

Artikelen

Automatisering van de moleculaire diagnostiek met behulp van capillaire elektroforese

A. W. H. M. KUYPERS, P. C. M. LINSSEN en E. J. B. M. MENSINK

Om de kwaliteit ervan te waarborgen moet aan de moleculaire diagnostiek hoge eisen worden gesteld. Automatisering van deze diagnostiek zou kwaliteitsverhogend kunnen werken. De diagnostiek kan dan beter gestandaardiseerd en daardoor met een hogere reproduceerbaarheid worden uitgevoerd. Een recente ontwikkeling op het gebied van automatisering is het gebruik van capillaire elektroforese (CE) als analyse methode. De toepassingsgebieden van deze techniek breiden zich in een snel tempo uit. De vele voordelen ten opzichte van de traditionele elektroforese technieken maken capillaire elektroforese uitermate geschikt voor de geautomatiseerde en routinematig toegepaste moleculaire diagnostiek.

Trefwoorden: capillaire elektroforese; DNA; PCR; automatisering; kwaliteitscontrole

Moleculaire diagnostiek, kwaliteitsaspecten

Er is ruim tien jaar verstreken sinds de polymerase ketting reactie (Polymerase Chain Reaction, PCR) werd ontdekt (1). De PCR is een cyclische biochemische reactie waarmee zeer efficiënt en met een enorm hoge specificiteit stukken DNA kunnen worden vermenigvuldigd. De PCR heeft een revolutie veroorzaakt binnen het bio-medische onderzoek (2). Een paar jaar geleden is hiervoor dan ook een Nobelprijs toegekend (Kary Mullis, 1993).

Veel ziekten vinden hun oorsprong in veranderingen in het erfelijkheidsmateriaal, het DNA. Het laatste decennium zijn veel van deze afwijkingen nauwkeurig in kaart gebracht door op PCR gebaseerde technieken. Kennis van deze DNA-mutaties is om twee redenen belangrijk. Het leert ons iets over het ontstaansmechanisme van de ziekte, wat de weg opent naar betere en meer gerichte behandelingswijzen. Daarnaast kan kennis van de precieze afwijking direct worden toegepast in de diagnostiek: een zieke cel bevat immers gemuteerd DNA en een normale cel niet. Door PCR kunnen een paar gemuteerde DNA-moleculen temidden van een overmaat normale mole-

culen zichtbaar worden gemaakt. In de praktijk wordt meestal een gevoeligheid van één op 10^5 gehanteerd, wat betekent dat in een patiëntenmonster één afwijkende cel op honderdduizend normale cellen kan worden teruggevonden. Dit biedt grote mogelijkheden voor de diagnostiek, bijvoorbeeld ter bewaking van ingewikkelde therapieën of als pré-symptomatische diagnostiek.

De moleculaire diagnostiek is in 4 fasen te verdelen: 1) DNA of RNA isolatie, 2) amplificatie, 3) analyse en 4) confirmatie van het resultaat. Voor waarborging van de kwaliteit van de diagnostiek dienen alle stappen goed gecontroleerd en gestandaardiseerd uitgevoerd te worden. De kwaliteitsproblematiek voor de amplificatie-stap is, door de hoge sensitiviteit van de PCR, groot. Dit komt vooral door overdrachtsbesmetting met PCR-producten van eerdere testen. Voorkomen van vals positieve uitslagen stelt hoge eisen aan de kennis, motivatie en discipline van de analist maar ook aan de fysieke laboratorium-omstandigheden. Uit de recente literatuur, samengevat door Cuypers et al. (3), blijkt dat de resultaten van gepubliceerde kwaliteitscontroles tegenvallen. De uitkomsten van de geciteerde onderzoeken variëren van 16% tot 84% foutloos. Er zijn verschillende aanbevelingen beschreven om vals positieve en vals negatieve PCR-resultaten zoveel mogelijk te voorkomen (4-6). De belangrijkste "grondregels" zijn: ruimtelijke scheiding van 1) de voorbehandeling van patiëntenmateriaal en toevoeging van grondstoffen, 2) de PCR-reactie en 3) de detectie en confirmatie van het PCR-product. Daarnaast is het gebruik van disposables, het dragen en frequent wisselen van disposable handschoenen, het alliquoteren van de grondstoffen, het maken van een "mastermix" waarin alle grondstoffen zitten voor alle reacties en waar mogelijk, het vermijden van een PCR op reeds geamplificeerd materiaal, aan te bevelen. Iedere PCR moet worden bewaakt door een goede positieve (bv. DNA of RNA afkomstig van een cellijn) en negatieve controle (bv. water) mee te nemen.

