

Uit de laboratoriumpraktijk

Volledig geautomatiseerde isolatie van DNA uit bloed met behulp van een pipetteerrobot

S.G. HEIL, B.A.J. GIESENDORF, J.M.F. TRIJBELS en H.J. BLOM

In dit artikel wordt de automatisering van DNA-isolatie uit bloed, gebruikmakend van de Dynabeads® DNA Direct™ kit en het geautomatiseerde pipetteerstation Biomek™ 2000 beschreven. Combinatie van deze technieken resulteert in een tijdsbesparende en nauwkeurige procedure, die het mogelijk maakt om DNA uit 96 bloedmonsters te isoleren in 45 minuten zonder enige centrifugatie stap. Het geïsoleerde DNA blijkt geschikt te zijn voor onder andere polymerase chain reactie (PCR) gevolgd door restrictie-enzym analyse. De in dit artikel beschreven methode maakt volledig geautomatiseerde DNA-analyse in de toekomst mogelijk.

Trefwoorden: automatisering; DNA-isolatie; homocysteïne; magnetische beads; mutatie-analyse; methyleentetrahydrofolaat reductase (MTHFR); pipetteerrobot

Het isoleren van DNA uit bloed en andere lichaamsmaterialen is een procedure die in diverse laboratoria veelvuldig op grote schaal uitgevoerd wordt. Het is echter een tijdrovende en arbeidsintensieve procedure. Indien DNA uit grote aantallen monsters geïsoleerd moet worden, is het zeer eentonig werk voor laboratoriummedewerkers. Met de komst van de Dynabeads® DNA Direct™ kit en de pipetteerrobot Biomek™ 2000 wordt het mogelijk om DNA-isolaties te automatiseren, waardoor de isolatietijd aanzienlijk korter wordt.

Binnen het laboratorium voor Kindergeneeskunde en Neurologie (LKN) van het Academisch Ziekenhuis Nijmegen (AZN, St. Radboud) wordt uitvoerig onderzoek gedaan aan diverse aspecten van hyperhomocysteinemie (1). Uit dit onderzoek blijkt dat een verhoogd homocysteïnegehalte een risicofactor is voor neurale buisdefecten (NBD) en vasculaire aandoeningen. Mede vanwege dit gegeven wordt onderzoek verricht naar genen betrokken bij het homocysteïne-

metabolisme. In dit artikel hebben we gekozen voor de analyse van de C677T-mutatie in het methyleentetrahydrofolaat reductase (MTHFR) gen (2) voor het optimaliseren van DNA-isolatie met behulp van de Dynabeads® DNA Direct™ kit en de Biomek™ 2000. Aangezien zeer grote groepen patiënten en controles op deze mutatie onderzocht moeten worden, zijn we overgegaan op automatisering van DNA-isolaties. In een later stadium zullen ook diverse vervolgproudures volledig geautomatiseerd worden.

We onderzochten in deze studie het gebruik van de Dynabeads® DNA Direct™ kit in combinatie met de Biomek™ 2000, voor het isoleren van DNA uit 96 bloedmonsters. Het DNA werd vervolgens gebruikt voor de screening van de C677T-mutatie in het MTHFR gen.

MATERIALEN en METHODEN

DNA-isolaties

Voor de isolaties van het DNA werd gebruik gemaakt van zowel EDTA-bloed als buffycoat. Onder buffycoat verstaan we in dit artikel de oorspronkelijke buffycoat inclusief de eerste 0,5 ml erythrocyten, afkomstig uit 5 ml EDTA-bloed.

Genomisch DNA werd geïsoleerd met behulp van de Dynabeads® DNA Direct™ kit systeem I (DynaI, ITK diagnostics, Uithoorn, Nederland), volgens de instructies van de fabrikant, op de Biomek™ 2000 (Beckman Instruments, Mijdrecht, Nederland). Allereerst vindt er cellysis plaats, door toevoeging van de Dynabeads Direct oplossing, om het DNA vrij te maken uit de kern van de cel. Vervolgens hecht het DNA zich aan het oppervlak van zogenaamde beads (dynabeads). Hierna volgt er een scheiding van het intact DNA-dynabeads complex met behulp van een magneet, waarna het complex twee keer gewassen wordt met wasbuffer. Het complex wordt hierna geresuspendeerd in resuspensiebuffer. Het DNA wordt uiteindelijk van de beads gescheiden door elutie. Het verkregen DNA is hierna direct geschikt voor PCR reacties.

