

Methodensammlung der Bund/Länder-Arbeitsgemeinschaft Gentechnik	
Quantitativer Nachweis von Vacciniavirus-DNA mittels Real Time PCR	AM012
Erstellt vom Unterausschuss Methodenentwicklung der LAG, März 2003	
Status: verabschiedet	

1. Zweck und Anwendungsbereich

Diese Methode beschreibt ein Routineverfahren zum quantitativen Nachweis von Wildtyp und rekombinanter Vaccinavirus-DNA mittels Real Time PCR (TaqMan[®] 5'-Nuclease Assay). Neben der Quantifizierung von Vacciniavirus-DNA kann mit dieser Methode zwischen Genomen von rekombinanten und Wildtyp-Vacciniaviren unterschieden werden.

Werden Wischproben, die z.B. im Rahmen von Kontaminationsuntersuchungen (Laboroberflächen) gewonnen wurden, als Ausgangsmaterial verwendet, so zeigt die Auswertung der durchgeführten Ringversuche, dass die Methode in diesem Fall nur eine semiquantitative Bewertung der Proben erlaubt.

Die Methode ist damit gut geeignet, den Kontaminationsgrad einer Laboroberfläche mit Vacciniaviren zu definieren.

2. Kurzbeschreibung

Zwei im Genom von Vacciniaviren (*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) Vacciniavirus-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 oder VIC) vom Quencher (TAMRA) getrennt wird [1]. Die Zunahme der für die Farbstoffe FAM und VIC spezifischen Fluoreszenzsignale sind direkt proportional zur Anzahl PCR-amplifizierter DNA-Fragmente des VvTK- respektive VvI4L-Gens. Handelt es sich um die DNA von Wildtyp-Vacciniaviren, können während der PCR beide Genfragmente amplifiziert werden und somit über die beiden Sonden quantitativ gemessen werden. Bei gentechnisch veränderten (rekombinanten) Vacciniaviren wird jedoch entweder ein Stück fremde DNA in die Mitte des VvTK-Gens kloniert [2] oder eine heterologe Sequenz ersetzt einen Teil des VvI4L-Gens [3], 1999). Die jeweiligen Sonden wurden so gewählt, dass sie beim Vorhandensein solcher fremder DNA-Fragmente die entstehenden PCR-Produkte nicht mehr nachweisen können. Daher kann bei der PCR mit DNA von rekombinanten Vacciniaviren jeweils nur das nicht veränderte Gen (Referenz-Gen: entweder VvTK oder VvI4L) detektiert und quantifiziert werden.

Die Anzahl Zyklen, bei der das gemessene Fluoreszenz-Signal einen vorgegebenen Schwellenwert übersteigt, ergibt den Ct-Wert. Für die Quantifizierung der Menge an Kopien des jeweiligen Vaccinavirus-Genoms 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
- Laborhandschuhe
- 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 :**

VvTK-F	5'-tcg atg aag gac agt tet ttc ca-3'
VvTK-R	5'-cca tcg agt gcg gct act ata a-3'
VvIL4-F	5'-gac act ctg gca gcc gaa at-3'
VvIL4-R	5'-ctg gcg gct aga atg gca ta-3'

- **Sonden:**

VvTK-FAM	5'-ttg cca tac gct cac aga att caa caa tgt-3'
VvIL4-VIC	5'-agc agc cac ttg tac tac aca aca tcc gga-3'

3.3 Lösungen

- VvTK-F: z.B. 12 µM Primer-Lösung
- VvTK-R: z.B. 9 µM Primer-Lösung
- VvIL4-F: z.B. 10 µM Primer-Lösung
- VvIL4-R: z.B. 12 µM Primer-Lösung
- VvTK-FAM: z.B. 10 µM Sonden-Lösung
- VvIL4-VIC: z.B. 10 µM Sonden-Lösung

3.4 Referenzmaterial

Als Referenzmaterial für die Bestimmung der absoluten Menge der Genomkopien der Vacciniaviren dienen Plasmide, die ein spezifisches Fragment der Vacciniavirus-DNA 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
pVvIL4-Ref

Diese Referenz-DNA ist auf Anfrage über den Unterausschuss „Methodenentwicklung“ des LAG erhältlich (www.lag-gentechnik.de).

4. Durchführung

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

Normalerweise kann der Nachweis des VvTK- und VvIL4-Gens mittels Multiplexreaktionen (im gleichen Reaktionsansatz) erfolgen (siehe 4.1 und 4.2). Wenn jedoch eines der beiden Gene in der Probe weniger als 1% des anderen ausmacht, ist die Genauigkeit der Multiplexreaktion ungenügend. In diesem Fall, muss der Nachweis über Einzelreaktionen erfolgen (siehe 4.3 und 4.4).

