Arbeitsgebiet: Mikrofluidik, Zellhandling und -analyse
Anwendungsbereich: Medizin und Gesundheitsvorsorge

Automatisierung der DNA Extraktion aus Vollblut unter Verwendung magnetischer Partikel auf der LabDisk Plattform

S. Wadle[1], O. Strohmeier[2], M. Rombach[2], D. Mark[2], R. Zengerle[1,2,3], F. von Stetten[1,2]
[1]Lehrstuhl für Anwendungsentwicklung, Institut für Mikrosystemtechnik – IMTEK, Universität Freiburg, Georges-Koehler-Allee 103, 79110 Freiburg
[2]HSG-IMIT, Institut für Mikro- und Informationstechnik, Georges-Koehler-Allee 103, 79110 Freiburg
[3]BIOSS - Center for Biological Signalling Studies, Universität Freiburg, 79110 Freiburg

Zusammenfassung

Die Integration der Probenvorbereitung spielt eine Schlüsselrolle in der Entwicklung von point-of-care Diagnostik-Systemen. Wir demonstrieren die Integration einer Magnetpartikel-basierten DNA Extraktion aus 200 µl Vollblut in eine zentrifugal-mikrofluidische LabDisk. Die mithilfe der LabDisk extrahierte DNA (vier unabhängige Extraktionen aus einer Blutprobe) wurde auf ihre Qualität geprüft. Als Referenz wurden dabei kommerziell verfügbare Säulen mit Silicamembranen als Goldstandard der DNA-Extraktion verwendet. Es konnten gleich gute Ausbeuten einer Wachstumsfaktor-Gensequenz – bestimmt mithilfe qPCR – ($c_{1:10\ LabDisk}$ = 4,6 +/- 0,7 ng/µl gg. $c_{1:10\ Aufreinigungssäulen}$ = 4,1 +/- 0,4 ng/µl) sowie Reinheiten (A260/A280 ~ 1,8 +/- 0,1) erzielt werden. Im Fall der LabDisk-extrahierten DNA lag eine leicht erhöhte Ethanol-Konzentration (5,9 +/- 2,4) % im Vergleich zu (3,3 +/- 0,2) % bei Aufreinigungssäulen vor. Die integierte und vollautomatiserte LabDisk-basierte DNA-Extraktion kann für weitere Anwendungen empfohlen werden.

Motivation

Blut ist eine wichtige Probenmatrix bei Genotypisierungs-Anwendungen. Mikrofluidische Chips für DNA-Aufreinigungen verwenden gewöhnlicherweise Probenvolumina von wenigen Mikrolitern. Hierdurch wird die klinische Sensitivität reduziert [1,2]. Unter Verwendung einer zentrifugal-mikrofluidischen Disk wurde eine DNA-Aufreinigung aus 100 µl Vollblut, versetzt mit Pathogenen, gezeigt [3]. Allerdings wurden hierzu aufwändige Laser-Ventile und bewegliche Magneten benötigt. In einem einfacheren LabDisk-basierten Ansatz unter Verwendung statischer Magnete und ohne Bedarf an Laser-Ventilen konnten wir die DNA-Aufreinigung aus *E. coli* Lysat zeigen [4]. Hier demonstrieren wir die Anwendbarkeit dieses Ansatzes um DNA aus Vollblut zu extrahieren, mit einem Fokus auf für die klinische Diagnostik (z.B. Tumormarker-Gene in Blutzellen) relevanten Volumina (200 µl).

Funktionsprinzip

COP-Folien basierte LabDisks [5] wurden mithilfe eines LabDisk-Player Prototypen prozessiert (Qiagen) (Abb. 1). Eine LabDisk verfügt über Einpipettierkammern für die Reagenzien, verbunden mit den Reaktionskammern der einzelnen Extraktionsschritte: Blutzelllyse und Anbindung der DNA an magnetische Partikel, zwei Waschschritte und Elution der DNA von den Partikeln. Der Partikel-Transport zwischen den Reaktionskammern wird mithilfe zweier statischer externer Magnete und langsamer Disk-Bewegung entlang der Magnete bewerkstelligt (Abb. 2). Reagenzien und die Probe (200 µl Vollblut vermischt mit magnetischen Partikeln und Proteinase K) werden in die LabDisk einpipettiert und anschließend der automatisierte Extraktionsprozess gestartet. Die eluierte DNA wurde auf Reinheit, Ausbeute und Ethanol-Restkonzentration untersucht. Ergebnisse wurden mit den Aufreinigungssäulen-basierten Referenzen (Qiagen DNA blood mini kit) verglichen. Alle Daten wurden anhand vier unabhängiger Extraktionen aus einer Blutprobe erhalten.