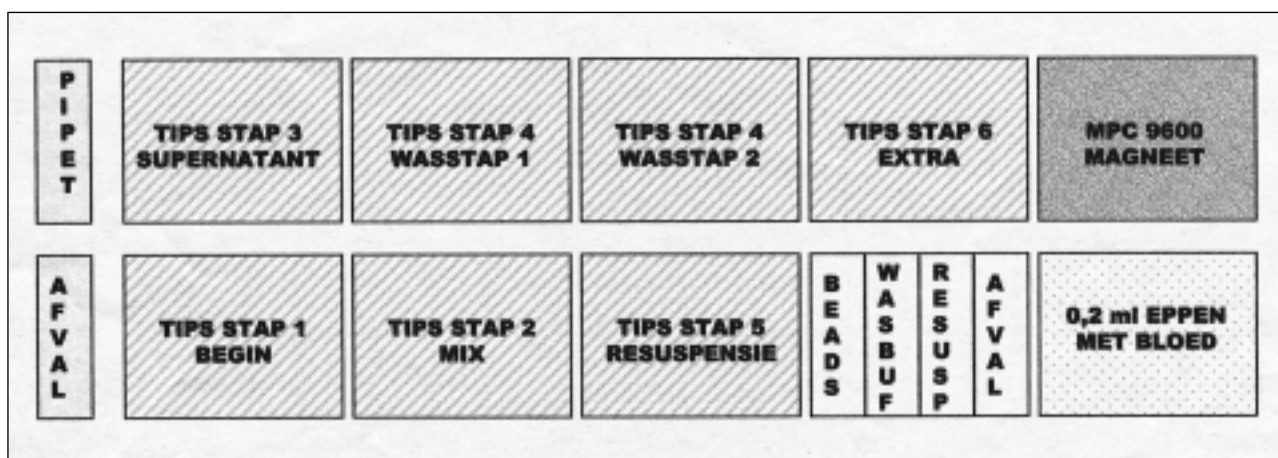
Biomek™ 2000 werkstation

De DNA-isolaties werden uitgevoerd op het Biomek™ 2000 werkstation. De Biomek heeft twee verschillende aanstuurprogramma's: Bioworks (versie

Laboratorium voor Kindergeneeskunde, Academisch Ziekenhuis Nijmegen

Correspondentie: Dr. H. J. Blom, Laboratorium voor Kindergeneeskunde, Academisch Ziekenhuis, Postbus 9101, 6500 HB Nijmegen.

Ingekomen: 02.10.97



Figuur 1. Configuratie van het Biomek 2000 werkstation. Schema voor 96 DNA-isolaties. Aanwezig zijn de MP-200 pipet met bijbehorende P250-pipettips. Aangegeven is waarvoor de tips gebruikt worden. Reagentia (beads, wasbuffer en resuspensiebuffer) zijn aanwezig in de daarvoor bestemde reservoirs.

1.4) en Bioscript. Bioworks is een eenvoudig te gebruiken programma waarin gekozen kan worden uit een aantal standaardconfiguraties. Met Bioscript kan iedere denkbare configuratie geprogrammeerd worden. Omdat wij gebruik wilden maken van een magnetische plaat met afwijkende maatvoering (13 x 8), hebben we het gehele programma met behulp van de Bioscript software geprogrammeerd. De Biomek is uitgerust met een "multi-channel" pipet (MP-200) met bijbehorende P250-tips (Beckman Instruments, Mijdrecht, Nederland). Reagentia bevinden zich in daarvoor bestemde reservoirs en buffycoats werden in 0,2 ml eppen aangeleverd. Het programma is een sterk aangepaste versie van Merel et al (3) en kan op aanvraag toegestuurd worden. De totale procedure is opgebouwd uit 6 stappen, zie figuur 1 voor het volledige pipetteerschema.

