

# artus<sup>®</sup> Orthopox LC PCR Kit

## Handbuch



24 (Katalog Nr. 4512003)



96 (Katalog Nr. 4512005)

Nur für Forschungszwecke

Zur Verwendung mit dem *LightCycler*<sup>®</sup> Instrument

Juni 2007 – Version 1



4512003, 4512005



1046937DE

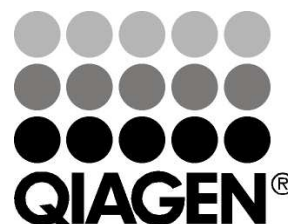


QIAGEN GmbH, QIAGEN Strasse 1, D-40724 Hilden

R1

**MAT**

1046937DE



*artus* Orthopox LC PCR Kit

Marken und Disclaimer

QIAGEN®, QIAamp®, *artus*® (QIAGEN Gruppe); *LightCycler*® (Roche Diagnostics).

Registrierte Namen, Warenzeichen, usw. in diesem Dokument können nicht, auch bei fehlender Kennzeichnung als solche, als gesetzlich ungeschützt betrachtet werden.

Der *artus* Orthopox LC PCR Kit wird nur für Forschungszwecke verkauft. Das Produkt ist nicht dafür vorgesehen, Informationen zu der Diagnose, Vorsorge oder Behandlung einer Krankheit zu liefern.

Die QIAamp Kits sind für den allgemeinen Laborgebrauch. Die Produktangaben oder Produktdarstellungen sind nicht dazu vorgesehen, Informationen für die Diagnose, Prävention oder Behandlung einer Erkrankung zu liefern.

Der Erwerb der *artus* PCR Kits beinhaltet eine limitierte Lizenz für ihre Verwendung zur Durchführung des Polymerasekettenreaktion-Verfahrens (PCR) in der humanen und veterinären In-vitro-Diagnostik in Verbindung mit einem Thermocycler, dessen Einsatz bei der automatisierten Durchführung der PCR durch die up-front Lizenzgebühr abgedeckt ist, die entweder an Applied Biosystems abgeführt wird oder durch den Erwerb eines autorisierten Thermocyclers entrichtet wird. Das PCR Verfahren ist geschützt durch entsprechende nationale Schutzrechte der U.S. Patente der Nummern 5.219.727 und 5.322.770 und 5.210.015 und 5.176.995 und 6.040.166 und 6.197.563 und 5.994.056 und 6.171.785 und 5.487.972 und 5.804.375 und 5.407.800 und 5.310.652 und 5.994.056; Eigentum der F. Hoffmann-La Roche Ltd.

© 2007 QIAGEN, alle Rechte vorbehalten

## Inhaltsverzeichnis

<b>1. Inhalt.....</b>	<b>4</b>
<b>2. Lagerung .....</b>	<b>5</b>
<b>3. Zusätzlich benötigte Materialien und Geräte.....</b>	<b>5</b>
<b>4. Allgemeine Vorsichtsmaßnahmen .....</b>	<b>5</b>
<b>5. Erreger-Informationen.....</b>	<b>6</b>
<b>6. Prinzip der Real-Time PCR.....</b>	<b>6</b>
<b>7. Produktbeschreibung.....</b>	<b>7</b>
<b>8. Protokoll .....</b>	<b>8</b>
8.1 DNA-Isolierung .....	8
8.2 Interne Kontrolle .....	11
8.3 Quantifizierung .....	12
8.4 Vorbereitung der PCR.....	13
8.5 Programmierung des <i>LightCycler</i> <sup>®</sup> Instruments .....	17
<b>9. Auswertung.....</b>	<b>20</b>
<b>10. Troubleshooting .....</b>	<b>24</b>
<b>11. Spezifikationen .....</b>	<b>26</b>
<b>12. Besondere Hinweise zum Produkt-Gebrauch .....</b>	<b>26</b>
<b>13. Sicherheitsinformationen.....</b>	<b>26</b>
<b>14. Qualitätskontrolle .....</b>	<b>27</b>
<b>15. Literatur .....</b>	<b>27</b>
<b>16. Erklärung der Symbole .....</b>	<b>28</b>

## artus<sup>®</sup> Orthopox LC PCR Kit

Für die Verwendung mit dem *LightCycler*<sup>®</sup> Instrument.

**Nur für Forschungszwecke. Das Produkt ist nicht dafür vorgesehen, Informationen zu der Diagnose, Vorsorge oder Behandlung einer Krankheit zu liefern.**

### 1. Inhalt

	Beschriftung und Inhalt	Art. Nr. 4512003 24 Reaktionen	Art. Nr. 4512005 96 Reaktionen
<b>Blau</b>	<i>Orthopox LC Master</i>	2 x 12 rxns	8 x 12 rxns
<b>Gelb</b>	<i>Orthopox LC Mg-Sol<sup>▪</sup></i>	1 x 400 µl	1 x 400 µl
<b>Rot</b>	<i>Orthopox LC QS 1<sup>▪</sup></i> <i>1 x 10<sup>4</sup> cop/µl</i>	1 x 200 µl	1 x 200 µl
<b>Rot</b>	<i>Orthopox LC QS 2<sup>▪</sup></i> <i>1 x 10<sup>3</sup> cop/µl</i>	1 x 200 µl	1 x 200 µl
<b>Rot</b>	<i>Orthopox LC QS 3<sup>▪</sup></i> <i>1 x 10<sup>2</sup> cop/µl</i>	1 x 200 µl	1 x 200 µl
<b>Rot</b>	<i>Orthopox LC QS 4<sup>▪</sup></i> <i>1 x 10<sup>1</sup> cop/µl</i>	1 x 200 µl	1 x 200 µl
<b>Violett</b>	<i>Orthopox LC HA</i> <i>for Primer</i>	1 x 50 µl	1 x 50 µl
<b>Violett</b>	<i>Orthopox LC HA</i> <i>rev Primer</i>	1 x 50 µl	1 x 50 µl
<b>Grün</b>	<i>Orthopox LC IC<sup>▪</sup></i>	1 x 1.000 µl	2 x 1.000 µl
<b>Weiß</b>	<i>Water (PCR grade)</i>	1 x 1.000 µl	1 x 1.000 µl

- <sup>▪</sup> QS = Quantifizierungsstandard  
IC = Interne Kontrolle  
Mg-Sol = Magnesium-Lösung

## 2. Lagerung

Die Komponenten des *artus* Orthopox LC PCR Kits werden bei -20 °C gelagert und sind bis zu dem auf dem Etikett angegebenen Datum haltbar. Wiederholtes Auftauen und Einfrieren (> 2 x) sollte vermieden werden, da dadurch die Sensitivität verringert wird. Bei unregelmäßigem Gebrauch sollten deshalb die Reagenzien aliquotiert werden. Sollte die Notwendigkeit bestehen, die Komponenten bei +4 °C zu lagern, darf ein Zeitraum von fünf Stunden nicht überschritten werden.

## 3. Zusätzlich benötigte Materialien und Geräte

- Puderfreie Laborhandschuhe
- DNA-Isolierungskit (siehe **8.1 DNA-Isolierung**)
- Pipetten (einstellbar)
- Sterile Pipettenspitzen mit Filter
- Vortex-Mixer
- Tischzentrifuge mit Rotor für 2 ml-Reaktionsgefäße
- *Color Compensation Set* (Roche Diagnostics, Kat.-Nr. 2 158 850) zur Erstellung einer *Crosstalk Color Compensation*-Datei
- *LightCycler*<sup>®</sup> Kapillaren (20 µl)
- *LightCycler*<sup>®</sup> Cooling Block
- *LightCycler*<sup>®</sup> Instrument
- *LightCycler*<sup>®</sup> Capping Tool

## 4. Allgemeine Vorsichtsmaßnahmen

Folgendes sollte vom Anwender immer beachtet werden:

- Sterile Pipettenspitzen mit Filter verwenden.
- Positivmaterial (Proben, Kontrollen, Amplifikate) räumlich getrennt von den übrigen Reagenzien lagern, aufreinigen und zur Reaktion zusetzen.
- Alle Komponenten vor Testbeginn vollständig bei Raumtemperatur auftauen.

