

Applications

Note 229 | August 2010

Weiterverwendung von mehrfach in Eppendorf BioPhotometer plus™ und UVette® gemessenen DNA-Proben für PCR- und real-time PCR Experimente

Martin Armbrecht, Nils Gerke, Eppendorf AG, Hamburg

Zusammenfassung

DNA-Proben wurden in drei verschiedenen Konzentrationsstufen mehrfach im BioPhotometer plus gemessen und anschließend direkt für real-time PCR und Standard PCR Experimente weiterverwendet. Im Vergleich zu ungemessenen Proben konnte anhand dieser Versuche keine Qualitätsminderung der DNA durch das einwirkende UV-Licht festgestellt werden. Aufgrund dieser Ergebnisse schließen wir, dass im Eppendorf BioPhotometer gemessene DNA-Proben für geeignete Folgeapplikationen weiterverwendet werden können.

Einleitung

Bei der photometrischen Bestimmung von DNA-Konzentrationen kann es vorkommen, dass die Proben in gering konzentrierten Lösungen und in kleinen Mengen vorliegen. Häufig ist das Probenvolumen dabei so gering (z.B. 50 µL), dass die Probe gerade mal für eine Messung in einer Küvette mit geringen Messvolumen wie der Eppendorf UVette ausreicht. Mikrolitermesssysteme wie die Hellma TrayCell oder das Nanodrop von Thermo Scientific können in solchen Fällen nicht verwendet werden, da der verwendete Lichtweg sehr kurz ist und sich für die Bestimmung von DNA-Proben mit niedrigen Konzentrationen daher kaum eignet.

Was soll man also tun, wenn man dennoch möglichst reproduzierbar die Konzentration einer Nukleinsäure photometrisch bestimmen muss, weil z.B. die Folgeapplikation eine genaue Bestimmung erfordert?

Um diese Frage zu beantworten, wollen wir hier anhand von real-time PCR und Standard PCR-Experimenten zeigen, dass es möglich ist, eine gemessene DNA-Probe, in der die DNA-Konzentration mit einem optischen Messweg von 10 mm sicher bestimmt werden kann, für nachfolgende Anwendungen zu nutzen. Es sollte dabei überprüft werden, ob mehrfach mit UV-Licht gemessene DNA-Proben die gleichen Ergebnisse in der PCR zeigen wie ungemessene Proben. Strangbrüche in der DNA durch die Einwirkung von UV-Licht würden zu kürzeren PCR-Produkten führen, die durch die eingesetzten

Detektionsmethoden erkennbar wären. Für die photometrische Bestimmung wurden Eppendorf UVetten mit dem optischen Messweg von 10 mm verwendet.

Material und Methoden

Mehrfachmessung von DNA Proben mit unterschiedlichen Konzentrationen und anschließender Verwendung für real-time PCR und Standard PCR

Material

Eppendorf BioPhotometer plus
Eppendorf UVette
Eppendorf Mastercycler pro
Eppendorf Mastercycler ep realplex
Eppendorf twin.tec PCR Platten
Eppendorf epMotion 5075 LH
Eppendorf Centrifuge 5804
Heat Sealer
Heat Sealing Film
Eppendorf Research Pipette
Eppendorf epT.I.P.S.
Humane genomische DNA (Roche, ca. 200 ng/µL)
λ-Bakteriophagen-DNA (Roche, ca. 200 ng/µL),
Invitrogen eGel 1 % (G7208-02)
UVP-BioDoc-IT-System

Setup real-time PCR mit λ -DNA	
	Endkonzentration (pro 20 μ L Ansatz)
Primer 1: Lambda F2 5'-cgcacaggaactgaagaatg-3'	300 nM
Primer 2: Lambda R2 5'-ccgtcgagaatactggcaat-3'	300 nM
QuantiFast SYBR Green PCR Kit (Qiagen)	1x
λ -Bakteriophagen-DNA	0,00025 ng/ μ L
H ₂ O	ad 20 μ L