Aan 3 µl buffycoat werd 200 µl Dynabeads Direct Solution toegevoegd. Hierbij werd gebruikt gemaakt van de tips 'begin' (stap 1). Vervolgens vond er een incubatie plaats van 5 minuten bij kamertemperatuur voor lysis en binding van het DNA aan de dynabeads. Hierna werd de oplossing overgepipetteerd naar de magnetische plaat MPC 9600™ (DynaL, ITK diagnostics, Uithoorn, Nederland), gebruikmakend van de tips 'mix', waar 2 minuten geïncubeerd werd (stap 2). Tijdens deze incubatie werden de dynabeads (inclusief DNA) door de magneet aangetrokken en geconcentreerd aan de wand van het epje. Het supernatant werd vervolgens afgepipetteerd met de tips 'supernatant' (stap 3). Het DNA-dynabeads complex werd hierna 2 keer gewassen met 200 µl wasbuffer met behulp van de tips 'wasstap' (stap 4). Resuspensie vond plaats door toevoeging van 40 µl resuspensiebuffer, gebruikmakend van de tips 'resuspensie' (stap 5). Hierna werden de epjes met de DNA oplossing handmatig van de magneet afgehaald. Vervolgens werden de oplossingen goed gehomogeniseerd door 40 keer 'opzuigen en uitspuiten' van de oplossing (stap 6, tips 'extra'). Elutie vond uiteindelijk plaats door de epjes 5 minuten bij kamertemperatuur te laten staan (zelf-elutie), voordat er verdere analyses met het DNA gedaan werden.

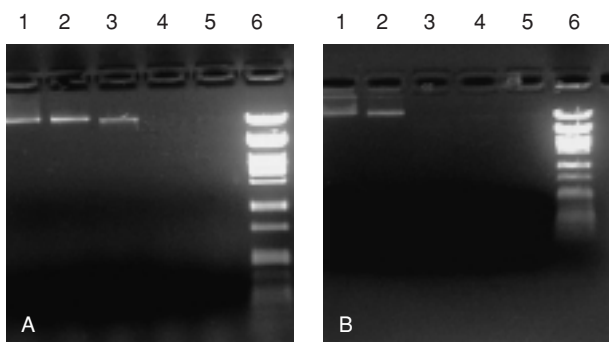
Mutatie-analyse

Mutatie-analyse werd uitgevoerd volgens Frosst et al (2). In eerste instantie werd er met 5 µl van de geïsoleerde DNA-oplossing een PCR uitgevoerd. De PCR vond plaats in een totaal volume van 50 µl en bevatte de volgende reagentia: 100 ng forward primer (MTHFR-11) en 100 ng reverse primer (MTHFR-12) (Life Technologies, Breda, Nederland), 200 µM dNTP-oplossing, 1,5 mM MgCl₂, 10 mM Tris.HCl en 0,5 unit *Taq*-polymerase (alles afkomstig van Life-Technologies, Breda, Nederland). De PCR vond plaats in een Perkin Elmer 9600 thermocycler (Perkin Elmer, Nieuwerkerk a/d IJssel, Nederland) onder de volgende omstandigheden: initiële denaturatie 92°C/120 sec., gevolgd door 40 cycli van 92°C/60 sec. (denaturatie), 56°C/30 sec. (annealing), 72°C/30 sec. (extensie). Het geamplificeerde product werd geknipt met *HinfI*. Dit resulteerde voor het wildtype (CC) in een ongeknipt fragment van 198 bp, terwijl het mutante genotype (TT) twee banden gaf; ten gevolge van de mutatie werd het oorspronkelijke fragment van 198 bp in twee fragmenten van respectievelijk 175 bp en 23 bp geknipt. Bij het heterozygote genotype (CT) ontstaan er drie fragmenten van 198 bp, 175 bp en 23 bp. Deze fragmenten werden van elkaar gescheiden op een 4% agarosegel: alleen de fragmenten van 198 bp en 175 bp zijn zichtbaar.