- Anschließend die Komponenten gründlich durchmischen und kurz zentrifugieren.
- Zügig auf Eis oder im *LightCycler*<sup>®</sup> Cooling Block arbeiten.

## 5. Erreger-Informationen

*Poxviridae* umfassen eine Familie komplexer DNA-Viren, die sich im Zytoplasma von Wirbeltieren oder Wirbellosen vermehren. Die Unterfamilie der *Chordopoxviridae* (Pockenviren von Wirbeltieren) besteht aus acht Gattungen; die medizinisch Bedeutendste ist die Gattung *Orthopoxvirus*. Die Gattung enthält – unter anderem – vier Viren, die Menschen infizieren können: das Pockenvirus, das Kuhpockenvirus, das Windpockenvirus (der Erreger, der zur Impfung gegen Pocken verwendet wird) und das Affenpockenvirus. Pocken werden durch Einatmen von Lufttröpfchen oder Aerosolen übertragen. Zwölf bis vierzehn Tage nach der Infektion bekommt der Patient üblicherweise Fieber und leidet unter schweren Atembeschwerden sowie extremen Erschöpfungserscheinungen. Etwa zwei bis drei Tage später entwickelt sich ein papulöser Ausschlag im Gesicht und breitet sich bis zu den Extremitäten aus. Der Ausschlag wird bald blasen- und später pustelartig. Der Patient fiebert während der Entwicklung des Ausschlags weiter und leidet üblicherweise bei Vergrößerung und Ausbreitung der Pusteln unter beträchtlichen Schmerzen. Schrittweise bildet sich Schorf, der bisweilen abfällt und tiefliegende Narben hinterlässt. Pocken führen bei 40 Prozent aller Patienten zum Tod, der in der Regel im Laufe der zweiten Woche eintritt.

## 6. Prinzip der Real-Time PCR

Bei dem Nachweis mittels Polymerase-Kettenreaktion (PCR) werden spezifische Bereiche aus dem Erregergenom amplifiziert. Die Detektion findet bei der Real-Time PCR mit Hilfe von Fluoreszenzfarbstoffen statt. Diese sind in der Regel an Oligonukleotid-Sonden gekoppelt, die spezifisch an das PCR-Amplifikat binden. Die Detektion der Fluoreszenzintensitäten im Verlauf der Real-Time PCR ermöglicht den Nachweis und die Quantifizierung der

Produkte, ohne die Probenröhrchen nach der PCR wieder öffnen zu müssen (Mackay, 2004).

## 7. Produktbeschreibung

Der *artus* Orthopox LC PCR Kit ist ein gebrauchsfertiges System für den Nachweis von *Orthopoxvirus*-DNA durch die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) und anschließender Schmelzkurve im *LightCycler*<sup>®</sup> Instrument. Der *Orthopox LC Master* beinhaltet Reagenzien und Enzyme für die spezifische Amplifikation eines 110 bp langen Abschnitts des Orthopox-Genoms sowie für die unmittelbare Detektion des Amplifikats im Fluorimeter-Kanal F2/Back-F1 des *LightCycler*<sup>®</sup> Instruments. Daneben enthält der *artus* Orthopox LC PCR Kit zum Nachweis einer möglichen PCR-Inhibition ein zweites heterologes Amplifikationssystem. Dieses wird als *Interne Kontrolle (IC)* im Fluorimeter-Kanal F3/Back-F1 detektiert. Dabei wird die Nachweisgrenze der analytischen Orthopox-PCR nicht herabgesetzt. Zur Unterscheidung des Pockenvirus von allen anderen Spezies der Gattung nutzt das System die spezifische Schmelztemperatur der Sonden, die im Verlauf der Schmelzkurve im Fluorimeter-Kanal F2/Back-F1 ein Signal bei 65°C für die Gattung *Orthopoxvirus*, bei 55°C für das Variola major Virus (ebenso für das Variola minor Virus) erzeugt. In Abhängigkeit unterschiedlicher Extraktionsbedingungen und daraus resultierender Pufferkonditionen kann es zu Schwankungen von 1 - 2°C kommen. Es werden externe Positivkontrollen (*Orthopox LC QS 1 - 4*) mitgeliefert, mit deren Hilfe eine Bestimmung der Erregerlast vorgenommen werden kann. Dazu lesen Sie bitte den Absatz **8.3 Quantifizierung**. Bitte beachten Sie, dass die Reagenzien nur mit Vaccinia-abgeleiteten Positivkontrollen geliefert werden. Der Kit enthält kein spezifisches Variola-Positivkontrollen-Material.

Außerdem enthält das System ein zweites „konventionelles“ Amplifikationssystem (Primer-Set) lokalisiert im Hämagglutinin-Gen (HA) des Virus'. Die Erregeridentität kann dann mit konventionellen Methoden bestätigt werden (Sequenzierung). Für weitere Informationen kontaktieren Sie bitte unseren Technischen Service.

**Wichtig:** Es wird empfohlen, dass eine positive PCR **unbedingt** durch eine weitere Methode bestätigt wird. Für eine solche Bestätigung sollte, je nach Probenmaterial, eine Sequenzierung, eine Elektronen-Mikroskop-Analyse oder ein Antikörpernachweis durchgeführt werden. Die Anerkennung der Ergebnisse sollte erst nach Sequenzierung von zwei zusätzlichen Gen-Segmenten erfolgen.

## 8. Protokoll

### 8.1 DNA-Isolierung

DNA-Isolierungskits werden von verschiedenen Herstellern angeboten. In Abhängigkeit vom Protokoll des gewählten Herstellers setzen Sie die angegebene Probenmenge in die Aufreinigung ein und führen die DNA-Isolierung entsprechend der Vorschrift durch. Folgende Isolierungskits werden empfohlen:

Proben-material	Aufreinigungs-kits	Katalog-nummer	Hersteller	Carrier-RNA
Plasma, Serum	QIAamp UltraSens Virus Kit (50)	53 704	QIAGEN	enthalten
Blut, Wundschorf	QIAamp DNA Mini Kit (50)	51 304	QIAGEN	nicht enthalten

- Der Einsatz von **Carrier-RNA** ist für die Effizienz der Aufreinigung und damit für die DNA-/RNA-Ausbeute von entscheidender Bedeutung. Falls der verwendete Isolierungskits keine Carrier-RNA enthalten sollte, beachten Sie bitte, dass bei der Aufreinigung von Nukleinsäuren aus zellfreien Körperflüssigkeiten bzw. Materialien mit geringem DNA-/RNA-Gehalt (z. B. Liquor) die Zugabe von Carrier-RNA (RNA-Homopolymer Poly(A), Amersham Biosciences, Kat.-Nr. 27-4110-01) dringend empfohlen wird. Bitte gehen Sie dann wie folgt vor:



- a) Resuspendieren Sie hierzu die lyophilisierte Carrier-RNA im Elutionspuffer (nicht im Lysispuffer) des Isolierungskits (z. B. AE-Puffer des QIAamp DNA Mini Kits) und stellen Sie eine Verdünnung mit einer Konzentration von 1 µg/µl her. Portionieren Sie diese Carrier-RNA-Lösung auf eine Ihren Anforderungen entsprechende Anzahl von Aliquots, die bei -20°C gelagert werden müssen. Vermeiden Sie das wiederholte Auftauen (> 2 x) eines Carrier-RNA-Aliquots.
- b) Pro Aufreinigung sollte 1 µg Carrier-RNA pro 100 µl Lysispuffer eingesetzt werden. Sieht das Extraktionsprotokoll beispielsweise 200 µl Lysispuffer pro aufzureinigende Probe vor, dann setzen Sie 2 µl der Carrier-RNA (1 µg/µl) direkt in den Lysispuffer ein. Vor Beginn jeder Aufreinigung muss ein Gemisch aus Lysispuffer und Carrier-RNA (und ggf. *Interner Kontrolle*, siehe **8.2 Interne Kontrolle**) gemäß folgendem Pipettierschema frisch hergestellt werden.