Experimentalteil

Die Reinheit (A260/A280) lag im optimalen Bereich (1,8-2,0): 1,79 +/- 0,10 (LabDisk) und 1,81 +/- 0,11 (Aufreinigungssäulen). Der Rest-Ethanolgehalt (massenspektrometrisch bestimmt) war bei der LabDisk leicht erhöht: (5,9 +/- 2,4) % (LabDisk) gg. (3,3 +/- 0,2) % (Aufreinigungssäulen). Die Ausbeute an der Wachstumsfaktor-Gensequenz (Triplikat-qPCR von 1:10-Verdünnungen) war gleich gut: 4,6 ng/µl +/- 0,7 ng/µl (LabDisk) und 4,1 ng/µl +/- 0,4 ng/µl (Aufreinigungssäulen) (Abb. 3).

Schlussfolgerung

Eine DNA-Extraktion aus 200 µl Vollblut auf einer LabDisk wurde mit einer Aufreinigungssäulen-basierten Extraktion (Goldstandard) verglichen. Bezüglich der Reinheit und Ausbeute lagen gute Übereinstimmungen vor. Die Rest-Ethanolkonzentration war leicht erhöht. Der vorgestellte Ansatz kann zur vollständigen Automatisierung der vor-Ort DNA-Analytik - von der Blutprobe bis zum Testresultat - genutzt werden. Hierzu wird der DNA Extraktion unmittelbar eine Real-Time DNA-Amplifikation nachgeschaltet, z.B. durch Methoden wie PCR, RPA oder LAMP.

Literatur

[1] G. R. Duarte et al.: Analyst, 2010, 135, S. 531–537
[2] S. Azimi et al.: Microfluid Nanofluid, 2011, 11, S. 157-165
[3] Y.-K. Cho et al.: Lab Chip, 2007, 7, S. 565–573
[4] O. Strohmeier et al.: Proc. of the 14th µTAS, 2010, S. 402-404
[5] M. Focke et al.: Lab Chip, 2010, 10, S. 2519–2526

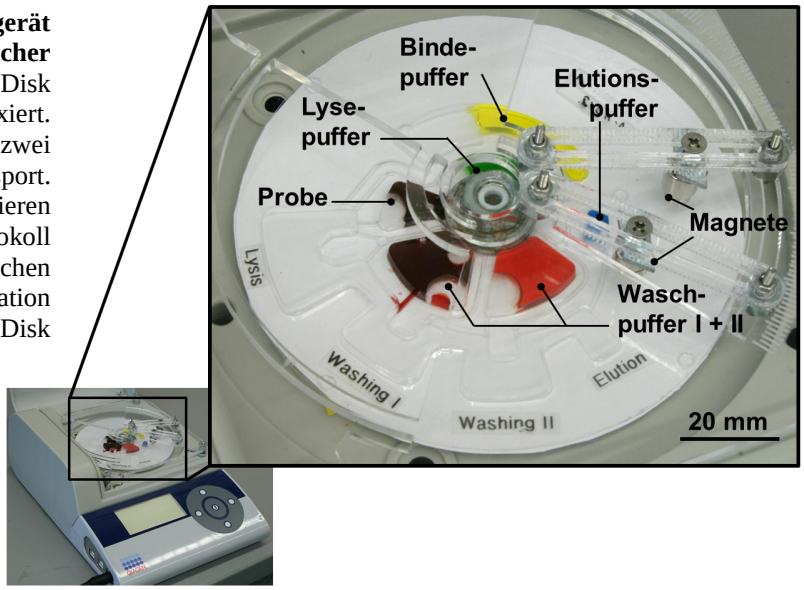

Abbildung 1: LabDisk Prozessiergerät Prototyp (Qiagen) mit mikrofluidischer LabDisk für die DNA Extraktion. Die Disk wird am Motor des Prozessierungsgerätes fixiert. Ein Halter über der Disk verfügt über zwei stationäre Magnete für den Partikel-Transport. Alle Reagenzien werden durch Pipettieren eingegeben bevor das automatisierte Protokoll gestartet wird. Lyse, Partikel-Bindung, Waschen und Elution werden automatisch durch Rotation bei verschiedenen Frequenzen der LabDisk durchgeführt.