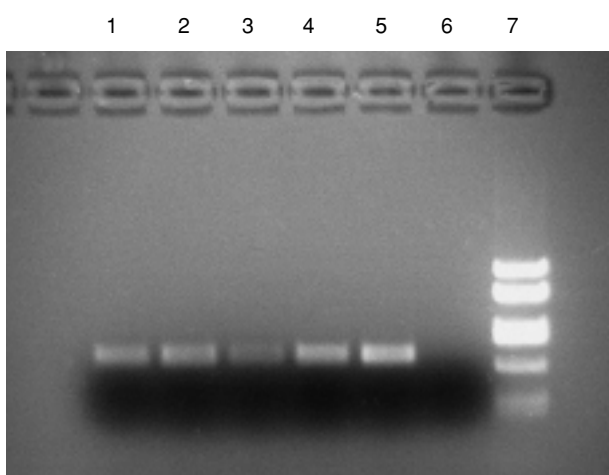
RESULTATEN

DNA isolaties met de Dynabeads® DNA Direct™ kit en het Biomek™ 2000 werkstation

Met de Dynabeads® DNA Direct™ kit en het Biomek™ 2000 werkstation werd van 96 monsters, volledig automatisch in 45 minuten, DNA geïsoleerd zonder centrifugatie-stappen. Verschillende condities werden uitgetest ter optimalisatie van de procedure, waaronder verschillende monsterverdunningen en variaties in pipetteerstappen. Uit figuur 2 blijkt dat de maximale opbrengst verkregen werd met 3 µl buffycoat (figuur 2A). Bij volbloed (figuur 2B) werd met zowel 3 µl als 10 µl de maximale opbrengst verkregen. We hebben in onze experimenten gekozen voor



Figuur 2. DNA-opbrengst uit verschillende hoeveelheden buffycoat en bloed. A: Weergegeven is 10 µl DNA geïsoleerd uit buffycoat met verschillende hoeveelheden als uitgangsmateriaal op een 1% agarosegel. Als uitgangsmateriaal is 10 µl, 3 µl, 1 µl, 0,3 µl en 0,1 µl buffycoat gebruikt (respectievelijk laan 1, 2, 3, 4 en 5). Laan 6 is de moleculaire gewichtsmarker λ -*Pst*I. B: Hetzelfde als voor A maar dan voor volbloed.



Figuur 3. Variaties in PCR-condities voor de C677T-mutatie in het MTHFR-gen. Voor de PCR werd 2, 5 en 10 µl DNA geïsoleerd uit 3 µl buffycoat gebruikt, 10 µl van deze PCR-producten is respectievelijk in laan 1,2 en 3 te zien op een 2% agarosegel. Tevens werd de PCR uitgevoerd met 5 µl DNA inclusief beads (laan 4) en met 5 µl DNA zonder beads (laan 5) in de PCR-mix, hiervan werd ook 10 µl op een 2% agarosegel geanalyseerd. Laan 6 is een negatieve controle op de PCR. Laan 7 is de moleculaire gewichtsmarker pUC-*Hae*III.

3 µl buffycoat en 10 µl volbloed omdat met deze hoeveelheden de beste PCR resultaten verkregen werden. Incubatietijden werden uitgevoerd volgens het protocol behorende bij de Dynabeads[®] DNA Direct[™] systeem I kit. Wasstappen vonden plaats op de magneet. De hoeveelheid DNA die geïsoleerd werd, werd geschat aan de hand van vergelijking met een moleculaire gewichtsmarker op een 1% agarosegel en niet met behulp van een spectrofotometer omdat de beads storen bij deze spectrofotometrische bepaling. Figuur 2A laat DNA geïsoleerd uit verschillende hoeveelheden buffycoat zien. De grootte is tenminste 12.000 bp en de hoeveelheid, verkregen uit 3 µl buffycoat (laan 2), is na vergelijking met de λ -*Pst*I marker (laan 6) geschat op ongeveer 5-10 ng/µl. In figuur 2B is hetzelfde weergegeven maar dan voor volbloed. De hoeveelheid DNA verkregen uit 10 µl volbloed (laan 1) is na vergelijking met de moleculaire gewichtsmarker λ -*Pst*I (laan 6), geschat op ongeveer 2-5 ng/µl.

Mutatie-analyse

Het geïsoleerde DNA werd gebruikt voor PCR gevolgd door restrictie-enzymanalyse, ter bepaling van de C677T-mutatie in het MTHFR-gen volgens Frosst et al (2). Hierbij werden verschillende condities getest. Toevoeging van verschillende hoeveelheden DNA toonde aan dat voor 3 µl buffycoat als uitgangsmateriaal, 2 tot 5 µl DNA het beste resultaat gaf in de PCR (figuur 3; laan 1 en 2). Door toevoeging van meer dan 5 µl DNA verliep de PCR minder goed (figuur 3; laan 3). Waarschijnlijk bevat het DNA onzuiverheden die bij meer dan 5 µl remmend/storend werken in de PCR. Verder werd de PCR uitgevoerd met DNA inclusief dynabeads en met DNA zonder dynabeads in de PCR mix. Figuur 3 (laan 4 en 5) laat zien dat dit geen invloed heeft op het uiteindelijke PCR-product.

