



Quantitativer Nachweis von **Adenovirus Typ 5 DNA** mittels Real Time Detection (TaqMan®Universal PCR)

SOP 239

(2. Version)

Änderungen:

Version	Änderungen	Grund
2	Aktualisierte Liste Verbrauchsmaterial, PCR Chemie und Reaktionsbedingungen (Kap. 3, 4)	Neue real-time PCR Geräte erfordern andere Reaktionsbedingungen/-chemie
2	Ergänzung Referenzmaterial: Qualität wird bei jedem Ansatz ad hoc validiert. (Kap. 5)	keine zertifizierten Referenzmaterialien erhältlich.

Autorin: C. Bagutti

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

Erstellt		Freigegeben		Version-Nr.:	Dateiname:
am	durch	am	durch	2	SOP239_2.doc
10/2/13	CB	13.3.13	PS		

1 EINLEITUNG

1.1 ZWECK

Diese Methode beschreibt ein Routineverfahren zum quantitativen Nachweis von Adenovirus Typ5 (Ad5)- DNA mittels Real Time Detection (TaqMan® 5'-Nuclease Assay).

1.2 ANWENDUNGSBEREICH

Mit dieser Methode kann Adenovirus-DNA quantitativ nachgewiesen werden.

2 PRINZIP

Ein Fragment (101 bp) des im Adenovirus Typ 5 Genom (GenBank Nr. M73260) vorkommenden „fiber protein„ - Gens (CDS 31042..32787) **Ad5-fiber** wird mit einem spezifischen Primer-Paar in einer PCR amplifiziert. Das PCR-Produkt wird mittels einer fluoreszenzmarkierten (FAM) Adenovirus-DNA-Sonde fluorimetrisch während jedem PCR-Zyklus (Real-time) nachgewiesen. Dabei wird die Nuklease-Aktivität der Taq DNA Polymerase ausgenutzt, 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 Farbstoffe FAM spezifischen Fluoreszenz-Signale ist direkt proportional zur Anzahl PCR-amplifizierter DNA Fragmente des Ad5-fiber-Gens.

Die Anzahl Zyklen, bei der das gemessene Fluoreszenz-Signal einen vorgegebenen Schwellenwert übersteigt, ergibt den Ct-Wert. Für die Quantifizierung der Menge an Adenovirus Genom Kopien in der Probe wird der Ct-Wert der Probe mit dem Ct-Wert eines Standards in Beziehung gebracht.

3 PRÜFEINRICHTUNGEN

(Wenn nicht mit einem * markiert, können auch Materialien, Geräte, Chemikalien und Lösungsmittel anderer Lieferanten resp. Hersteller verwendet werden.)

3.1 MATERIAL & GERÄTE

(Kunststoff- und Glasmaterialien müssen vor der Verwendung sterilisiert werden. Die Verwendung von aerosolgeschützten Pipettenspitzen dient als Schutz vor Kontamination)

- Thermocycler mit Fluoreszenzdetektionseinheit (ABI Prism® Sequence Detection System 7500 oder StepOnePlus von Applied Biosystems)*
- Mikrozentrifuge
- diverse Kolbenhubpipetten
- Latexhandschuhe (**puderfrei**) (z.B.: Roth AG, Reinach/BL)
- PCR-Verbrauchsmaterial
 - PCR-Platten: MicroAmp® Fast Optical 96-well Reaction Plate, ABI Art. 4346906 oder MicroAmp® Optical 96-well Reaction Plate, ABI Art. N8010560 bzw.
 - Klebefolien: Optical Adhesive Film, ABI Art. 4311971
 - Adhesive Seal Applicator und Compression Pad Kit , ABI, Art.Nr. 4311971
- aerosolgeschützte Pipettenspitzen (diverse)
- Reaktionsgefäße (diverse)

3.2 REAGENZIEN

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

- sterilisiertes deion. Wasser
- **Universal (Fast) PCR Master Mix** (Applied Biosystems)*
- **Primer und Sonden :**

Ad5-fiber-F	5'-aag cta gcc ctg caa aca tca-3'
Ad5-fiber-R	5'-ccc aag cta cca gtg gca gta-3'
Ad5-fiber-Probe-FAM	5'-FAM*-cct cac cac cga tag cag tac cct tac-TAMRA-3'

* Es können auch andere Farbstoffe und Quencher verwendet werden.

