



Quantitativer Nachweis von *Vaccinia Virus* DNA mittels Real Time Detection (TaqMan®Universal PCR)

SOP 222

(2. Version)

Änderungen:

Version	Änderungen	Grund
2	Hinweis zu weiterem möglichen Insertionsregionen für Transgene neben den nachweisbaren I4L u. TK (Kap. 2)	Bisherige Schlussfolgerung bei gleichzeitiger Detektion von I4L und TK auf Wild-Typ je nach verwendetem Vacciniavirentyp nicht korrekt.
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.

Verfasser: C. Bagutti

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

Erstellt		Freigegeben		Version-Nr.:	Dateiname:
am	durch	am	durch	2	SOP222_2.doc
10/2/13	CB	13.3.13	PS		

1 EINLEITUNG

3.1 ZWECK

Diese Methode beschreibt ein Routineverfahren zum quantitativen Nachweis von wildtyp und rekombinanter *Vaccinia* Virus-DNA mittels Real Time Detection (TaqMan® 5'-Nuclease Assay).

3.2 ANWENDUNGSBEREICH

Mit dieser Methode kann *Vaccinia* Virus-DNA quantitativ nachgewiesen werden. Zudem ist diese Methode fähig zwischen rekombinanten und wildtyp *Vaccinia* Viren Genomen zu unterscheiden.

2 PRINZIP

Zwei im *Vaccinia* Viren Genom (*Vaccinia* Virus, Stamm Copenhagen: GenBank Nr. M35027) vorkommende Gene (Thymidinkinase (CDS 83855..84388):**VvTK**; Ribonucleotidreduktase (CDS 65056..67371): **VvI4L**) werden mit je einem spezifischen Primer-Paar in einer PCR amplifiziert. Die PCR-Produkte werden mittels je einer verschiedenen fluoreszenzmarkierten (FAM oder VIC) *Vaccinia* Virus-DNA-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 oder VIC) vom Quencher (TAMRA) getrennt wird (Holland et al., 1991). Die Zunahmen, der für die Farbstoffe FAM und VIC spezifischen Fluoreszenz-signalen sind direkt proportional zur Anzahl PCR-amplifizierter DNA Fragmente des VvTK-, respektive VvI4L-Gens. Die Anzahl Zyklen, bei der das gemessene Fluoreszenz-Signal einen vorgegebenen Schwellenwert übersteigt, ergibt den Ct-Wert. Für die Quantifizierung der Menge an *Vaccinia* Virus Genom Kopien in der Probe wird der Ct-Wert der Probe mit dem Ct-Wert eines Standards in Beziehung gebracht.

Um zwischen gentechnisch veränderten (rekombinanten) und Wildtyp *Vaccinia* Viren unterscheiden zu können, müssen die Fremdgen-Insertionsstellen der zu untersuchenden *Vaccinia* Viren bekannt sein: Bei einer gentechnischen Veränderung von *Vaccinia* Viren wird die fremde DNA vorwiegend in die Mitte des VvTK-Gens gesetzt (Fuerst et al., 1986) oder die Fremd-DNA ersetzt einen Teil des VvI4L-Gens (Tsung et al., 1996; persönliche Mitteilung von Herrn Paul Zajac (ZLF, Basel), 1999). Die jeweiligen Sonden wurden so gewählt, dass in solchen Fällen der Nachweis des I4L- bzw. des TK-Gens nicht mehr möglich ist, da an dessen Stelle die fremde DNA gesetzt wurde. Das jeweilig andere Gen kann jedoch nachgewiesen werden. Wird ausschliesslich mit diesen Insertionsstellen gearbeitet, ist der Nachweis von *beiden* Genen somit ein Hinweis auf das Vorliegen von wildtyp *Vaccinia* Viren. Wird mit anderen Insertionsstellen gearbeitet, kann vom gleichzeitigen Nachweis von I4L und TK nicht auf das Vorliegen von Wildtyp geschlossen werden.

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 :**

VvTK-F	5'-tcg atg aag gac agt tct ttc ca-3'
VvTK-R	5'-cca tcg agt gcg gct act ata a-3'
VvTK-FAM	5'-(FAM*)-ttg cca tac gct cac aga att caa caa tgt-(TAMRA*)-3'
Vvl4L-F	5'-gac act ctg gca gcc gaa at-3'
Vvl4L-R	5'-ctg gcg gct aga atg gca ta-3'
Vvl4L-VIC	5'(VIC*)-agc agc cac ttg tac tac aca aca tcc gga-(TAMRA*)3'

* Es können auch andere Farbstoffe und Quencher verwendet werden.

3.3 LÖSUNGEN

- VvTK-F: z.B. 10 µM Primer-Lösung*
- VvTK-R: z.B. 10 µM Primer-Lösung*
- Vvl4L-F: z.B. 10 µM Primer-Lösung*
- Vvl4L-R: z.B. 10 µM Primer-Lösung*
- VvTK-FAM: z.B. 10 µM Sonden-Lösung*
- Vvl4L-VIC: 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 *Vaccinia* Virus Genom Kopien dienen Plasmide, welche ein spezifisches *Vaccinia* Virus DNA Fragment enthalten, das durch die jeweiligen Primer und Sonden nachgewiesen werden kann. Plasmide können im Gegensatz zu genomischer DNA einfach in reiner Form dargestellt und danach mittels UV-Spektroskopie quantifiziert werden. Die Referenzplasmide für den quantitativen Nachweis von *Vaccinia* Viren heissen wie folgt:

- pVvTK-Ref
- pVvl4L-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 TK-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 VvTK-F [10 µM]	600 nM	1.5
Primer VvTK-R [10 µM]	200 nM	0.5
Sonde VvTK-FAM [10 µM]	200 nM	0.5
steriles deion. Wasser	-	5.0
TaqMan Universal PCR Master Mix (2x)	1x	12.5

* dient zur Rechenhilfe

4.2 HERSTELLUNG DES MASTERMIXES FÜR DEN NACHWEIS DES I4L-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 Vvi4L-F [10 µM]	500 nM	1.25
Primer Vvi4L-R [10 µM]	500 nM	1.25
Sonde Vvi4L-VIC [5 µM]	150 nM	0.75
steriles deion. Wasser	-	4.25
TaqMan Universal PCR Master Mix (2x)	1x	12.5

* dient zur Rechenhilfe

4.3 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 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.

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 *Vaccinia* Virus-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 *Vaccinia* Virus 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

Fuerst T.R., Niles E.G., Studier F.W. and Moss B. (1986) Eukaryotic transient-expression system based on recombinant *Vaccinia* virus that synthesizes bacteriophage T7 RNA polymerase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **83**: 8122-8126

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

Tsung K., Yim J.H., Marti W., Buller R.M.L. and Norton J.A. (1996) Gene expression and cytopathic effect of *Vaccinia* virus inactivated by psoralen and long-wave UV light. *J. Virol.* **70**: 165-171

