Gesundheitsdepartement des Kantons Basel-Stadt

Kantonales Laboratorium Basel-Stadt

Quantitativer Nachweis von Lentiviren (HIV1)-RNA mittels 'real-time' RT-PCR

SOP 347

Verfasser: M. Alt, C. Bagutti

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

Erstellt		Geprüft und freigegeben		Revisionsstand	Handbuch-Nr.
am	durch	am	durch	Version: 1	3
7/1/10	Ba	14.1.2010	PR		
Dok.-Name SOP 347_1				Gültig ab: 14/1/10	

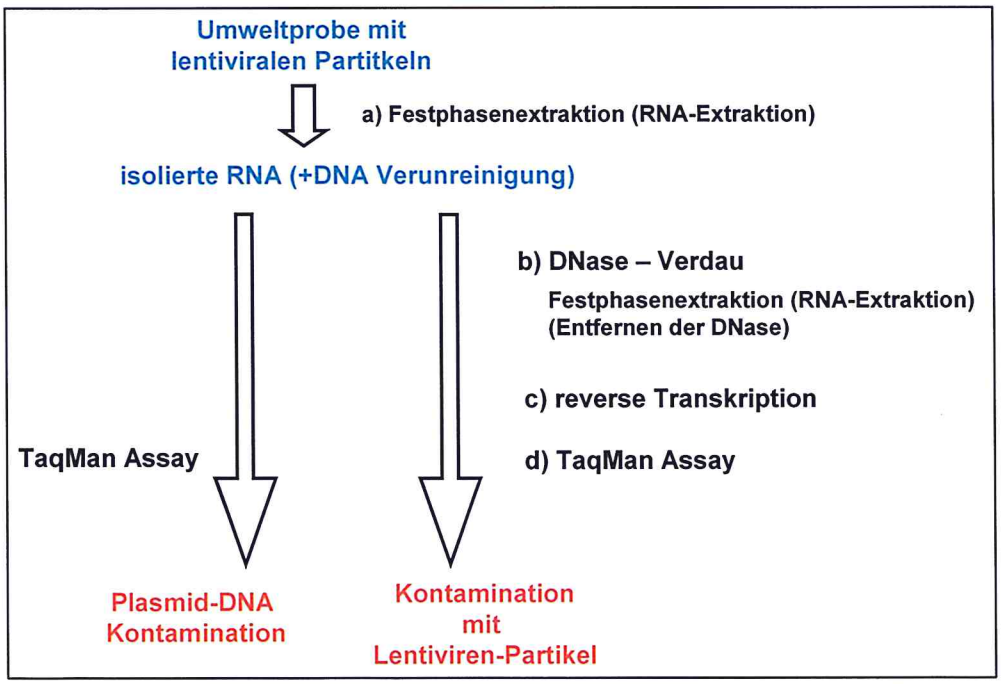
Quantitativer Nachweis von Lentiviren (HIV1)-RNA mittels 'real-time' RT-PCR)

1. ZWECK UND ANWENDUNGSBEREICH

Diese Methode beschreibt ein Verfahren zum quantitativen Nachweis von Lentiviren (HIV1) – RNA mittels reverser Transkription und quantitativer PCR (Polymerase Chain Reaction) aus RNA-Extrakten.

2. PRINZIP

RNA-Extrakte von erhobenen Proben (z.B. Wischproben gemäss SOP220) werden nach einem Verdauungsschritt mit DNase und einer anschliessenden Reinigung der RNA (SOP 348) auf das Vorhandensein von Lentivirus-RNA mit HIV1-Hintergrund untersucht. Zu diesem Zweck wird eine kombiniertes Verfahren aus reverser Transkription und quantitativer „TaqMan" PCR durchgeführt (siehe rechten Strang der schematischen Darstellung). Dieser Extrakt wird zur Kontrolle des DNA-Verdaus auch *ohne* reverse Transkription einer quantitativen PCR unterzogen. Als weitere Kontrolle wird auch mit dem *nicht* DNase-behandelten Extrakt eine quantitative PCR ohne reverse Transkription durchgeführt, um in den Proben mögliche DNA-Kontaminationen der nachzuweisenden Sequenz zu identifizieren (siehe schematischen Darstellung: links).



