Gesundheitsdepartement des Kantons Basel-Stadt

Bereich Gesundheitsschutz

▶ Kantonales Laboratorium

Extraktion von Virus-RNA
mit dem QIAamp® Viral RNA Mini Kit der Firma QIAGEN

SOP 348

(2. Version)

Änderungen:

Version	Änderungen	Grund
2	Alternative RNA-Extraktion mit Extraktionsroboter (Kap. 3, 4)	neue Möglichkeiten der automatischen Extraktion
2	Hinweis auf Anwendung des DNase-Verdaus. (Kap. 3, 4)	bisher unklare Formulierung

Verfasser: C. Bagutti

Die Entwicklung dieser Methode wurde zum Teil durch das BAFU finanziert.

Erstellt		Freigegeben		Version-Nr.:	Dateiname:
am	durch	am	durch		
26/7/13	Ba	30.7.13	EI	2	SOP348_2.doc

1 EINLEITUNG

1.1 ZWECK

Diese für lentivirale (HIV1) Vektoren und Influenzaviren erfolgreich getestete Methode dient zur Extraktion von Virus-RNA aus Flüssigkeiten.

1.1 ANWENDUNGSBEREICH

Die extrahierte RNA ist nach diesem Prozess direkt für RT-PCR (Reverse Transkriptase-Polymerase Kettenreaktion) Anwendungen verwendbar. Da das Extraktionsverfahren nicht selektiv für RNA ist, kann im nicht DNase-behandelten Extrakt auch DNA nachgewiesen werden. Diese kann durch einen DNase-Verdau und eine zusätzliche Reinigung entfernt werden.

2 PRINZIP

Nach einer Denaturierung der viralen Partikel wird die freigewordene RNA während eines Zentrifugationsschrittes an eine Silikagelmembran einer „Spinsäule" gebunden (Festphasenextraktion). Die gebundene RNA wird in der Folge in zwei Schritten von kontaminierenden Stoffen gereinigt und mit einem kleinen Volumen Extraktionspuffer eluiert. Bei den zu untersuchenden Proben, bei denen nur mit geringsten Mengen an Viren zu rechnen ist, wird dem Lysis-Puffer eine sogenannte „Carrier"-RNA beigemischt (gemäß Anleitung des Herstellers: 10 µg/ml Endkonzentration), um die RNA-Extraktionsverluste durch unspezifische Bindungen am Plastikmaterial zu verringern.
Der RNA-Extrakt kann durch DNA verunreinigt sein, welche das Messergebnis stört. Dies gilt im Speziellen für Wischproben, welche auf das Vorhandensein lentiviraler (HIV1) RNA untersucht werden (vgl. SOP347). In einem solchen Fall wird ein Aliquot des Eluates aus der ersten Extraktion jeder Probe mit RNase-freier DNase verdaut und nochmals mittels Festphasenextraktion gereinigt.

3 PRÜFEINRICHTUNGEN

(Die Validierung dieser Methode wurde mit den Geräten, Chemikalien und Lösungsmittel der angegebenen Lieferanten resp. Hersteller durchgeführt. Prinzipiell können auch andere Lieferanten bzw. Hersteller berücksichtigt werden. Bei Materialien, welche mit * markiert sind, sollte eine vorherige Vergleichsvalidierung durchgeführt werden.)

3.1 MATERIAL & GERÄTE

(Kunststoff- und Glasmaterialien sollten steril sein. Die Verwendung von aerosolgeschützten Pipettenspitzen dient als Schutz vor Kontamination)

- Mikrozentrifuge
- QIAcube* Extraktionsroboter (Fa. QIAGEN 9001292)
- Vortex-Mischgerät
- Thermomixer Comfort der Firma Eppendorf mit Wechselblock für 1,5 und 2.0 ml Eppendorfröhrchen
- Sterile Werkbank
- diverse Kolbenhubpipetten
- Handschuhe Nitril oder Latex (puderfrei)
- Plastikverbrauchsmaterial
  - aerosolgeschützte Pipettenspitzen (diverse)
  - diverse Reaktionsgefässe (Eppendorfröhrchen)

3.2 REAGENZIEN

(Es sind grundsätzlich analysenreine, für die Molekularbiologie geeignete Reagenzien zu verwenden)

- **QIAamp® Viral RNA Mini Kit** (QIAGEN), Artikel Nr. 52904*
- **RNase-Free DNase Set** (QIAGEN), Artikel Nr. 79254* (siehe Hinweis Kap.4.2)
- Ethanol puriss.
- RNase freies Wasser (QIAGEN), Artikel Nr. 0011018017*

AUSFÜHRUNG

4.1 FESTPHASENEXTRAKTION VON RNA

HINWEIS: Die Laborräumlichkeiten, in denen diese Arbeitsschritte durchgeführt werden, müssen der Risikoeinstufung des Virus angepasst sein: z.B. bei Influenza A Subtyp H1N1 "Schweinegrippe" im Stufe-3-Bereich (Sicherheitswerkbank MSCIII); bei Lentiviren in einem Labor der Sicherheitsstufe 2!)

