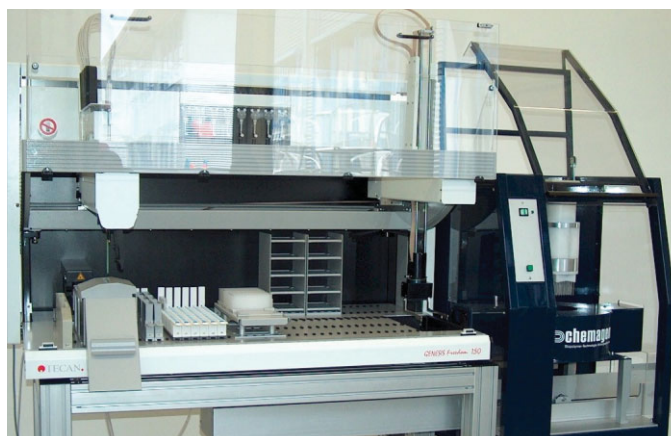


## Medium und High Volume DNA-Extraktion für die HLA-Typisierung

Jürgen Fetzer<sup>1</sup> und Stephan Jacobs<sup>2</sup>, <sup>1</sup>Tecan Deutschland GmbH, Crailsheim und <sup>2</sup>chemagen Biopolymer-Technologie AG, Baesweiler

► Das humane Leukozyten-Antigen-System (HLA) besteht aus einer Gruppe hoch-polymorpher Glykoproteine, die paarweise auf der Leukozytenoberfläche exprimiert werden und eine zentrale Rolle in der Physiologie des Immunsystems, insbesondere bei der Abwehr von Infektionserregern und körperfremden Stoffen spielen. Um bei Knochenmarks-Transplantationen Abstoßungsreaktionen infolge einer Unverträglichkeit der Spender- und Patienten-HLA-Systeme zu vermeiden, werden HLA-Typisierungen auf Gewebeverträglichkeit vorgenommen. Hierbei werden allelische Polymorphismen des HLA-Systems untersucht. Neben der serologischen Bestimmung von Anti-HLA-Antikörpern, dem sogenannten lymphotoxischen Test, kommen inzwischen häufig molekularbiologische Methoden zum Einsatz. Außer der direkten Sequenzierung der HLA-Gene (SBT=sequence based typing) wird vornehmlich die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) mit sequenzspezifischen Primern verwendet (PCR-SSP) und die Oligonukleotid-Hybridisierung PCR-amplifizierter DNA-Abschnitte (PCR-SSO) genutzt, wobei meist eine Kombination der Methoden zur sicheren Bestimmung des HLA-Haplotyps notwendig ist. Um die optimale Übereinstimmung zwischen Spender und Patient zu finden, ist eine Vielzahl von PCR-Reaktionen notwendig. Hierfür werden bis zu 100 µg genomische DNA höchster Reinheit benötigt. In der Regel wird diese DNA aus 100 µl bis 2 ml Vollblut gewonnen. Eine neue Automationsplattform für den Routineeinsatz ermöglicht jetzt kontaminationsfrei und schnell die Probenvorbereitung und DNA-Extraktion in der erforderlichen



**Abb. 1:** Tecan Freedom 150/8 Workstation (links) mit angeschlossenem chemagic Magnetic Separation Module I (rechts). Der Roboterarm kann den Plattencarrier unter der Arbeitsplattform durch eine Öffnung in der Plattform be- und entladen.

Menge und Qualität, wobei die sonst bei DNA-Extraktionsmethoden üblichen Präzipitations-, Zentrifugations- und Vakuumschritte entfallen. Die erhaltene gereinigte genomische DNA liegt sofort gelöst in geeigneter Konzentration vor und lässt sich so direkt in die diagnostischen Downstream-Prozesse überführen.

### Prozess 1: Probenvorbereitung

Die neue Automationsplattform für die High Volume Extraktion genomischer DNA für die HLA-Typisierung ist eine Kombination der Tecan Freedom 150/8 Workstation (Tecan Deutschland GmbH, *Abb. 1 links*) an die das chemagic Magnetic Separation Module I (chemagen Biopolymer-Technologie AG, *Abb. 1 rechts*) angeschlossen ist. Die Freedom 150/8 Workstation ist mit 4 Teflon-beschichteten Standard-Stahlnadeln und einem 4-fach Adapter für Wechselspitzen ausgestattet. Auf der Arbeitsplattform befinden sich Carrier für Primärröhrchen, Wechselspitzen, Reagenzien,

Mikrotiter-Platten und Deep-Well Platten. Der Barcodeleser identifiziert sowohl Primärröhrchen als auch Mikrotiter-Platten verwechslungsfrei und unterstützt das sichere Handling. Die Deep-Well Platten werden in zwei Plattenhotels bereitgestellt. Eine zentrale Funktion in der Automationslösung hat der Roboter-Manipulatorarm der Anlage. Er transportiert nicht nur die die Deep-Well Platten von den Plattenhotels zu den Pipettierpositionen, sondern diese auch durch eine Öffnung in der Arbeitsplatte unter die Platte in eine Transportschiene, die sie dann für die magnetische Separation zum chemagic Magnetic Separation Module I befördert und so die beiden Geräte miteinander verbindet.

