

Methodensammlung der Bund/Länder-Arbeitsgemeinschaft Gentechnik	
Extraktion von Virus-RNA	AM023
Erstellt vom Unterausschuss Methodenentwicklung der LAG, April 2009	
Status: verabschiedet	

1. Zweck und Anwendungsbereich

Diese für lentivirale (HIV1) Vektoren erfolgreich getestete Methode dient zur Extraktion von Virus-RNA aus Flüssigkeiten, beispielsweise aus Wischproben (s. Methode "Abwischen von Viren von Laboroberflächen" der Methodensammlung der LAG). Die extrahierte RNA ist nach diesem Prozess direkt für RT-PCR (Reverse Transkriptase-Polymerase Kettenreaktion) Anwendungen verwendbar. Der nicht DNase-behandelte Teil des Extraktes kann zur Bestimmung von DNA-Kontaminationen verwendet werden.

2. Kurzbeschreibung

Nach einer Denaturierung der viralen Partikel wird die freigewordene RNA während eines Zentrifugationsschrittes an eine Silikagelmembran einer „Spinsäule“ gebunden (Festphasenextraktion). Die gebundene RNA 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, nur mit geringsten Mengen an Viren zu rechnen ist, wird dem Lysis-Puffer eine sogenannte „Carrier“-RNA beigemischt (gemäß Anleitung des Herstellers: 10 µg/ml Endkonzentration), um die RNA-Extraktionsverluste durch unspezifische Bindungen am Plastikmaterial zu verringern. Der RNA-Extrakt kann durch DNA verunreinigt sein. Ein Aliquot des Eluates aus der ersten Extraktion jeder Probe wird daher mit RNase-freier DNase verdaut und nochmals mittels Festphasenextraktion gereinigt. Der nicht DNase-behandelte Rest wird zur Untersuchung von DNA-Rückständen verwendet.

3. Material

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

3.1 Geräte und Verbrauchsmaterial

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

- Mikrozentrifuge
- Vortex-Mischgerät
- Thermomixer mit Block für 1,5 ml Reaktionsgefäße
- Sterile Werkbank
- diverse Kolbenhubpipetten
- Handschuhe Nitril oder (Latex, puderfrei)
- Plastikverbrauchsmaterial
 - aerosolgeschützte Pipettenspitzen (diverse)
 - diverse Reaktionsgefäße (z.B. Mikroliterreaktionsgefäße)

3.2. Reagenzien

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

- **QIAamp® Viral RNA Mini Kit** (QIAGEN, Art. Nr. 52904)*
- **RNase-Free DNase Set** (QIAGEN, Art. Nr. 79254)*
- Ethanol reinst
- RNase freies Wasser (z.B. QIAGEN, Art. Nr. 0011018017)

4. Durchführung

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

4.1 Festphasenextraktion von RNA

- Proben auf Raumtemperatur bringen
- Vorbereitung der im Kit mitgelieferten Puffer beachten
- Extraktion der RNA gemäß "Spin Protocol"-Anleitung des Herstellers
- RNA-Extrakte bei -20°C oder -80°C aufbewahren

4.2 Verdau der RNA-Extrakte mit RNase-freier DNase

- 20 µl jedes RNA-Extraktes in je ein 200 µl Reaktionsgefäß geben (Einzelreaktionsgefäß oder Titerplatte)
- Zu jedem RNA-Extrakt werden folgende Reagenzien hinzupipettiert.
(Diese Reagenzien können für eine entsprechende Anzahl Proben vorgemischt und als Gemisch zugefügt werden!):

RDD Buffer (RNase-Free DNase Set)	2 µl
DNase I (RNase-Free DNase Set)	0.5 µl
H ₂ O RNase-frei (RNase-Free DNase Set)	2.5 µl

- Das Reaktionsgemisch wird durch Auf- und Abpipettieren gut gemischt.
- Auf einem Thermocycler Gerät wird folgendes Temperatur-Programm durchgeführt:

10 min. / 25°C	DNase-Verdau
15 min. / 70°C	Inaktivierung der DNase
∞ / 4°C	

- Die 25 µl dieses Reaktionsgemisches werden mit 115 µl RNase-freiem Wasser auf 140 µl Totalvolumen ergänzt.
- Aus diesem Gemisch wird die RNA mit dem QIAamp Viral RNA Mini Kit nach vorliegender SOP (s 4.1) nochmals gereinigt.
Das Endvolumen des Eluates beträgt 60 µl.