A. Manuelle Extraktion

(für RNA Viren geeignet, deren Nachweis am KLBS durchgeführt wird)

- Proben auf Raumtemperatur bringen.
- Puffer AVL mit Carrier RNA (QIAamp® Viral RNA Mini Kit) muss bei sichtbarem Präzipitat erhitzt werden (bis 80°C und höchstens 5 Minuten). Danach ist der Puffer wieder auf Raumtemperatur zu bringen.
- Pro Probe wird ein 1,5 ml Reaktionsgefäss vorbereitet (klar beschriftet).
- 560 µl des Puffers AVL (QIAamp® Viral RNA Mini Kit) in jedes vorbereitete Reaktionsgefäss zugeben.
- 140 µl jeder Probe in das jeweilige Reaktionsgefäss mit AVL-Puffer geben, das Reaktionsgefäss verschliessen und während 15 Sekunden mit dem Vortex-Mischgerät mischen.
- 10 Minuten bei 25°C im Thermomixer inkubieren.
- ca. 5 Sekunden bei 6'000 x g = 8'000 rpm (Umdrehungen pro Minute) zentrifugieren, um Flüssigkeit aus dem Deckel des Reaktionsgefässes zu entfernen und beim Öffnen Kontaminationen zu vermeiden.
- 560 µl Ethanol puriss. zugeben, das Reaktionsgefäss verschliessen und während 15 Sekunden mit dem Vortex-Mischgerät mischen.
- ca. 5 Sekunden bei 8'000 rpm zentrifugieren.
- 630 µl des Gemisches vorsichtig auf eine zuvor beschriftete Spinsäule mit 2 ml Auffangröhrchen (QIAamp® Viral RNA Mini Kit) geben. Säule mit Deckel verschliessen.
- Spinsäule zusammen mit dem 2 ml Auffangröhrchen während 1 Minute bei 8'000 rpm zentrifugieren
- Spinsäule in ein neues Auffangröhrchen stellen und das Vorherige mit der Flüssigkeit verwerfen.
- Der Rest des Gemisches (ca. 630 µl) vorsichtig auf die entsprechenden Spinsäulen mit 2 ml Auffangröhrchen geben. Säulen mit Deckel verschliessen.
- Spinsäule zusammen mit dem 2 ml Auffangröhrchen (QIAamp® Viral RNA Mini Kit) während 1 Minute zentrifugieren.
- Spinsäulen in ein neues 2 ml Auffangröhrchen stellen, vorheriges 2 ml Auffangröhrchen inklusive Flüssigkeit verwerfen.
- Deckel der Spinsäule vorsichtig öffnen und 500 µl des Puffers AW1 (QIAamp® Viral RNA Mini Kit) zugeben
- Spinsäule verschliessen und mit Auffangröhrchen während 1 Minute bei 8'000 rpm zentrifugieren
- Spinsäule in ein neues 2 ml Auffangröhrchen stellen, vorheriges 2 ml Auffangröhrchen inklusive Flüssigkeit verwerfen.
- Deckel der Spinsäule vorsichtig öffnen und 500 µl des Puffers AW2 (QIAamp® DNA Mini Kit) zugeben
- Spinsäule verschliessen und mit Auffangröhrchen während 3 Minuten bei 20'000 x g (13'500 rpm) zentrifugieren
- Spinsäule vorsichtig in ein neues, beschriftetes 1,5 ml Reaktionsgefäss stellen, vorheriges 2 ml Auffangröhrchen inklusive Flüssigkeit verwerfen.
- Deckel der Spinsäule vorsichtig öffnen und 60 µl des Puffers AVE (QIAamp® Viral RNA Mini Kit) zugeben (Puffer muss direkt auf die Membran in der Mitte der Spinsäule getropft werden), Spinsäule verschliessen und 1 Minute stehen lassen.
- Die Spinsäule mit dem 1,5 ml Reaktionsgefäss während 1 Minute bei 8'000 rpm zentrifugieren
- Spinsäule aus Reaktiongefäss entfernen und wegwerfen, Reaktionsgefäss mit RNA-Extrakt verschliessen und bei -20°C oder –80°C aufbewahren.

B. Automatische Extraktion mittels Extraktionsroboter (QIAcube)

(für Lentiviren RNA geeignet. Für andere RNA Viren, die am KLBS nachgewiesen werden, muss die Roboterextraktion vorgängig getestet werden.)