De geamplificeerde monsters kunnen op verschillende manieren geanalyseerd worden. Meestal wordt gelelektroforese uitgevoerd. Variërende factoren bij deze analyse zijn de hoeveelheid opgebracht product en de kleuring of de labeling voor de detectie. Soms ook worden kleurreacties na binding aan een geïmmobiliseerde DNA-probe met een bekende sequentie toegepast. Dit laatste is een combinatie van analyse en confirmatie op sequentie.

Centraal Hematologisch Laboratorium, Academisch Ziekenhuis St. Radboud, Nijmegen

Correspondentie: Dr. E.J.B.M. Mensink, CHL, Academisch Ziekenhuis St. Radboud, Geert Grooteplein Zuid 8, 6525 GA, Nijmegen.

Ingekomen: 23.04.96

Een dubbele confirmatie van het PCR-product, dat wil zeggen op basis van grootte én sequentie, om een vals positieve uitslag ten gevolge van een artefact uit te sluiten, is sterk aan te bevelen. Een mogelijkheid hiervoor is het blotten van de PCR-producten en het screenen van de blot met een probe. Dit is echter een zeer bewerkelijke en langdurige procedure. Als alternatief wordt een digestie met een restrictie enzym, gevolgd door gelelektroforese gebruikt, zoals bijvoorbeeld is beschreven voor de detectie van de factor V Leiden (7).

Automatisering van de moleculaire diagnostiek

Automatisering van de moleculaire diagnostiek is een recente ontwikkeling die de kwaliteit van de diagnostiek positief zal beïnvloeden. Geautomatiseerde amplificatie, analyse en confirmatie van de monsters in één gesloten systeem zal enerzijds de contaminatie problematiek van de PCR verkleinen, onder andere omdat in een gesloten systeem rigoreuze fysische en chemische decontaminatie-procedures mogelijk zijn (bijvoorbeeld spoelen met zuren of bestraling met UV), en anderzijds zal de diagnostiek sneller, met een hogere reproduceerbaarheid en beter gestandaardiseerd kunnen worden uitgevoerd.

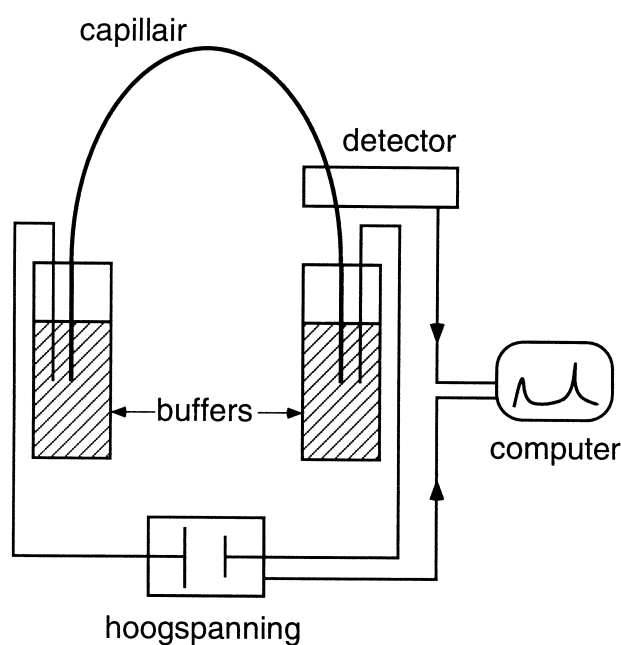
Een eerste generatie apparatuur waarin amplificatie, analyse en confirmatie zijn geïntegreerd is inmiddels op de markt*. Deze apparatuur is gebaseerd op "lock in" technologie en kan derhalve slechts voor een paar "dedicated" toepassingen, vooralsnog alleen op het terrein van de microbiële diagnostiek, gebruikt worden. Als alternatief is capillaire elektroforese (CE), als gecombineerde analyse en confirmatie methode, een stap in de richting van geautomatiseerde diagnostiek. Verschillende CE-systemen zijn inmiddels commercieel verkrijgbaar**.