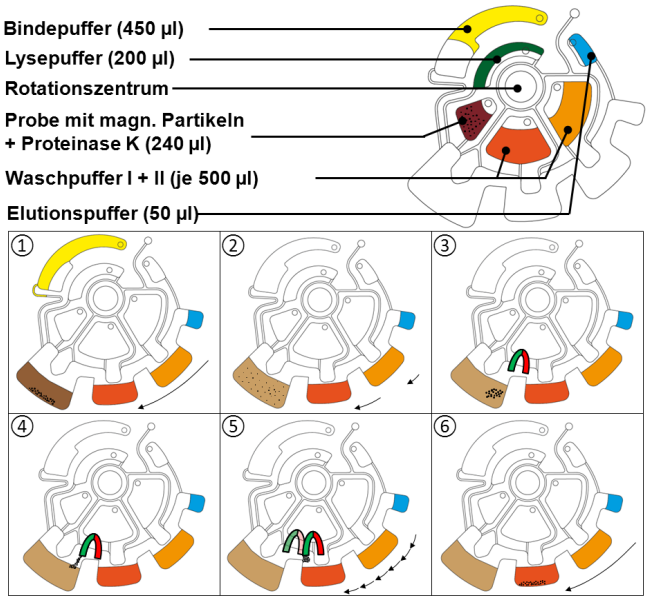

Abbildung 2: Microfluidische Struktur und Protokoll der DNA Extraktion. Die LabDisk wird mit der Probe und allen Reagenzien beladen. Anschließend wird ein automatisches Frequenzprotokoll gestartet: ① Reagenzien und Probe werden in eine Reaktionskammer übertragen und die chemische Lyse beginnt. ② Abwechselndes Anhalten und Beschleunigen der Disk ermöglichen die Übertragung des Bindepuffers in die Lysekammer, so dass die freigesetzte DNA an magnetische Silika-Partikel binden kann. Folgende Schritte werden für zwei Waschvorgänge und die Elution wiederholt: ③ & ④ Die Disk wird angehalten, um die Partikel mithilfe der externen Mangnete zu sammeln. ⑤ Langsame schrittweise Drehung führt zum Partikel-Transport in Richtung nächster Reaktionskammer. ⑥ Durch Disk-Rotation werden die Partikel in die nächste Kammer freigesetzt.

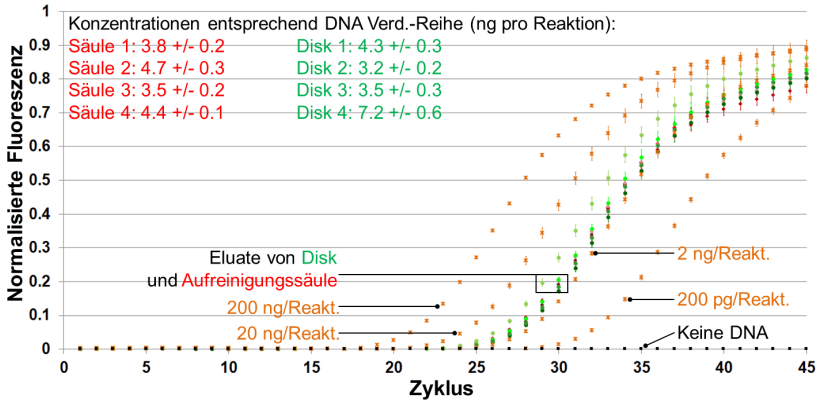

Abbildung 3: Quantitative PCR Ergebnisse. Die Amplifikation wurde in Triplikaten durchgeführt. Konzentrationen humaner DNA (humane Wachstumsfaktor-Gensequenz) in Eluaten der Disk und Aufreinigungssäulen (1:10 Verdünnung) wurden basierend auf Quantifizierungszyklus (C_q) Werten bekannter Konzentrationen humaner DNA zurückgerechnet. Farbcode: Standards (orange), Disk (grün), Referenz-Säule (rot).