

## BAVARIAN GENOMES - PROJEKTÜBERSICHT

<b>1</b>	<b>ZIEL</b>		
	<p>Das Projekt <b>Bavarian Genomes</b> vernetzt die bayerischen <b>Zentren für Seltene Erkrankungen</b> und hat das Ziel ursächliche <b>Sequenzvarianten im Genom</b> von mindestens 1.000 Patientinnen und Patienten <b>mit einer seltenen Erkrankung</b> aber genetisch unklarer Diagnose <b>zu identifizieren</b>.</p>		
<b>2</b>	<b>DETAILS</b>		
	<p>Nach <b>Asservierung</b> der <b>Bioproben</b> wird eine Sequenzierung des gesamten Genoms und des Transkriptoms der Patienten-DNA und RNA auf einer zentralen Sequenzierplattform an der TU München geplant. Ärzte und Patienten an den Zentren erhalten einen netzbasierten, kontrollierten Zugang für eine dezentrale Auswertung und Interpretation.</p> <p>Die <b>Probensammlung</b> und <b>Lagerung</b> erfolgt dezentral an den einzelnen Zentren nach standardisierten Protokollen. Blutproben und Zellen werden dabei stets <b>pseudonymisiert</b>. Zur Asservierung werden die an den jeweiligen Standorten nach Projektvorgaben gemäß nachfolgender SOP konfektionierten Entnahme-Sets verwendet.</p> <p>Ein Teil der Blutproben wird zur Analyse an die TU München verschickt. Die übrigen Bioproben werden an den jeweiligen Standorten unter standardisierten Bedingungen in zertifizierten <b>Biobanken</b> gelagert. Eine teilweise oder vollständig zentralisierte Einlagerung von Bioproben ist nach bilateraler oder multilateraler Absprache möglich.</p> <p>Wenn immer möglich, sollen auch <b>Bioproben der Eltern der Indexpatienten</b> gewonnen werden.</p>		
<b>3</b>	<b>ANSPRECHPARTNER</b>		
	<table style="width: 100%; border: none;"> <tr> <td style="width: 50%; border: none;">           Prof. Dr. Thomas Meitinger            Klinikum rechts der Isar der TUM            Trogerstraße 32            81675 München            089 4140 6381            diagnostik.ihg@mri.tum.de            https://www.mri.tum.de/humangenetik         </td> <td style="width: 50%; border: none; vertical-align: top;">           BAVARIAN GENOMES             www.bavarian-genomes.de         </td> </tr> </table>	Prof. Dr. Thomas Meitinger Klinikum rechts der Isar der TUM Trogerstraße 32 81675 München 089 4140 6381 diagnostik.ihg@mri.tum.de https://www.mri.tum.de/humangenetik	BAVARIAN GENOMES  www.bavarian-genomes.de
Prof. Dr. Thomas Meitinger Klinikum rechts der Isar der TUM Trogerstraße 32 81675 München 089 4140 6381 diagnostik.ihg@mri.tum.de https://www.mri.tum.de/humangenetik	BAVARIAN GENOMES  www.bavarian-genomes.de		

### PROJKTORGANISATION

**Kontakt:**  
 Prof. Dr. Thomas Meitinger  
 MRI TUM  
 Trogerstraße 32  
 81675 München  
 089 4140 6381  
 sekretariat.ihg@mri.tum.de  
 https://www.mri.tum.de/humangenetik










## BAVARIAN GENOMES PROBENENTNAHME-BASIS-KIT

Zur Asservierung von Bioproben stehen **PROBENENTNAHME-BASIS-KITS** zur Verfügung. Die Entnahme der Proben folgt den lokalen Vorgaben und SOPs zur Präanalytik bzw. diesem Leitfaden zur Probenentnahme.

Die Probenentnahmekits werden von der Projektorganisation des Instituts für Humangenetik des Klinikums rechts der Isar mit den meisten Materialien, die für die Blut- und Gewebeernte benötigt werden, sowie Versandetiketten für die Rücksendung von Materialien an das Institut für Humangenetik bereitgestellt.

Stellen Sie sicher, dass alle Röhren während der Verarbeitung und zum Zeitpunkt des Versands ordnungsgemäß beschriftet sind.

