

Herstellung von Puffern für die Extraktion viraler RNA zum Nachweis einer SARS-CoV-2-Infektion

Paul Klemm¹, Linda Lattermann³, Blerina Shkodra-Pula¹, Karoline F. Haupt⁵, David Pretzel¹, Christine Weber¹, Stephanie Schubert^{2,4}, Anja Traeger^{1,2}, Uwe Köhn¹, Stephan König³, Bettina Löffler⁵, Michael Baier⁵, Stefanie Deinhardt-Emmer^{5*}, Ulrich S. Schubert^{1,2*}

Jena, 24. März 2020

¹Lehrstuhl für Organische und Makromolekulare Chemie (IOMC), Friedrich-Schiller-Universität Jena, Humboldtstrasse 10, 07743 Jena. www.schubert-group.de; E-Mail: ulrich.schubert@uni-jena.de

²Jena Center for Soft Matter (JCSM), Friedrich-Schiller-Universität Jena, Philosophenweg 7, 07743 Jena.

³TrophoSYS GmbH, Botzstrasse 5, 07743 Jena.

⁴Institut für Pharmazeutische Technologie, Friedrich-Schiller-Universität Jena, Lessingstrasse 8, 07743 Jena.

⁵Institut für Medizinische Mikrobiologie, Universitätsklinikum Jena, Am Klinikum 1, 07747 Jena. E-Mail: stefanie.deinhardt-emmer@med.uni-jena.de

Präambel: Die quantitative Real Time Polymerasekettenreaktion (q-RT-PCR) ist für die Identifikation von Patienten mit dem Coronavirus (SARS-CoV-2 / Covid-19) essentiell. Vor einer qPCR muss die virale RNA aus den Proben isoliert werden. Aufgrund von Lieferengpässen kommerziell erhältlicher RNA-Isolationskits und deren Bestandteile, wurden sechs einfach herzustellende Pufferlösungen auf ihr Potenzial als Zellyse- und Extraktionspuffer untersucht. Im Folgenden werden die Rezepte der einzelnen Pufferlösungen sowie die Ergebnisse der Nukleinsäureextraktion aus respiratorischen Material von positiv getesteten SARS-CoV-2 PatientInnen aufgeführt. Alle Pufferlösungen wurden in das Standardprotokoll des QIAamp viral RNA Mini Kit von Qiagen (Hilden, Deutschland)

impliziert und unter Nutzung des RNeasy Mini Kit von Qiagen getestet. Die Verwendung der RNeasy Säulen, sowie der im QIAamp DNA Mini Kit enthaltenen Waschpuffer AW1 und AW2 führten in der q-RT-PCR zu einer vergleichbaren Detektion (RIDAGene, R-Biopharm) des E-Gens. Die Pufferlösungen 1 und 2 basieren auf der denaturierenden und chaotropen Substanz Guanidiniumthiocyanat. Beide Pufferlösungen eignen sich zur Isolation von viraler RNA und können als Alternative zu den kommerziellen Pufferlösungen verwendet werden (Tabelle 3). Aufgrund der Toxizität von 2-Mercaptoethanol ist die Pufferlösung 2 der Pufferlösung 1 vorzuziehen, da damit eine Exposition des / der Durchführenden mit diesem Stoff vorgebeugt wird. Mit den Guanidiniumthiocyanat-freien Pufferlösungen 3 und 4 kann ebenfalls, jedoch mit geringerer Effizienz, genetisches Material isoliert werden (Tabelle 3). Sofern das potente Guanidinium-Salz nicht verfügbar ist, kann auf diese Pufferlösungen zurückgegriffen werden. Die Pufferlösungen 5 und 6 zeigen keine erfolgreiche Isolation viraler RNA (Tabelle 3). Damit konnte eine Alternative zu den Guanidiniumthiocyanat-basierten kommerziellen Puffern aufgezeigt werden.