Capillaire elektroforese

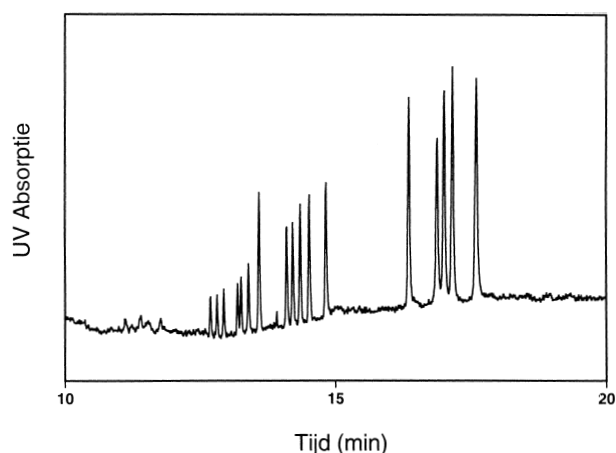
Capillaire elektroforese heeft sinds zijn introductie, enkele jaren geleden (8,9), een snelle ontwikkeling doorgemaakt. Op dit moment is de ontwikkeling zo ver gevorderd dat deze analyse methode ook ingezet kan worden bij routinematige moleculaire diagnostiek.

Bij CE vindt de scheiding plaats in een glazen (fused silica) capillair. Typische afmetingen van een capillair zijn 50-100 µm voor de inwendige diameter, 375 µm voor de uitwendige diameter en 20-80 cm voor de totale lengte. De buitenkant van het capillair is gecoat met polyimide, zodat het glazen capillair flexibel is en minder breekbaar.

Figuur 1 toont een schematische weergave van een CE-opstelling. Beide uiteinden van het capillair worden in een buffer geplaatst. In de buffer worden ook twee elektrodes geplaatst waardoor er met behulp van een spanningsbron een hoog potentiaal verschil over het capillair kan worden aangelegd. Na injectie (met



Figuur 1. Schematische weergave van een capillaire elektroforese opstelling



Figuur 2. Elektroferogram van de moleculaire gewichtsmarker pBr322 Hae III, met de fragment lengtes: 51-57-64 80-89-104-123+124 184-192-213-234-267 434-458-504-540-587 bp.

behulp van druk of potentiaal verschil), migreren de moleculen onder invloed van het potentiaalverschil door het capillair. Aan het einde van het capillair is een venstertje gebrand in de polyimide coating, zodat de migrerende moleculen gedetecteerd kunnen worden. Informatie van de detector wordt naar een computer gestuurd, waar het door een data-acquisitiesysteem wordt verwerkt en opgeslagen. De analyse wordt weergegeven in een elektroferogram, met op de x-as de migratietijd en op de y-as bijvoorbeeld de UV-absorptie (figuur 2).

Net als bij traditionele elektroforese bestaan er verschillende capillaire elektroforese methoden. Naast Capillaire Zone Elektroforese (CZE), de meest toegepaste vorm, is er nog Capillaire Isoelectric Focusing (CIEF), Capillaire Isotachoforese (CITP), wat op dit moment ook gebruikt wordt als pré-concentratie van het monster in het capillair en Micellaire Elektrokinet-

* de Cobas Amplicor van Roche Diagnostic Systems

** De auteurs hebben ervaring met de BioFocus 3000 (BioRad), de P/ACE 2210 (Beckman) en het modulair CE systeem van Prince Technologies.

tische Capillaire Chromatografie (MECC), voor de scheiding van ongeladen moleculen (10). Voor de scheiding van DNA- of PCR-moleculen, met een voor alle fragmenten gelijke lading-massa-ratio, moet het capillair gevuld worden met een "sieving" matrix, waardoor de moleculen gescheiden kunnen worden op basis van hun grootte. Als matrix kan bijvoorbeeld lineaire polyacrylamide, hydroxyethylcellulose of methylcellulose gebruikt worden (11). Deze vorm van elektroforese wordt ook wel Capillaire Gel Elektroforese genoemd (CGE).