Schematische Darstellung des Vorgehens bei der Untersuchung von Proben auf Kontaminationen mit lentiviralen Partikeln

Bei diesem Nachweisprozess wird die RNA im Bereich der HIV-Ψ–Sequenz („Packaging Signal Sequence", Genbank Acc No. AF033819) mit einem spezifischen Primer in cDNA umgeschrieben. In einer PCR-Reaktion wird in diesem Sequenzbereich ein 137 bp grosses Fragment amplifiziert und mit einer TaqMan Sonde fluorimetrisch während jedem PCR-Zyklus (Real-time) nachgewiesen. Dabei wird die Nuklease-Aktivität der *Taq* DNA Polymerase ausgenützt, indem die Sonde während der Polymerisation gespalten und dadurch der fluoreszierende Farbstoff (FAM) vom Quencher (TAMRA) getrennt wird (Holland et al., 1991). Die Zunahme, der für den

FAM-Farbstoff spezifischen Fluoreszenz-Signale ist direkt proportional zur Anzahl PCR-amplifizierter DNA-Fragmente der HIV1-Ψ–Sequenz.

Die Anzahl Zyklen, bei der das gemessene Fluoreszenz-Signal einen vorgegebenen Schwellenwert übersteigt, ergibt den c_T-Wert. Für die Quantifizierung der Menge an HIV1-Ψ–RNA-Sequenzen in der Probe wird der c_T-Wert der Probe mit dem c_T-Wert eines Standards in Beziehung gebracht.

3. PRÜFEINRICHTUNGEN

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

3.1. MATERIAL & GERÄTE

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

- Thermocycler mit Fluoreszenzdetektionseinheit (z.B. Applied Biosystems: Sequence Detection System 7500)*. Für die Einstellungen am Gerät folge man dem Handbuch des Geräteherstellers.
- Mikrozentrifuge
- diverse Kolbenhubpipetten
- Nitril- oder Latexhandschuhe (puderfrei)
- **QuantiTect Probe RT- PCR Kit (QIAGEN)** Artikel Nr. 204443*
- PCR-Verbrauchsmaterial
  - PCR-Platten (z.B. Microamp® Optical/96-well Reaction Plate, ABI Art.Nr. N8010560)
  - Klebefolien (z.B. Adhesive Cover mit Adhesive Seal Applicator und Compression Pad Kit, ABI Art.Nr. 4311971)
- aerosolgeschützte Pipettenspitzen (diverse)
- Reaktionsgefässe (diverse)
- Eis

3.2. REAGENZIEN

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

- steriles deion. Wasser
- **Primer :**

HIV1_PSS_F	**5'-cgc agg act cgg ctt gct-3'**
HIV1_PSS_R	**5'-gac gct ctc gca ccc at-3'**

- **Sonde:**

HIV1_PSS_FAM	**5'-ccy ctc gcc tct tgc ygt gyg crc-3'**

3.3 LÖSUNGEN

- **HIV1_PSS_F:** 10 µM Primer-Lösung$
- **HIV1_PSS_R:** 10 µM Primer-Lösung$
- **HIV1_PSS_FAM:** 10 µM Sonden-Lösung$

$ Primer und Sonden werden im Originalröhrchen durch Zugabe des entsprechenden Volumens an TE-Buffer (1mM Tris, pH 8; 0.01 mM EDTA) auf die gewünschte Konzentration eingestellt.

- **Referenzlösung für Lentiviren**

Als Referenzmaterial für die Abschätzung der Menge an Lentiviren-Partikeln dient eine mittels Bioassay titrierte Lentivirenprobe in Konzentrationen zwischen 10^4 bis 10^6 TU/µl (transformierende Einheiten). Eine Messreihe von mindestens drei unterschiedlichen Konzentrationen aus dieser Reihe dient zur Bestimmung einer Referenzgeraden.