Setup Standard-PCR (beta-Globin)	
	Endkonzentration (pro 20 μ L Ansatz)
Primer 1: forward 5'-ggttgcccaatctactccagg-3'	500 nM
Primer 2: reverse 5'-gctcactcagtggtgcaaaag-3'	500 nM
5X Green GoTaq reaction Buffer	1x
MgCl ₂	2,5 mM
dNTP's	200 μ M
GoTaq Hot Start Polymerase (Promega)	0,025 U/ μ L
Human Genomische DNA	0,25 ng/ μ L
H ₂ O	ad 20 μ L

Durchführung

Aus Proben mit λ -Bakteriophagen-DNA bzw. humaner genomischer DNA wurden 3 Verdünnungsstufen hergestellt mit jeweils ca. 50, 25 und 10 ng/ μ L DNA. Jede der drei Verdünnungsstufen wurde in die UVette überführt und 10 mal nacheinander im BioPhotometer plus mit der Methode dsDNA gemessen. Vor der 1., nach der 5. und nach der 10. Messung wurde je eine Probe von 60 μ L entnommen. Für die real-time PCR wurden alle Proben mit der epMotion 5075 LH auf eine Konzentration von 0,001 ng/ μ L verdünnt. Anschließend wurden in einer Eppendorf twin.tec Platte 15 μ L des oben beschriebenen PCR-Ansatzes vorgelegt und dann mit 5 μ L der verdünnten DNA-Lösung aufgefüllt, so dass ca. 0,005 ng λ -DNA (ca. $7,5 \cdot 10^5$ Kopien) pro Reaktionsansatz eingesetzt wurden. Von jeder Probe wurden jeweils 3 x 5 μ L für die PCR entnommen, so dass insgesamt 27 Proben vorlagen. Als Negativkontrolle wurden zusätzlich 3 PCR-Ansätze mit je 5 μ L Wasser aufgefüllt. Die real-time PCR wurde im Eppendorf Mastercycler ep realplex mit folgendem Programm durchgeführt:

95 °C - 5 min
 95 °C - 10 s
 60 °C - 30 s }x40
 95 °C - 15 s
 60 °C - 15 s
 10 min bis 95 °C
 95 °C - 15 s

Für die Standard-PCR wurden alle Proben auf ca. 1 ng/ μ L mit einer epMotion 5075 LH verdünnt. Anschließend wurden in einer Eppendorf twin.tec Platte 15 μ L des oben beschriebenen PCR-Ansatzes vorgelegt und dann mit 5 μ L der

verdünnten DNA-Lösung aufgefüllt, so dass ca. 5 ng DNA pro Reaktionsansatz eingesetzt wurden. Von jeder Probe wurden jeweils 3 x 5 μ L für die PCR entnommen, so dass insgesamt 27 Proben vorlagen. Als Negativkontrolle dienten wie bei der real-time PCR 3 Ansätze, die je mit 5 μ L Wasser aufgefüllt wurden.

Die anschließende PCR wurde in einem Eppendorf Mastercycler pro mit folgendem Programm durchgeführt.

95 °C - 2 min
 95 °C - 15 s
 56 °C - 15 s }x30
 72 °C - 30 s
 72 °C - 5 min
 10 °C - ∞

Nach dem PCR-Lauf wurden alle Proben auf ein Invitrogen eGel übertragen und das Bild anschließend auf einer Gelddokumentsanlage (UVP-BioDoc-IT-System) ausgewertet.