Anzahl der Proben	1	12
Lysispuffer	z. B. 200 µl	z. B. 2.400 µl
Carrier-RNA (1 µg/µl)	2 µl	24 µl
<b>Gesamtvolumen</b>	<b>202 µl</b>	<b>2.424 µl</b>
<b>Volumen für die Aufreinigung</b>	<b>200 µl</b>	<b>je 200 µl</b>

- c) Setzen Sie das frisch hergestellte Gemisch aus Lysispuffer und Carrier-RNA sofort für die Aufreinigung ein. Eine Lagerung des Gemisches ist nicht möglich.
- Der Einsatz von **Carrier-RNA** ist für die Effizienz der Aufreinigung und damit für die DNA-/RNA-Ausbeute von entscheidender Bedeutung. Um eine höhere Stabilität der im QIAamp UltraSens Virus Kit mitgelieferten Carrier-RNA zu erzielen, empfehlen wir folgendes von den Angaben im Handbuch des Isolierungskits abweichendes Vorgehen:
    - Resuspendieren Sie die lyophilisierte Carrier-RNA vor Erstbenutzung des Isolierungskits in 310 µl des im Kit enthaltenen Elutionspuffers (Endkonzentration 1 µg/µl, keinen Lysispuffer verwenden) und portionieren Sie diese Carrier-RNA-Lösung auf eine Ihren Anforderungen entsprechende Anzahl von Aliquots, die bei -20°C

gelagert werden müssen. Vermeiden Sie das wiederholte Auftauen (> 2 x) eines Carrier-RNA-Aliquots.

- b. Vor Beginn jeder Aufreinigung muss ein Gemisch aus Lysispuffer und Carrier-RNA (und ggf. *Interner Kontrolle*, siehe **8.2 Interne Kontrolle**) gemäß folgendem Pipettierschema frisch hergestellt werden.

Anzahl der Proben	1	12
Lysispuffer AC	800 µl	9.600 µl
Carrier-RNA (1 µg/µl)	5,6 µl	67,2 µl
<b>Gesamtvolumen</b>	<b>805,6 µl</b>	<b>9.667,2 µl</b>
<b>Volumen für die Aufreinigung</b>	<b>800 µl</b>	<b>je 800 µl</b>

- c. Setzen Sie das frisch hergestellte Gemisch aus Lysispuffer und Carrier-RNA sofort für die Aufreinigung ein. Eine Lagerung des Gemisches ist nicht möglich.
- Es wird empfohlen, für die Elution der DNA 50 µl Elutionspuffer zu verwenden, um eine maximale Sensitivität des *artus* Orthopox LC PCR Kit zu erlangen.
  - Durch die Benutzung des **QIAamp UltraSens Virus Kits** kann eine Aufkonzentrierung der Probe erzielt werden. Sollte es sich bei Ihrem Probenmaterial nicht um Serum oder Plasma handeln, so geben Sie bitte mindestens 50 % (v/v) negatives Humanplasma zur Probe.
  - Bei Aufreinigungen, die Ethanol-haltige Waschpuffer benutzen, stellen Sie unbedingt sicher, dass vor der Elution ein zusätzlicher Zentrifugationsschritt (drei Minuten, 13.000 Upm) zur Beseitigung von Ethanol-Rückständen durchgeführt wird. Dies verhindert mögliche PCR-Inhibitionen.
  - Der *artus* Orthopox LC PCR Kit ist nicht geeignet für Aufreinigungsverfahren, die auf der Grundlage von **Phenol** arbeiten.

**Wichtig:** Die *Interne Kontrolle* des *artus* Orthopox LC PCR Kits kann direkt in die Aufreinigung eingesetzt werden (siehe **8.2 Interne Kontrolle**).

## 8.2 Interne Kontrolle

Es wird eine *Interne Kontrolle* (*Orthopox LC IC*) mitgeliefert. Mit dieser haben Sie die Möglichkeit, **sowohl die Aufreinigung der DNA als auch eine mögliche Inhibition der PCR** zu kontrollieren (siehe Abb. 1). Für diese Anwendung geben Sie die *Interne Kontrolle* in einem Verhältnis von 0,1 µl pro 1 µl Elutionsvolumen zur Aufreinigung hinzu. Verwenden Sie beispielsweise den QIAamp UltraSens Virus Kit und eluieren die DNA in 50 µl AVE-Puffer, dann setzen Sie bitte 5 µl der *Internen Kontrolle* ein. Die Menge der eingesetzten *Internen Kontrolle* ist **nur** abhängig vom Elutionsvolumen. Die *Interne Kontrolle* und Carrier-RNA (siehe **8.1 DNA-Isolierung**) dürfen nur zugesetzt werden zum

- Gemisch aus Lysispuffer und Probenmaterial oder
- direkt zum Lysispuffer.

Die *Interne Kontrolle* darf nicht direkt zum Probenmaterial gegeben werden. Bei Zugabe zum Lysispuffer ist zu beachten, dass das Gemisch aus *Interner Kontrolle* und Lysispuffer/Carrier-RNA frisch angesetzt werden muss und sofort einzusetzen ist (Lagerung des Gemischs bei Raumtemperatur oder im Kühlschrank kann bereits nach wenigen Stunden zum Ausfall der *Internen Kontrolle* und zu einer Verminderung der Aufreinigungseffizienz führen). Pipettieren Sie die *Interne Kontrolle* und die Carrier-RNA **nicht** direkt zum Probenmaterial.

Optional kann die *Interne Kontrolle* **ausschließlich zur Kontrolle einer möglichen PCR-Inhibition** verwendet werden (siehe Abb. 2). Hierfür geben Sie pro Ansatz 0,5 µl der *Internen Kontrolle* und 2 µl *Orthopox LC Mg-Sol* direkt zu 13 µl *Orthopox LC Master* hinzu. Verwenden Sie für jede PCR-Reaktion 15 µl des so hergestellten Master Mixes\* und fügen Sie anschließend 5 µl der aufgereinigten Probe hinzu. Sollten Sie einen Lauf für mehrere Proben ansetzen, so erhöhen Sie die benötigten Mengen des

---

\* Die durch die Zugabe der *Internen Kontrolle* bedingte Volumenerhöhung wird beim Ansetzen der PCR-Reaktion vernachlässigt. Die Sensitivität des Nachweissystems wird nicht beeinträchtigt.

*Orthopox LC Masters*, der *Orthopox LC Mg-Sol* und der *Internen Kontrolle* entsprechend der Probenzahl (siehe **8.4 Vorbereitung der PCR**).

### 8.3 Quantifizierung

Die mitgelieferten *Quantifizierungsstandards* (*Orthopox LC QS 1 - 4*) werden wie eine bereits aufgereinigte Probe behandelt und im gleichen Volumen eingesetzt (5 µl). Um im *LightCycler*<sup>®</sup> Instrument eine Standardkurve zu erstellen, setzen Sie bitte alle vier mitgelieferten *Quantifizierungsstandards* (*Orthopox LC QS 1 - 4*) ein, definieren Sie diese in dem *Sample Loading Screen* als Standards und geben Sie die angegebenen Konzentrationen ein (siehe *LightCycler Operator's Manual*, Version 3.5, Chapter B, 2.4. Sample Data Entry). Auch für nachfolgende Quantifizierungen kann diese Standardkurve verwendet werden, wenn mindestens ein Standard **einer** definierten Konzentration während des aktuellen Laufs mitgeführt wird. Dafür ist es erforderlich, die zuvor erstellte Standardkurve zu importieren (siehe *LightCycler Operator's Manual*, Version 3.5, Chapter B, 4.2.5. Quantification with an External Standard Curve). Bei dieser Form der Quantifizierung muss jedoch berücksichtigt werden, dass es infolge der Variabilität zwischen den PCR-Läufen zu Abweichungen im Ergebnis kommen kann.