4.1 Herstellung des Mastermixes für den Nachweis von Vacciniaviren, welche die Fremd-DNA in das VvTK-Gen integriert haben (Multiplexreaktion)

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

Reagenzien	Endkonz.	µl für einen Ansatz
Primer VvTK-F [12 µM]	600 nM	1,25
Primer VvTK-R [9 µM]	200 nM	0,56
Sonde VvTK-FAM [10 µM]	200 nM	0,5
Primer VvIL4-F [10 µM]	180 nM	0,45
Primer VvIL4-R [12 µM]	180 nM	0,38
Sonde VvIL4-VIC [10 µM]	150 nM	0,38
steriles deion. Wasser	-	3,98
TaqMan Universal PCR Master Mix (2x)	1x	12,5

4.2 Herstellung des Mastermixes für den Nachweis von Vacciniaviren, welche die Fremd-DNA in das VvI4L-Gen integriert haben (Multiplexreaktion)

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

Reagenzien	Endkonz.	µl für einen Ansatz
Primer VvTK-F [12 µM]	200 nM	0,42
Primer VvTK-R [9 µM]	70 nM	0,19
Sonde VvTK-FAM [10 µM]	200 nM	0,5
Primer VvIL4-F [10 µM]	500 nM	1,25
Primer VvIL4-R [12 µM]	500 nM	1,04
Sonde VvIL4-VIC [10 µM]	150 nM	0,38
steriles deion. Wasser	-	3,72
TaqMan Universal PCR Master Mix (2x)	1x	12,5

4.3 Herstellung des Mastermixes für den Nachweis von Vacciniaviren mittels Detektion des VvTK-Gens (Einzelreaktion)

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

Reagenzien	Endkonz.	µl für einen Ansatz
Primer VvTK-F [12 µM]	600 nM	1,25
Primer VvTK-R [9 µM]	200 nM	0,56
Sonde VvTK-FAM [10 µM]	200 nM	0,5
steriles deion. Wasser	-	5,19
TaqMan Universal PCR Master Mix (2x)	1x	12,5

4.4 Herstellung des Mastermixes für den Nachweis von Vaccinia viren mittels Detektion des VvI4L-Gens (Einzelreaktion)

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

- **Mastermix:**

Reagenzien	Endkonz.	µl für einen Ansatz
Primer VvIL4-F [10 µM]	500 nM	1,25
Primer VvIL4-R [12 µM]	500 nM	1,04
Sonde VvIL4-VIC [10 µM]	150 nM	0,38
steriles deion. Wasser	-	4,83
TaqMan Universal PCR Master Mix (2x)	1x	12,5

- 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.
- 20µl Mastermix in sterile Tubes (z.B. Microamp[®] Optical/96-well Reaction Plate) vorgeben.
- Jeweils 5µl der zu untersuchenden DNA-Lösungen zupipettieren.
- Mit Deckel (z.B. Microamp[®] Optical caps, 8caps/strip) verschließen und gut mit dem „Cap Installing Tool“ andrücken.
- PCR-Platte (z.B. Microamp[®] Optical/96-well Reaction Plate) 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 (z.B. am ABI Prism[®] Sequence Detection System 7700 für *Multiplex PCR Reaktionen* („Instrument“ - „Diagnostics“ - „Advanced Options“ - Checkbox: „Use Spectral Compensation for Real Time“ aktivieren, danach Programm beenden und nochmals starten)
- Eingabe des Reaktions -Volumens „25 µl“
- Eingabe der Anzahl Zyklen „45“
- Standort und probenspezifische Angaben der Referenz-, Kontroll-, und Untersuchungsproben in den Eingabevorlagen für die Fluoreszenzmarker FAM und VIC 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 Vacciniavirus-DNA wird durch den Ct-Wert des jeweiligen Referenzgens 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 Vacciniavirus-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 Kopienzahl der Vacciniavirus-Genome. 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

Im Jahr 2002 wurde diese Methode durch den Unterausschuss „Methodenentwicklung“ des LAG in einem Ringversuch validiert, an dem insgesamt 6 bundesdeutsche und ein Schweizer Überwachungslabor teilnahmen.

Alle 7 Laboratorien wendeten die vorliegende Methode „**mit Erfolg**“ an.

Jeder Teilnehmer sollte in fünf codierten Proben mit verschiedenen Kopienzahlen von Genomen rekombinanter und Wildtyp-Vacciniaviren eine entsprechende Quantifizierung der viralen DNA vornehmen. Die Quantifizierung der viralen DNA sowie die Differenzierung in Wildtyp : gentechnisch verändert wurde von allen beteiligten Laboren erfolgreich durchgeführt.

Diese Methode beruht auf einer Standard-Arbeitsanweisung (SOP) des kantonalen Laboratoriums Basel- Stadt (SOP P222), deren Entwicklung finanziell durch das Schweizer Bundesamt für Umwelt, Wald und Landschaften (BUWAL) unterstützt wurde.

8. Literatur

1. **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
2. **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
3. **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