



Automatisierte Extraktion von hochmolekularer Nukleinsäure – aus hochvolumigen Blutproben

Einführung

Aufgrund der stetig wachsenden Anforderungen an zu bearbeitende Proben, sowohl im akademischen Umfeld als auch in der Industrie, kommen Automatisierungslösungen immer tragendere Rollen zu. Die Aufreinigung genomischer DNA ist der Ausgangspunkt für eine Vielzahl von nachfolgenden Prozessen, bei denen die Quantität und Reinheit der isolierten DNA von großer Bedeutung ist. Herkömmliche Extraktionsverfahren verwenden teure Reagenzien und basieren auf der Handhabung geringer Probenmengen sowie den daraus resultierenden mehrfach sich wiederholenden Aufreinigungsprozeduren. Zudem erhöht sich hierdurch das Risiko, dass wertvolles Probenmaterial verloren geht.

SmartExtraction ist Analytik Jena's innovative Technologie zur Extraktion hochmolekularer DNA. Diese Technologie ist die Basis für ein grundlegend neues Verfahren zur automatisierten Isolierung und Aufreinigung von Nukleinsäuren. SmartExtraction kombiniert die patentierte Extraktionschemie (DC-Technologie) mit einer intelligenten Oberfläche, genannt „Smart Modified Surface“. SmartExtraction vereinfacht den gesamten automatisierten Workflow der DNA Extraktion deutlich und setzt dabei neue Maßstäbe in Sachen Effizienz, Ausbeute und Qualität der DNA. Auf Grund hoher Bindekapazitäten ist es möglich, besonders große Mengen an DNA zu gewinnen. Darüber hinaus kann DNA mit einem hohen Molekulargewicht automatisiert isoliert werden (200 kb - >500 kb).

Die „Smart Modified Surface“ ermöglicht zudem die Abbildung des gesamten Extraktionsprozesses innerhalb einer Pipettenspitze über einfache Pipettierschritte.

Aufgabe

Automatisierte Aufreinigung genomischer DNA mit einer hohen Quantität und Qualität durch ein einfaches und robustes Verfahren.

Lösung

SmartExtraction vereinfacht den gesamten automatisierten Workflow der DNA Extraktion deutlich und setzt dabei neue Maßstäbe in Sachen Effizienz, Ausbeute und Qualität der DNA:

- einfache Methode, schnelle Routinen
- Extraktion hochmolekularer DNA
- hohe Ausbeuten bei guten Reinheiten

Die SmartExtraction Technologie greift weder auf die Verwendung von Phenol/Chloroform, Ionen Austauschern, Filtersäulen oder Filterplatten zurück, noch wird eine Suspension von magnetischen oder paramagnetischen Partikeln zur Bindung der DNA benötigt. Vorbefüllte und versiegelte Reagenzien-Plastiken vereinfachen zudem die Handhabung und können analog zu den funktionalisierten Pipettenspitzen direkt auf dem Pipettiersystem CyBio FeliX verwendet werden. Diese Technologie kommt dem steigenden Bedarf an automatisiertem Liquid Handling besonders entgegen.

CyBio FeliX ist ein flexibles, vollautomatisiertes Pipettier-System mit 1 - 384 Kanälen im Volumenbereich von 1 – 1000 µl. Neben dem hochpräzisen, parallelen Transfer im 96- und 384-well Format kann auch einkanalig, spalten- oder reihenweise pipettiert werden. Das entsprechende Zubehör wird automatisch innerhalb einer Pipettieroutine erkannt und gewechselt. CyBio FeliX bietet höchste Flexibilität bei minimalem Platzbedarf, was sich insbesondere in seinem einzigartigen Gerätedesign mit je 6 Deckpositionen auf 2 Ebenen widerspiegelt. Durch das modulare Konzept des CyBio FeliX können applikationsspezifische Konfigurationen jederzeit ergänzt werden. Auf Grundlage vorgefertigter und optimierter Pipettier Routinen ruht der Fokus stets auf der Applikation.