Die Probenentnahme-Kits enthalten die folgenden Artikel und bieten das notwendige Zubehör, um Proben von einem Probanden zu sammeln:

PROBENENTNAHME-BASIS-KIT (hier: Beispiel SARSTEDT und BD)	
1	
1x SERUM-Monovette 4,7 ml, braun	
2x EDTA-Monovette, 2,7 ml, rot	
1x PAXGene-Röhrchen 2,5 ml, orange	
1x BD Vacutainer CPT	
1x Safety-Multifly-Kanüle	
1x Blutkulturadapter Long Neck	
6x Cryo-Röhrchen für SERUM-Aliquots	
1x Biopsiestanze	
1x 15 ml Falcon	

2

## NUTZUNG DER PROBEN

Diese **Basis-Kits** umfassen Material für **SERUM, EDTA-BLUT, BLUT** für **RNA-ISOLATION, BLUT** für die **ISOLATION** von **PBMCs** und eine **HAUTBIOPSIE**. Diese Proben sollten stets in gleicher Form vorverarbeitet und anschließend in den Standort-Biobanken asserviert werden.

3

## BEREITSTELLUNG DER ENTNAHMESETS

Das Proben-Entnahme-Set kann unter folgender Email-Adresse angefordert werden:

**diagnostik.ihg@mri.tum.de**

Stellen Sie sicher, dass Sie Ihre Vorräte und/oder zusätzliche Materialien lagernd sind, damit sowohl geplante als auch spontane Probenentnahmen möglich sind.

Bitte erlauben Sie uns ZWEI Wochen für die Bearbeitung und Lieferung von Probenentnahme-Kit-Bestellungen.

Zusätzlich dazu soll folgendes von der Probenentnahmestelle bereitgestellt werden:

Tourniquet

Alkohol Tupfer

Gaze-Pad

Verband

Rack für Mikrozentrifugenröhrchen

Handschuhe

Behälter und Deckel für scharfe Gegenstände

Trockeneis

Pipetten und Pipettenspitzen

Steri-Strips

NaCl / Nährmedium (z.B. RPMI, DMEM)

PBS zur Aufarbeitung der PBMCs

## VORGABEN ZUR PROBENGEWINNUNG

### ES GELTEN DIE JEWEILIGEN LOKALEN VORGABEN ZUR BLUTABNAHME

Um sicherzustellen, dass Proben von höchster Qualität entnommen, verarbeitet und gelagert werden, bitten wir Sie die **kritischen Prozessschritte** zu beachten und die beschriebenen Verarbeitungs- und Versandverfahren zu befolgen.

Zur Asservierung von Bioproben stehen **PROBENTNAHME-BASIS-KITS** zur Verfügung. Die Entnahme der Proben folgt den **lokalen Vorgaben** und SOPs zur Präanalytik bzw. diesem Leitfaden zur Probenentnahme.

### BENÖTIGTE DOKUMENTE

1

**Patienteninformation** und **Einwilligungserklärung** werden vom Institut für Humangenetik zur Verfügung gestellt. Sie können auch unter <https://www.mri.tum.de/humangenetik> oder über folgenden QR-Code heruntergeladen werden:




Des Weiteren werden klinische Angaben (**Arztbriefe mit Epikrise sowie Synopse**) des Patienten benötigt, insbesondere die bereits durchgeführten **genetischen Voruntersuchungen**.

