



Anwendung der  
**'Falsch-Negativ'-Kontrolle (FNC)**  
zur Überprüfung der Amplifizierbarkeit extra-  
hierter DNA in 'real-time' PCR Analysen

**SOP327** (Version 1)

---

Verfasser: M. Alt, C. Bagutti, P. Brodmann

Erstellt		Freigegeben		Version-Nr.:	Dateiname:
am	durch	am	durch	1	SOP327_1.doc
20/1/12	BA	23.1.12	PB		

# 1 EINLEITUNG

## 1.1 ZWECK

Die vorliegende SOP beschreibt ein Verfahren, das als 'Falsch-Negativ'-Kontrolle (=FNC) in der 'real-time' PCR-Reaktion dient.

## 1.2 ANWENDUNGSBEREICH

Mit der FNC-Methode wird überprüft, ob die 'real-time' PCR-Reaktion durch interne Parameter im DNA-Extrakt gehemmt wird, da bei der DNA-Extraktion aus Umweltproben oft PCR-Inhibitoren (z.B. Huminsäuren aus Bodenproben) aus den Umweltmatrices mitextrahiert werden. Bei der Detektion von spezifischer DNA in Umweltproben ist daher darauf zu achten, dass ein negatives Resultat nicht fälschlicherweise aufgrund eines PCR-Inhibitors zustande kommt.

# 2 PRINZIP

Ausgegangen wird von einer frei erfundenen DNA-Sequenz, die in der Gen-Datenbank [1] nirgends zu finden ist. Innerhalb dieser Sequenz sind einzig zwei Restriktionsschnittstellen (BamHI und HindIII) definiert. Die gesamte Sequenz ist danach gemäss SOP299 (Herstellung eines Referenz-Plasmids) in ein DNA-Plasmid kloniert worden.

Zum Nachweis der Sequenz wird ein Fragment von 110 Basenpaaren mit einem spezifischen Primerpaar in einer PCR amplifiziert. Das PCR-Produkt wird mittels einer VIC-fluoreszenzmarkierten DNA-Sonde 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 (VIC) vom Quencher (TAMRA) getrennt wird [2]. Die Zunahme, der für den Farbstoffe VIC spezifischen Fluoreszenzsignale ist direkt proportional zur Anzahl PCR-amplifizierter DNA Fragmente des synthetischen FNC-DNA-Fragmentes. Die Anzahl Zyklen, bei der das gemessene Fluoreszenz-Signal einen vorgegebenen Schwellenwert übersteigt, ergibt den cT-Wert.

Der auf Inhibition zu testende DNA-Extrakt wird als "Template" zusammen mit einer bekannten Menge an FNC-Plasmid mit dem FNC Primer- und Sondenset analysiert. Der cT dieser Probe wird verglichen mit dem cT-Wert einer Kontrollreaktion, in der anstelle des DNA-Extrakts Wasser eingesetzt wird. Eine Zunahme des cT-Werts der Proben- gegenüber demjenigen der Kontrollreaktion lässt auf eine Inhibition der PCR-Reaktion durch den DNA-Extrakt schliessen.

# 3 PRÜFEINRICHTUNGEN

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

## 3.1 GERÄTE UND MATERIAL

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

- Thermocycler mit Fluoreszenzdetektionseinheit (ABI Prism<sup>®</sup> Sequence Detection System 7700 von Applied Biosystems)\*
- Mikrozentrifuge
- diverse Kolbenhubpipetten
- aerosolgeschützte Pipettenspitzen (diverse)
- Eppendorfröhrchen (diverse)
- Latex- oder Nitrilhandschuhe puderfrei, (z.B.: Roth AG, Reinach/BL)
- PCR-Verbrauchsmaterial:
  - PCR-Platten: MicroAmp<sup>®</sup> Fast Optical 96-well Reaction Plate, ABI Art. 4346906 oder MicroAmp<sup>®</sup> 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

### 3.2 REAGENZIEN

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

- Steriles deionisiertes Wasser
- 2 x Fast Universal PCR Master Mix (ABI, Art. 4352042)\*, 2 x Universal PCR Master Mix (ABI, Art. 4304437)\* oder Quantitect Multiplex MM (QIAGEN Art. 204541 od. 204741, mit od. ohne ROX)\*
- **Primer:**

<b>FNC-F</b>	<b>5'-cgt cac atc ggt aga cga act aa-3'</b>
<b>FNC-R</b>	<b>5'-ttc aag tcc tga gcg gtt gta a-3'</b>

- **Sonde:**

<b>FNC-Probe-VIC</b>	<b>5'-acc taa cgc agc aac tta tcg acc gtt cac tt-3'</b>
----------------------	---

### 3.3 LÖSUNGEN

- **Primer** FNC-F; FNC-R: 10 µM Primer-Lösung\$
- **Sonde** FNC-Sonde-VIC: 10 µM Sonden-Lösung\$  
<sup>s</sup> 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.