**Beachte:** Die *Quantifizierungsstandards* sind definiert als Kopien/µl. Zur Umrechnung der anhand der Standardkurve ermittelten Werte in Kopien/ml Probenmaterial ist folgende Formel anzuwenden:

$$\text{Ergebnis (Kopien/ml)} = \frac{\text{Ergebnis (Kopien/µl)} \times \text{Elutionsvolumen (µl)}}{\text{Probenvolumen (ml)}}$$

Bitte beachten Sie, dass grundsätzlich das ursprüngliche Probenvolumen in die o. g. Formel einzusetzen ist. Das ist zu berücksichtigen, wenn das Probenvolumen vor der Nukleinsäure-Aufreinigung verändert worden ist (z. B. Einengung durch Zentrifugation oder Erhöhung durch Auffüllen auf das für die Aufreinigung geforderte Volumen).

**Wichtig:** Zur Vereinfachung der quantitativen Auswertung von *artus*-Systemen am *LightCycler*<sup>®</sup> Instrument gibt es unter

[www.qiagen.com/Products/ByLabFocus/MDX](http://www.qiagen.com/Products/ByLabFocus/MDX) einen Leitfaden (**Technical Note zur Quantifizierung am *LightCycler*<sup>®</sup> 1.1/1.2/1.5 bzw. *LightCycler*<sup>®</sup> 2.0 Instrument**).

## 8.4 Vorbereitung der PCR

Stellen Sie sicher, dass der Cooling Block mit den darin enthaltenen Adaptern (Zubehör des *LightCycler*<sup>®</sup> Instruments) auf +4 °C vorgekühlt ist. Setzen Sie die für die geplanten Reaktionen erforderliche Anzahl *LightCycler*<sup>®</sup> Kapillaren in die Adapter des Cooling Blocks. Beachten Sie dabei, dass pro PCR-Lauf mindestens ein *Quantifizierungsstandard* (*Orthopox LC QS 1 - 4*) sowie eine Negativkontrolle (*Water, PCR grade*) mitgeführt werden. Zur Erstellung einer Standardkurve nutzen Sie pro PCR-Lauf bitte alle mitgelieferten *Quantifizierungsstandards* (*Orthopox LC QS 1 - 4*). Alle Reagenzien sollten vor Testbeginn vollständig bei Raumtemperatur aufgetaut, gut durchmischt (mehrfaches Auf- und Abpipettieren oder kurzes Vortexen) und anschließend anzentrifugiert werden.

Wollen Sie mit der *Internen Kontrolle* **sowohl die Aufreinigung der DNA als auch eine mögliche Inhibition der PCR** kontrollieren, so muss zuvor die *Interne Kontrolle* zur Aufreinigung zugegeben werden (siehe **8.2 Interne Kontrolle**). Verwenden Sie in diesem Fall folgendes Pipettierschema (siehe auch schematische Übersicht in Abb. 1):

Anzahl der Proben		1	12
1. Ansetzen des Master Mixes	<i>Orthopox LC Master</i>	13 µl	156 µl
	<i>Orthopox LC Mg-Sol</i>	2 µl	24 µl
	<i>Orthopox LC IC</i>	0 µl	0 µl
	<b>Gesamtvolumen</b>	<b>15 µl</b>	<b>180 µl</b>
2. Ansetzen der PCR-Reaktion	Master Mix	15 µl	je 15 µl
	Probe	5 µl	je 5 µl
	<b>Gesamtvolumen</b>	<b>20 µl</b>	<b>je 20 µl</b>

Wollen Sie die *Interne Kontrolle* **ausschließlich zur Kontrolle einer PCR-Inhibition** einsetzen, so muss sie direkt zum *Orthopox LC Master* zugesetzt

werden. In diesem Fall verwenden sie folgendes Pipettierschema (siehe auch schematische Übersicht in Abb. 2):

	Anzahl der Proben	1	12
<b>1. Ansetzen des Master Mixes</b>	<i>Orthopox LC Master</i>	13 µl	156 µl
	<i>Orthopox LC Mg-Sol</i>	2 µl	24 µl
	<i>Orthopox LC IC</i>	0,5 µl	6 µl
	<b>Gesamtvolumen</b>	<b>15,5 µl*</b>	<b>186 µl*</b>
<b>2. Ansetzen der PCR-Reaktion</b>	Master Mix	15 µl*	je 15 µl*
	Probe	5 µl	je 5 µl
	<b>Gesamtvolumen</b>	<b>20 µl</b>	<b>je 20 µl</b>

Pipettieren Sie in das Plastikreservoir jeder Kapillare 15 µl des Master Mixes. Anschließend geben Sie 5 µl des Eluats aus der DNA-Isolierung hinzu. Entsprechend müssen als Positivkontrolle 5 µl von mindestens einem der *Quantifizierungsstandards* (*Orthopox LC QS 1 - 4*) und als Negativkontrolle 5 µl Wasser (*Water, PCR grade*) eingesetzt werden. Verschließen Sie die Kapillaren. Um den Ansatz aus dem Plastikreservoir in die Kapillare zu überführen, zentrifugieren Sie die Adapter mit den darin enthaltenen Kapillaren in einer Tischzentrifuge für zehn Sekunden bei maximal 400 x g (2.000 Upm).

---

\* Die durch die Zugabe der *Internen Kontrolle* bedingte Volumenerhöhung wird beim Ansetzen der PCR-Reaktion vernachlässigt. Die Sensitivität des Nachweissystems wird nicht beeinträchtigt.

### Zugabe der *Internen Kontrolle* zur Aufreinigung

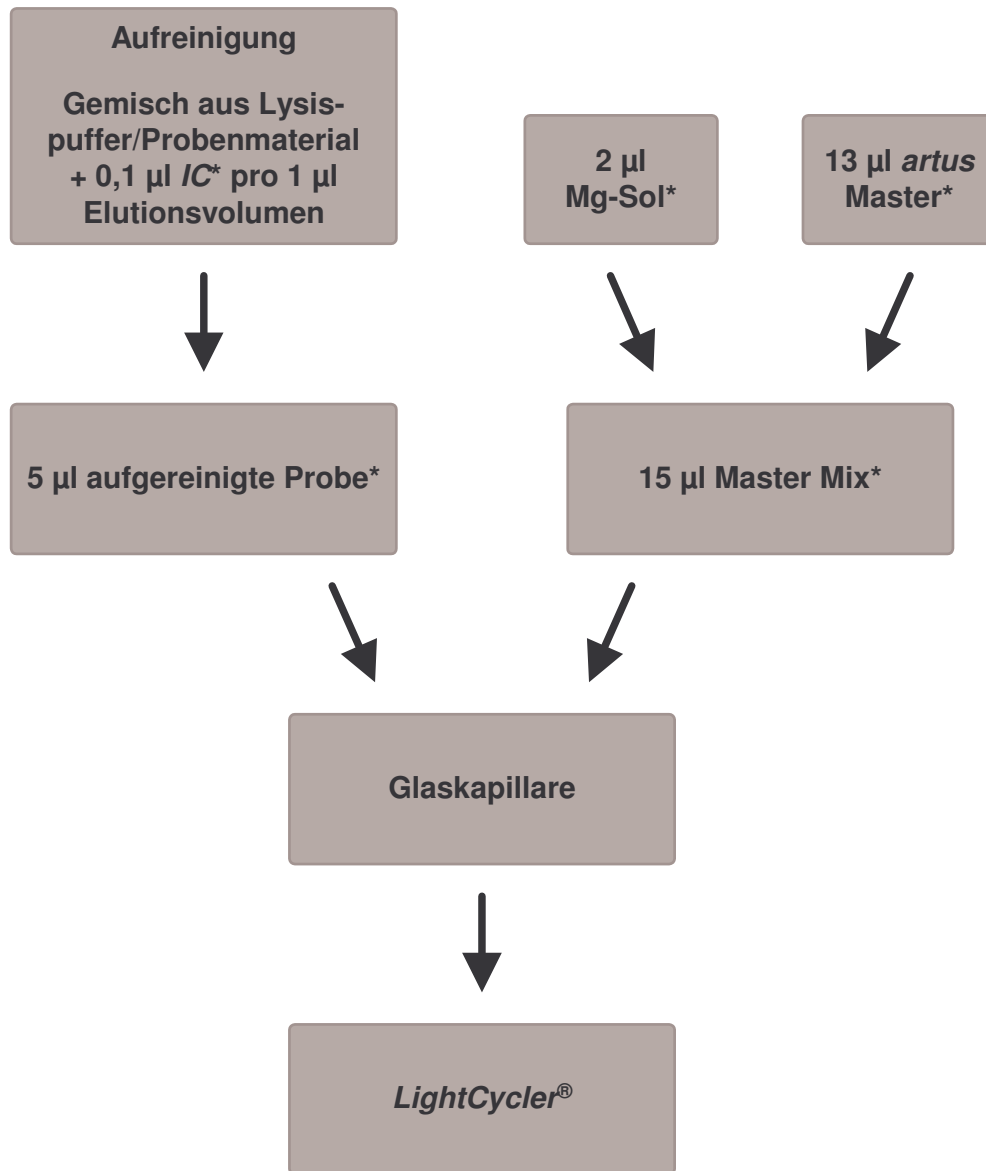


Abb. 1: Schematischer Arbeitsablauf zur Kontrolle von Aufreinigung und PCR-Inhibition.

