



Extraktion von Virus-DNA mit dem QIAamp[®] DNA Mini Kit der Firma QIAGEN

SOP 221

(2. Version)

Änderungen:

Version	Änderungen	Grund
2	Ergänzung Referenzmaterial: Qualität wird bei jedem Ansatz ad hoc validiert (Kap. 5).	keine zertifizierten Referenzmaterialien erhältlich.
2	Alternative DNA-Extraktion mit Extraktionsroboter (Kap. 3, 4)	neue Möglichkeiten der automatischen Extraktion

Verfasser: C. Bagutti

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

Erstellt		Freigegeben		Version-Nr.:	Dateiname:
am	durch	am	durch	2	SOP221_2.doc
26/7/10	AB	30.7.13	ET		

1 EINLEITUNG

1.1 ZWECK

Diese Methode beschreibt ein Routineverfahren zum Extrahieren von Virus-DNA aus Flüssigkeiten.

1.2 ANWENDUNGSBEREICH

Mit dieser Methode kann Virus-DNA (getestet für Vaccinia Viren und Adenoviren) aus Flüssigkeiten (zum Beispiel: Wischprobe) extrahiert werden. Die extrahierte DNA ist nach diesem Prozess direkt für PCR (Polymerase Ketten Reaktion) Anwendungen benutzbar.

2 PRINZIP

Nach einem Verdau der viralen Hüllproteine mit Proteinase K wird die freigewordene DNA während eines Zentrifugationsschrittes an eine Silikagelmembran einer Spinsäule gebunden (Festphasenextraktion). Die gebundene DNA wird in der Folge in zwei Schritten von kontaminierenden Stoffen gereinigt und mit einem kleinen Volumen Extraktionspuffer eluiert. Da bei den meisten zu untersuchenden Proben, wenn überhaupt, mit nur geringsten Mengen an Viren zu rechnen ist, wird zu Beginn 1 µg einer sogenannten „Carrier“-DNA (Sonicated Herring Sperm DNA) hinzugefügt, um die DNA-Extraktionsverluste durch unspezifische feste Bindungen zu verringern.

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)

- Mikrozentrifuge
- QIAcube* Extraktionsroboter (Fa. QIAGEN 9001292)
- Vortex-Mischgerät
- Thermomixer Comfort der Firma Eppendorf mit Wechselblock für 1,5 ml Eppendorfröhrchen
- Sterile Werkbank
- diverse Kolbenhubpipetten
- Nitrilhandschuhe
- Plastikverbrauchsmaterial
 - aerosolgeschützte Pipettenspitzen (diverse)
 - diverse Reaktionsgefäße (Eppendorfröhrchen)

3.2 REAGENZIEN

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

- QIAamp® DNA Mini Kit (QIAGEN), Artikel Nr. 51304*
- Ethanol puriss.
- sterilisiertes bidestilliertes Wasser
- 1 M Tris-HCl pH 7,6, z.B. Fluka Artikel Nr. 93314
- 0,5 M EDTA pH 8,0, z.B. Fluka Artikel Nr. 03690
- Sonicated Herring Sperm DNA*, Promega, Artikel Nr. D1811

3.3 LÖSUNGEN

- 0,1 µg / µl Sonicated Herring Sperm DNA in TE-Puffer

- **TE-Puffer:** 10 mM Tris-HCl pH 7,6; 1 mM EDTA
Herstellung für 40 ml: 400 µl 1M Tris-HCl pH 7,6
80 µl 0,5 M EDTA pH 8,0
auf 40 ml mit sterilem bidestilliertem Wasser ergänzen
(in graduiertem 50 ml Reaktionsgefäss mit verschraubbarem Deckel)

4 AUSFÜHRUNG

Proben auf Raumtemperatur bringen.

