

Methodensammlung der Bund/Länder-Arbeitsgemeinschaft Gentechnik (LAG)	
Quantitativer Nachweis von Adenovirus DNA mittels Real Time PCR	AM017
Erstellt vom Unterausschuss Methodenentwicklung der LAG, Februar 2005	
Status: verabschiedet	

1. Zweck und Anwendungsbereich

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

2. Kurzbeschreibung

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. Material

3.1 Geräte

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

- Thermocycler mit Fluoreszenzdetektionseinheit
- Mikrozentrifuge
- diverse Kolbenhubpipetten
- Latexhandschuhe (puderfrei)
- PCR-Verbrauchsmaterial
 - PCR-Platten
 - Deckel für PCR-Platten
 - Cap Installing Tool
 - aerosolgeschützte Pipettenspitzen (diverse)
 - Reaktionsgefäße (diverse)

3.2. Reagenzien

Es sind grundsätzlich analysenreine, für die Zellkultur und die Molekularbiologie geeignete Reagenzien zu verwenden.

- steriles deion. Wasser
- **Universal PCR Master Mix**

- **Primer :**

Ad5-fiber-F	5'-aag cta gcc ctg caa aca tca-3'
Ad5-fiber-R	5'-ccc aag cta cca gtg gca gta-3'

- **Sonde:**

Ad5-fiber-Probe-FAM	5'-cct cac cac cac ega tag cag tac cct tac-3'
----------------------------	--

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

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: **pAd5-fiber-Ref**

Dieses Referenzplasmid kann beim kantonalen Laboratoriums Basel-Stadt, Herrn Dr. Guido Vogel, Kannenfeldstraße 2, 4012 Basel (Schweiz), email guido.vogel@kl.bs.ch, bezogen werden.

4. Durchführung

Die für ein analytisches PCR-Labor notwendigen Vorsichtsmassnahmen (räumliche Trennung, DNA-Dekontamination, etc.) sind einzuhalten.

4.1. Herstellung des Mastermixes für den Nachweis von Adenoviren

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

4.2. Ansetzen und Durchführung der PCR-Reaktionen

- Die Gesamtmenge der einzelnen zu pipettierenden Lösungen ergibt sich aus der Anzahl durchgeführter PCR-Reaktionen und einem Überschuss von mindestens 5%.
- Den Mastermix kurz mischen.
- 20 µl Mastermix in sterile Tubes vorgeben.
- Jeweils 5 µl der zu untersuchenden DNA-Lösungen zupipettieren.
- Mit Deckel verschließen und gut mit dem „Cap Installing Tool“ andrücken.
- PCR-Platte im TaqMan gemäß folgendem Temperatur-Zeit-Programm inkubieren:

Schritt	
UNG-Aktivität*	2 min./ 50 °C
Aktivierung AmpliTaq Gold	10 min./ 95°C
Amplifikation (45 Zyklen)	15 sec./ 95°C
	60 sec./ 60°C

*System zur Vermeidung von „carry-over“-Kontaminationen. Kontaminierende Amplikons werden vor der PCR durch das Enzym Uracil-N-Glykosylase (UNG) abgebaut.

- Einstellen des Berechnungsmodus (siehe Anleitung des verwendeten Thermocyclers)
- Eingabe des Reaktions-Volumens „25 µl“
- 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

Die Auswertung erfolgt gemäß den jeweiligen Anleitungen der verwendeten Thermocycler

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

6. Hinweise zur Qualitätssicherung

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 Adenovirus 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 des **Referenzplasmides** zum Bestimmen der gemessenen Adenovirus 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. Ringversuch

In den Jahren 2003 und 2004 wurde diese Methode durch den Unterausschuss „Methodenentwicklung“ des LAG in einem Ringversuch validiert, an dem insgesamt 7 bundesdeutsche und ein Schweizer Überwachungslabor teilnahmen.

Alle 8 Laboratorien wendeten die vorliegende Nachweismethode „**mit Erfolg**“ an.

Jeder Teilnehmer sollte in fünf codierten Proben mit verschiedenen Kopienzahlen von adenoviralen Genomen (davon eine Negativprobe/Puffer) eine entsprechende Quantifizierung der viralen DNA vornehmen. Die Quantifizierung der viralen DNA wurde von allen beteiligten Laboren erfolgreich durchgeführt.

Diese Methode beruht auf einer Standard Arbeitsanweisung (SOP) des kantonalen Laboratoriums Basel-Stadt (SOP P239), deren Entwicklung finanziell durch das Schweizer Bundesamt für Umwelt, Wald und Landschaften (BUWAL) unterstützt wurde.

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