Effekt angeboten (Firma Pall ®). Die Extraktionsmethode wurde im hiesigen Labor nun auch für Flechten modifiziert. Die Testung mittels diverser flechtenspezifischer PCRs ergab gute Ergebnisse.