\* Bei jedem Pipettierschritt ist unbedingt darauf zu achten, dass die zu verwendenden Lösungen vollständig aufgetaut, gut durchmischt und kurz zentrifugiert sind.

## Zugabe der *Internen Kontrolle* zum *artus* Master

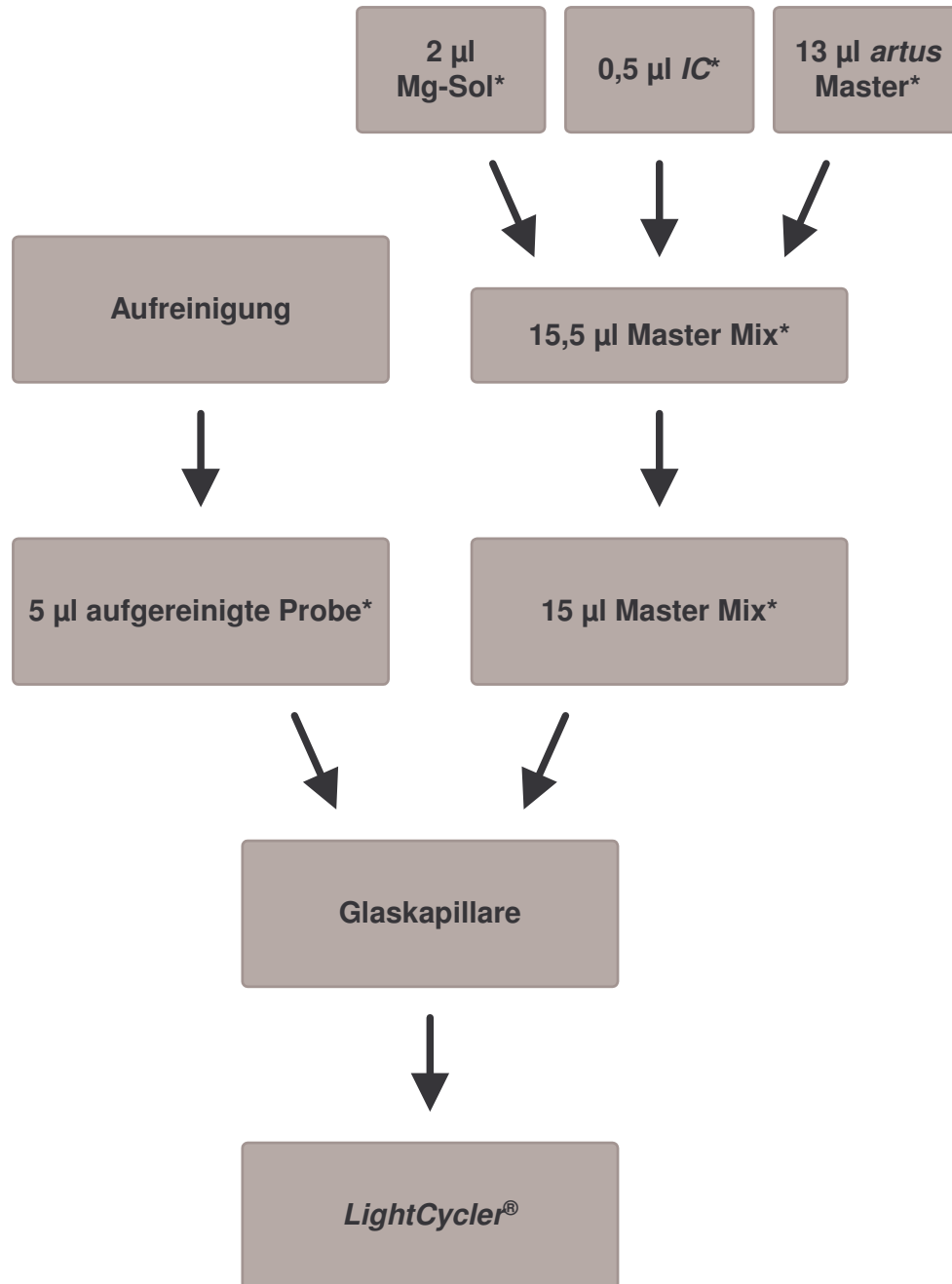


Abb. 2: Schematischer Arbeitsablauf zur Kontrolle der PCR-Inhibition.

\* Bei jedem Pipettierschritt ist unbedingt darauf zu achten, dass die zu verwendenden Lösungen vollständig aufgetaut, gut durchmischt und kurz zentrifugiert sind.



## 8.5 Programmierung des *LightCycler*<sup>®</sup> Instruments

Zur Detektion der *Orthopoxvirus*-DNA erstellen Sie auf Ihrem *LightCycler*<sup>®</sup> Instrument ein Temperaturprofil gemäß den folgenden vier Arbeitsschritten (siehe Abb. 3 - 6).

- |    |   |        |
|----|---|--------|
| A. | Initiale Aktivierung des Hot Start-Enzyms | Abb. 3 |
| B. | Amplifikation der DNA                     | Abb. 4 |
| C. | Schmelzkurve                              | Abb. 5 |
| D. | Kühlung                                   | Abb. 6 |

Beachten Sie insbesondere die Einstellungen für *Analysis Mode*, *Cycle Program Data* und *Temperature Targets*. In den Abbildungen sind diese Einstellungen durch schwarze Rahmen hervorgehoben. Hinweise zur Programmierung des *LightCycler*<sup>®</sup> Instruments finden Sie im *LightCycler Operator's Manual*.

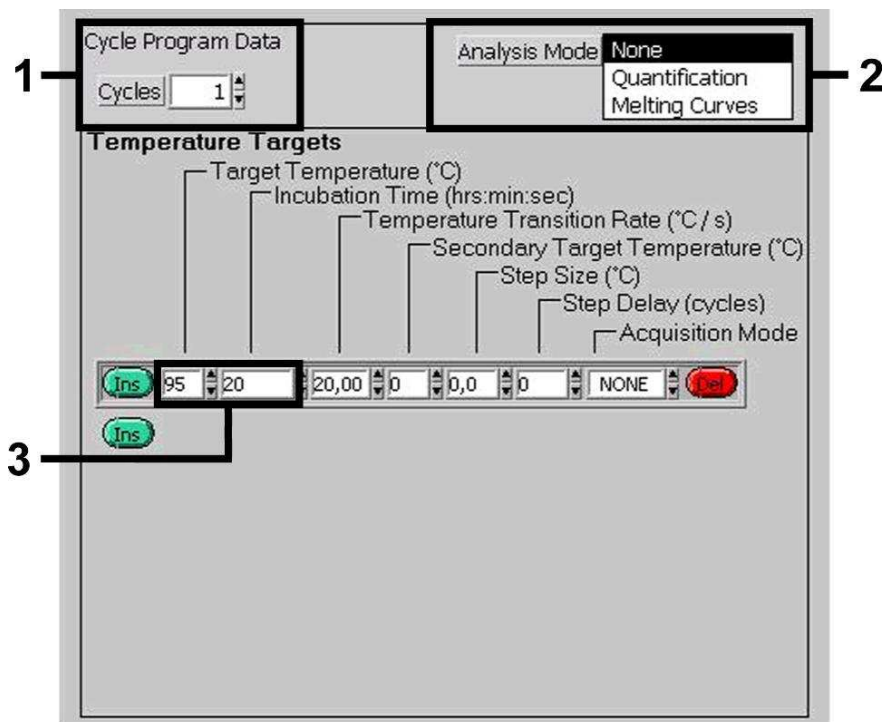


Abb. 3: Initiale Aktivierung des Hot Start-Enzyms.

