

Optimalisatie van RNA-Concentratie door Verlaging van Elutievolume in Maxwell® RSC 48-Assay

INTRODUCTIE

Bij kleine biopten of cytologiestalen is de concentratie RNA verkregen uit formalin fixed paraffin embedded (FFPE) coupes vaak te laag of onvoldoende. Het doel van dit project is om de RNA concentratie te verhogen omdat in de toekomst doelgerichte RNA sequencing (Archer FusionPlex) vervangen zal worden door whole transcriptome sequencing (WTS) waarvoor minder volume input kan gebruikt worden. In deze validatiestudie werd getest of het elutievolume van de RNA-extractie met de Maxwell® RSC 48-assay verlaagd kon worden om de RNA-concentratie bij RNA-extractie te verhogen. In totaal werden er 13 experimenten uitgevoerd op 4 verschillende dagen waarbij de resultaten van de RNA-extractie werden onderzocht bij elutievolumes van 50 µl en 30 µl. Zowel de volume opbrengst als de concentratie bij beide elutievolumes werd getest.

MATERIALEN EN METHODEN

I. Macrodissectie en RNA-Extractie

Het tumorweefsel werd van het glaasje geschraapt en verzameld in een Eppendorf tube. Vervolgens werd er een semi-automatische RNA-extractie op uitgevoerd met behulp van een kit en de Maxwell RSC 48.



2. Bepaling volumeopbrengst

Het overgebleven volume werd telkens gemeten om het volumeverlies te bepalen.



3. Qubitmeting

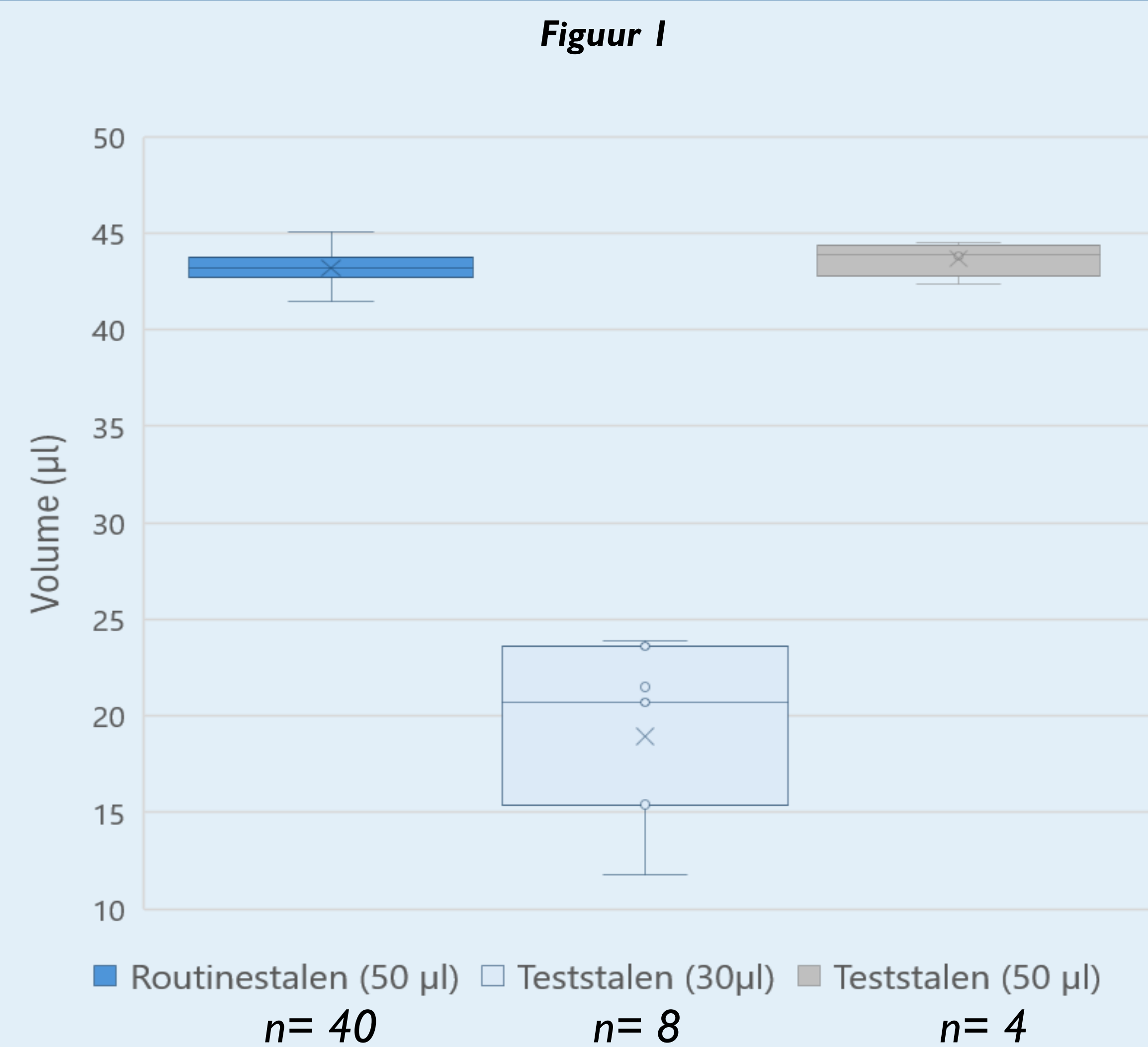
De RNA-concentratie werd gemeten met een Qubit fluorimeter waarbij de Invitrogen Qubit RNA High Sensitivity kit werd gebruikt.