Ergebnisse und Diskussion

Mehrfachmessung von DNA-Proben mit unterschiedlichen Konzentrationen und anschließender Verwendung für real-time PCR und Standard-PCR

Ziel dieses Experimentes war es, mittels real-time PCR zu überprüfen, ob es möglich ist, die Konzentration einer DNA-Probe in der UVette photometrisch mit dem BioPhotometer plus zu bestimmen und anschließend direkt für Folge-Applikationen wie PCR weiter zu verwenden. In der Vergangenheit konnten wir dies bereits mit Mikroarray-Experimenten zeigen, in denen die gesamte Probe nach der Konzentrationsbestimmung in der UVette für eine weitere Mikroarray-Prozessierung verwendet werden konnte [2]. Eine direkte Weiterverwendung der Probe ist insbesondere dann wichtig, wenn nur eine sehr geringe DNA-Konzentration, beispielsweise im Bereich von 5 ng/ μ L, vorliegt und diese möglichst genau bestimmt werden muss. Bei dem Versuch, Proben in diesem Konzentrationsbereich mit anderen Systemen, die kürzere Lichtwege verwenden, auszuwerten, besteht die Gefahr, sehr ungenaue Messergebnisse zu erhalten, da man sich hier deutlich unterhalb des empfohlenen Messbereiches befindet. So entsprechen beispielsweise 5 ng/ μ L dsDNA bei einem 2 mm Lichtweg einer Absorption von 0,02 E, bei 1 mm Lichtweg 0,01 E und bei 0,2 mm Lichtweg gerade mal 0,002 E. Laut Literatur sollten die Absorption von DNA-Lösungen immer oberhalb 0,1 E liegen [1], um reproduzierbare Messungen durchzuführen zu können. Aber auch für höhere DNA-Konzentrationen, die sich beispielsweise nach einer Plasmid-Präparation ergeben, ergibt sich bei direkter Weiterverwendung eine Zeitersparnis, da ein zusätzlicher Verdünnungsschritt wegfällt.

Bezüglich der Wiedergewinnung können Proben aus der UVette ohne Probleme mit einer Pipette entnommen werden. Entscheidend ist dabei das relativ große Probenvolumen von 50 µL. Im Vergleich dazu werden bei Mikrolitermesssystemen erheblich kleinere Volumina von etwa 2 µL verwendet, wodurch sich die Wiederaufnahme einer Probe schwieriger gestaltet. Zudem wird durch die Verwendung der UVette eine Kontamination mit Resten von älteren Proben sicher vermieden, wenn die Probe wieder gewonnen werden soll.

Wie in der Durchführung erwähnt, wurden ungemessene DNA-Proben mit 5-fach und 10-fach photometrisch gemessenen DNA-Proben in drei Konzentrationsstufen mittels real-time und Standard PCR verglichen.

Nach den photometrischen Bestimmungen wurden für die PCR-Läufe alle Proben mit der Eppendorf epMotion 5075 auf eine einheitliche Konzentration eingestellt, um die Ergebnisse besser miteinander vergleichen zu können. Da jeweils 3 Replikate pro Konzentration und Anzahl der Messungen und zusätzlich 3 Negativkontrollen hergestellt wurden, lagen insgesamt 30 Proben für die PCR-Läufe vor.

Durch die Verwendung des Pipettierautomaten epMotion sollten mögliche individuelle Pipettierfehler vermieden werden, die das Ergebnis der real-time PCR beeinflussen können.

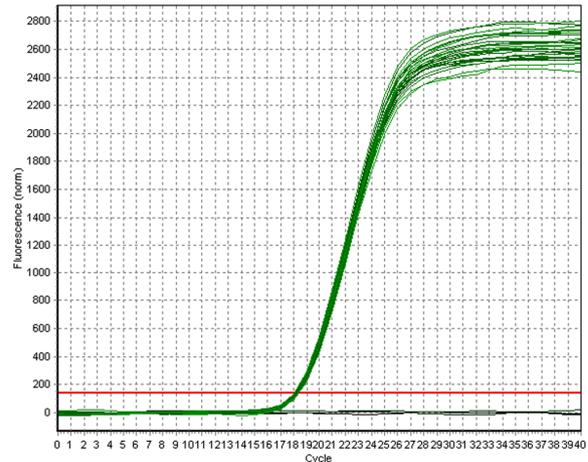


Abbildung 1: Ergebnis der real-time PCR mit Lambda-DNA. Die Detektion der PCR-Produkte erfolgte mit SYBR-Green.