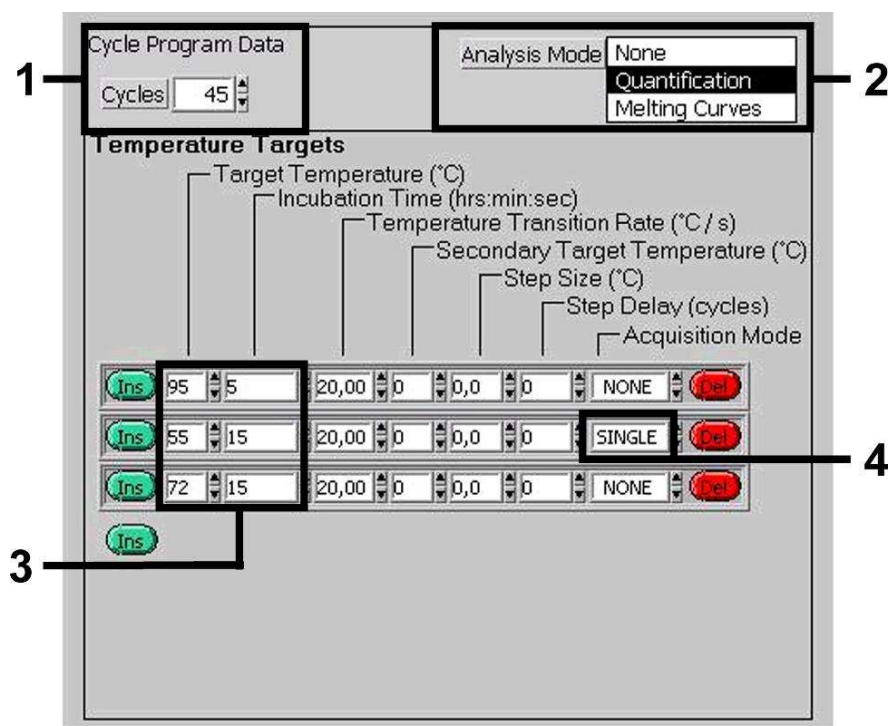


Abb. 4: Amplifikation der DNA.

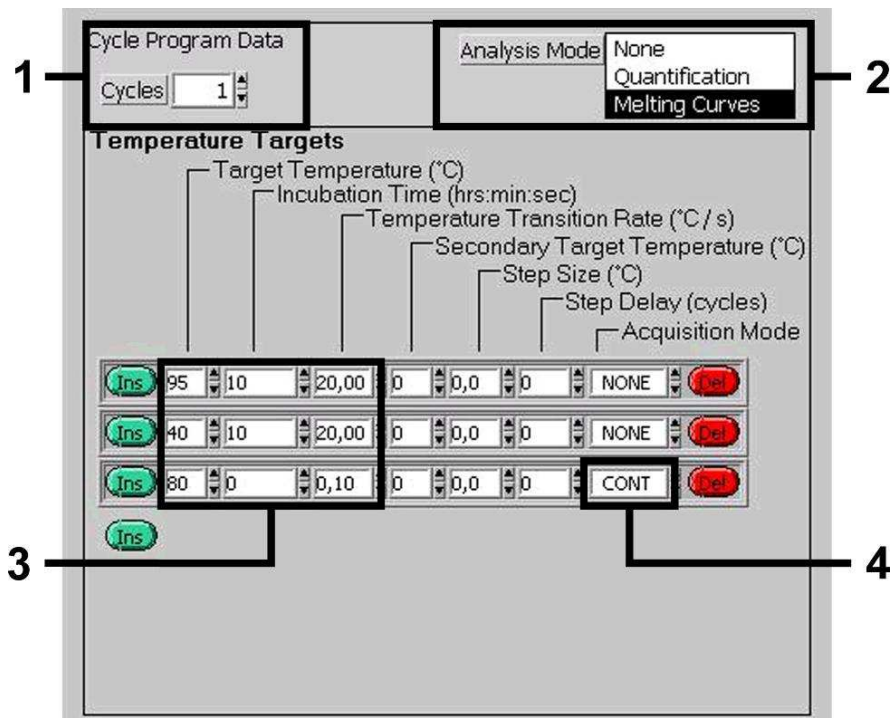


Abb. 5: Schmelzkurve.

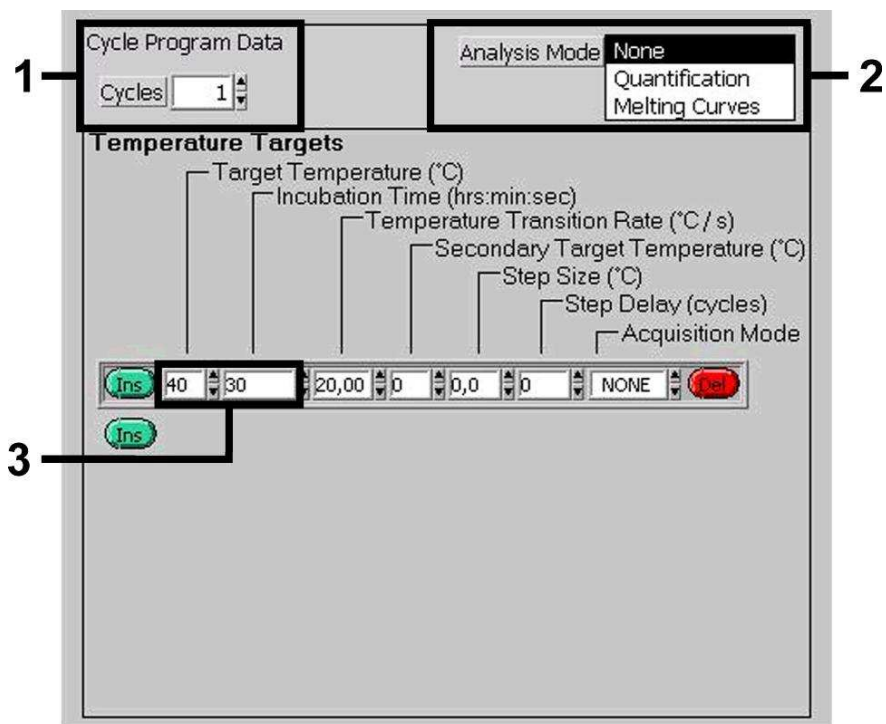


Abb. 6: Kühlung.

## 9. Auswertung

Bei Multicolor-Analysen treten Interferenzen zwischen den Fluorimeter-Kanälen auf. Die Software des *LightCycler*<sup>®</sup> Instruments enthält eine als *Color Compensation File* bezeichnete Datei, welche diese Einstrahlungen kompensiert. Diese Datei öffnen Sie vor, während oder im Anschluss des PCR-Laufs durch Aktivierung der Schaltfläche *Choose CCC File* bzw. *Select CC Data*. Sollte kein *Color Compensation File* installiert sein, erstellen Sie die Datei bitte unter Beachtung der Anleitung im *LightCycler Operator's Manual*. Nach Aktivierung des *Color Compensation File* erscheinen in den Fluorimeter-Kanälen F1, F2 und F3 getrennte Signale. Zur Analyse der PCR-Ergebnisse, die mit dem *artus Orthopox LC PCR Kit* gewonnen werden, wählen Sie bitte die Ansichtsfunktionen F2/Back-F1 für die analytische Orthopox-PCR bzw. F3/Back-F1 für die PCR der *Internen Kontrolle*. Für die Analyse quantitativer Läufe beachten Sie bitte unbedingt den Abschnitt **8.3 Quantifizierung** sowie die **Technical Note zur Quantifizierung am *LightCycler*<sup>®</sup> 1.1/1.2/1.5 bzw. *LightCycler*<sup>®</sup> 2.0 Instrument** unter [www.qiagen.com/Products/ByLabFocus/MDX](http://www.qiagen.com/Products/ByLabFocus/MDX).