A) Pufferlösungen mit hohem Potenzial**Pufferlösung 1 (Basis: chaotrope Substanz Guanidiniumthiocyanat): Ansatz für 120 mL**

56,717 g (480 mmol) Guanidiniumthiocyanat wurden in einem Erlenmeyerkolben in 60 mL Reinstwasser unter Einwirkung von Ultraschall bei 65 °C gelöst. In einem separaten Erlenmeyerkolben wurden 0,882 g (3 mmol) Natriumcitrat Dihydrat in 10 mL Reinstwasser unter ständigem Rühren gelöst. Die erhaltene Natriumcitratlösung wurde unter Verwendung von 0,1 molarer Salzsäure auf pH = 7,0 eingestellt und zur Guanidiniumthiocyanat-Lösung zugegeben. Anschließend wurden 0,601 g (2,05 mmol) Sarkosyl (Natriumsalz) und 0,837 mL (12 mmol) 2-Mercaptoethanol (Abzug!) zugegeben und solange geschüttelt, bis eine klare Lösung vorlag. Diese wurde mit Reinstwasser final auf 120 mL aufgefüllt.

Aufgrund der bestehenden Toxizität von 2-Mercaptoethanol, laut GESTIS-Stoffdatenbank zu 2-Mercaptoethanol: 244 mg/kg (LD₅₀, Ratte, oral) und 167 mg/kg (LD₅₀, Kaninchen, transdermal), ist die Verwendung von Schutzkleidung (Kittel, Handschuhe und Schutzbrille) sowie das Arbeiten unter einem Abzug erforderlich. In der Literatur wird ein Haltbarkeitsdatum des Puffers bei Lagerung bei Raumtemperatur von einem Monat angegeben.

Für die Herstellung größerer Puffermengen empfiehlt sich die Herstellung einer Vorratslösung der wässrigen Natriumcitratlösung (pH = 7) sowie einer höher konzentrierten Salzsäure. Die voreingestellte Natriumcitrat-Lösung kann dabei neben Reinstwasser zum Lösen von Guanidiniumthiocyanat verwendet werden.

Tabelle 1: Ansatz für 10 L Puffer, Endkonzentration der einzelnen Komponenten und Anbieter.

	Endkonzentration	Einwaage	Volumen	Anbieter	Bestellnummer
Guanidinium thiocyanat	4 mol/L	4726,4 g		Carl Roth	2628.1
Natriumcitrat Dihydrat	0,025 mol/L	73,525 g		Carl Roth	4088.1
alternativ:					
NaCitrat (1 M) pH = 7,0)	0,025 mol/L		250 mL		
Na Sarkosyl	0,01 mol/L	29,338 g		Sigma Aldrich	L9150
2-Mercaptoethanol	0,1 mol/L	78,13 g	69,76 mL	Sigma Aldrich	63689

Quelle: P. Chomczynski, N. Sacchi, "The Single-Step Method of Rna Isolation by Acid Guanidinium Thiocyanate-Phenol-Chloroform Extraction: Twenty-Something Years On", *Nature Protocols* **2006**, *1*, 581-585.

Pufferlösung 2 (Basis: chaotrope Substanz Guanidiniumthiocyanat): Ansatz für 204 mL

In einem Erlenmeyerkolben wurden 1,576 g (10 mmol) Tris-Cl in 60 mL Reinstwasser unter ständigem Rühren gelöst. Der pH-Wert wurde mittels 0,1 molarer Natriumhydroxid-Lösung auf 6,4 eingestellt und anschließend das Volumen der Lösung mit Reinstwasser auf 100 mL aufgefüllt. 120 g (1016 mmol) Guanidiniumthiocyanat wurden direkt in das Vorratsgefäß eingewogen und durch vollständige Zugabe der zuvor hergestellten Tris-Cl-Lösung unter Einwirkung von Ultraschall bei 65 °C gelöst. In einem separaten Erlenmeyerkolben wurden 18,612 g (50 mmol) Na₂EDTA Dihydrat (Dinatriumsalz) mit 80 mL Reinstwasser versetzt und unter Zugabe von Natriumhydroxid-Pellets unter ständigem Rühren gelöst. Die erhaltene EDTA-Lösung wurde unter Verwendung von 0,1 molarer Natriumhydroxid-Lösung auf pH = 8,0 eingestellt, filtriert und mit Reinstwasser auf 100 mL aufgefüllt. 8,8 mL dieser EDTA-Lösung wurden zur Guanidiniumthiocyanat-Lösung zugegeben. Anschließend wurden 2,455 mL (4,2 mmol) Triton X-100 hinzugegeben und solange geschüttelt bis eine homogene Lösung vorlag.