In Abbildung 1 ist das Ergebnis der real-time PCR Läufe dargestellt. Die Amplifizierungskurven aller 30 PCR-Läufe sind parallel dargestellt.

Tabelle 1: C_t-Werte der einzelnen PCR-Läufe mit Lambda-DNA

Position in der Platte	Probenbezeichnung	Anzahl Messungen im BioPhotometer plus	C _t -Wert SYBR	durchschnittlicher C _t -Wert SYBR	Standardabweichung C _t -Wert
A1	Negativkontrolle	0	-		
A2	Negativkontrolle	0	-		
A3	Negativkontrolle	0	-		
A4	Hohe DNA-Konzentration	0	18,30	18,27	0,02
A5	Hohe DNA-Konzentration	0	18,26	18,27	0,02
A6	Hohe DNA-Konzentration	0	18,26	18,27	0,02
A7	Hohe DNA-Konzentration	5	18,35	18,20	0,15
A8	Hohe DNA-Konzentration	5	18,04	18,20	0,15
A9	Hohe DNA-Konzentration	5	18,22	18,20	0,15
A10	Hohe DNA-Konzentration	10	18,28	18,29	0,10
A11	Hohe DNA-Konzentration	10	18,20	18,29	0,10
A12	Hohe DNA-Konzentration	10	18,39	18,29	0,10
B4	Mittlere DNA-Konzentration	0	18,05	18,10	0,06
B5	Mittlere DNA-Konzentration	0	18,17	18,10	0,06
B6	Mittlere DNA-Konzentration	0	18,09	18,10	0,06
B7	Mittlere DNA-Konzentration	5	18,09	18,23	0,15
B8	Mittlere DNA-Konzentration	5	18,39	18,23	0,15
B9	Mittlere DNA-Konzentration	5	18,20	18,23	0,15
B10	Mittlere DNA-Konzentration	10	18,25	18,24	0,15
B11	Mittlere DNA-Konzentration	10	18,09	18,24	0,15
B12	Mittlere DNA-Konzentration	10	18,39	18,24	0,15
C4	Geringe DNA-Konzentration	0	18,13	18,07	0,05
C5	Geringe DNA-Konzentration	0	18,05	18,07	0,05
C6	Geringe DNA-Konzentration	0	18,03	18,07	0,05
C7	Geringe DNA-Konzentration	5	18,25	18,23	0,09
C8	Geringe DNA-Konzentration	5	18,12	18,23	0,09
C9	Geringe DNA-Konzentration	5	18,30	18,23	0,09
C10	Geringe DNA-Konzentration	10	18,29	18,38	0,10
C11	Geringe DNA-Konzentration	10	18,49	18,38	0,10
C12	Geringe DNA-Konzentration	10	18,37	18,38	0,10

Da nahezu identische C_t -Werte mit minimalen Abweichungen (Tabelle 1) für die jeweiligen Ansätze erhalten wurden, liegt die Vermutung nahe, dass die jeweiligen DNA-Proben unabhängig von der Konzentration unbeschadet aus den Messungen in der UVette mit dem BioPhotometer plus hervorgegangen sind. Auch die Schmelzkurvenanalyse der PCR-Produkte in Abbildung 2 zeigt einen vergleichbaren Verlauf der ungemessenen und photometrisch gemessenen Proben. So wären zum Beispiel kurze DNA-Fragmente, die eventuell durch Strangbrüche hätten entstehen können, anhand von niedrigeren Schmelzpunkten aufgefallen. Zusätzlich zu dem real-time PCR-Lauf wurde anschließend eine Standard-PCR mit einem längeren PCR-Target durchgeführt.

