

Master-Abschlussarbeit

Thema: Entwicklung einer Methode zur Abreicherung menschlicher DNA aus Sulkusflüssigkeit

Zusammenfassung:

Die Next-Generation-Sequencing-Technologie (NGS) hat sich für den Nachweis menschlicher Krankheitserreger aus klinischen Proben als vielversprechend erwiesen. Eine der Herausforderungen für die Verwendung einer Shotgun-Metagenom-Sequenzierung in der diagnostischen Mikrobiologie ist allerdings das niedrige Verhältnis von bakterieller zu menschlicher DNA in vielen klinischen Proben. Ziel dieser Masterarbeit war es, ein Probenverarbeitungsprotokoll für die metagenomische Sequenzierung zu entwickeln, um menschliche DNA selektiv aus Sulkusflüssigkeits-Proben zu entfernen. Zu diesem Zweck wurden Sulkusflüssigkeits-Proben von Parodontitis-Patienten vor der DNA-Extraktion mit dem Detergens Saponin und DNase vorbehandelt. Um den Anteil bakterieller und menschlicher DNA nach der DNA-Extraktion zu ermitteln, wurde eine quantitative Echtzeit-PCR durchgeführt. Die Ergebnisse zeigen eine über 99%ige Reduktion der humanen DNA, wenn die Proben mit einer 0,05 % oder 0,10%igen Saponinkonzentration und DNase vorbehandelt wurden. Insgesamt erwies sich in diesem Versuch eine Saponinkonzentration von 0,05 % am effizientesten, da mit dieser Konzentration die höchste Reduktion humaner DNA (99,68 %) bei dem geringsten Verlust bakterieller DNA (8,62 %) erzielt werden konnte. Im weiteren Verlauf dieser Arbeit wurden Sulkusflüssigkeits-Proben mit einer 0,025 %, 0,05 % und 0,10%igen Saponinkonzentration vorbehandelt und einer Shotgun-Metagenom-Sequenzierung unterzogen. Die Wirts-DNA-Abreicherungseffizienz wurde mit Proben verglichen, welche mit einem kommerziell erhältlichen Kit (NEBNext Microbiome DNA Enrichment Kit) bearbeitet wurden. Insgesamt zeigen die Ergebnisse eine sehr inhomogene Verteilung humaner und bakterieller Reads. Es konnte nicht festgestellt werden, dass Proben, welche mit höheren Saponinkonzentrationen vorbehandelt wurden, auch den geringsten Anteil humaner Reads aufweisen. Im Vergleich beider Behandlungsmethoden konnte gezeigt werden, dass eine Vorbehandlung mit einer 0,10%igen Saponinkonzentration und eine Behandlung mit dem NEB Kit ähnliche Ergebnisse hervorbringen. Bei beiden Methoden lag der relative Anteil humaner DNA bei ungefähr 50 %.

Die Ergebnisse zeigen, dass die Vorverarbeitung klinischer Proben mit dem Detergens Saponin und DNase zu einer signifikanten Reduzierung der Hintergrund-DNA führt. Die Vorbehandlung stellt eine kostengünstige, schnelle und automatisierbare Alternative im Vergleich zu einer Probenaufbereitung mit dem NEBNext Microbiome DNA Enrichment Kit dar.

Verfasser: Stephan Paul Geuchen
Betreuerin: Prof. Dr. rer. nat. Dagmar Willkomm
Datum der Abgabe: 29.07.2022