

DNA-extractie uit bloedstalen met behulp van de Chemagic 360 in de context van predictieve analyse

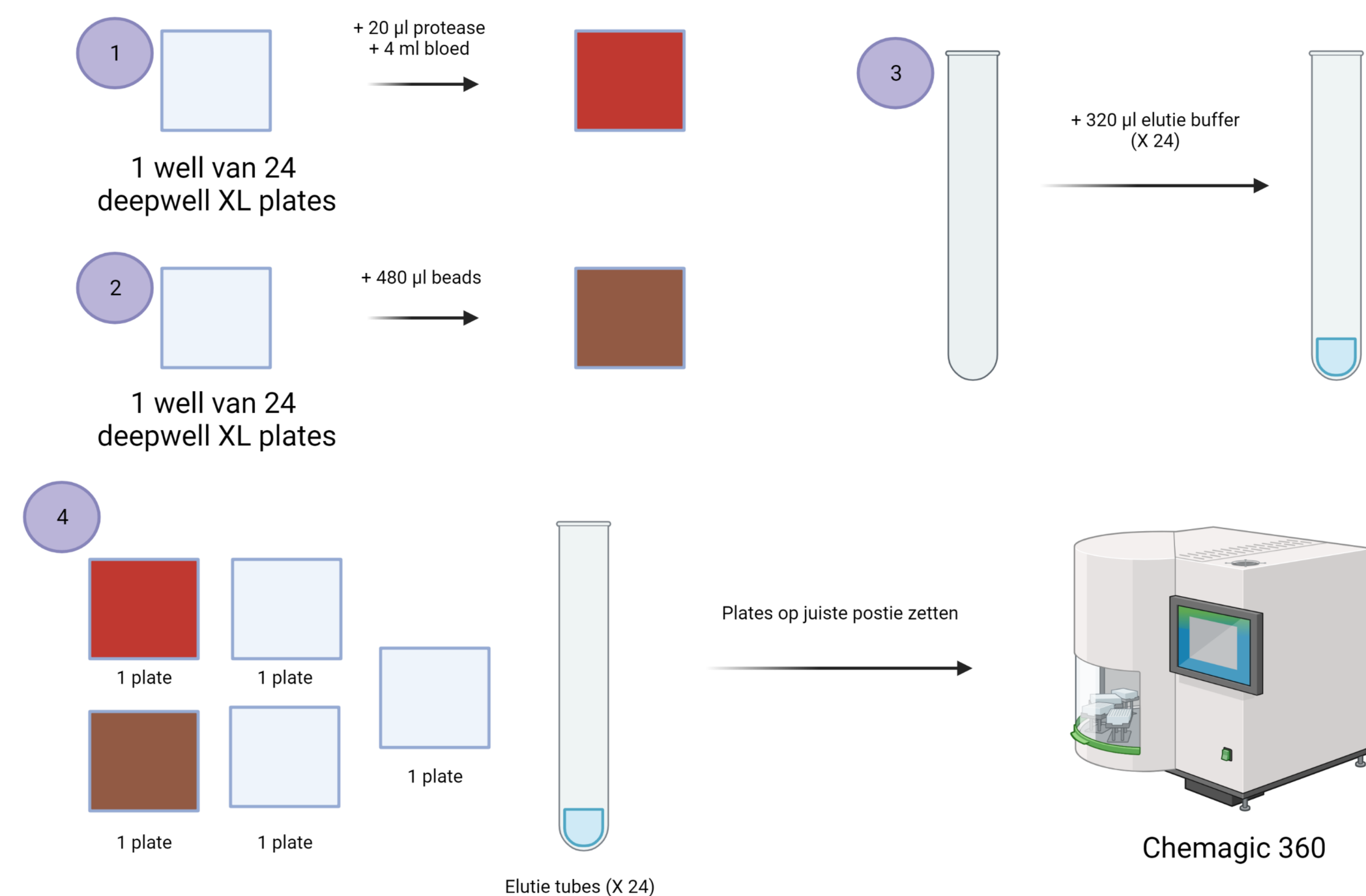
Maxime Van Nijverseel, Sara Vander Borgh, Bruno Vankeirsbilck