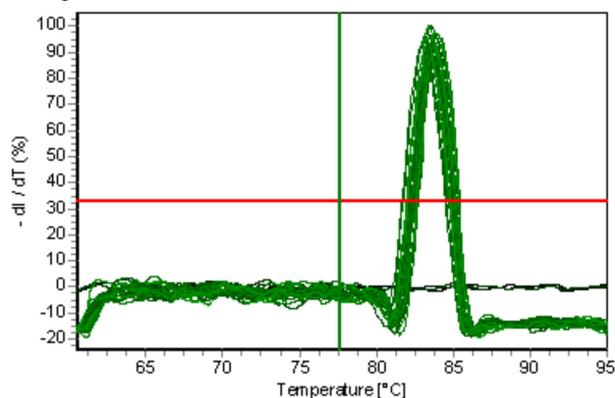


Abbildung 2: Ergebnis der Schmelzkurvenanalyse.
Der Kurvenverlauf zeigt sich homogen, was auf eine gleiche Länge der DNA-Produkte schließen lässt.

Nach der elektrophoretischen Auftrennung der PCR-Produkte im Agarosegel (Abbildung 3) wurde auch bezüglich der Qualität und Quantität ein vergleichbares Ergebnis bei den ungemessenen und photometrisch vermessenen Proben festgestellt. Aus den Ergebnissen der hier durchgeführten PCR-Experimente lässt sich keine Degradierung der DNA infolge der UV-Messungen im BioPhotometer plus erkennen.

Fazit

In den hier durchgeführten PCR- und real-time PCR-Experimenten ließ sich bei den DNA-Proben auch nach Mehrfachmessungen in der UVette im UV-Bereich des BioPhotometers keine Beeinträchtigung (z.B. durch DNA-Strangbrüche) in der Ergebnisqualität feststellen. Die Weiterverwendung photometrisch gemessener DNA lieferte bei den durchgeführten PCR-Folgeapplikationen vergleichbare Ergebnisse zu den ungemessenen DNA-Proben. Dieses Ergebnis konnten wir zumindest für doppelsträngige DNA bei zwei PCR-Experimenten belegen. In der Vergangenheit konnten wir bereits für gelabelte Einzelstrang-DNA im Rahmen von Microarray-Experimenten aufzeigen, dass in der UVette gemessene Proben weiter verwendet werden können [2].

Auf Grundlage dieser Ergebnisse lassen sich also DNA-Proben, deren Konzentration im BioPhotometer plus mit der UVette bestimmt wurden, für PCR-Experimente weiter verwenden.