DISCUSSIE

De automatisering van DNA-isolaties uit volbloed en buffycoat, met behulp van de Dynabeads[®] DNA Direct[™] kit en het Biomek[™] 2000 werkstation, bleek zeer succesvol. Isolatie van DNA met behulp van de Dynabeads[®] DNA Direct[™] kit is een zeer snelle methode. Zowel handmatig als automatisch vormt dit een snellere methode dan de conventionele DNA-isolatiemethoden (4). Een nadeel kan zijn dat het DNA niet hoogmoleculair is en dat de opbrengst laag is (2-10 ng/µl) vanwege de kleine hoeveelheid uitgangsmateriaal (3 µl buffycoat of 10 µl volbloed). Het bepalen van de concentratie van het DNA met behulp van een moleculaire gewichtsmarker, is een globale schatting. Spectrofotometrische bepaling was niet mogelijk omdat de beads hierbij sterk stoorden, waardoor ook de zuiverheid niet betrouwbaar bepaald kon worden. Indien meer dan 3 µl buffycoat werd gebruikt en meer dan 10 µl volbloed, bleven rode bloedcellen achter in de uiteindelijk verkregen DNA-oplossing. Deze rode bloedcellen zouden eventueel kunnen storen in vervolgreacties. Tevens treedt er bij gebruik van bovengenoemde hoeveelheden verzadiging op van de dynabeads. In figuur 2A is te zien dat 10 µl buffycoat als uitgangsmateriaal te veel is; hierdoor wordt niet al het vrijgekomen DNA gebonden aan de beads, waardoor de DNA-opbrengst relatief minder wordt. In sommige gevallen liet het verzadigde DNA-dynabeads complex zelfs los van de wand van het epje waardoor het vervolgens verwijderd werd tijdens afpipetteren van het supernatant. In onze experimenten werd gebruik gemaakt van 3 µl buffycoat en 10 µl volbloed als uitgangsmateriaal, omdat met deze hoeveelheden goede resultaten verkregen werden voor de bepaling van de C677T-mutatie in het MTHFR-gen. Het is overigens mogelijk om meer uitgangsmateriaal te gebruiken; hiervoor is een andere kit beschikbaar, de zogenaamde Dynabeads[®] DNA Direct[™] kit, systeem II (Dyna, ITK Diagnostics, Uithoorn, Nederland). Dit DNA Direct[™] systeem II is echter niet geschikt voor volledige automatisering op de Biomek, omdat er onder andere een centrifugatiestap aan vooraf gaat ter verwijdering van de rode bloedcellen.

Om de zuiverheid van het DNA te verbeteren kan overwogen worden om de wasstappen niet geheel met de magneet uit te voeren (zie instructies fabrikant). Momenteel wordt er gewerkt aan een vernieuwde versie van de magnetische plaat (Dynal, Oslo, Noorwegen) die zowel aan- als uitgeschakeld kan worden. Door uitschakelen van de magneet tijdens het wassen zal het complex loslaten van de wand van het epje, waardoor het veel beter gewassen kan worden, hetgeen leidt tot zuiverder DNA (persoonlijke communicatie, Dynal). Door toepassing van aan- en uitschakelen van de magneet zal de configuratie van de Biomek veranderen. Alle stappen kunnen plaatsvinden op één positie, hetgeen zal resulteren in minder pipetteerhandelingen en gebruik van minder tips. Hierdoor zullen er posities op de Biomek vrijkomen, die gebruikt kunnen worden voor andere additionele stappen, zoals het toevoegen van PCR-reagentia aan het geïsoleerde DNA.

Voor bepaling van de C677T-mutatie in het MTHFR-gen is de in dit artikel beschreven methode uitermate geschikt. Met de komst van de Biomek™ 2000 werd het mogelijk om DNA-isolaties uit bloed volledig te automatiseren. Automatisering brengt een aantal voordelen met zich mee: de nauwkeurigheid is erg groot; de kans op pipetteerfouten en/of monsterverwisseling is minimaal geworden. Daarnaast is er sprake van enorme tijdwinst; DNA wordt uit 96 monsters geïsoleerd in 45 minuten. Als nadeel is te noemen de kosten voor aanschaf van de Dynabeads® DNA Direct™ kit (ongeveer twee keer duurder dan conventionele DNA-isolatie methoden). Aangezien volledig geautomatiseerde isolatie van DNA een besparing in de arbeidskosten oplevert, is deze methode ruim 2 keer goedkoper.