CE heeft een aantal grote voordelen ten opzichte van de traditionele slabgelelektroforese. Omdat de oppervlakte-volume-ratio van het capillair zeer hoog is, is er een zeer goede warmte-afvoer. Dit maakt het mogelijk om zeer hoge voltages te gebruiken (10-30 kV), wat resulteert in relatief korte analyse-tijden (5-30 minuten). Als detectie wordt doorgaans gebruik gemaakt van on-line UV-absorptie, fluorescentie of laser geïnduceerde fluorescentie (LIF), maar ook een conductiviteitsmeter of een massaspectrometer behoren tot de detectie-mogelijkheden. Dit in tegenstelling tot de detectie bij slabgelelektroforese waarbij de gel na de scheiding (off-line) moet worden gekleurd of, wanneer gebruik is gemaakt van (radioactieve) labels, moet worden geëxposeerd. Andere voordelen van CE zijn het lage monster- en reagentia-verbruik, de hoge reproduceerbaarheid en de hoge resolutie.

Het grootste voordeel is echter het geautomatiseerde karakter van CE. De monsters hoeven na de PCR niet meer meer gezuiverd, geconcentreerd of gekleurd te worden. Het opbrengen van het monster, de scheiding, de detectie en de eventuele dosimetrie zijn geheel geautomatiseerd en daardoor gestandaardiseerd. Daarnaast wordt bij CE de uitkomst van de analyse direct in de computer opgeslagen. Dit laatste heeft in het kader van GLP het voordeel dat ruwe onderzoeksgegevens van bepalingen ten behoeve van de patiëntenzorg op deze manier worden vastgelegd. Bovendien kunnen gegevens later nog bewerkt of opnieuw geanalyseerd worden. Het feit dat de verschillende CE-firma's complete analyse-kits (capillair, buffers, monsterstandaard) voor de verschillende bepalingen op de markt brengen draagt nog eens extra bij tot de reproduceerbaarheid en standaardisering.

Het nadeel van CE, namelijk het feit dat maar één monster tegelijk geanalyseerd kan worden en de totale analyse-tijd van alle monsters toch nog lang wordt, kan worden ondervangen door meerdere capillairen tegelijk te gebruiken (12), de analyse-tijd nog sneller (< 1 minuut) te maken door het gebruik van zeer korte (3 cm) capillairen (13) of meerdere monsters tegelijk te analyseren met behulp van verschillende labels voor ieder monster.

Toepassingen van CE in de moleculaire diagnostiek

Na de introductie van de analyse van DNA- en PCR-producten met behulp van capillaire elektroforese is het aantal toepassingen van CE in de moleculaire diagnostiek snel gegroeid. CE kan bijvoorbeeld ingezet worden bij de detectie van puntmutaties. Die puntmutaties kunnen gedetecteerd worden met behulp van de

Single Strand Conformation Polymorphism (SSCP) methode (14) of met de Constant Denaturant Capillary Electrophoresis (CDCE) methode (15). Andere toepassingen van CE zijn de kwantificering van DNA-afwijkingen, zoals chromosomale translocaties (16), DNA-sequencing (17), oligonucleotide-controle, zowel kwalitatief als kwantitatief (18), analyse van DNA-restrictie-fragmenten (19,20) of analyse van Short Tandem Repeats (STR) om de herkomst van bepaalde cellen te achterhalen (bv. bij slachtoffer/dader- of donor/patiënt-identificatie) (21,22). Een gevalideerde toepassing van capillaire elektroforese in de routine, waarbij de analyse en de confirmatie zijn geïntegreerd, is de bepaling van de factor V Leiden puntmutatie door een allel-specifiek amplificatie-protocol (23). De analyse en confirmatie duurt 10 minuten, waarna de uitslag normaal, heterozygoot of homozygoot mutant gegeven kan worden.

Technische aanpassingen van CE-apparatuur kunnen leiden tot verdere automatisering van methodieken. Een voorbeeld hiervan is het "on-line" opsmelten van PCR-producten voor de detectie van puntmutaties met de SSCP-methode (24). Hiervoor is enkelstrengs DNA nodig, wat verkregen wordt door vóór de analyse het DNA te verhitten en snel af te koelen op ijs. Door het capillair zeer lokaal sterk te verhitten (tot $\pm 95^{\circ}\text{C}$), kan het DNA opengesmolten worden tijdens de elektroforese. Alle monstervoorbewerking is daarmee overbodig gemaakt.