2


### REIHENFOLGE DER ABNAHME DER BIOPROBEN

1. Serum-Röhrchen
2. EDTA-Röhrchen
3. PAX-Röhrchen
4. BD Vacutainer CPT
5. Biopsiestanze


## PROBENGEWINNUNG SERUM

1	<p style="text-align: center;"><b>BENÖTIGTE MATERIALIEN</b></p> <p><b>1X SERUM-Gel-Röhrchen</b></p> <ul style="list-style-type: none"><li>• z.B. SARSTEDT-Monovette 4,7 ml, braun</li></ul> 
2	<p style="text-align: center;"><b>VORBEREITUNG DER ABNAHME (am Beispiel Sarstedt-Monovette)</b></p> <ul style="list-style-type: none"><li>• Es gelten die Herstellerangaben</li><li>• Standard-Kanülengröße verwenden</li><li>• Monovette auf Multi-Adapter aufsetzen und per Rechtsdrehung verriegeln</li><li>• zu jedem Etikett die passenden Proben abnehmen und die richtige Zuordnung der Etiketten zur Monovette einhalten</li></ul>
3	<p style="text-align: center;"><b>PROBENTNAHME SERUM</b></p> <ul style="list-style-type: none"><li>• Es gelten die Herstellerangaben</li><li>• Kein Mehrfacheinstich an selber Stelle</li><li>• Gleichmäßiges Aspirieren</li><li>• Kein Durchstechen der Vene</li><li>• Möglichst kein Faustschluss oder Pumpen</li><li>• Reihenfolge der Befüllung einhalten (erst SERUM-, dann EDTA-, zuletzt PAX-Röhrchen)</li><li>• Füllung der Monovetten durch gleichmäßigen Zug am Stempel</li><li>• Füllstand beachten (Markierung)</li><li>• Stempel nach Befüllung abknicken</li><li>• <b>Kritischer Schritt:</b> Monovette vom Adapter abziehen und nach zweimaligem Schwenken um 180° aufrecht in einen Ständer stellen</li><li>• Die Gerinnung des Blutes in der Monovette ist nach <b>ca. 20 bis 30 Minuten</b> abgeschlossen</li></ul>
4	<p style="text-align: center;"><b>VERARBEITUNG DER PROBEN (am Beispiel Sarstedt-Monovette)</b></p> <ul style="list-style-type: none"><li>• Es gelten die Herstellerangaben</li><li>• <b>Kritischer Schritt:</b> Zentrifugieren: <b>10 min/ 2500 x g</b> (Beispiel Sarstedt-Monovette)</li><li>• Jeweils 350 µl Serum in die bereitgestellten Cryo-Röhrchen füllen (ergibt max. 6 Aliquots á 350 µl)<ul style="list-style-type: none"><li>• <b>Kritischer Schritt:</b> Den Übertrag von Blutzellen vermeiden!</li></ul></li><li>• Einfrieren und Lagern von Proben in Cryo-Aufbewahrungsboxen bei -80 °C (-112°F) im Gefrierschrank. Bei -80 °C aufbewahren, bis Sie die Proben auf Trockeneis versenden.</li></ul>


## PROBENGEWINNUNG EDTA-BLUT

BENÖTIGTE MATERIALIEN	
1	<b>2X EDTA-Röhrchen</b> <ul style="list-style-type: none"><li>z.B. SARSTEDT-Monovette 2,7 ml, rot</li></ul> 
2	<b>VORBEREITUNG DER ABNAHME (am Beispiel Sarstedt-Monovette)</b> <ul style="list-style-type: none"><li>Standard-Kanülengröße verwenden</li><li>Monovette auf Multi-Adapter aufsetzen und per Rechtsdrehung verriegeln</li><li>zu jedem Etikett die passenden Proben abnehmen und die richtige Zuordnung der Etiketten zur Monovette einhalten</li></ul>
3	<b>PROBENTNAHME EDTA-BLUT</b> <ul style="list-style-type: none"><li>Kein Mehrfacheinstich an selber Stelle</li><li>Gleichmäßiges Aspirieren</li><li>Kein Durchstechen der Vene</li><li>Möglichst kein Faustschluss oder Pumpen</li><li>Reihenfolge der Befüllung einhalten (erst SERUM-, dann EDTA-, zuletzt PAX-Röhrchen)</li><li>Füllung der Monovetten durch gleichmäßigen Zug am Stempel</li><li>Füllstand beachten (Markierung)</li><li>Stempel nach Befüllung abknicken</li><li><b>Kritischer Schritt:</b> Die gerinnungshemmende Wirkung von EDTA kommt nur voll zur Geltung, wenn die Monovette nach der Blutentnahme 5-10 x über Kopf geschwenkt wird.</li></ul>
4	<b>VERARBEITUNG DER PROBEN (am Beispiel Sarstedt-Monovette)</b> <ul style="list-style-type: none"><li>Lagerung der Proben bei -80 °C, Versand auf Trockeneis.</li></ul>