Folgende Ergebnisse können auftreten:

1. Im Fluorimeter-Kanal F2/Back-F1 wird ein Signal detektiert.

**Das Ergebnis der Analyse ist positiv: Die Probe enthält *Orthopoxvirus*-DNA.**

In diesem Fall ist die Detektion eines Signals im Kanal F3/Back-F1 unwesentlich, da hohe Ausgangskonzentrationen an *Orthopoxvirus*-DNA (positives Signal im Kanal F2/Back-F1) zu einem reduzierten bis ausbleibenden Fluoreszenz-Signal der *Internen Kontrolle* im Kanal F3/Back-F1 führen können (Kompetition).

**Wichtig:** Es wird empfohlen, dass eine positive PCR **unbedingt** durch eine weitere Methode bestätigt wird. Für eine solche Bestätigung sollte, je nach Probenmaterial, eine Sequenzierung, eine Elektronen-Mikroskop-Analyse oder ein Antikörpernachweis durchgeführt werden. Die Anerkennung der Ergebnisse sollte erst nach Sequenzierung von zwei zusätzlichen Gen-Segmenten erfolgen.

Die Differenzierung kann anhand des Schmelzpunktes (Kanal F2/Back-F1, Programm *Melting Curve*) für das Orthopoxviren-Amplikon bei 65°C, für das Variola-Virus-Amplikon bei 55°C durchgeführt werden. In Abhängigkeit unterschiedlicher Extraktionsbedingungen und daraus resultierender Pufferkonditionen kann es zu Schwankungen von 1 - 2°C kommen, die sich dann aber gleichermaßen auf das Orthopoxviren- und das Variola-Virus-Amplikon beziehen.

2. Im Fluorimeter-Kanal F2/Back-F1 wird kein Signal detektiert, sondern nur im Kanal F3/Back-F1 (Signal der *Internen Kontrolle*).

**In der Probe ist keine *Orthopoxvirus*-DNA nachweisbar. Sie kann daher als negativ angesehen werden.**

Bei negativer *Orthopoxvirus*-PCR schließt das detektierte Signal der *Internen Kontrolle* die Möglichkeit einer PCR-Inhibition aus.

3. Weder im Kanal F2/Back-F1 noch im Kanal F3/Back-F1 wird ein Signal detektiert.

**Eine Aussage ist nicht möglich.**

Hinweise zu Fehlerquellen und deren Beseitigung sind unter **10. Troubleshooting** aufgeführt.

Beispiele für positive und negative PCR-Reaktionen sind in Abb. 7, 8 und 9 wiedergegeben.

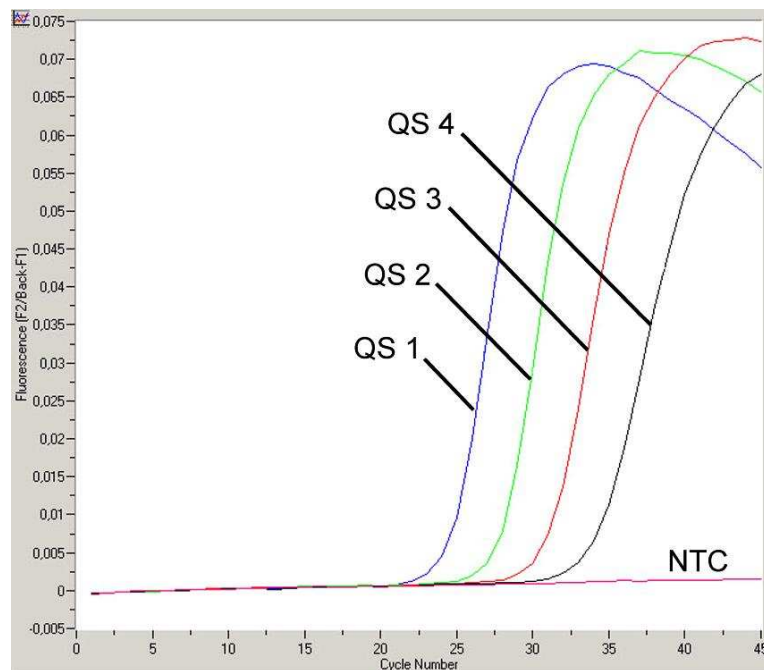


Abb. 7: Nachweis der *Quantifizierungsstandards* (Orthopox LC QS 1 - 4) im Fluorimeter-Kanal F2/Back-F1. NTC: non-template control (Negativkontrolle).

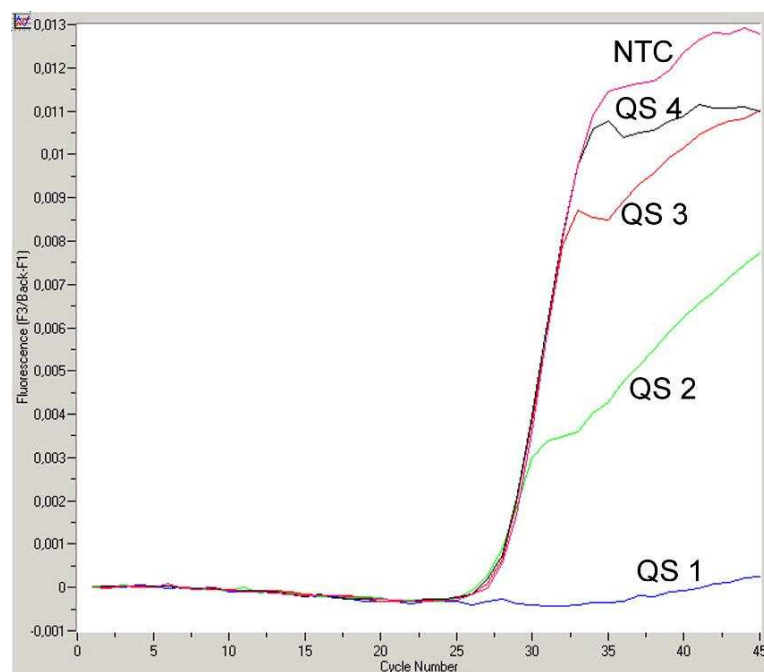


Abb. 8: Nachweis der *Internen Kontrolle* (IC) im Fluorimeter-Kanal F3/Back-F1 bei gleichzeitiger Amplifikation der *Quantifizierungsstandards* (Orthopox LC QS 1 - 4). NTC: non-template control (Negativkontrolle).

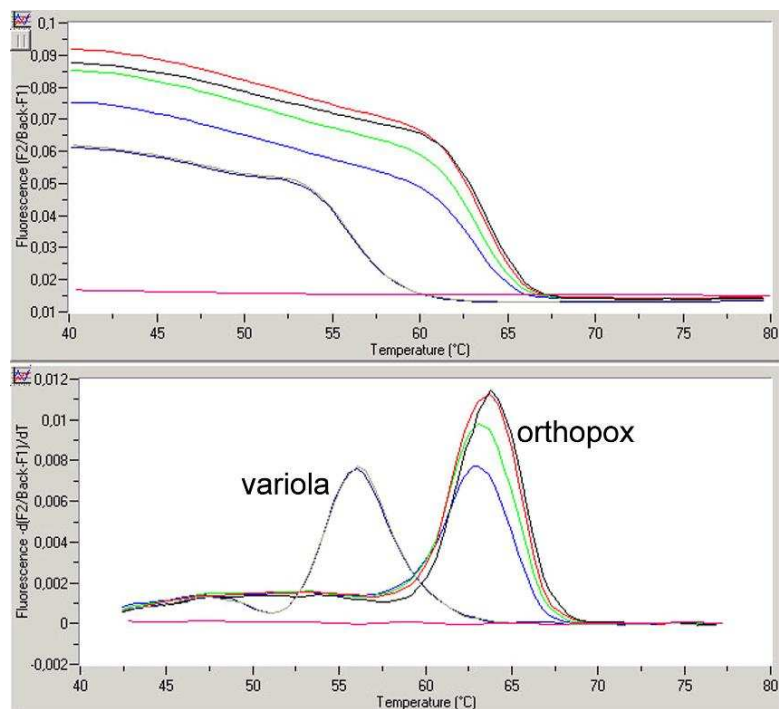


Abb. 9: Differenzierung zwischen der Gruppe der Orthopoxviren und den Variola-Spezies im Fluorimeter-Kanal F2/Back-F1 (Programm *Melting Curve*).