Centrum Menselijke Erfelijkheid, UZ Leuven

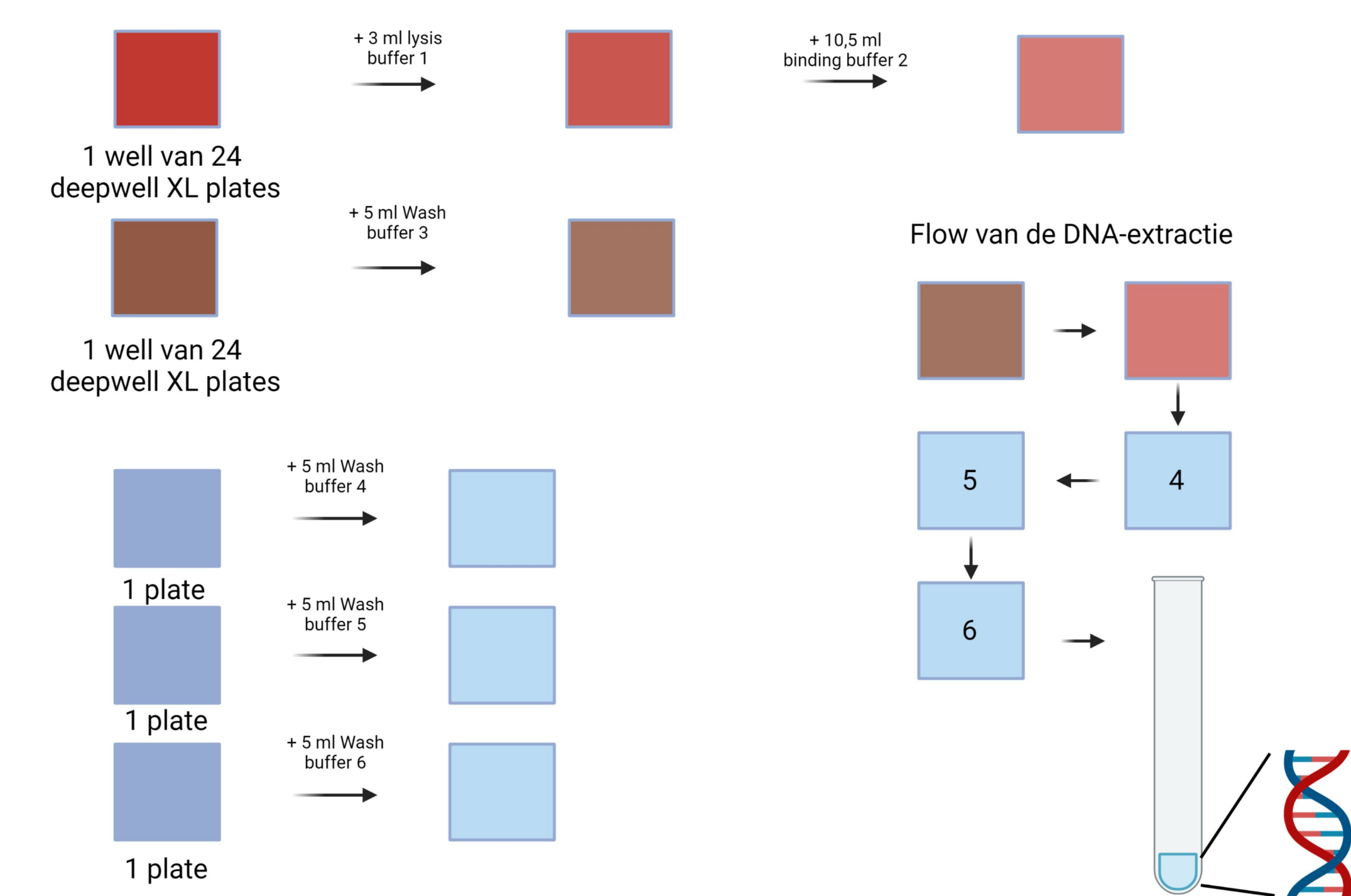
Inleiding

De DNA-extractie wordt uitgevoerd door de extractiefaciliteit op de dienst Centrum Menselijke Erfelijkheid (CME). De predictieve bloedstalen (twee per patiënt) nodig voor de extractie worden nagekeken door de stalenreceptie en gesorteerd door de Automate 1200 (Beckman Coulter) sorteerrobot. Er worden telkens twee bloedstalen per patiënt geanalyseerd om meer zekerheid te krijgen over het resultaat. Voor de DNA-extractie wordt gebruik gemaakt van de Chemagic 360 (PerkinElmer) met behulp van de reagentia uit de kit, 'Chemagic DNA blood kit special 4 ml' (CMG-1074; PerkinElmer). De kit bevat magnetische beads, lysis buffer, bindingsbuffer, wasbuffers en protease om zuiver DNA te verkrijgen. Het doel van de extractie is om een geoptimaliseerde input te verkrijgen voor downstream toepassingen zoals bijvoorbeeld PCR en Sanger sequencing.