Für die Herstellung größerer Puffermengen empfiehlt sich die Herstellung von Vorratslösungen von EDTA und Tris-Cl sowie einer höher konzentrierten Natronlauge.

Tabelle 2: Ansatz für 10 L Puffer, Endkonzentration der einzelnen Komponenten und Anbieter.

	Endkonzentration	Einwaage	Volumen	Anbieter	Bestellnummer
Guanidinium thiocyanat	5 mol/L	5908 g		Carl Roth	2628.1
Tris-Cl (0,1 M, pH = 6,4)	0,05 mol/L		5 L	Carl Roth	9090.1
EDTA (0,5 M, pH = 8,0)	0,022 mol/L		440 mL	Carl Roth	8043.1
Triton X-100	1,2 wt/v	120 g	112,15 mL	Sigma Aldrich	T8787

Quelle: R. Boom, C. J. Sol, M. M. Salimans, C. L. Jansen, P. M. Wertheim-van Dillen, J. van der Noordaa, "Rapid and Simple Method for Purification of Nucleic Acids", *Journal of Clinical Microbiology* **1990**, 28, 495-503.

Die Ergebnisse der q-RT-PCR aller Pufferlösungen sind in Tabelle 3 zusammengefasst.

Tabelle 3: Gesamtüberblick über die q-RT-PCR Ergebnisse der getesteten Puffer.

#	Pufferlösung	Pat. Probe	Cq Werte pot. Puffer	Cq Werte Qiagen
1	Guanidinium Lysis Puffer 1	vi6460	26,01	26,32
2	Guanidinium Lysis Puffer 2	vi6446	25,66	27,85
3	Triton X	vi6460	30,04	26,32
4	SDS Lysis Puffer I (+ frisch DTT)	vi6446	32,33	27,85
5	SDS Lysis II	vi6460	/	26,32
6	NP-40 Lysis Puffer	vi6446	/	27,85

Tabelle 4: Gesamtüberblick über die q-RT-PCR Ergebnisse der getesteten Puffer mit Vergleich der Qiagen viral RNA Säule und der RNeasy Mini Kit Säule.

#	Pufferlösung	Cq Werte (viral RNA Kit)	Cq Werte (RNeasy Mini Kit)
1	Guanidinium Lysis Puffer 1	16,56	16,59
2	Guanidinium Lysis Puffer 2	15,59	15,97

B) Pufferlösungen mit moderatem Potenzial (alternativ zum Guanidiniumthiocyanat)**Pufferlösung 3 (Triton X): Ansatz für 120 mL**

1,050 g (18 mmol) Natriumchlorid und 0,189 g (1,2 mmol) Tris-Cl wurden in 80 mL Reinstwasser unter ständigem Rühren gelöst. Zu der erhaltenen Lösung wurden 0,3 mL (0,51 mmol) Triton hinzugegeben und unter Einwirkung von Ultraschall homogenisiert. Der pH-Wert der Lösung wurde mit einer 0,1 molaren Natriumhydroxid-Lösung auf 7,4 eingestellt. Das Volumen der Lösung wurde mit Reinstwasser auf 120 mL aufgefüllt.

Tabelle 5: Ansatz für 10 L Puffer, Endkonzentration der einzelnen Komponenten und Anbieter.

	Einwaage	Volumen	Endkonzentration	Anbieter	Bestellnummer
Natriumchlorid	87,66 g		0,15 mol/L	Fluka	11984051
Tris-Cl	15,76 g		0,01 mol/L	Carl Roth	9090.1
Triton X-100	26,75 g	25 mL	0,25%	Sigma Aldrich	T8787

Quelle: K. Shatzkes, B. Teferedegne, H. Murata, "A Simple, Inexpensive Method for Preparing Cell Lysates Suitable for Downstream Reverse Transcription Quantitative PCR", *Scientific Reports* **2014**, *4*, 4659.