Verdere technische aanpassingen zouden het mogelijk kunnen maken om alle stappen van de moleculaire diagnostiek in één apparaat onder te brengen. Verdere integratie van CE met de PCR-apparatuur ligt dan ook voor de hand.

Conclusies

Het valt te verwachten dat in de nabije toekomst moleculaire diagnostiek een steeds grotere rol zal spelen in de ondersteuning van de patiëntenzorg. Het kwaliteitsoogmerk, een goede uitwisseling tussen patiëntenzorg en research en een nauw overleg tussen laboratorium en aanvragend arts zijn daarbij vanzelfsprekend cruciaal.

Automatisering van de moleculaire diagnostiek zal de kwaliteit ervan ten goede komen. Het gebruik van capillaire elektroforese kan gezien worden als een eerste stap in die richting.

Wij bedanken de Stichting voor de Technische Wetenschappen (STW), de firma Prince Technologies in Emmen en de Maurits en Anna de Kock stichting voor ondersteuning.

Literatuur

1. Saiki RK, Scharf S, Faloona F, Mullis KB, Horn GT, Erlich HA, Arnheim N. Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science* 1985; 230: 1350-1354.
2. Erlich HA. Polymerase Chain Reaction. *J Clin Immunol* 1989; 9: 437-447.
3. Cuypers HTM. Kwaliteitscontrole in de Moleculaire Diagnostiek. *Tijdschr NVKC* 1994; 19: 233-234.
4. Kwok S, Higuchi R. Avoiding false positives with PCR. *Nature* 1989; 339: 237-238.

5. Clewley JP. The polymerase chain reaction, a review of the practical limitations for human immunodeficiency virus diagnosis. *J Virol Methods* 1989; 25: 179-187.
6. Victor T, Jordaan A, du Toit R, Van Helden PD. Laboratory Experience and guidelines for avoiding false positive polymerase chain reaction results. *Eur J Clin Chem Clin Biochem* 1993; 31: 531-535.
7. Bertina RM, Koeleman BPC, Koster T, Rosendaal FR, Dirven RJ, de Ronde H, van der Velden PA, Reitsma PH. Mutation in blood coagulation factor V associated with resistance to activated protein C. *Nature* 1994; 369: 64-67.
8. Mikkers FEP, Everaerts FM, Verheggen TP. High performance zone electrophoresis. *J Chromatogr* 1979; 169: 11-20.
9. Jorgenson JW, Lukacs KD. Zone electrophoresis in open tubular glass capillaries. *Anal Chem* 1981; 53: 1298-1302.
10. Landers JP. Clinical Capillary Electrophoresis. *Clin Chem* 1995; 41/4: 495-509.
11. Righetti PG. Macroporous gels: facts and misfacts. *J Chromatogr A* 1995; 698: 3-17.
12. Huang XC, Quesada MA, Mathies RA. DNA sequencing using capillary array electrophoresis. *Anal Chem* 1992; 64: 2149-2154.
13. Müller O, Foret F, Ruiz-Martinez MC, Karger BL. Practical aspects of ultrafast DNA separations by capillary electrophoresis. 1996; HPCE '96, Orlando, abstract P-230.
14. Kuypers AWHM, Willems PMW, van der Schans MJ, Linssen PCM, Wessels HMC, de Bruijn CHMM, Everaerts FM, Mensink EJB. Detection of point mutations in DNA using capillary electrophoresis in a polymer network. *J Chromatogr Biomed Appl* 1993; 621: 149-156.
15. Khrapko K, Hanekamp JS, Thilly WG, Belenkii A, Foret F, Karger BL. Constant denaturant capillary electrophoresis (CDCE) - a high resolution approach to mutational analysis. *Nucl Acid Res* 1994; 22: 364-369.
16. Kuypers AWHM, Meijerink JPP, Smetsers TFCM, Linssen PCM, Mensink EJB. Quantitative analysis of DNA aberrations amplified by competitive polymerase chain reaction using capillary electrophoresis. *J Chromatogr B* 1994; 660: 271-277.
17. Chen DY, Harke HR, Dovichi NJ. 2-label peak-height encoded DNA sequencing by capillary gel electrophoresis-3 examples. *Nucl Acids Res* 1992; 20: 4873-4880.
18. Cohen AS, Najarian DR, Paulus A, Guttman A, Smith JA, Karger BL. Rapid separation and purification of oligonucleotides by high-performance capillary gel electrophoresis. *Proc Natl Acad Sci USA* 1988; 85: 9660-9663.
19. Ulfelder KJ, Schwartz HE, Hall JM, Sunzeri FJ. Restriction fragment length polymorphism analysis of ERBB2 oncogene by capillary electrophoresis. *Anal Biochem* 1992; 200: 260-267.
20. Schwartz HE, Ulfelder KJ, Sunzeri FJ, Busch MP, Brownlee RG. Analysis of DNA restriction fragments and polymerase chain reaction products towards detection of the AIDS (HIV-1) virus in blood. *J Chromatogr* 1991; 559: 267-283.
21. Butler JM, Mccord BR, Jung JM, Allen RO. Rapid analysis of the short tandem repeat HUMTHO1 by capillary electrophoresis. *Biotechniques* 1994; 17: 1062.
22. Wang YW, Ju JY, Carpenter BA, Atherton JM, Sensabaugh GF, Mathies RA. Rapid sizing of short tandem repeat alleles using capillary array electrophoresis and energy-transfer fluorescent primers. *Anal Chem* 1995; 67: 1197-1203.
23. van de Locht LTF, Kuypers AWHM, Verbruggen BW, Linssen PCM, Nováková IRO, Mensink EJB. Semi-automated detection of the factor V mutation by allele specific amplification and capillary electrophoresis. *Thromb Haemos* 1995; 74: 1276-1279.
24. Kuypers AWHM, Linssen PCM, Willems PMW, Mensink EJB. On-line melting of double-stranded DNA for analysis of single-stranded DNA using capillary electrophoresis. *J Chromatogr B* 1996; 675: 205-211.