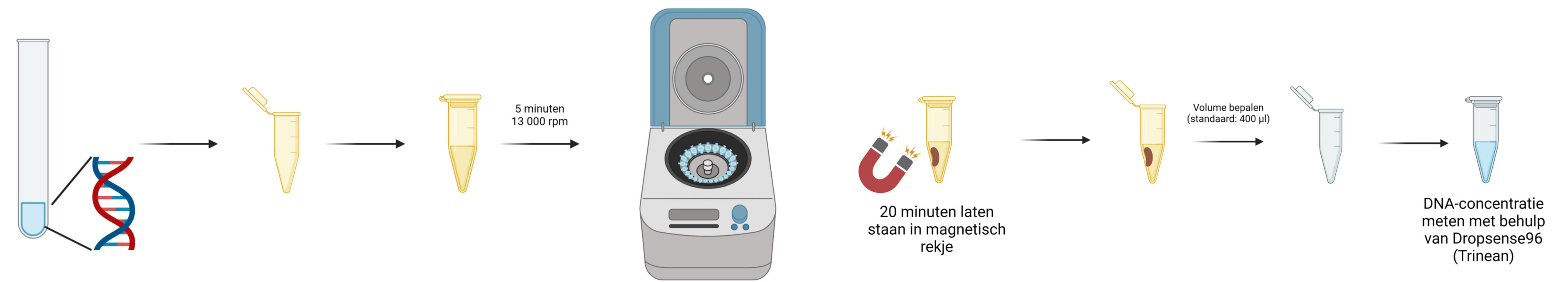
Materialen en methoden



Figuur 1 Manuele voorbereiding van de DNA-extractie



Figuur 2 Verschillende stappen tijdens het 'Chemagen 4K protocol' op Chemagic 360



Figuur 3 Manuele deel na de DNA-extractie door de Chemagic 360

Resultaten

Nummer staal	DNA-concentratie (µg/ml)	A ₂₆₀ /A ₂₈₀	A ₂₆₀ /A ₂₃₀
1A	217,37	1,97	2,40
1B	168,23	2,07	2,82
2A	234,57	1,99	2,18
2B	171,50	2,03	2,33
3A	263,25	2,00	2,19
3B	209,03	2,03	2,34
4A	251,01	1,98	2,17
4B	186,49	2,00	2,33
5A	257,11	2,00	2,15
5B	169,76	1,99	2,32
6A	201,95	1,98	2,18
6B	122,96	2,04	2,28

In de resultatensectie zijn voorbeelden weergegeven van twaalf DNA-metingen met behulp van de Dropsense96 (Trinean). De maximum concentratie naar waar wordt gestreefd is 330 µg/ml zodat de stalen vlot pipetteerbaar zijn. Bijgevolg worden deze stalen niet verdund. Een A₂₆₀/A₂₈₀ ratio van 1,8-2,0 is nodig om vast te stellen dat het DNA zuiver is van contaminanten (reagentia). Daarnaast wordt gekeken naar de A₂₆₀/A₂₃₀ ratio. Deze ratio wordt bekeken om te kijken of er contaminatie is van eiwitten. Deze wordt gebruikt omdat peptidebindingen een duidelijke absorptiepiek hebben bij een golflengte van 228 nm. Deze stalen zijn zuiver en mogen doorgegeven worden naar de downstream toepassingen.

Conclusie

De DNA-extractie is een eerste belangrijke stap voor een verdere moleculaire analyse van de predictieve vraagstelling. Het is belangrijk dat deze extractie zo correct mogelijk verloopt om voldoende zuiver DNA te bekomen voor onder andere de toepassing PCR gevolgd door Sanger sequencing. De methode van het bedrijf PerkinElmer zorgt voor een goede opzuivering van het DNA om kwaliteitsvol DNA te bereiken. Deze opzuivering kan gebeuren dankzij de goede werking van de 'Chemagic DNA blood kit special 4 ml' (CMG-1074; PerkinElmer). Dankzij de kit en de Chemagic 360 (PerkinElmer) verloopt de extractie op een gebruiksvriendelijke manier. De analyse resultaten van beide geëxtraheerde stalen (bijvoorbeeld 1A en 1B) worden met elkaar vergeleken en indien overeenstemmend wordt een rapport opgemaakt voor de aanvrager (klinisch geneticus) die de resultaten met de patiënt zal bespreken.

Referenties

1. CME-UZ Leuven. DNA isolatie met de Chemagen B-4K methode. UZ Leuven; 2023; EXF-MT048-PR
2. CME-UZ Leuven. Concentratiebepaling van DNA stalen mbv Dropsense 96. UZ Leuven; 2021; EXF-MT255-PR
3. Trinean. DropSense 96 and DropQuant v1.5. België; 2015; p. 70