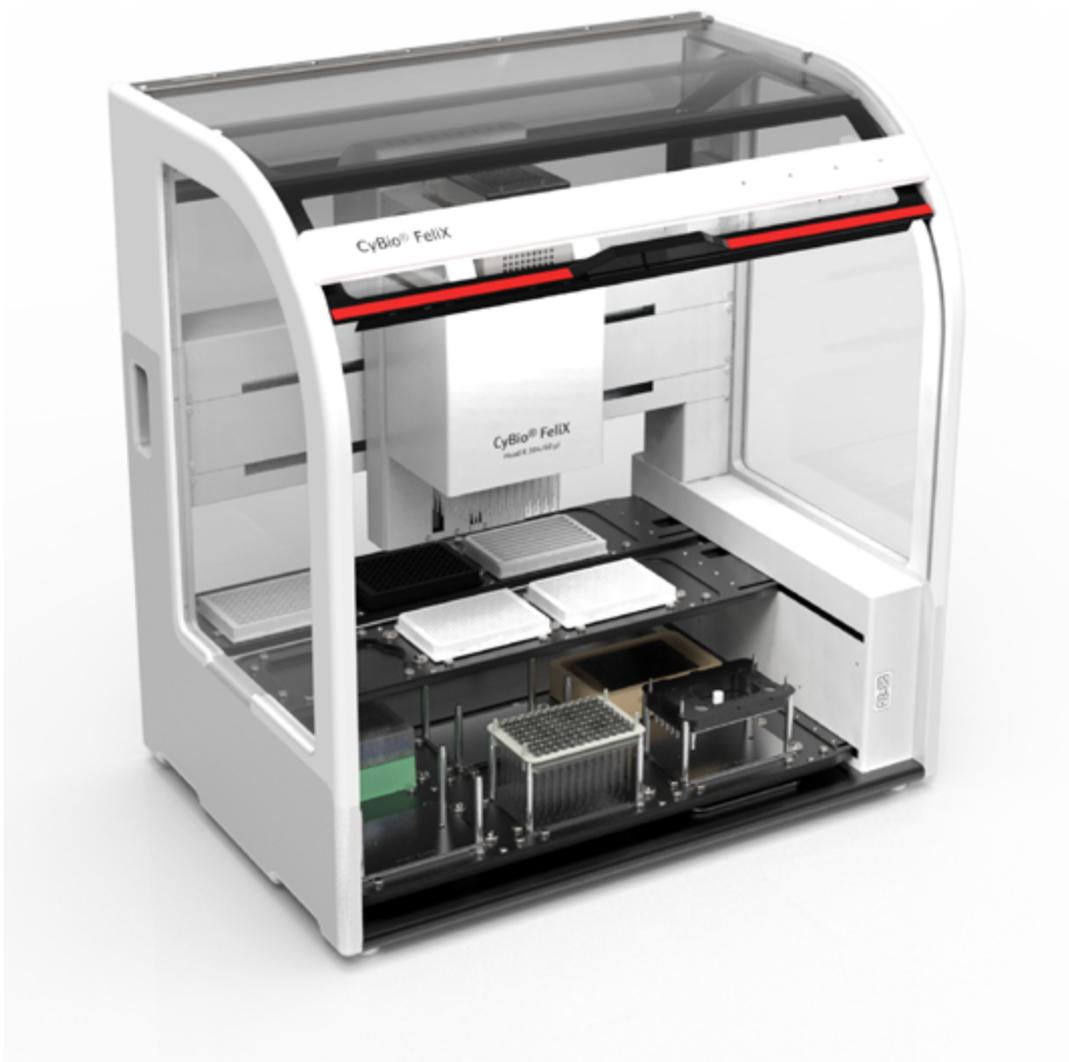


Abbildung 1: CyBio FeliX Basiseinheit

Material

- CyBio FeliX Basiseinheit (OL5015-24-100, Analytik Jena GmbH)
- CyBio FeliX Kopf R 96/1000 µl (OL3316-14-950, Analytik Jena GmbH)
- 96-Kanalmagazin; Kopf R 96/1000 µl (OL3810-13-024, Analytik Jena GmbH)
- smart Blood DNA Midi prep(a96) (845-ASP-1296096, Analytik Jena GmbH)
- Zentrifuge (z.B. Eppendorf 5424R)
- Thermalmixer (e.g. BioShake iQ, 848-1808-0506, Analytik Jena GmbH)
- Gel Electrophorese System (z.B. Compact M Elektrophorese-Kammer für Agarosegele, 846-025-200, Analytik Jena GmbH)
- 1 x PBS Puffer (137 mM NaCl; 2,7 mM KCl, 10 mM Na₂HPO₄, 1,8 mM KH₂PO₄)
- ddH₂O (S15-012, GE Healthcare)
- 1 x TBE Puffer, pH 8.0
- LE Agarose (Biozym, 840004)
- Roti®-Load DNA mit Glycerol (Roth, X904.1)
- Spectrophotometer (ScanDrop 250, Analytik Jena GmbH)
- Vollblut (EDTA stabilisiert; gelagert bei -80 °C für 2 Monate)

Methoden

Lyse der Erythrozyten

Eingesetzt wurden jeweils 3 ml Vollblut eines Spenders. Die Lyse der Erythrocyten und die Pelletierung der kernhaltigen Blutzellen erfolgte entsprechend den Angaben im Manual (Kit: smart Blood DNA Midi prep(a96)). Im Anschluss an die Pelletierung der kernhaltigen Zellen wurden diese in 120 µl 1 x PBS vollständig resuspendiert.

Enzymatische Lyse (Proteolyse) und Extraktion