5. Hinweis zur Qualitätssicherung

In jeder Extraktionsreihe müssen folgende Kontrollen mitgeführt werden:

- eine **Negativkontrolle** zum Feststellen von Kreuzkontaminationen: Anstatt einer Probe werden 140 µl eines nicht kontaminierten Puffers (zum Beispiel PBS) durch das Extraktionsprotokoll geführt.
- eine **Positivkontrolle** zum Überprüfen des Extraktionsverfahrens (z.B. eine schon gemessene Probe, welche *Lentiviren* Partikel enthält).
- Quantifizierte Referenzen für die nachfolgende Analyse. Mindestens 3 Konzentrationen einer titrierten *Lentiviren*probe. Diese Proben werden durch den ganzen Extraktions- und Analyseprozess mitbearbeitet.

Wenn die Kontrollen nicht das erwartete Resultat ergeben, müssen die Resultate dieser Versuchsreihe verworfen und die Untersuchung nach einer Fehleranalyse und der Beseitigung von Fehlerquellen wiederholt werden.

6. Ringversuch

Diese Methode wurde im Jahr 2007 zusammen mit der Methode 'Quantitativer Nachweis von *Lentiviren* (HIV1)-RNA mittels real-time RT-PCR' durch den Unterausschuss "Methodenentwicklung" der LAG in einem Ringversuch validiert, an dem insgesamt 9 Überwachungslabore teilnahmen.

Jedem Teilnehmer wurde zur Durchführung von RNA-Extraktionen ein QIAamp® Viral RNA Mini Kit (Version 12/2007) sowie ein RNase-Free DNase Set zur Verfügung gestellt. Mit diesen Materialien waren für 2 x 5 codierte Doppelblindproben mit verschiedenen Kopienzahlen an lentiviralen Genomen sowie 5

codierte Negativproben die Nukleinsäureextraktionen durchzuführen. Nach den Extraktionen wurde eine Quantifizierung der kontaminierenden DNA sowie der lentiviralen RNA mittels PCR-Untersuchungen vorgenommen.

Die Auswertung der Ergebnisse des Ringversuchs ist ausführlich im Abschnitt 7 der SOP „Quantitativer Nachweis von Lentiviren (HIV1)-RNA mittels Real-time RT-PCR“ beschrieben. Da das Konzept des Ringversuchs nicht auf die alleinige Validierung der Extraktionsmethode ausgelegt war, umfassen die auf Basis der Ringversuchsergebnisse ermittelten Vergleichstandardabweichungen sowohl den Einfluss des PCR-Verfahrens als auch des Extraktionsverfahrens. Generell hat die statistische Auswertung ergeben, dass die Extraktionsmethode erfolgreich für das anschließende PCR-Verfahren verwendet wurde. Die zufälligen Messabweichungen beim Extraktionsschritt liegen in der gleichen Größenordnung wie beim PCR-Verfahren. Eine detaillierte Bewertung der Ringversuchsergebnisse ist dem Statistikbericht „RV Lentiviren“, der auf Anfrage beim Bundesamt für Verbraucherschutz (BVL) erhältlich ist, zu entnehmen.

7. Anmerkung

Diese Methode beruht auf einer Standard-Arbeitsanweisung (SOP348) des Kantonalen Laboratoriums Basel-Stadt, deren Entwicklung finanziell durch das Schweizer Bundesamt für Umwelt (BAFU) unterstützt wurde. Die Ringversuchsmaterialien wurden vom Bundesamt für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit (BVL) zur Verfügung gestellt, die statistische Auswertung wurde im Auftrag des BVL durchgeführt.

8. Literatur

Handbuch des QIAamp® Viral RNA Mini Kits der Firma QIAGEN

quo data - Gesellschaft für Qualitätsmanagement und Statistik mbH, Dresden. (März 2009)

Ergebnisbericht zur statistischen Auswertung des Ringversuches