

Automatisierte Nukleinsäure-Extraktion

Frühjahrsputz auf der Laborbank

Ob für den kleinen Forschungsbetrieb oder das durchsatzstarke Routinediagnostiklabor – für alle Belange der Nukleinsäure-Extraktion gibt es Systeme, die DNA und RNA vollautomatisch und zuverlässig reinigen – und auf fast jede Laborbank passen.



Früher war die Nukleinsäure-Extraktion aus Viren, Bakterien und Geweben echte Fleißarbeit. Zunächst mussten die Zellen lysiert, störende Proteine verdaut und unlösliche Bestandteile abgetrennt werden. Dann wurden die Überstände mit einem Phenol-Chloroform-Gemisch (oder einem anderen, ähnlich giftigen Lösungsmittel) ausgeschüttelt, bevor man endlich die kostbaren DNA- oder RNA-Moleküle mit viel Fingerspitzengefühl isolieren konnte. Zwischen all diesen Schritten hieß es: Pipettieren, inkubieren, zentrifugieren!

Die zahlreichen Arbeitsgänge der manuellen Aufreinigung erforderten mehrere Stunden intensiver Laborarbeit – im Zeitalter des *Next Generation Sequencing* und der Fast-PCR ein nicht zu akzeptierender zeitlicher Aufwand. Deshalb ist es nicht verwunderlich, dass in den letzten Jahren immer mehr halb- und vollautomatisierte Aufreinigungsverfahren in den Markt der Life-Science- und Diagnostik-Labore vordringen sind. In der klinischen Routinediagnostik kommen heute überwiegend Großgeräte zum Einsatz, bei denen die quantitative Analyse der Nukleinsäuren mittels PCR häufig inklusive ist.

Drei dieser Technologien, nämlich den *VERSANT kPCR* von Siemens sowie das *BD Viper*- und das *BD MAX*-System (BD Diagnostics), haben wir bereits in der letzten Trillium-Ausgabe vorgestellt. Zwei weitere solcher Vollautomaten, den *QIA:symphony RGQ* von Qiagen und das *PANTHER-System* von Gen-Probe, finden Sie in diesem

Heft auf den Seiten 58 und 59. Diese Systeme sind vor allem für große Diagnostiklabore geeignet, die Viren, Chlamydien und Bakterien nachweisen.

Säulen und Magnete

Für den kleinen bis mittleren Durchsatz, also für die Diagnostik von selten angeforderten Erregern, HLA-Subtypen, Tumorgenen oder genetischen Defekten sowie für den gesamten Bereich der molekularbiologischen Forschung bietet sich

die Aufreinigung mit Hilfe vorgepackter „Spin-Säulen“ (siehe Bild oben) an: Die Isolierung der Nukleinsäuren erfolgt hier meist über die Bindung der DNA bzw. RNA an ein Silicagel, gefolgt von einem Zentrifugationsschritt (Spin).

Zur Automatisierung dieser Säulentechnik gibt es schon seit einigen Jahren kleine Pipettierroboter, beispielsweise *LabTurbo* (LTF) und *QIAcube* (Qiagen), die die Aufreinigung fast zu einem Kinderspiel machen. Alle Schritte, von der Lyse

Prozesslösungen für die Molekulare Analyse

Die automatisierten DNA/RNA-Extraktionslösungen von Beckman Coulter bieten dem Anwender in der Molekularen Diagnostik den entscheidenden Vorteil, neben der DNA/RNA-Extraktion auch weitere typische molekular-diagnostische Anwendungen zu automatisieren. Dazu zählen u. a.:

- DNA/RNA-Extraktion für 1-96 Proben/Lauf
- Hoher Durchsatz (bis zu 96 Proben/1,5-2,5 h)
- Quantifizierung & Normalisierung der DNA/RNA
- PCR-Setup
- PCR-Aufreinigung und/oder Size Selection
- Setup für Sequenzierung (NextGen oder Sanger)
- Aufreinigung der Sequenzen



- Automatische Probenverfolgung
- Einfache Anbindung an LIMS-Systeme

Die Basis für diese offenen Lösungen bilden die Biomek®-Pipettierer, die flexibel auf die Bedürfnisse an Geschwindigkeit und Durchsatz angepasst werden können. Insbesondere in Verbindung mit unseren magnetischen Agencourt®-Beads zur Aufreinigung bzw. Separierung werden herausragende Genauigkeiten und Reproduzierbarkeiten erreicht.

Somit bieten die Lösungen von Beckman Coulter die Möglichkeit der vollständigen Automatisierung nahezu aller in der Molekularen Analyse anfallenden Prozesse. Einen Überblick über unser gesamtes molekularbiologisches Spektrum mit den verfügbaren Systemen und Reagenzien finden sie auf unserer Homepage: www.beckmancoulter.de/molekularbiologie



Kontaktinformation

Beckman Coulter GmbH • Dr. Stefan Overkamp • soverkamp@beckmancoulter.com • Tel. 02151/333-5

des Ausgangsmaterials über das Binden und Waschen bis zur Elution der Nukleinsäuren, erfolgen nach einem standardisierten Protokoll, das Anwendungsfehler zu vermeiden hilft. Und das Beste: Durch die „Walk Away“-Automation bekommt der Benutzer kostbare Arbeitszeit geschenkt.

