



UNIVERSITÄTS KLINIKUM HEIDELBERG

Heidelberg University Hospital | Im Neuenheimer Feld 400 | 69120 Heidelberg

SOP Liquorlabor - Liquor für cfDNA-Sequenzierung

Diese SOP dient als Standard für die Annahme und initialen Probenverarbeitung von Liquor und Blut, bei welchen die Anforderung zur zellfreien DNA-Sequenzierung (cell-free DNA-Sequencing, oder auch cfDNA-Seq) besteht.

Bei Rückfragen / Problemen / Anmerkungen, melden Sie sich gerne bei unserer eMail-Adresse:

liquidbiopsy.NEU@med.uni-heidelberg.de

Vielen Dank!

Das Liquid-Biopsy Team ☺

Im Neuenheimer Feld 400
69120 Heidelberg

Germany

Tel. +49 6221 56-7504

Fax +49 6221 56-7554

liquidbiopsy.NEU@med.uni-heidelberg.de

www.klinikum.uni-heidelberg.de

Stand 01.07.2025

Autore(n) dieser Auflage:

PD Dr. med. Tobias Kessler

Sebastian Schulz

Mail: tobias.kessler@med.uni-heidelberg.de
sebastian.schulz@med.uni-heidelberg.de

Telefon: +49 6221 56-7504
+49 151 20715505

Materialien:

Material	Katalognummer	Lagerort
Schritt 1: Überführen der Proben in Einzelbestandteile		
Zentrifuge für 15 mL Röhren (1.800xg)		
Zentrifuge für 2 mL Röhren (15.000xg)		
Falcon 15 mL	Falcon™ 352095	
Eppendorf LoBind-Tube 2 mL	Eppendorf Katalog-Nr.: 0030108078	
Eppendorf LoBind-Tube 1.5 mL	Eppendorf Katalog-Nr.: 0030108051	
Sterile Serumpipetten (2.5 mL)		
P1000 Pipette mit Filtertip		

Wichtige Grundprinzipien:

- **Eine schnelle Probenverarbeitung ist von entscheidender Bedeutung!**

Verschiedene Körperflüssigkeiten enthalten unterschiedliche Mengen an zellulären Bestandteilen. Nach einer Probenentnahme sterben diese Zellen ab, zerfallen in ihre Komponenten und lassen ihre DNA in die Flüssigkeit frei. Diese zelluläre / genomische DNA verdünnt / kontaminiert dann die vorliegende zellfreie (cf)DNA und lässt sich nur schwer bis nahezu gar nicht von dieser trennen! Insbesondere kommt es hierbei zu einer relevanten Reduktion an cfDNA, wodurch deren Nachweis und das Sequenzierungsergebnis erschwert und / oder verfälscht wird. Daher ist vor allem bei zellreichen Flüssigkeiten (z.B. Blut) eine schnelle Probenverarbeitung von hoher Relevanz, aber auch bei zellarmen Proben (z.B. Liquorprobe), da es hierbei nicht der Zellzerfall das Problem ist, sondern vielmehr die Degradierung der DNA nicht der Zellzerfall das Problem ist, sondern vielmehr die Degradierung der DNA (z.B. durch verschiedene Nukleasen in der Körperflüssigkeit) zu falschen Ergebnissen führt.

- **Längere Probenlagerung sollte in speziellen cfDNA-Röhren (Streck / Roche™) erfolgen!**

Sollte eine sofortige Probenverarbeitung nicht möglich sein (Probe kommt am späten Nachmittag, Wochenende), ist eine Lagerung der Proben auf Raumtemperatur in speziellen cfDNA-Röhren (Streck Cell-Free BCT) wichtig (Blut im Kühlschrank falls nicht in einem Streck-Röhren). Hierdurch lässt sich der zelluläre Zerfall, als auch die cfDNA-Degradierung stark minimieren. Daher sollte immer überprüft werden, ob das gelieferte Probenmaterial bereits in cfDNA-Röhren ankommt - und falls nein, sind Liquor und Blut in entsprechende Röhren zu überführen.

Optimal wäre es jedoch, wenn trotz sehr knapper Zeit, die Liquorproben in Zellpellet und Überstand getrennt werden, da es sonst zu einer Verunreinigung der Liquorprobe mit genomischer DNA aus Leukozyten - und somit zu einer Qualitätsabnahme in der Diagnostik - kommt. Nach der Trennung von Liquorüberstand und Zellpellet, kann dieser auch in einem „normalen“ Falcon / 1.5 mL Eppendorf LoBind-Tube aufbewahrt werden.