4.1 MANUELLE EXTRAKTION

- Thermomixer auf 56°C vorheizen.
- pro Probe wird ein 1,5 ml Reaktionsgefäss vorbereitet (klar beschriftet).
- 20 µl Proteinase K Lösung (QIAamp® DNA Mini Kit) zu jedem Reaktionsgefäss pipettieren.
- 10 µl Sonicated Herring Sperm DNA-Lösung zu jedem Reaktionsgefäss pipettieren.
- 200 µl jeder Probe in das jeweilige vorbereitete Reaktionsgefäss geben und durch Pipettieren mit den zwei vorgelegten Lösungen mischen.
- 200 µl des Puffers AL (QIAamp® DNA Mini Kit) zugeben, das Reaktionsgefäss verschliessen und während 15 Sekunden mit dem Vortex-Mischgerät mischen.
- 10 Minuten bei 56°C im Thermomixer inkubieren.
- 5 Sekunden bei 8'000 rpm (Umdrehungen pro Minute) zentrifugieren (um Flüssigkeit aus dem Deckel des Reaktionsgefässes zu entfernen und beim Öffnen Kontaminationen zu vermeiden).
- 200 µl Ethanol puriss. zugeben, das Reaktionsgefäss verschliessen und während 15 Sekunden mit dem Vortex-Mischgerät mischen.
- 5 Sekunden bei 8'000 rpm zentrifugieren.
- Gemisch vorsichtig auf eine zuvor beschriftete Spinsäule mit 2 ml Auffangröhrchen (QIAamp® DNA Mini Kit) geben, Säule mit Deckel verschliessen.
- Spinsäule zusammen mit dem 2 ml Auffangröhrchen (QIAamp® DNA Mini Kit) während 1 Minute bei 6'000 x g (8'000 rpm) zentrifugieren.
- Spinsäule in ein neues 2 ml Auffangröhrchen (QIAamp® DNA Mini Kit) stellen, vorheriges 2 ml Auffangröhrchen inklusive Flüssigkeit verwerfen, Deckel der Spinsäule vorsichtig öffnen und 500 µl des Puffers AW1 (QIAamp® DNA Mini Kit) zugeben.
- Spinsäule verschliessen und mit Auffangröhrchen während 1 Minute bei 6'000 x g (8'000 rpm) zentrifugieren.
- Spinsäule in ein neues 2 ml Auffangröhrchen (QIAamp® DNA Mini Kit) 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 50 µl des Puffers AE (QIAamp® DNA Mini Kit) zugeben (Puffer muss direkt auf die Membran in der Mitte der Spinsäule getropft werden). 1 Minute stehen lassen.
- Spinsäule verschliessen und mit dem 1,5 ml Reaktionsgefäss während 1 Minute bei 6'000 x g (8'000 rpm) zentrifugieren.
- Spinsäule aus Reaktionsgefäss entfernen und wegwerfen, Reaktionsgefäss mit DNA-Extrakt verschliessen und bei -20°C aufbewahren.

4.2 EXTRAKTION MITTELS EXTRAKTIONSROBOTER (QIAcube)

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

Bei der DNA-Extraktion aus Viren wird der QIAcube Extraktionsroboter nur angewendet, wenn es sich um Proben aus dem Bioassay handelt. Andernfalls ist die manuelle Extraktion durchzuführen (Kap. 4.1).

Bei einer Extraktion mit dem Roboter werden für die Proben ausschliesslich 2ml Reaktionsgefässe verwendet; für das DNA-Eluat 1.5ml Reaktionsgefässe. Letztere sind bei den fixfertigen bestückten Adaptern schon enthalten.

- Der Extraktionsroboter wird nach Anleitung mit Kunststoffröhrchen, Pipettenspitzen, Adaptern, Extraktionssäulen und Lösungen bestückt (oder mit fertig bestückten Adaptern).
- Zur Aufarbeitung wird das Programm „QIAamp DNA Blood Mini“/Blood or Body fluid/Elution volume: 100µl, verwendet.*
- Vorab wird zu den 200µl Probenlösungen je 10µl Herring Sperm DNA-Lösung zugegeben.
- Die zu extrahierenden Proben werden in den Extraktionsroboter gestellt und mit dem vorgegebenen Programm extrahiert.

*In der vorliegenden SOP wird bei der manuellen Extraktion mit einem Elutionsvolumen von 50µl gearbeitet. Dieses Volumen ist beim QIAcube nicht vorgesehen und kann deshalb nicht angewählt werden. Deshalb wird bei der Cube-Extraktion mit 100µl gearbeitet. Da in diesem Fall (Extraktion aus Bioassay) eine Zunahme der Viren gemessen werden soll, d.h. eine Vorher-Nachher-Aufnahme, spielt es keine Rolle, ob 50 oder 100µl eluiert werden.