## PROBENGEWINNUNG PAX-BLUT

1	<p style="text-align: center;"><b>BENÖTIGTE MATERIALIEN</b></p> <p><b>1X PAXgene®-Röhrchen 2,5 ml</b></p> 
2	<p style="text-align: center;"><b>VORBEREITUNG DER ABNAHME</b></p> <ul style="list-style-type: none"><li>• Sicherstellen, dass das PAXgene®-RNA-Röhrchen vor Gebrauch auf +18 bis +25 °C temperiert ist</li><li>• Zu jedem Etikett die passenden Proben abnehmen und die richtige Zuordnung der Etiketten zur Monovette einhalten.</li><li>• Mitgelieferten Adapter zusammensetzen</li></ul>
3	<p style="text-align: center;"><b>PROBENTNAHME PAX-BLUT <u>ERWACHSENE</u></b></p> <ul style="list-style-type: none"><li>• Reihenfolge der Befüllung einhalten (erst SERUM-, dann EDTA-, zuletzt PAX-Röhrchen)</li><li>• Mit Hilfe des Blutentnahmesets und eines Halters entsprechend dem von der jeweiligen Einrichtung empfohlenen Standardverfahren für Venenpunktion Blut in ein PAXgene®-RNA-Röhrchen entnehmen. Arm des Spenders weist nach unten.</li><li>• Röhrchen während der Blutentnahme in einer vertikalen Stellung unterhalb des Spenderarms halten.</li><li>• Stauschlauch lösen, sobald Blut in das Röhrchen fließt.</li><li>• Sicherstellen, dass während der Venenpunktion weder Stopfen noch Kanülenspitze mit Zusatzstoffen in Berührung kommt.</li><li>• <b><u>Kritischer Schritt:</u></b> Röhrchen nach erfolgter Füllung <b>10x schwenken</b></li></ul> <p style="text-align: center;"><b>PROBENTNAHME PAX-BLUT <u>KINDER</u></b></p> <ul style="list-style-type: none"><li>• Führen Sie eine Injektionsnadel in das PAXgene-Röhrchen ein</li><li>• 3 ml PAXgene-Flüssigkeit sammeln und in ein 15 ml Falcon-Tube überführen</li><li>• Mit einer frischen Injektionsnadel 1 ml Blut vom Kind entnehmen und in das 15 ml Falcon-Tube mit der PAXgene Tube-Flüssigkeit überführen</li><li>• <b><u>Kritischer Schritt:</u></b> Röhrchen nach erfolgter Füllung <b>10x schwenken</b></li></ul>
4	<p style="text-align: center;"><b>VERARBEITUNG DER PROBEN</b></p> <ul style="list-style-type: none"><li>• Es gelten die Herstellerangaben</li><li>• <b><u>Kritischer Schritt I:</u></b> Vor der Weiterverarbeitung das PAXgene®-RNA-Röhrchen für mindestens <b>zwei Stunden (max. 72 Stunden!)</b> aufrecht <b>bei Raumtemperatur</b> (+18 bis +25 °C) stehen lassen. Ein ungekühlter Versand ist in diesem Zeitfenster noch möglich.</li><li>• <b><u>Kritischer Schritt II:</u></b> Anschließend <b>24 Stunden bei -20 °C kühlen</b></li><li>• Danach bei -80 °C aufbewahren, bis Sie die Proben auf Trockeneis versenden.</li></ul>


## PROBENGEWINNUNG PBMCs

1	<h3>BENÖTIGTE MATERIALIEN</h3> <ul style="list-style-type: none"><li>• 1x BD Vacutainer CPT</li></ul> 
2	<h3>VORBEREITUNG DER ABNAHME</h3> <ul style="list-style-type: none"><li>• Sicherstellen, dass das BD Vacutainer CPT Röhrchen vor Gebrauch auf +18 bis +25 °C temperiert ist</li><li>• Zu jedem Etikett die passenden Proben abnehmen und die richtige Zuordnung der Etiketten zum Röhrchen einhalten.</li><li>• Mitgelieferten Long Neck Adapter von der PAX-Blut Abnahme verwenden</li></ul>
3	<h3>PROBENTNAHME</h3> <ul style="list-style-type: none"><li>• Reihenfolge der Befüllung einhalten (erst SERUM-, dann EDTA-, dann PAX-Röhrchen, dann BD Vacutainer CPT)</li><li>• Mit Hilfe des Blutentnahmesets und des Long Neck Adapters aus der vorherigen PAX-Blut Entnahme entsprechend dem von der jeweiligen Einrichtung empfohlenen Standardverfahren für Venenpunktion Blut in ein BD Vacutainer CPT-Röhrchen entnehmen. Arm des Spendenden weist nach unten.</li><li>• Röhrchen während der Blutentnahme in einer vertikalen Stellung unterhalb des Spenderarms halten.</li><li>• Stauschlauch lösen, sobald Blut in das Röhrchen fließt.</li><li>• Sicherstellen, dass während der Venenpunktion weder Stopfen noch Kanülenspitze mit Zusatzstoffen in Berührung kommt.</li><li>• <b>Kritischer Schritt:</b> Röhrchen nach erfolgter Füllung 5x schwenken und bei Raumtemperatur lagern</li><li>• <b>WENN KEINE VERARBEITUNG DER PROBEN AM STANDORT MÖGLICH IST MUSS DIE PROBE INNERHALB VON 24 h AN DAS INSTITUT GESANDT WERDEN</b></li></ul>
4	<h3>VERARBEITUNG DER PROBEN</h3> <ul style="list-style-type: none"><li>• Es gelten die Herstellerangaben</li><li>• <b>Kritischer Schritt:</b> Probe innerhalb von 20 min verarbeiten für ein optimales Ergebnis</li><li>• Maximal 24 h nach der Abnahme muss eine Verarbeitung erfolgt sein</li><li>• Vor der Zentrifugation noch einmal 5x schwenken</li><li>• <b>Kritischer Schritt:</b> Zentrifugieren: <b>20 min/ 1650 x g bei Raumtemperatur</b></li><li>• Weiße Phase (enthält die PMCs) in ein 15 ml Falcon überführen</li><li>• Mit PBS auf 15 ml auffüllen</li><li>• 5x invertieren und 15 min bei 300 g zentrifugieren</li></ul>