Summary

Automation of molecular diagnostics using capillary electrophoresis. Kuypers AWHM, Linssen PCM and Mensink EJB. Ned Tijdschr Klin Chem 1996; 21: 235-238.

To assure the reliability of molecular diagnostics adequate quality assessment procedures are necessary. Automation of molecular diagnostics would lead to standardization and higher reproducibility and therefore improve quality. A recent development in the field of automation is the use of capillary electrophoresis (CE) as an analysis method. The number of applications of this technique is growing rapidly. When compared to traditional electrophoresis capillary electrophoresis has many advantages, which makes it very suitable for use in automated and routine molecular diagnostics.

Key-words: capillary electrophoresis; DNA; PCR; automation; quality control

Ned Tijdschr Klin Chem 1996; 21: 238-244

Plasma glutathion S-transferase Alfa1-1 als marker voor leverschade

T.P.J. MULDER¹, W.H.M. PETERS¹, E.A.P. STEEGERS² en J.B.J.M. JANSEN¹

Humane lever bevat grote hoeveelheden glutathion S-transferasen van de Alfa klasse (GST-Alfa). De plasmaspiegel van GSTA1-1, het voornaamste isoenzym van Alfa klasse, is waarschijnlijk een gevoelige marker voor levercelschade. Daarom werd een zeer gevoelige en specifieke sandwich ELISA voor GSTA1-1

ontwikkeld. De verdeling van GSTA1-1 in plasma van gezonde controles werd vrijwel normaal na een logaritmische transformatie. Gezonde mannen hadden significant hogere plasma GSTA1-1-spiegels dan gezonde vrouwen. Bij vrouwen werd een significante stijging vastgesteld met toenemende leeftijd, iets wat bij mannen niet werd waargenomen. Patiënten met gastrointestinale aandoeningen die niet gepaard gaan met levercelschade en patiënten met alcoholische levercirrose hadden normale plasma GSTA1-1-niveaus. Patiënten met primaire biliare cirrose, primaire scleroserende cholangitis of chronische hepatitis B hadden significant verhoogde plasma GSTA1-1-niveaus maar de ASAT activiteit was bij

Afdeling Gastroenterologie¹ en Obstetrie en Gynaecologie², Academisch Ziekenhuis St. Radboud, Nijmegen

Correspondentie: Dr. T.P.J. Mulder, Afdeling Gastroenterologie, Academisch Ziekenhuis St. Radboud, Postbus 9101, 6500 HB Nijmegen.

Ingekomen: 16.01.96