5 HINWEISE ZUR QUALITÄTSSICHERUNG

Die Vorgaben im „Sicherheitskonzept für Tätigkeiten, welche der ESV unterstehen“ und entsprechende Betriebsanweisungen 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 Extraktionsreihe müssen folgende Kontrollen mitgeführt werden:

- eine **Negativkontrolle** zum Feststellen von Kreuzkontaminationen: Anstatt einer Probe wird 200 µl eines nicht kontaminierten Puffers (zum Beispiel PBS) durch das Extraktionsprotokoll geführt.
- eine **Positivkontrolle** zum Überprüfen der Funktionsfähigkeit des Extraktionsverfahrens (z.B. eine schon gemessene Probe, welche *Vaccinia* oder *Adeno* Viren enthält).

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

6 VALIDIERUNGSUNTERLAGEN

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

7 LITERATUR

- **Offizielle Anleitung zum Gebrauch des QIAamp® DNA Mini Kits der Firma QIAGEN** (Januar 1999)
- **Manual des QIAcube der Firma QIAGEN**
- **Protocoll Sheet für diese Anwendung (Anhang)**
- **Ausubel F.M., Brent R., Kingston R.E., Moore D.D., Seidman J.G., Smith J.A. and Struhl K.** (1992) Short protocols in molecular biology, second edition, *Published by Green Publishing Associates and John Wiley & Sons, New York, ISBN 0-471-57735-9*

QIAcube | Protocol Sheet

General Information (May 2008)

Application	DNA
Kit	QIAamp [®] DNA Blood Mini Kit (50) plus QIAamp DNA Blood Mini Accessory Set A, cat. no. 1043368 or QIAamp DNA Blood Mini Kit (250) plus QIAamp DNA Blood Mini Accessory Set B, cat. no. 1043369.
Sample material	Blood or body fluid
Short protocol name	Elution volume: 200 μ l
Version	3
Full protocol name	Blood and body fluid spin protocol V3
Editable parameters	-
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	200 μ l blood or body fluid
Vessel	2 ml screw-cap tube without skirted base*
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

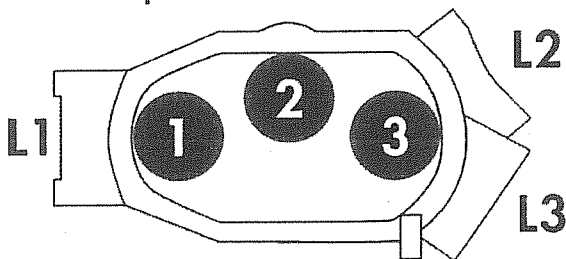
Disposable Filter-Tips, 1000 μ l
Disposable Filter-Tips, 200 μ l

Reagent Bottle Rack

Rack labeling strip	QIAamp DNA
----------------------------	------------

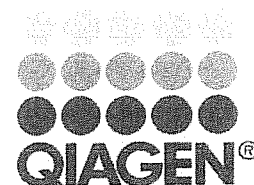
Position	Reagent
1	-
2	Buffer AL
3	96-100% ethanol
4	Buffer AW1
5	Buffer AW2
6	Buffer AE

Rotor Adapter



Position	Labware	Lid position
1	QIAamp spin column	L1
2	-	-
3	1.5 ml collection tube*	L3

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



QIAcube | Protocol Sheet

Microcentrifuge Tube Slots

	Position		
	A	B	C
Content	QIAGEN® Protease		
Vessel	1.5 ml microcentrifuge tube*		

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

Number of samples	Volume of reagent required for the indicated number of samples (µl)		
	A	B	C
2	68		
3	90		
4	111		
5	133		
6	155		
7	176		
8	198		
9	219		
10	241		
12	284		

Comments

Use a pipet to transfer the required volume of Buffer AL to the reagent bottle. Avoid generating large air bubbles or foam as this may lead to a liquid-detection error during the load check.