Die proteolytische Lyse der Zellen erfolgte extern. Dazu wurden die resuspendierten Zellen mit 200 µl eines Lysepuffers (Lysis Solution CBV) und 30 µl Proteinase K versetzt und der Lyseansatz im BioShake iQ für 30 min bei 55 °C und 800 rpm inkubiert. Anschließend wurde das Lysat in die Reagenzien Platte übertragen und auf die Geräteposition 10 des CyBio FeliX gestellt. Entsprechend der Angaben im Protokoll smart Blood DNA Midi prep (a96) erfolgte die automatisierte Prozessierung und Elution der DNA Proben. Die zur automatisierten DNA Extraktion benötigten Reagenzien Platten des Kits sind mit allen Reagenzien vorbefüllt.

Überprüfung der ausgeführten DNA Extraktion

Die extrahierte DNA wurde mittels Agarose-Gel verifiziert. Dabei wurden 10 µl jeden Eluates und 7 µl der DNA Ladder auf ein 0,8 % TBE Gel gegeben (enthält Ethidiumbromid, 5 µl Ethidiumbromid für 100 ml Agarose-Gel). Die elektrophoretische Auftrennung erfolgte in einer horizontalen Gelelektrophorese (Analytik Jena GmbH) unter Anlage von konstanten 127 mA für optimale Laufeigenschaften. Die erzielten DNA Banden wurden unter Verwendung von UV-Licht visualisiert. Die Ausbeute und Qualität der DNA wurde mit Hilfe eines Spektralphotometers bestimmt (ScanDrop 250, Analytik Jena GmbH). Dazu wurden 4 µl jeden Eluates in eine entsprechende CHIPCUVETTE gegeben. Die Messung wurde bei 1,0 mm Weglänge durchgeführt.