3.3 LÖSUNGEN

- Ad5-fiber-F: z.B. 10 µM Primer-Lösung*
- Ad5-fiber-R: z.B. 10 µM Primer-Lösung*
- Ad5-fiber-Probe-FAM: z.B. 10 µM Sonden-Lösung*

*Herstellung gemäss separater Vorschrift „Herstellung von Primern und Sonden“

3.4 REFERENZMATERIAL

Als Referenzmaterial für die Bestimmung der absoluten Menge an Adenovirus Genom Kopien dient ein Plasmid, welches ein spezifisches Adenovirus DNA Fragment enthält, das durch die oben beschriebenen Primer und Sonde nachgewiesen werden kann. Plasmide können im Gegensatz zu genomischer DNA einfach in reiner Form dargestellt und danach mittels UV-Spektroskopie quantifiziert werden. Das Referenzplasmid für den quantitativen Nachweis von Adenoviren heisst wie folgt:

pAd5-fiber-Ref

Die genaue Beschreibung der Herstellung dieser Plasmide ist Bestandteil der Validierungsunterlagen.

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 DES Ad5-fiber-GENS

Die folgenden Angaben gelten für **25 µl** Ansätze (**5 µl** extrahierte DNA + **20 µl** Mastermix). Folgende Lösungen werden in ein steriles 1,5 ml Eppendorfröhrchen pipettiert:

Mastermix:

Reagenzien	Endkonz.	µl für einen Ansatz*
Primer Ad5_fiber_F [10 µM]	100 nM	0.25
Primer Ad5_fiber_R [10 µM]	300 nM	0.75
Sonde Ad5_fiber_Probe_Fam [10 µM]	100 nM	0.25
steriles deion. Wasser	-	6.25
TaqMan Universal PCR Master Mix (2x)	1x	12.5

* dient zur Rechenhilfe

4.2 ANSETZEN UND DURCHFÜHREN DER PCR-REAKTIONEN

- Den Mastermix durch kurzes Vortexen mischen und zentrifugieren
- Je 20µl Mastermix in sterile 'Wells' (Optical 96-well Reaction Plate) vorgeben.
- Jeweils 5 µl der zu untersuchenden DNA-Lösungen zupipettieren (eingesetzte DNA-Menge = max. 200ng).
- Mit der Folie verschliessen und gut mit dem Adhesive Seal Applicator andrücken.
- ACHTUNG: Jede Platte kurz zentrifugieren, um Luftblasen sicher zu entfernen.
- PCR-Platte im TaqMan gemäss folgendem Temperatur-Zeit-Programm inkubieren.

➤ Bei Verwendung von "Universal PCR Master Mix"

Schritt	Zeit / Temp.
Aktivierung AmpliTaq Gold	10 min./ 95°C
Amplifikation (45 Zyklen)	15 sec./ 95°C 1 min./ 60°C

➤ **Bei Verwendung von "Fast Universal PCR Master Mix"**

Schritt	Zeit / Temp.
Aktivierung AmpliTaq Gold	20 min./ 95°C
Amplifikation (45 Zyklen)	3 sec./ 95°C 30 sec./ 60°C

Da die einzelnen am Gerät durchzuführenden Arbeitsschritte Gerätetypen-abhängig sind, wird für die weitere Durchführung der PCR auf das jeweilige Geräte-Manual verwiesen.

5 AUSWERTUNG

Die Auswertung erfolgt gemäss Manual des Herstellers des jeweiligen PCR-Geräts.

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 Ad5 -DNA wird durch den Ct-Wert des jeweiligen Referenz-Gens definiert.
- Falls die Amplifikationskurven unklar sind, müssen die jeweiligen „Multicomponent“ Darstellungen geöffnet und interpretiert werden.

6 HINWEISE ZUR QUALITÄTSSICHERUNG

Die Vorgaben des QS-HB, Kap. 6, Anhang: „Die Polymerase Chain Reaktion (PCR) Analytik“ sind zu erfüllen.

Die Qualität der verwendeten Referenzmaterialien und Reagenzien wird bei jeder Untersuchung „ad hoc“ überprüft. Dies erlaubt das Verwenden von Reagenzien über ihr allfälliges Verfalldatum hinaus. Ein möglicher Einfluss auf das Resultat wird damit erkannt.

In jeder Analysenreihe müssen folgende Kontrollen mitgeführt werden:

- ein **Reagenzien-Blindwert** (Mastermix, der mit Wasser anstatt DNA-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 Ad5 DNA enthält z.B. Puffer). Die Negativkontrolle muss negativ sein, ansonsten ist eine Kontamination bei der DNA-Extraktion zu vermuten.
- eine **Positivkontrolle** (z.B. eine schon gemessene Probe, welche klar positiv war). Die Positivkontrolle muss eine sichtbare Amplifikation ergeben, ansonsten muss ein Fehler in der PCR vermutet werden.
- je eine Messreihe mit 4 unterschiedlichen Mengen der beiden **Referenzplasmide** zum Bestimmen der gemessenen *Vaccinia* Virus Genom Kopien. Die Steigung der Geraden bei der Auswertung dieser Messreihen muss zwingend zwischen -3.3 und -3.7 liegen.

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

7 VALIDIERUNGSUNTERLAGEN

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

8 LITERATUR

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