

SageHLS: Aufreinigung hochmolekularer DNA

Dr. Monika Burbach, Biozym Scientific GmbH, Hessisch Oldendorf

Sage Science hat eine Plattform zur Extraktion und Reinigung extrem großer DNA-Fragmente direkt aus Bakterien- und Gewebekulturen, Blutproben oder anderen Zellquellen entwickelt. Die mit dem SageHLS™ HMW Library-System aufgereinigten DNA-Fragmente besitzen eine Größe von 50 Kilobasen bis zu 2 Megabasen und können daher zur Aufklärung von Haplotypen, Strukturvarianten sowie anderen Applikationen, die hochmolekulare DNA benötigen, eingesetzt werden.

Viele genomische Applikationen sind auf hochmolekulare DNA (high molecular weight = HMW) oder sehr große DNA-Fragmente angewiesen. Mit herkömmlichen Probenvorbereitungsprozessen ist es nahezu unmöglich, DNA in dieser Länge aufzureinigen. Dies beschränkt die Möglichkeiten, größtmögliche Informationen aus Long-Read- und Long-Range-Sequenzierungen, optischen Kartierungen, Droplet Digital-PCR und anderen Single-Molecule-Applikationen zu erfassen. „Wir glauben, dass der Zugang zu DNA-Molekülen mit einer Größe von hunderten von Kilobasen oder sogar Megabasen es Wissenschaftlern ermöglichen wird, zukunftsweisende genomische Technologien anzuwenden, um neue Erkenntnisse darüber zu erlangen, auf welche Weise große DNA-Elemente Krankheiten und andere Phänotypen beeinflussen“, sagt Todd Babera, Geschäftsführer von Sage Science Inc. „Die SageHLS-Plattform kann DNA in Größenordnungen reinigen, mit denen bislang keine andere Plattform konsequent umgehen konnte“, so Babera.

Die SageHLS-Technologie beruht auf der automatisierten Extraktion und Reinigung hochmolekularer DNA sowie anschließender enzymatischer Fragmentierung und Selektion großer DNA-Fragmente mittels Gelelektrophorese. Hierzu werden Zellen in einem isotonischen Gel-Ladepuffer resuspendiert und in eine spezielle Agarose-Gelkassette geladen. Dort finden Zellyse, enzymatische Fragmentierung und Entfernung von Verunreinigungen statt. Aufgrund der Größe der genomischen DNA – viele Megabasen – kann diese nach der Lyse noch nicht ins Gel einwandern. Nach der Behandlung mit einer unspezifischen Nuklease liegt die Größe der DNA-Fragmente zwischen 50 kb und 2 Mb. Diese lassen sich elektrophoretisch auftrennen und werden automatisch aus dem Gel eluiert.

How to CATCH Your Gene of Interest

Zusätzlich zu der gerade beschriebenen Extraktion von sehr langer, unspezifisch fragmentier-

ter DNA kann das System auch mit der CRISPR/Cas9-Technologie eingesetzt werden, um spezifische genomische Regionen auszuschneiden und zu reinigen. Dies ist dann interessant, wenn die Region zu lang, zu repetitiv oder zu variabel für traditionelle Anreicherungsverfahren ist. Die Methode beruht auf CATCH (Cas9-assisted targeted of chromosome segments), einem Protokoll, das vom Yuval-Ebensteins Labor an der Universität Tel Aviv¹ entwickelt wurde. Zur Anwendung von CATCH müssen nur die Sequenzen der flankierenden Elemente des Gens oder der zu untersuchenden Region bekannt sein. Die Technik verwendet die RNA-guided Cas9-Endonuklease, um auf beiden Seiten außerhalb des interessierenden Bereichs die DNA zu schneiden. Es folgt ein Größen-selektionsschritt, bei dem kleinere oder größere Fragmente entfernt werden, die möglicherweise durch Off-Target-Effekte entstanden sind. Diese Methode wurde für DNA-Fragmente größer 50kb entwickelt.

Die CATCH-Methode selbst beruht auf einer Gelelektrophorese und lässt sich daher gut auf das SageHLS-System übertragen. Eine Studie der Universität Tel Aviv und der Icahn School of Medicine am Mount Sinai² verwendete bereits das SageHLS-System für die CATCH-Methode. Bei *E. coli* und humanen Proben wurden maßgeschneiderte Cas9-Nukleasen verwendet, um die gewünschten genomischen Regionen zu isolieren. Eine Verifizierung des entsprechenden 200 kb-Fragments aus *E. coli* erfolgte durch Sequenzierung auf einem MinION-Gerät (Oxford Nanopore Technologies, Oxford, GB). Für die humane Probe wurde diese Technik verwendet, um ein 200 kb-Fragment, welches das BRCA1-Gen enthielt, zu reinigen. Die Validierung der Ergebnisse erfolgte hier mittels qPCR.

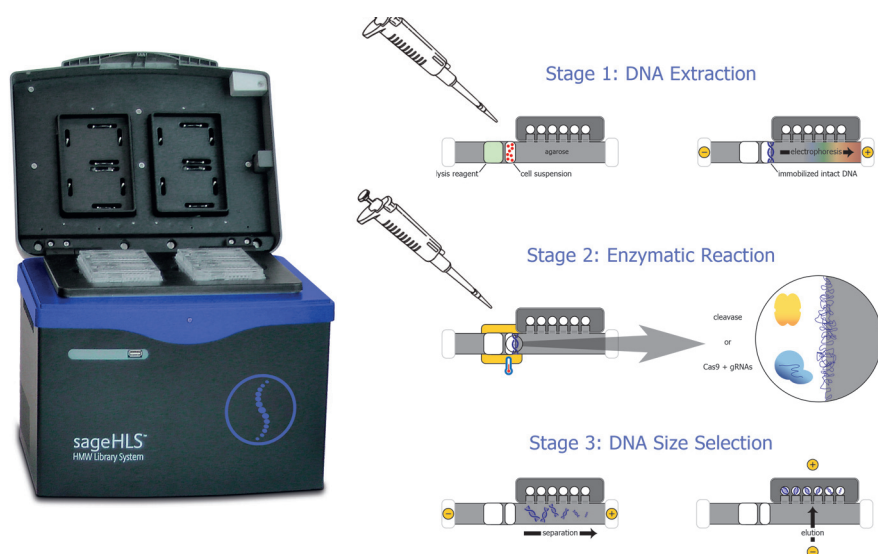
Neben den beschriebenen Applikationen eröffnet die SageHLS-Plattform weitere neue Möglichkeiten in Bezug auf das Ausgangsmaterial (verschiedene Zelltypen und Gewebe) und die enzymatische Behandlung (DNA-modifizierende Enzyme).

Referenzen

1. Cas9-assisted targeting of chromosome segments, Jiang et. al., 2015, Nature Communications, doi:10.1038/ncom9101
2. Targeted isolation of long genomic DNA molecules (AGBT Poster)

Kontakt:

Dr. Monika Burbach,
Biozym Scientific GmbH,
31840 Hessisch Oldendorf,
Tel.: +49 (0) 5152 9020
monika.burbach@biozym.com



Übersicht der einzelnen Arbeitsschritte der Sage HLS-Plattform.