Pufferlösung 4 (SDS Lyse Puffer I): Ansatz für 120 mL

0,600 g (2,08 mmol) Natriumlaurylsulfat und 0,946 g (6 mmol) Tris-Cl wurden in 80 mL Reinstwasser unter ständigem Rühren gelöst. Der pH-Wert der Lösung wurde mit einer 0,1 molaren Natriumhydroxid-Lösung auf 7,4 eingestellt. Das Volumen der Lösung wurde mit Reinstwasser auf 120 mL aufgefüllt. 1,2 g (7,78 mmol) Dithiothreitol wurden unmittelbar vor der Verwendung des Puffers der Lösung zugegeben und geschüttelt, bis eine klare Lösung vorlag.

Tabelle 6: Ansatz für 10 L Puffer, Endkonzentration der einzelnen Komponenten und Anbieter.

	Einwaage	Endkonzentration	Anbieter	Bestellnummer
Natriumlaurylsulfat	50 g	0,5 wt%	Carl Roth	L9150
Tris-Cl	78,8 g	0,05 mol/L	Carl Roth	9090.1
Dithiothreitol	100 g	1 wt%	Fisher Sci.	R0862

Quelle: https://en.wikipedia.org/wiki/Lysis_buffer, 20.03.2020, 15:00.

C) Pufferlösungen ohne Potenzial**Pufferlösung 5 (SDS Lyse Puffer II): Ansatz für 100 mL**

2 g (6,93 mmol) Natriumlaurylsulfat, 0,584 g (10 mmol) Natriumchlorid und 6,057 g (50 mmol) Tris wurden in 80 mL Reinstwasser unter ständigem Rühren gelöst. Der pH-Wert der Lösung wurde mit konzentrierter Salzsäure auf 8,0 eingestellt. Das Volumen der Lösung wurde mit Reinstwasser auf 100 mL aufgefüllt. Im Gegensatz zur Originalvorschrift wurde auf die Zugabe von 8 mg/mL Milchpulver /g Sediment hinzugefügt.

Tabelle 7: Ansatz für 10 L Puffer, Endkonzentration der einzelnen Komponenten und Anbieter.

	Endkonzentration	Einwaage	Anbieter	Bestellnummer
Natriumlaurylsulfat	2 wt%	200 g	Carl Roth	L9150
Tris	0,5 mol/L	605,7 g	Carl Roth	0188.1
Natriumchlorid	0,1 mol/L	1000 g	Fluka	11984051

Quelle: T. Miura, Y. Masago, D. Sano, T. Omura, "Development of an Effective Method for Recovery of Viral Genomic Rna from Environmental Silty Sediments for Quantitative Molecular Detection", *Applied and Environmental Microbiology* **2011**, 77, 3975.

Pufferlösung 6 (NP-40 Lyse Puffer): Ansatz für 120 mL

1,050 g (18 mmol) Natriumchlorid und 0,945 g (6 mmol) Tris-Cl wurden in 80 mL Reinstwasser unter ständigem Rühren gelöst. Zu der erhaltenen Lösung wurden 1,2 mL (2,05 mmol) Triton X-100 hinzugegeben und unter Einwirkung von Ultraschall homogenisiert. Der pH-Wert der Lösung wurde mit einer 0,1 molaren Natriumhydroxid-Lösung auf 7,4 eingestellt. Das Volumen der Lösung wurde mit Reinstwasser auf 120 mL aufgefüllt.

Tabelle 8: Ansatz für 10 L Puffer, Endkonzentration der einzelnen Komponenten und Anbieter.

	Endkonzentration	Einwaage	Volumen	Anbieter	Bestellnummer
Natriumchlorid	0,15 mol/L	87,66 g		Fluka	11984051
Tris-Cl	0,05 mol/L	78,8 g		Carl Roth	9090.1
Triton X-100	1%	107 g	100 mL	Sigma Aldrich	T8787

Quelle: https://en.wikipedia.org/wiki/Lysis_buffer, 20.03.2020, 15:00.

Danksagung: Deutsche Forschungsgemeinschaft (DFG), SFB 1278 („PolyTarget“), Projektnummer 316213987