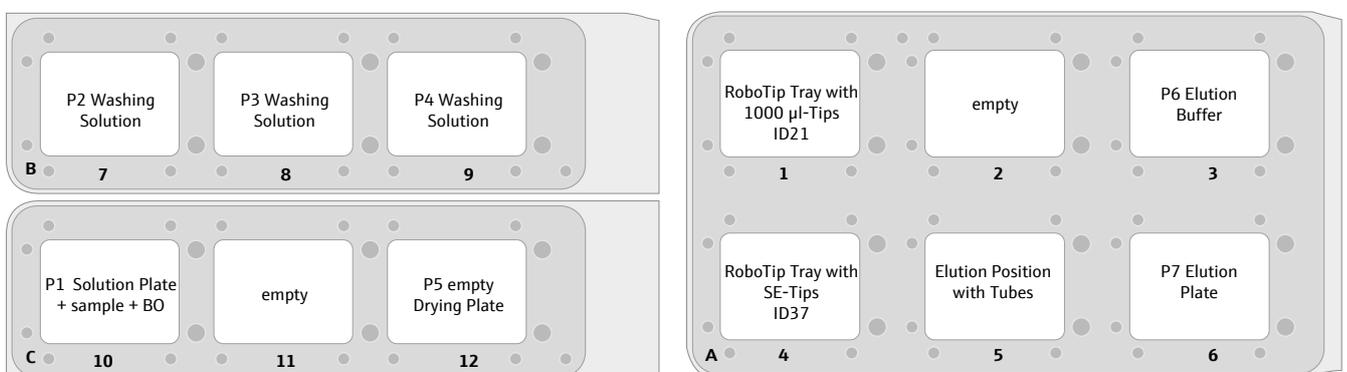


Abbildung 2: CyBio FeliX Decklayout für die automatisierte Extraktion mit smart Blood DNA Midi prep (a96).

Ergebnisse und Diskussion

In Kombination von smart Blood DNA Midi prep (a96) mit CyBio FeliX erfolgte die automatisierte Extraktion genomischer DNA (gDNA) aus 10 unterschiedlichen Vollblutproben (3 ml). Eine Agarose-Gelelektrophorese (Abb.3) und spektrophotometrische Messungen (Tabelle 1) wurden genutzt, um die Qualität und die Ausbeute der isolierten DNA zu bestimmen. In Tabelle 1 sind die Reinheit ($A_{260}:A_{280}$ und $A_{260}:A_{230}$) und Konzentration der extrahierten DNA aufgeführt. Gemessen wurden Reinheit und Konzentration mit dem ScanDrop 250 der Analytik Jena GmbH. Die Qualität der extrahierten DNA ist in Bezug auf die Auswertung $A_{260}:A_{280}$ und $A_{260}:A_{230}$ exzellent.

Die Extraktionsmethode ermöglicht eine hohe Ausbeute an hochmolekularer DNA. Die Proben wurden zudem ungleichmäßig über die Platte verteilt, um die Vergleichbarkeit und Reproduzierbarkeit der Probenaufarbeitung innerhalb der Reaktionsplatte darzustellen.