Viele der neueren Systeme arbeiten mit paramagnetischen Partikeln, die von einer speziellen DNA-bindenden Matrix umhüllt sind. Eine Auswahl solcher Extraktionsautomaten finden Sie in unserer Produktübersicht auf den Seiten 56-57: Zu den offenen Systemen, die Testkits unterschiedlicher Hersteller zulassen, gehören der *Biomek Liquid Handler* (Beckman Coulter) sowie der *LabTurbo* (LTF Labortechnik).

Bei dem *EZI Advanced XL* (Qiagen), dem *Maxwell 16* (Promega), dem *Arrow* (LTF Labortechnik), dem *NucliSENS easyMAG* (bioMérieux), dem *InviGenius* (STRATEC Molecular) und dem *Geno-*

Xtract (Hain Lifescience) handelt es sich um geschlossene Geräte, die mit firmeneigenen Kits arbeiten. Bei den Magnet-Bead-Systemen hält ein Magnet die Kügelchen während des Waschvorganges im Gefäß und macht aufwändiges Zu- und Abpipetieren überflüssig. Auch Verunreinigungen und Kreuzkontaminationen können so weitgehend ausgeschlossen werden.

Ein ganz anderes Extraktionsverfahren stammt aus der Fotoindustrie: Die organische Polymermembran der Firma Fuji-Film liefert nicht nur schöne Urlaubsbilder. In Säulchen gepackt kann sie auch negativ geladene Makromoleküle binden – eine Eigenschaft, die der *Quickgene* für eine besonders einfache Nukleinsäure-Aufreinigungstechnik nutzt.

Extraktion aus FFPE-Gewebe

Besonders für Pathologen interessant: Seit einiger Zeit gibt es eine Reihe von

Automatisierungsverfahren für die DNA-/RNA-Extraktion aus formalinfixierten und in Paraffin eingebetteten Schnitten (abgekürzt FFPE). Solche Gewebepreparationen stellen eine wertvolle Quelle für Biomarker in Forschung und Diagnostik dar. Allerdings gestaltet sich hier die Isolierung von Nukleinsäuren, besonders der empfindlichen RNA, eher schwierig. Der Grund: Proteine und Nukleinsäuren werden durch das Fixierungsverfahren häufig quervernetzt, chemisch modifiziert und oft stark fragmentiert.

Bisher waren nur wenige standardisierte Methoden zur Extraktion von Nukleinsäuren aus FFPE-Gewebe etabliert. Seit Anfang 2011 gibt es nun von Siemens ein vollautomatisiertes System (siehe Kasten). Auch die auf S. 56-57 genannten Geräte *Maxwell 16* von Promega und *EZI Advanced XL* von Qiagen sind dafür ausgelegt, in Kombination mit speziellen Kits Nukleinsäuren aus FFPE-Schnitten zu extrahieren. Dazu kann bei beiden Systemen ein Entparaffinierungsschritt vorgeschaltet werden, der manuell mit einer speziellen Lösung des Herstellers durchgeführt wird. Das macht die Behandlung mit gesundheitsschädigenden Lösungsmitteln wie Xylol überflüssig.

Individuelle Bedürfnisse

Wie schon von Frau Dr. Eßbauer auf S. 42 festgestellt, muss letztlich jeder Anwender selbst aus der umfangreichen Palette das Aufreinigungsverfahren auswählen, das zu seiner spezifischen Applikation in Diagnostik oder Forschung am besten passt. Wir hoffen, dass die Anregungen in dieser Märzausgabe dabei helfen, das passende „Reinigungsmittel“ für die individuellen Bedürfnisse beim Frühjahrsputz auf der Laborbank zu finden. ✿

SIEMENS

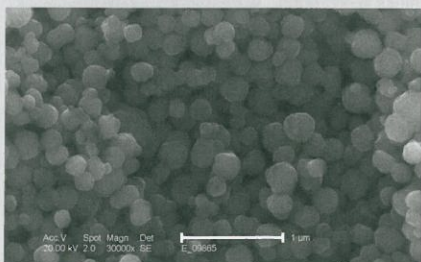
Siemens Tissue Preparation Solution Tissue Preparation System & VERSANT® Tissue Preparation Reagent Kit (CE)

Siemens kommerzialisiert 2011 das erste voll automatisierte Extraktionssystem zur Isolation von Nukleinsäuren aus formalinfixierten und paraffineingebetteten Gewebeschnitten. Die Walkaway-Methode beinhaltet insbesondere einen xylolfreien Entparaffinierungsschritt und

ermöglicht einen hohen Probendurchsatz von bis zu 48 Proben in weniger als 4 Stunden. Die CE-markierten VERSANT® Tissue Preparation Reagenzien erlauben die Aufreinigung von DNA wie auch RNA mit Hilfe von silikat-beschichteten Nanopartikeln. Das Tissue Preparation System setzt einen Standard für umfangreiche retrospektive Biomarkerstudien an archiviertem FFPE-Gewebematerial und macht die Routinediagnostik in der molekularen Pathologie robuster und reproduzierbarer.

Weiterführende Literatur:

Bohmann K, et al. Clin. Chem. 2009; 55(9):1719–27
Hennig G, et al. Clin. Chem. 2010; 56(12):1845–53



Silikat-beschichtete Nano-Beads

Kontaktinformation

Siemens Healthcare Diagnostics Holding GmbH • Ludwig-Erhard-Straße 12 • 65760 Eschborn •
Dr. Guido Hennig • guido.hennig@siemens.com

Dr. Elke Matuschek