(gemäss "Protocol Sheet" des QIAcubes für das QIAamp® Viral RNA Mini Kit von QIAGEN; Anhang)

Die ersten Schritte für eine Extraktion mit dem Roboter müssen wie oben beschrieben, manuell durchgeführt werden.

- Proben auf Raumtemperatur bringen.
- Puffer AVL mit Carrier RNA (QIAamp® Viral RNA Mini Kit) muss bei sichtbarem Präzipitat erhitzt werden (bis 80°C und höchstens 5 Minuten). Danach ist der Puffer wieder auf Raumtemperatur zu bringen.
- Pro Probe wird ein **2 ml** Reaktionsgefäss vorbereitet (klar beschriftet).
- 560 µl des Puffers AVL (QIAamp® Viral RNA Mini Kit) in jedes vorbereitete Reaktionsgefäss zugeben.
- 140 µl jeder Probe in das jeweilige Reaktionsgefäss mit AVL-Puffer geben, das Reaktionsgefäss verschliessen und während 15 Sekunden mit dem Vortex-Mischgerät mischen.
- 10 Minuten bei 25°C im Thermomixer inkubieren.
- ca. 5 Sekunden bei 6'000 x g = 8'000 rpm (Umdrehungen pro Minute) zentrifugieren, um Flüssigkeit aus dem Deckel des Reaktionsgefässes zu entfernen und beim Öffnen Kontaminationen zu vermeiden.

Nun wird der Roboter nach Anleitung mit Kunststoffröhrchen, Pipettenspitzen, Adaptern, Extraktionssäulen und Lösungen bestückt.
Zur weiteren Aufarbeitung wird folgendes Programm aufgerufen: „QIAamp Viral RNA Mini Kit / Body fluid: Manual Lysis (Purification of Viral RNA from manually lysed cell-free body fluids).
Starting Material: 700µl.
Das Elutionsvolumen ist festgelegt auf 60µl AVE. Eine der Probenanzahl entsprechende Menge AVE-Puffer ist in einem Reaktionsgefäss in Position B des Roboters einzusetzen. Das vorgegebene Volumen entnehme man der Anleitung (Protocol sheet).

4.2 VERDAU DER RNA-EXTRAKTE MIT RNase-FREIER DNase

<u>HINWEIS</u>: Die folgenden 2 Arbeitsschritte (Kap. 4.2 und 4.3) sind fakultativ. Zusammen mit der RNA kann auch DNA mitextrahiert werden. Falls dies einen störenden Einfluss auf den späteren Nachweis der Zielorganismen-RNA hat - wie es z.B. bei Lentiviren-Extrakten der Fall ist - muss ein DNase Verdau durchgeführt werden.

<u>HINWEIS</u>: Soll in der gleichen Probe sowohl Viren-spezifische RNA als auch DNA nachgewiesen werden, muss der Viren-Nachweis mit einem Teil des Extrakts ohne nachfolgenden Dnase-Verdau (d.h. Anleitung ohne Kap. 4.2/4.3) durchgeführt werden. Siehe dazu z.B. Anleitung SOP347 "Quantitativer Nachweis von Lentiviren (HIV1)-RNA mittels Real Time Detection (TaqMan RT-PCR)".

20 µl jedes RNA-Extraktes in je ein 200 µl Reaktionsgefäss geben (Einzelreaktionsgefäss oder Titerplatte)

- Zu jedem RNA-Extrakt werden folgende Reagenzien hinzupipettiert. (Diese Reagenzien können für eine entsprechende Anzahl Proben vorgemischt und als Gemisch zugefügt werden!):

RDD Buffer (RNase-Free DNase Set)	2.0 µl/Probe
DNase I (RNase-Free DNase Set)	0.5 µl/Probe
H_2O RNase-frei (RNase-Free DNase Set)	2.5 µl/Probe

- Das Reaktionsgemisch wird durch Auf- und Abpipettieren gut gemischt.
- Auf einem Thermocycler Gerät wird folgendes Temperatur-Programm durchgeführt:

10 min. / 25°C	DNase-Verdau
15 min. / 70°C	Inaktivierung der DNase
∞ / 4°C	Kühlung bis zur Weiterverarbeitung

- Die 25 µl dieses Reaktionsgemisches werden mit 115 µl RNase-freiem Wasser auf 140 µl Totalvolumen ergänzt.

4.3 REINIGUNG DES DNase REAKTIONSGEMISCHES

- Das auf 140 µl eingestellte DNase Reaktionsgemisch aus Kap. 4.2. wird durch nochmaliges Durchführen der Schritte unter Kap. 4.1. gereinigt.
- Das Endvolumen des Eluates beträgt 60 µl.

4 HINWEISE ZUR QUALITÄTSSICHERUNG

Die Vorgaben der „Richtlinie Biologische Sicherheit" sind zu erfüllen.