Wanneer DNA in dezelfde ruimte geïsoleerd wordt als waar de PCR's plaatsvinden, kan er contaminatie van het DNA optreden. Contaminatie met amplimeren (stukjes DNA vermenigvuldigd door PCR) kan voorkomen worden door DNA te isoleren in een ruimte waar geen amplimeren voorkomen. Om de contaminatie-problematiek verder te reduceren kan men in deze 'amplimeervrije ruimte' een overdruk laten heersen, waardoor er geen lucht van buitenaf deze ruimte in kan.

In de toekomst zullen er vele andere moleculair genetische bepalingen geautomatiseerd gaan worden (5), hetgeen zal leiden tot verbeterde mutatie-analyses, die ook door niet-gespecialiseerde laboratoria uitgevoerd kunnen worden. Hierbij kan men denken aan koppeling van de Biomek aan een PCR-apparaat en vervolgens aan een Capillaire Elektroforese systeem (CE), waardoor mutatie-analyse volledig geautomatiseerd kan plaatsvinden. Een andere mogelijkheid is om ter vervanging van PCR gevolgd door restrictie-enzymanalyse, gebruik te maken van zogenaamde

molecular beacons (6,7). Met behulp van deze fluorescerende probes kan mutatiedetectie plaatsvinden in een geautomatiseerd gesloten systeem. Dit laatste zal in de nabije toekomst gerealiseerd worden.

De in dit artikel beschreven volledig geautomatiseerde isolatie van DNA uit bloed is een belangrijke stap op weg naar ons uiteindelijke doel: volledig geautomatiseerde DNA-analyse in een gesloten systeem.

We willen Beckman Instruments (Mijdrecht, Nederland) bedanken voor technische assistentie en ITK Diagnostics (Uithoorn, Nederland) voor technische ondersteuning. Dit werk werd gefinancierd door de EU commission demonstration project contractnummer BMH4-CT95-0505.

Literatuur

1. Blom HJ, Boers GHJ, Eskes TKAB en Trijbels JMF. Hyperhomocysteinemie. *Ned Tijdschr Klin Chem* 1995; 20: 20-26.
2. Frosst P, Blom HJ, Milos R, Goyette P, Sheppard CA, Matthews RG, Boers GHJ et al. A candidate genetic risk factor for vascular disease: A common mutation in methylenetetrahydrofolate reductase. *Nature Genet* 1995; 10: 111-113.
3. Merel P, Dupin B, Comeau F, Lacoste L and Vezon G. Completely automated extraction of DNA from whole blood. *Clin Chem* 1996; 42: 1285-1286.
4. Miller SA, Dykes DD and Polesky HF. A simply salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Res* 1988; 16: 1215.
5. Giesendorf BAJ, Blom HJ en Trijbels JMF. Nieuwe ontwikkelingen in de automatisering van moleculaire diagnostiek: mutatie-analyse. *Ned Tijdschr Klin Chem* 1997; 22: 215-218.
6. Tyagi S and Kramer FR. Molecular beacons: probes that fluoresce upon hybridisation. *Nature Biotechnol* 1996; 14: 303-308.
7. Giesendorf BAJ, Vet JAM, Tyagi S, Trijbels JMF, Mensink EJBM en Blom HJ. Molecular beacons: a new approach for semi-automated mutation detection. *Clin Chem* 1998. In press.

Summary

Isolation of DNA from blood using the automated Biomek™ 2000 workstation. Heil SG, Giesendorf BAJ, Trijbels JMF and Blom HJ. Ned Tijdschr Klin Chem 1998; 23: 58-61.

In this article the automation of DNA-isolation by the use of the Dynabeads® DNA Direct™ kit and the automated Biomek™ 2000 workstation is described. Combination of these techniques results in a fast and accurate procedure, that enables DNA-isolation from 96 blood samples in 45 minutes without centrifugation. The isolated DNA appears to be suitable for the polymerase chain reaction (PCR) followed by restriction-enzyme analysis. This procedure makes it possible to realise completely automated DNA-analysis in the near future.

Key-words: automation; DNA isolation; homocysteine; magnetic beads; mutation analysis; methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR); robotic workstation.