### Prozess 2: Magnetische DNA-Separation

Die Isolierung der DNA wird effizient mit dem chemagic Magnetic Separation Module I (Fig. 2) durchgeführt, das mit verschiedenen Separationsköpfen bestückt werden kann und so

das Arbeiten mit unterschiedlichsten Probenvolumina ermöglicht. So können unter Verwendung des Separationskopfes mit 96 magnetisierbaren und rotierbaren Metallstäben, 96er Deep-Well- (Arbeitsvolumen bis zu 2 ml) oder Mikrotiter-Platten prozessiert werden, während die Verwendung des Separationskopfes mit 12 Metallstäben das Arbeiten in zwölf 50 ml oder 15 ml Röhrchen erlaubt. In Verbindung mit den von chemagen entwickelten Kitreagentien (chemagic DNA Blood Kits) ist die DNA-Extraktion sowohl aus 10-300 µl Vollblut (Low to Medium Volume) in Deep-Well Platten als auch aus bis zu 10 ml Vollblut (High Volume DNA-Extraktion) in 50 ml Falcon-Röhrchen durchführbar. Durch die rotierenden Stäbe wird für beide Formate eine optimale Aufreinigung der DNA für die Downstream-Prozesse erreicht. Das chemagic Magnetic Separation Module I ist auf der rechten Seite des Tecan Freedom positioniert, dessen Roboterarm alle Positionen des Plattencarriers unter der Arbeitsplatte be- und entladen kann. Das Separationsmodul wird über ein Interface von der Tecan Gemini Software gesteuert, wodurch die koordinierte Zusammenarbeit der beiden Geräte gewährleistet ist.



**Abb. 2:** chemagic Magnetic Separation Module I mit 96 magnetisierbaren und rotierbaren Metallstäben, die in die Lösung mit magnetischen Beads eintauchen. 1: Elektromagnet, 2: Separationskopf mit 96 Metallstäben

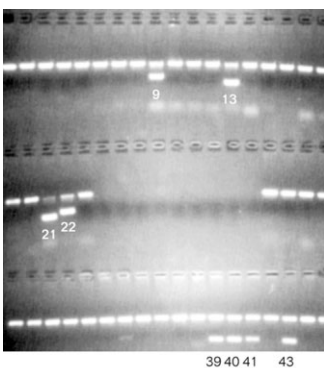
Medium Volume DNA-Extraktion: 96 Extraktionen aus 100 µl Vollblut	High Volume DNA-Extraktion: 12 Extraktionen aus 2 ml Vollblut
Separationskopf: 96 Stäbe	Separationskopf: 12 Stäbe
96er Deep-Well Platten	50 ml Falcon-Röhrchen
100 µl Vollblut	2 ml Vollblut
+ 200 µl Lysispuffer	+ 3 ml Lysispuffer
+ 450 µl Bindungspuffer	+ 8 ml Bindungspuffer
+ 150 µl Magnetic Beads	+ 240 µl Magnetic Beads
3 x 500 µl Waschpuffer	4 x 5 ml Waschpuffer
100 µl Elutionspuffer	500 µl Elutionspuffer
<b>Separationsergebnis:</b> 3 – 4 µg gereinigte genomische DNA (OD, Gelelektrophorese)	<b>Separationsergebnis:</b> 60 – 100 µg gereinigte genomische DNA (OD, Gelelektrophorese)
Prozessdauer: 50 Minuten	Prozessdauer: 70 Minuten

### Medium und High Volume DNA-Extraktion

Die Primärproben, Reagenzien und Wechselspitzen befinden sich in Carriern auf der Arbeitsplattform, die Deep-Well Platten in den Plattenhotels, das chemagic Magnetic Separation Module I ist mit dem Separationskopf bestückt. Der Barcodeleser liest zunächst die Daten der Primärproben ein und der Liquid Handling Arm bereitet folgende Deep-Well Platten resp. Falcon-Röhrchen vor:

### Ergebnisse

Die Extraktionsergebnisse aus mehr als 1.500 Spenderproben



**Abb. 3: PCR-SSP Analyse von HLA-DRB1 und HLA-DQB1 Allelen. Genomische DNA wurde amplifiziert mit 45 verschiedenen Allel-spezifischen Primerpaaren für die Gene DRB1 bis DRB5 und DQB1. Allel-spezifische PCR-Produkte erscheinen als intensive Banden unterhalb des 439 bp Kontrollamplicons (HGH Gen) in den Lanes 9, 13, 21, 22, 39, 40, 41, 43 (Daten: Dr. S. Ferencik, Institut für Immunologie, Universitätsklinik Essen).**

zeigten eine hohe Vergleichbarkeit der erhaltenen DNA-Mengen ( $76 \mu\text{g} \pm 9 \mu\text{g}$ ) und der DNA-Reinheit ( $\text{OD } 1,8 \pm 0,09$ ). Die gereinigte DNA wurde in der Routine zur Typisierung von HLA-A, B, C, DRB1 und DQB1 Allelen mittels PCR-SSP eingesetzt (s. beispielhafte Ergebnisse in *Abb. 3*).

### Fazit

Die Automationslösung eignet sich hervorragend für den Routineeinsatz bei der Probenvorbereitung in der HLA-Typisierung aber auch für alle anderen Prozesse, bei denen Ausbeute und Reinheit genomischer DNA essentiell sind. Genomische DNA wird kontaminationsfrei und schnell in der erforderlichen Menge und Qualität für die Analyse gewonnen.

### Korrespondenzadressen:

**Dr. Jürgen Fetzer**  
 Tecan Deutschland GmbH  
 Theodor-Storm-Str. 17  
 D-74564 Crailsheim  
 Tel.: +49-7951-9417-18  
 Fax: +49-7951-5038  
 juergen.fetzer@tecan.com

**Dr. Stephan Jacobs,**  
 chemagen Biopolymer-Technologie AG  
 Arnold-Sommerfeld-Ring 2  
 D-52499 Baesweiler  
 Tel.: +49-2401-805-500  
 Fax: +49-2401-805-519  
 stephan.jacobs@chemagen.com