In jeder Extraktionsreihe müssen folgende Kontrollen mitgeführt werden:

- eine ***Negativkontrolle*** zum Feststellen von Kreuzkontaminationen: Anstatt einer Probe wird 140 µl einer keine Viren enthaltende Probe (mit z.B. PBS) oder eine Probe, welche für den Nachweis von spezifischer RNA (z.B. mittels SOP494 od. SOP347) irrelevante Virentypen enthält, durch das Extraktionsprotokoll geführt. Siehe entsprechende SOPs für Details zu den Kontrollen.
- eine ***Positivkontrolle*** zum Überprüfen der Funktionsfähigkeit des Extraktionsverfahrens: eine mit Sicherheit die nachzuweisenden Viren (z.B. Influenza A Subtyp H1N1 mittels SOP494 od. Lentiviren (HIV1) mittels SOP347) enthaltende Probe. Siehe entsprechende SOPs für Details zu den Kontrollen.

Wenn die Kontrollen nicht das gewünschte Resultat ergeben, müssen die Resultate dieser Versuchsreihe verworfen und die Untersuchung, allenfalls nach Durchführung geeigneter Massnahmen, wiederholt werden.

5 VALIDIERUNGSUNTERLAGEN

Die Validierungsunterlagen bilden ein eigenes Dokument, um eine problemlosere Anpassung zu ermöglichen.

6 LITERATUR

- **Handbuch des QIAamp® Viral RNA Mini Kits der Firma QIAGEN.**
- **Manual des QIAcube der Firma QIAGEN**
- **Protocoll Sheet für diese Anwendung (Anhang)**

QIAcube | Protocol Sheet

General Information (April 2010)

Application	Virus
Kit	QIAamp® Viral RNA Mini Kit plus QIAamp Viral RNA Mini Accessory Set, cat. no. 1048147
Sample material	Body fluid
Short protocol name	Manual lysis
Version	2
Full protocol name	Purification of viral RNA from manually lysed cell-free body fluids
Editable parameters	Elution volume: 50–100 µl in increments of 5 µl; default 60 µl
Required QIAcube® software versions	**Firmware version FIW-50-001-J_FW_MB.hex and PLC program version FIW-50-002-G-PLC_MB.prs or higher; available from the QIAcube Web Portal**

Shaker

Material	700 µl lysate from samples of cell-free body fluids (for detailed information, see "Comments" on the next page)
Vessel	2 ml screw-cap tubes without skirted base* (use in combination with Shaker Rack Plugs)
Adapter	Shaker adapter for 2 ml screw-cap tubes (marked with "S2")

* Sample Tubes CB, 2 ml (cat. no. 990382); see www.qiagen.com/MyQIAcube.

Disposable Tips

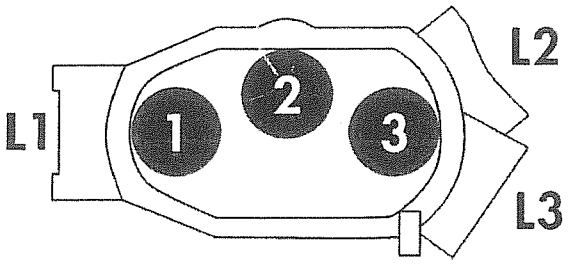
Disposable Filter-Tips, 1000 µl

Reagent Bottle Rack

Rack labeling strip	QIAamp Viral RNA

Position	Reagent
1	–
2	100% ethanol
3	Buffer AW1
4	Buffer AW2
5	–
6	–

Rotor Adapter



Position	Labware	Lid position
1	QIAamp Mini spin column	L1
2	–	–
3	1.5 ml collection tube†	L3

† Sarstedt, Micro tube 1.5 ml Safety Cap (see www.sarstedt.com).

QIAGEN®

Microcentrifuge Tube Slots

	Position		
	A	B	C
Content	–	Buffer AVE	–
Vessel		2 ml screw-cap tube without skirted base‡	

‡ Sample Tubes CB, 2 ml (cat. no. 990382); see www.qiagen.com/MyQIAcube.

	Volume of reagent required for the indicated number of samples (µl)		
Number of samples	–	**Buffer AVE**	–
2		256	
3		364	
4		472	
5		580	
6		688	
7		796	
8		904	
9		1012	
10		1120	
12		1336	

Comments

Things to do before starting

Prepare the samples by following steps 1–4 of "Protocol: Purification of Viral RNA (Spin Protocol)" in the *QIAamp Viral RNA Mini Handbook (Second Edition, December 2005)*. Transfer the lysate (approximately 700 µl) to a 2 ml screw-cap tube without skirted base (cat. no. 990382), and place it onto the QIAcube shaker.

Trademarks: QIAGEN®, QIAamp®, QIAcube® (QIAGEN Group).
© 2007–2010 QIAGEN, all rights reserved.