RESULTATEN

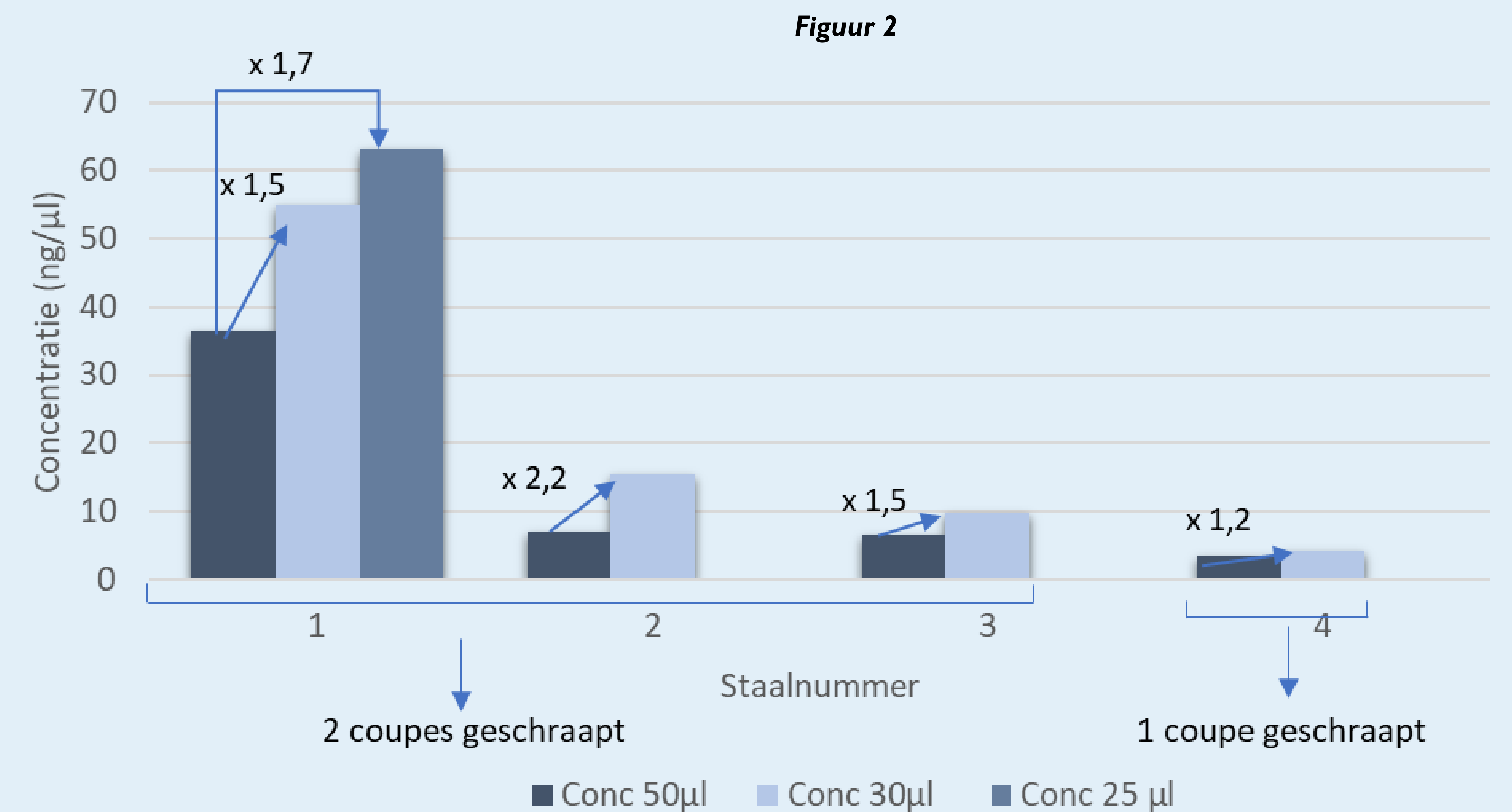
Figuur 1: Efficiëntiebepaling van RNA-extractie

Het volume verlies is aanzienlijk groter bij een elutie met 30 µl dan met 50 µl. De variatie in volume was lager wanneer er gekozen werd voor een elutievolume van 50 µl.



Figuur 2: Stijging concentratie

Een stijging in concentratie was telkens waar te nemen bij een lager elutievolume.



CONCLUSIE

Deze validatiestudie bevestigt dat het verlagen van het elutievolume van 50 µl naar 30 µl in de Maxwell® RSC 48-assay een effectieve strategie is om de RNA-concentratie te verhogen. De reproduceerbaarheid werd ook bevestigd door het uitvoeren van een intra run en inter run test. De resultaten van deze studie bieden een goede basis voor de implementatie van een aangepast elutievolume in de routine van RNA-extractie, wat de kwaliteit en betrouwbaarheid van WTS zal verbeteren.

REFERENTIES

1. Archer, Archer® FusionPlex® NGS Assays and Bioinformatic Analysis. (APM011 Rev.A)
2. New England Biolabs® Inc. (2017). Obtain superior NGS library performance with lower input amounts using the NEBNext® Ultra™ II Directional RNA Library Prep Kit for Illumina®. New England Biolabs.
3. Promega. (2022). Maxwell® RSC RNA FFPE Kit (9FB184). Promega
4. Claerhout S et al. Targeted RNA sequencing for upfront analysis of actionable driver alterations in non-small cell lung cancer. Lung Cancer. 2022 Apr;166:242-249.
5. Images created by BioRender.com