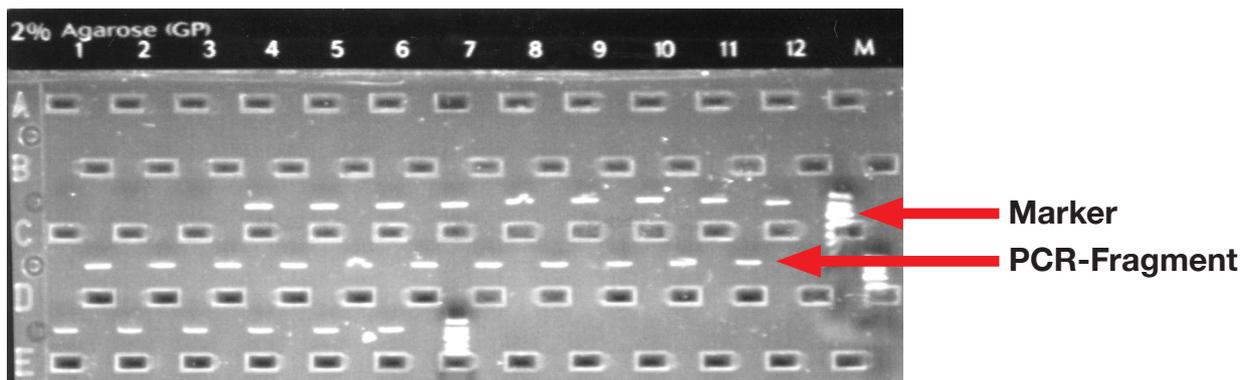


Abbildung 3: Ergebnis des PCR-Laufes

A1-A3 Negativ-Kontrolle, A4-A6 ungemessen, hohe DNA-Konzentration, A7-A9 5fach gemessen, hohe DNA-Konzentration, A10-A12 10fach gemessen, hohe DNA-Konzentration, AM Marker, B1-B3 ungemessen, mittlere DNA-Konzentration, B4-B6 5fach gemessen, mittlere DNA-Konzentration, B7-B9 10fach gemessen, mittlere DNA-Konzentration, B9-B11 ungemessen, niedrige DNA-Konzentration, BM Marker, C1-C3 5fach gemessen, niedrige DNA-Konzentration, C4-C6 10fach gemessen, niedrige DNA-Konzentration, C7 Marker.

Es konnten keine signifikanten Unterschiede in den PCR Produkten festgestellt werden.

Literatur

- [1] Cornel Mülhardt: Der Experimentator: Molekularbiologie/Genomics, 4.Auflage, Spektrum Akademischer Verlag (2003)
- [2] Ludwig Eichinger and Lorna Moll, Martin Armbrrecht, Use of Cy labeled cDNA in microarray analyses after determination of the incorporation rate with the Eppendorf BioPhotometer plus and UVettes. Application Note 188. www.eppendorf.com

Bestellinformationen		
Bezeichnung	Beschreibung	Bestell-Nr.
Eppendorf BioPhotometer plus™ 230 V / 50 - 60 Hz	Netzstecker Europa, weitere Netzanschlussvarianten erhältlich	6132 000.008
Thermodrucker DPU 414	Inkl. Netzteil und Druckerkabel 230 V	6131 011.006
Thermopapier	5 Rollen	0013 021.566
UVette®	Original Eppendorf Kunststoffküvette, einzeln verpackt, direkt im BioPhotometer verwendbar, zertifiziert RNase-, DNA und protein-frei, 80 Stück	0030 106.300
UVette® routine pack	Eppendorf Quality Reinheitsgrad, wiederverschließbare Box, 200 Stück	0030 106.318
Küvettenständer	Für 16 Küvetten	4308 078.006
epMotion® 5075 LH	PC-Version	5075 000.750
TS-50 Einkanal-Werkzeug	für den Volumenbereich 1-50 µL	5280 000.010
epT.I.P.S.® Motion Pipettenspitzen	50 µL Volumenbereich, 1-50 µL, 15 x 96 Tips in Racks	0030 003.942
Safe-Lock Reaktionsgefäße	2,0 mL, per 1.000 Stück, farblos	0030 120.094
Thermorack für 24 x Safe-Lock Gefäße 0,5/ 1,5/ 2,0 mL	zur Vorlage von 24 Reaktionsgefäßen	5075 771.004
Thermoblock für PCR	96 wells	5075 766.000
Mastercycler® pro		6321 000.515
Mastercycler® ep realplex ²		6300 000.507
Eppendorf twin.tec® PCR Platte 96	semi-skirted, 25 Stück (farblos)	0030 128.575

eppendorf
In touch with life

Eppendorf Vertrieb Deutschland GmbH · Peter-Henlein Str. 2 · 50389 Wesseling-Berzdorf · Deutschland
Tel: +49 2232 418-0 · Fax: +49 2232 418-155 · E-mail: vertrieb@eppendorf.de · www.eppendorf.de
Eppendorf Austria · Ignaz Köck Straße 10/2. OG · 1210 Wien · Österreich
Tel: +43 1 890 13 64-0 · Fax: +43 (0)1 890 13 64-20 · E-mail: office@eppendorf.at · www.eppendorf.at
Vaudaux-Eppendorf AG · Im Kirschgarten 30 · 4124 Schönenbuch · Schweiz
Tel: +41 61 482 1414 · Fax: +41 61 482 1419 · E-mail: vaudaux@vaudaux.ch · www.eppendorf.ch

Application Support Tel: +49 1803 666 789 · E-mail: support@eppendorf.com