Protokoll:

Anmerkung: Alle Proben sind jederzeit nachvollziehbar zu kennzeichnen, damit sowohl der/die Patient*in, als auch das Probenmaterial (Liquor, Plasma, Buffy-Coat) eindeutig zuzuordnen sind.

Schritt 1: EDTA-Vollblut biobanken

1. EDTA-Röhrchen 10x invertieren um eine gute Durchmischung zu garantieren.
2. **EDTA-Röhrchen aufschrauben und den gesamten Inhalt in ein Falcon Tube (15 mL) umschütten.**
3. Wegfrieren des Vollbluts bei -80 °C.

Schritt 2: Überführen der Proben in ihre Einzelbestandteile

1. Herunterkühlen der Zentrifugen auf 22°C.
2. **Erste Zentrifugation** der Liquorproben in Streck Cell-Free DNA-Röhrchen.
Bei 1.800xg für 10 min bei 22°C
3. Überführen des Liquorüberstands mit einer Serumpipette in separate Tubes.
 - 3.1. Überführen des Liquorüberstandes – für die zweite Zentrifugation – in 2 mL Eppendorf LoBind-Tubes. (Bei einer 5 mL-Probe also 2x 2 mL, 1x 1 mL in ein LoBind-Tube.)

Anmerkung: Hierbei sollte sehr genau darauf geachtet werden, dass das Zellpellet nicht gestört wird.

In den meisten Fällen ist das Zellpellet nach der Zentrifugation nur leicht sichtbar. Da wir jedoch das Zellpellet erhalten wollen, wird so viel Liquor wie nötig abgezogen, ohne das Zellpellet zu verletzen. Normalerweise sollten hierbei nicht mehr als 500 µL Liquor „verloren“ gehen.

4. **Zweite Zentrifugation** der Liquorüberstände (Aus 3.1.) in 2 mL Eppendorf LoBind-Tubes.

Bei 16.000xg für 10 min bei 22°C

5. Überführen der Liquorüberstände nach der 2. Zentrifugation mit einer P1000-Pipette in Falcon-Tubes.

5.1. Der Überstand aller 2 mL Eppendorf LoBind Plasma-Tubes wird in einem bzw. zwei 15 mL-Tube(s) gepoolt. (**Label: Liquor**)

Im ersten Tube sollen max. 5 mL Liquor sich befinden (**Label: Liquor Probe 1**). In das zweite Tube wird der restliche Liquor überführt (**Label: Liquor Backup**).

In den 2 mL Eppendorf LoBind-Tubes sollte sich ein kleines Zellpellet gebildet haben, welches auf keinen Fall mit überführt werden darf. Dieses ist in den meisten Fällen jedoch nicht sichtbar.

Schritt 3: Probenlagerung bis zum Versand

1. **Liquor:**

Kurzzeitlagerung (1 Tag): - 20°C

Langzeitlagerung: - 80°C

2. **EDTA-Vollblut:**

Kurzzeitlagerung (1 Tag): - 20°C

Langzeitlagerung: - 80°C

Schritt 4: Probenversand und -anmeldung

Versand der folgenden Proben und Dokumente an das Liquid Biopsy Labor des Universitätsklinikums in Heidelberg.

Proben: (auf Trockeneis falls nicht in Streck Röhrchen abgenommen, präferenziell auf Eis, falls Streck Röhrchen für die Abnahme benutzt)

- Liquorüberstand (ohne Zellen)
- EDTA-Vollblut

Dokumente:

- Ausgefülltes Einsendeformular
- Überweisungsschein

Versandadresse:

Universitätsklinik Heidelberg, Kopfklinik

Liquid Biopsy Lab Hirntumore

Im Neuenheimer Feld 400

69120 Heidelberg

Telefonnummer: +49 6221 56-35603 (Sandy Walter) oder +49 6221 56-38265 (Andrea Dormann)

Im Anschluss den Probenversand (ohne Klarnamen!) bei unserer zentralen Mailadresse anmelden: liquidbiopsy.NEU@med.uni-heidelberg.de

Über diese werden Sie auch über den Eingang und die Bearbeitung Ihrer Probe informiert.