- **Positivkontrolle**

Wird diese Methode zur Analyse von Wischproben (SOP220) verwendet, kommt zusätzlich eine Positivkontrolle eingesetzt. Dabei handelt es sich um eine mit Sicherheit Lentiviren enthaltende Probe, welche durch den ganzen Abwisch-, Extraktions- und Analyseprozess mitbearbeitet wird.

4. AUSFÜHRUNG

Die für ein analytisches PCR-Labor notwendigen Vorsichtsmassnahmen (räumliche Trennung, DNA-Dekontamination, etc.) sind in einer separaten QS-Richtlinie (RL L001) beschrieben.

4.1. HERSTELLUNG DES MASTERMIXES FÜR DEN NACHWEIS VON LENTIVIREN-RNA

Die folgenden Angaben gelten für **25 µl** Ansätze (**5 µl** extrahierte und DNase behandelte RNA **+ 20 µl** Mastermix). **Alle Reaktionen werden auf Eis pipettiert.**
Folgende Lösungen werden in ein steriles 1,5 ml Reaktionsgefäß pipettiert:

- **Mastermix:**

Reagenzien	Endkonzentration	µl für einen Ansatz A mit RT	µl für einen Ansatz B ohne RT*
Primer **HIV1_PSS_F** [10 µmol/l]	400 nmol/l	1.0	1.0
Primer **HIV1_PSS_R** [10 µmol/l]	400 nmol/l	1.0	1.0
Sonde **HIV1_PSS_FAM** [10 µmol/l]	150 nmol/l	0.38	0.38
RNase freies Wasser	-	4.88	5.13
QuantiTect RT Mix	-	0.25	0
QuantiTect Probe RT-PCR Mix (2x)	1x	12.5	12.5

*Zusätzliche Kontrollen, siehe Kapitel 2 und 6

Die Gesamtmenge der einzelnen zu pipettierenden Lösungen ergibt sich aus der Anzahl durchgeführter PCR-Reaktionen und einem Überschuss von mindestens 5%.

4.2. Ansetzen und Durchführung der PCR-Reaktionen

Von jeder Probe werden folgende PCR-Analysen im Doppel durchgeführt. (Siehe Kapitel 6.)
1. TaqMan PCR **ohne** RT (Ansatz B) der Probe **vor** dem DNase Verdau.
2. TaqMan **RT-PCR** (Ansatz A) der Probe **nach** dem DNase Verdau.
3. TaqMan PCR **ohne** RT (Ansatz B) **nach** dem DNase Verdau.

- Den Mastermix kurz mischen.
- Je 20 µl Mastermix in sterile PCR-Platte (Microamp® Optical/96-well Reaction Plate) vorgeben.
- Jeweils 5 µl der zu untersuchenden RNA-Lösungen hinzupipettieren.
- Mit Klebefolie oder Deckel verschließen.
- PCR-Platte gemäß folgendem Temperatur-Zeit-Programm inkubieren:

Schritt	
Reverse Transkription	30 min./ 50 °C
Aktivierung der Taq Polymerase	15 min./ 95°C
Amplifikation (45 Zyklen)	15 sec./ 94°C 60 sec./ 60°C

- Eingabe des Reaktionsvolumens „25 µl" und Eingabe der Anzahl Zyklen „45".
- Standort und probenspezifische Angaben der Referenz-, Kontroll-, und Untersuchungsproben in den Eingabevorlagen für den Fluoreszenzmarker FAM eingeben.
- Messung starten.

5. AUSWERTUNG

5.1. QUANTITATIVE PCR

Die Auswertung der PCR-Reaktion erfolgt gemäß Manual des Herstellers des PCR-Gerätes.
Hinweise:

- Nulllinie in der linearen Darstellung festlegen (in der Regel zwischen dem 5. und 15. Zyklus)
- Wahl eines geeigneten „Thresholds" in der logarithmischen Darstellung (in der Regel <0,2)
- Die Menge vorhandener Lentiviren-RNA-Partikel wird anhand der c_T-Werte der Referenz-RNA-Proben definiert.
- Falls die Amplifikationskurven unklar sind, müssen die jeweiligen „Multicomponent" Darstellungen sowie die Rohdaten geöffnet und interpretiert werden.