- Überstand entfernen und PBMCs in frischem PBS resuspendieren
- Auf 10 ml mit PBS auffüllen
- Erneut 15 min bei 300 g zentrifugieren
- Zellpellet in 1 ml RPMI Medium aufnehmen
- Herstellung des Einfriermediums aus 80 % FBS und 20 % DMSO
- 250 µl Einfriermedium zu 250 µl Zellsuspension geben und schrittweise bis – 80 °C einfrieren

## PROBENGEWINNUNG HAUTBIOPSIE

1	<p style="text-align: center;"><b>BENÖTIGTE MATERIALIEN</b></p> <p><b>1X Hautstanze</b> <b>1X 15 ml Falcon</b> z.B. Stiefel Biopsy Punch 3,0 mm</p> 
2	<p style="text-align: center;"><b>VORBEREITUNG DER ABNAHME</b></p> <ul style="list-style-type: none"><li>• Lokale Betäubung an Entnahmestelle. Als Entnahmestelle bietet sich die volare Seite des Unterarms an. Die Betäubung kann transkutan z.B. mit Emla-Pflaster oder Creme erfolgen. Alternativ kann auch ein Lokalanästhetikum, z.B. Lidocain injiziert werden. Hierfür ist jedoch die vorherige Desinfektion des Injektionsgebiets notwendig.</li><li>• Desinfektion des Entnahmegebiets, z.B. mit Octenisept und sterilen Tupfern/Kompressen</li></ul>
3	<p style="text-align: center;"><b>PROBENTNAHME HAUTSTANZE</b></p> <ul style="list-style-type: none"><li>• Unter sterilen Bedingungen (sterile Handschuhe, sterile Abdeckung) die Hautstanze auf das betäubte Hautareal aufsetzen und unter Rotation wenige Millimeter in die Haut stanzen.</li><li>• Danach Stanze wieder aus dem Hautniveau entfernen. Die herausgetanzte Haut unter der Zuhilfenahme einer sterilen anatomischen Pinzette in ein Falcon-Tube mit einem sterilen Medium (z.B. NaCl oder DMEM) übertragen.</li><li>• Verschluss der Haut mit Steri-Strips und einem Wundverband unter sterilen Bedingungen.</li></ul>
4	<p style="text-align: center;"><b>VERARBEITUNG DER PROBEN</b></p> <ul style="list-style-type: none"><li>• <b>Kritischer Schritt:</b> Die Hautstanze entweder <b>direkt</b> unter Raumtemperatur versenden.</li><li>• Oder alternativ für ein Anzüchten von Fibroblasten die Haut aus dem Falcon-Tube unter sterilen Bedingungen (Hood) in eine sterile Petri-Schale übertragen.</li><li>• Haut mit 2 Skalpellern zerkleinern. Nährmedium z.B. DMEM in einer 5ml oder 10ml Pipette vorlegen und zerkleinerte Hautstücke danach aufnehmen. Hautstücke in Nährmedium in eine Zellkulturflasche übertragen und in einem Brutschrank anzüchten.</li></ul>