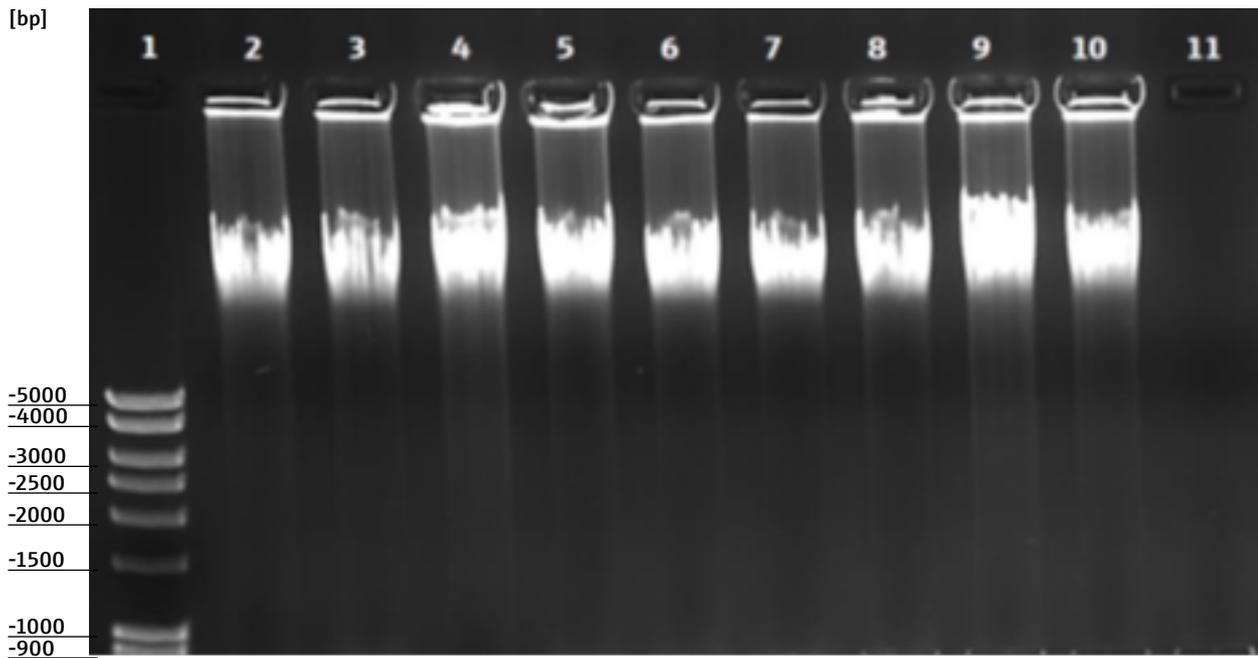


Abbildung 3: Ergebnisse der horizontalen Agarose-Gelelektrophorese, automatisiert extrahierte gDNA aus Vollblut Proben (pelletiert kernhaltige Zellen) unter Verwendung des smart Blood DNA Midi prep (a96) in Kombination mit dem Pipettiersystem CyBio FeliX. Visualisiert ist eine eingesetzte Menge von 10 μ l Eluat auf einem 0,8 % Agarose Gel, versetzt mit Ethidiumbromid. Bahn 1: DNA Ladder; Bahn 2 – 10: DNA extrahiert aus kernhaltigen Zellen aus 3 ml Vollblut; Bahn 11: negativ Kontrolle (CO)

Lane	Whole blood [ml]	A ₂₆₀ :A ₂₈₀	A ₂₆₀ :A ₂₃₀	Conc. [ng/μl]	Yield [μg]
1	DNA Ladder	–	–	–	–
2	3 ml	1,8	2,4	188	94
3	3 ml	1,8	2,3	175	87,5
4	3 ml	1,8	2,6	216	108
5	3 ml	1,8	2,3	229	114,5
6	3 ml	1,8	2,2	213	106,5
7	3 ml	1,8	2,7	194	97
8	3 ml	1,8	2,3	216	108
9	3 ml	1,8	2,8	178	89
10	CO	–	–	0,0	0,0

Tabelle 1 : Spektralphotometrisch ermittelte Ergebnisse der gDNA Extraktion aus Vollblut Proben unter Verwendung des ScanDrop 250

Zusammenfassung

SmartExtraction, als neuartige und innovative Technologie zur Isolierung von Nukleinsäuren, ist mit dem flexiblen Pipettiersystem CyBio FeliX elegant und effizient automatisierbar. Es können hochwertige und reproduzierbare Pipettiererergebnisse erzielt werden, auf dessen Grundlage eine hohe Ausbeute an hochmolekularer DNA möglich ist. Auf Basis eines modularen Systems, ist der Grad der Automatisierung vom Kunden frei konfigurierbar. Die flexible Automationslösung trägt zur Verbesserung der Reproduzierbarkeit der Ergebnisse bei und steigert die Effektivität der Arbeitsprozesse. Die automatisierte Extraktion von DNA für Downstream Prozesse resultiert in einer einfacheren und parallelen Präparation von Proben, bei minimalem Aufwand und maximaler Konsistenz. Darüber hinaus ist der CyBio FeliX auch für weiterführende Liquid Handling Routineaufgaben nutzbar.

Dieses Dokument ist zum Zeitpunkt der Veröffentlichung wahr und korrekt; die darin enthaltenen Informationen können sich ändern. Dieses Dokument kann durch andere Dokumente ersetzt werden einschließlich technischer Änderungen und Korrekturen.