5.2. BERECHNUNG DER ANZAHL DNA- BZW. RNA-GENOMKOPIEN

Die Umrechnung der Anzahl DNA- bzw. RNA-Genomkopien pro Reaktion in Anzahl DNA- bzw. RNA-Genomkopien pro Milliliter Wischprobe basiert auf den in der SOP- Extraktion von Virus-RNA und in der vorliegenden SOP vorgegebenen Arbeitsschritten und verwendetenVolumina.

DNA-Genomkopien (vor DNase, ohne RT):

Kopienzahl pro ml Wischprobe: (Mittelwert x 12 : 140) x 1000 = Mittelwert x 86

RNA-Genomkopien (nach DNase, mit RT)

Kopienzahl pro ml Wischprobe: (Mittelwert x 12 x 3 : 140) x 1000 = Mittelwert x 257

6. HINWEISE ZUR QUALITÄTSSICHERUNG

Die Qualität der verwendeten Referenzmaterialien und Reagenzien wird bei jeder Untersuchung „ad hoc" überprüft. Dies erlaubt das Verwenden von Reagenzien über ihr angegebenes Verfalldatum hinaus. Ein möglicher Einfluss auf das Resultat wird damit erkannt.
Die Vorgaben des QS-HB Kap. 6, Anhang „Die Polymerase Chain Reaction (PCR) Analytik" sind zu erfüllen.

Zur **Kontrolle des DNase-Verdaus** wird von jedem RNA-Extrakt vor und nach der DNase-Behandlung eine PCR-Reaktion ohne Zugabe des „QuantiTect RT Mix" (keine reverse Transkription siehe Punkt 4.1. und 4.2.) durchgeführt. Diese zwei Kontrollreaktionen geben einerseits Auskunft über das Funktionieren des DNase-Verdaus. Andererseits kann durch die Analyse vorhandener DNA vor dem DNase-Verdau eine allfällige Kontamination der Proben mit DNA gleicher Sequenz festgestellt werden.

In jeder Analysenreihe müssen folgende Kontrollen mitgeführt werden:

- ein ***Reagenzien-Blindwert***: Mastermix, der mit Wasser anstatt RNA-Extraktionslösung versetzt wird. Der Reagenzien-Blindwert muss negativ sein, ansonsten ist der Mastermix kontaminiert.
- eine ***Negativkontrolle*** (eine negative Extraktionskontrolle): eine Probe, die durch den ganzen Extraktionsschritt mitgeführt wurde, die aber mit Sicherheit keine Lentiviren-RNA enthält, z.B. Puffer). Die Negativkontrolle muss negativ sein, ansonsten ist eine Kontamination bei der RNA-Extraktion zu vermuten.
- ***Verdünnungsreihe der Referenzlösungen:*** die mitbearbeitete Verdünnungsreihe der Referenzlösung für Lentiviren mit mindestens 3 Konzentrationen an Lentiviren transformierenden Einheiten. Sämtliche Extrakte müssen eine sichtbare Amplifikation in der RT-PCR ergeben. Die Steigung der Geraden bei der Auswertung dieser Messreihe muss zwingend zwischen -3.3 und -3.7 liegen.

Wenn die Kontrollen nicht das erwartete Resultat ergeben, müssen die Resultate dieser Versuchsreihe verworfen und die Untersuchung nach einer geeigneten Fehleranalyse und der Beseitigung von Fehlerquellen einer geeigneten Fehleranalyse und der Beseitigung von Fehlerquellen wiederholt werden.

7. VALIDIERUNGSUNTERLAGEN

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

8. LITERATUR

- **Handbuch des QIAamp® Viral RNA Mini Kits der Firma QIAGEN**
- **Holland P.M., Abramson R.D., Watson R. and Gelfand D.H.** (1991) Detection of specific polymerase chain reaction product by utilizing the 5'-3' exonuclease activity of *Thermus aquaticus* DNA polymerase. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **88**: 357-362.
- **Zufferey R., et al.** (1998) Self-Inactivating Lentivirus Vector for Safe and Efficient In Vivo Gene Delivery. Journal of Virology, Dec 1998, Vol. 72, No.12, p.9873-9880