### 3.4 REFERENZMATERIAL

- **Referenzplasmid pFNC\_Ref:** 10<sup>3</sup>, 10<sup>4</sup> oder 10<sup>5</sup> Sequenzkopien / 5µl

## 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

Die folgenden Angaben gelten für 25 µl Ansätze (5 µl extrahierte DNA oder Wasser + 15 µl Mastermix + 5 µl FNC-Template). Anhand der folgenden Angaben können mehrere Ansätze des gleichen Primer- und Sonden-systems - in ein steriles 1,5ml Eppendorfröhrchen pipettiert - vorbereitet werden. (Dabei ist zu beachten, dass aufgrund des Pipettierverlustes ein Überschuss von mind. 5 % des Volumens miteinberechnet werden sollte.)

Folgende Lösungen werden in ein steriles 1,5 ml Eppendorfröhrchen pipettiert:

#### TaqMan-PCR-Mastermix:

Reagenzien	Endkonz.	µl für einen Ansatz*	
		zu untersuchende Probe	FNC-Kontroll-probe
Primer <b>FNC_F</b> [10 µM]	300 nM	0.75	0.75
Primer <b>FNC_R</b> [10 µM]	300 nM	0.75	0.75
Sonde <b>FNC_Probe_VIC</b> [10 µM]	100 nM	0.25	0.25
<b>pFNC-Ref</b>	-	5.0	5.0
steriles deion. Wasser	-	<b>0.75</b>	<b>5.75</b>
zu untersuchender DNA-Extrakt	-	<b>5.0</b>	-
TaqMan Universal PCR Master Mix (2x)	1x	12.5	12.5
<b>TOTAL</b>		25.0	25.0

\* Volumenangaben dienen als Rechenhilfe

Es ist zu beachten, dass sich die Gesamtmenge der einzelnen zu pipettierenden Lösungen aus der Anzahl durchgeführter PCR-Reaktionen und einem Überschuss von mindestens 5% ergibt.

### 4.2 ZUGABE MASTERMIX ZUM DNA EXTRAKT

- 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. 200 ng).

- Mit der Folie verschliessen und gut mit dem Adhesive Seal Applicator andrücken.
- ACHTUNG: Jede Platte kurz zentrifugieren, um Luftblasen sicher zu entfernen.

### 4.3 REAL-TIME PCR

- 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 sek./ 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 Geräte-Manual des jeweiligen PCR-Gerätes.
- Falls die Amplifikationskurven unklar sind, müssen die jeweiligen „Multicomponent“ Darstellungen geöffnet und interpretiert werden.
- **Erkennung der PCR Inhibition durch DNA-Extrakte:**

Die cT-Werte der Kontrollprobe und der zu untersuchenden Probe werden miteinander verglichen. **Eine inhibitorische Wirkung des DNA-Extraktes auf die PCR-Reaktion herrscht vor, wenn das  $\Delta cT > 1.5$**  (cT-Wert der zu untersuchenden Probe minus cT-Wert der Kontrollprobe), d.h. wenn von einem signifikantem Quantitätsunterschied in ca. einer halben Grössenordnung ausgegangen werden muss. Bei Unklarheiten oder zur Bestätigung einer Inhibition kann eine Verdünnungsreihe des DNA-Extrakts nachgemessen werden. Der Hemmeffekt müsste sich damit auch verdünnen lassen.

## 6 HINWEISE ZUR QUALITÄTSSICHERUNG

- Die Vorgaben des QS-HB, Kapitel 6, Anhang: „Die Polymerase Chain Reaktion (PCR) Analytik“ sind zu erfüllen.
- In jeder Analysenreihe muss eine Negativkontrolle 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. Wenn die Kontrolle nicht das gewünschte Resultat ergeben, müssen die Resultate dieser Versuchsreihe verworfen und die Untersuchung, allenfalls nach Durchführung geeigneter Massnahmen wiederholt werden.
- Die Positivkontrolle ist bereits durch den Versuchsansatz gegeben (siehe Kap. 4.1. FNC-Kontrollprobe).

## 7 VALIDIERUNGSUNTERLAGEN

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

## 8 LITERATUR

1. Benson, D.A., et al., *GenBank*. Nucleic Acids Res, 2008. **36**(Database issue): p. D25-30.
2. Holland, D.T., et al., *Differentiation and characterization of enteroviruses by computer-assisted viral protein fingerprinting*. J Clin Microbiol, 1998. **36**(6): p. 1588-94.