## 10. Troubleshooting

### Kein Signal bei den Positivkontrollen (*Orthopox LC QS 1 - 4*) im Fluorimeter-Kanal F2/Back-F1:

- Die Wahl des Fluorimeter-Kanals bei der PCR-Datenanalyse entspricht nicht den Protokollangaben.
  - Wählen Sie für die Datenanalyse den Fluorimeter-Kanal F2/Back-F1 für die analytische Orthopox-PCR und den Fluorimeter-Kanal F3/Back-F1 für die PCR der *Internen Kontrolle*.
- Die Programmierung des Temperaturprofils des *LightCycler*® Instruments ist fehlerhaft.
  - Vergleichen Sie das Temperaturprofil mit den Protokollangaben (siehe **8.5 Programmierung des *LightCycler*® Instruments**).
- Fehlerhaftes Zusammenstellen der PCR-Reaktion.
  - Überprüfen Sie Ihre Arbeitsschritte mit Hilfe des Pipettierschemas (siehe **8.4 Vorbereitung der PCR**) und wiederholen Sie ggf. die PCR.
- Die Lagerungsbedingungen für eine oder mehrere Kit-Komponenten entsprachen nicht den in **2. Lagerung** angeführten Vorschriften oder das Haltbarkeitsdatum des *artus* Orthopox LC PCR Kits wurde überschritten.
  - Bitte überprüfen Sie sowohl Lagerungsbedingungen als auch Haltbarkeitsdatum (siehe Kit-Etikett) der Reagenzien und verwenden Sie ggf. einen neuen Kit.

### Schwaches oder ausbleibendes Signal der *Internen Kontrolle* im Fluorimeter-Kanal F3/Back-F1 bei gleichzeitiger Abwesenheit eines Signals im Kanal F2/Back-F1:

- Die PCR-Bedingungen entsprechen nicht dem Protokoll.
  - Überprüfen Sie die PCR-Bedingungen (siehe oben) und wiederholen Sie ggf. die PCR mit korrigierten Einstellungen.
- Die PCR wurde inhibiert.
  - Stellen Sie sicher, dass Sie ein von uns empfohlenes Aufreinigungsverfahren benutzen (siehe **8.1 DNA-Isolierung**) und halten Sie sich exakt an die Herstellervorschrift.



- Vergewissern Sie sich, dass bei der DNA-Aufreinigung der zusätzliche empfohlene Zentrifugationsschritt zur vollständigen Entfernung von Ethanol-Resten vor der Elution durchgeführt wurde (siehe **8.1 DNA-Isolierung**).
- Es liegen aufreinigungsbedingte DNA-Verluste vor.
  - Sollte die *Interne Kontrolle* zur Aufreinigung zugegeben worden sein, kann ein Ausbleiben des Signals der *Internen Kontrolle* bedeuten, dass aufreinigungsbedingte DNA-Verluste vorliegen. Stellen Sie sicher, dass Sie ein von uns empfohlenes Aufreinigungsverfahren anwenden (siehe **8.1 DNA-Isolierung**) und halten Sie sich an die Herstellervorschrift.
- Die Lagerungsbedingungen für eine oder mehrere Kit-Komponenten entsprachen nicht den in **2. Lagerung** angeführten Vorschriften oder das Haltbarkeitsdatum des *artus Orthopox LC PCR Kits* wurde überschritten.
  - Bitte überprüfen Sie sowohl Lagerungsbedingungen als auch Haltbarkeitsdatum (siehe Kit-Etikett) der Reagenzien und verwenden Sie ggf. einen neuen Kit.

#### **Signale bei den Negativkontrollen im Fluorimeter-Kanal F2/Back-F1 der analytischen PCR.**

- Es liegt eine Kontamination während der Vorbereitung der PCR vor.
  - Wiederholen Sie die PCR mit noch unbenutzten Reagenzien in Replikaten.
  - Verschließen Sie die einzelnen PCR-Gefäße nach Möglichkeit jeweils unmittelbar nach Zugabe der zu untersuchenden Probe.
  - Pipettieren Sie die Positivkontrollen grundsätzlich zuletzt.
  - Stellen Sie sicher, dass Arbeitsflächen und -geräte regelmäßig dekontaminiert werden.
- Es liegt eine aufreinigungsbedingte Kontamination vor.
  - Wiederholen Sie die Aufreinigung und PCR der zu untersuchenden Proben unter Verwendung noch unbenutzter Reagenzien.
  - Stellen Sie sicher, dass Arbeitsflächen und -geräte regelmäßig dekontaminiert werden.

Sollten weitere Fragen oder Probleme auftreten, kontaktieren Sie bitte unseren Technischen Service.

## 11. Spezifikationen

Die Reagenzien wurden in Zusammenarbeit mit führenden Fachleuten der *Orthopoxvirus*-Forschung validiert. Die Ergebnisse wurden publiziert. Es ist möglich, eine Kopie unter [info-hamburg@qiagen.com](mailto:info-hamburg@qiagen.com) anzufordern.

## 12. Besondere Hinweise zum Produkt-Gebrauch

- Der *artus* Orthopox LC PCR Kit wird nur für Forschungszwecke verkauft.
- Der Kit darf nicht für die spezifische klinische Anwendung (Diagnostik, Prognosen oder Therapie) genutzt werden. Es liegt in der Verantwortung des Anwenders, den *artus* Orthopox LC PCR Kit für besondere Nutzen zu validieren.
- Die genaue Einhaltung des Protokolls ist unbedingt erforderlich, um optimale PCR-Ergebnisse zu erreichen.
- Die auf der Verpackung und den Etiketten der einzelnen Komponenten angegebenen Verfallsdaten sind zu beachten. Abgelaufene Reagenzien sind nicht zu benutzen.

## 13. Sicherheitsinformationen

Sicherheitsinformationen zum *artus* Orthopox LC PCR Kit können Sie dem entsprechenden Material Sicherheits-Datenblatt entnehmen (material safety data sheet, MSDS). Dieses finden Sie als kompakte und anwenderfreundliche PDF-Datei unter [www.qiagen.com/support/msds.aspx](http://www.qiagen.com/support/msds.aspx).

## 14. Qualitätskontrolle

In Übereinstimmung mit dem ISO 9001 und ISO 13485-zertifizierten Qualitäts-Management-System von QIAGEN wurde jede Charge des *artus* Orthopox LC PCR Kits gegen vorgegebene Spezifikationen getestet, um eine einheitliche Produktqualität zu gewährleisten.

## 15. Literatur

- (1) Mackay IM. Real-time PCR in the microbiology laboratory. Clin. Microbiol. Infect. 2004; 10 (3): 190 - 212.
- (2) Niedrig M, Schmitz H, Becker S, Günther S, Meulen J, Meyer H, Ellerbrock H, Nitsche A, Gelderblom HR, Drosten Ch. First International Quality Assurance Study on the Rapid Detection of Viral Agents of Bioterrorism. J Clin Microbiol 2004; 42 (4): 1753 - 1755.
- (3) Olson VA, Laue T, Laker MT, Babkin I, Drosten Ch, Shchelkunov SN, Niedrig M, Damon IK, Meyer H. Real-Time PCR System for Detection of Orthopoxviruses and Simultaneous Identification of Smallpox Virus. J Clin Microbiol 2004; 42 (5): 1940 - 1946.

## 16. Erklärung der Symbole



Verwendbar bis



Chargenbezeichnung



Hersteller



Bestellnummer



Materialnummer



Handbuch



Inhalt reicht für <N> Tests



Zulässiger Temperaturbereich

**QS**

*Quantifizierungsstandard*

**IC**

*Interne Kontrolle*

**Mg-Sol**

*Magnesium-Lösung*







**Austria ■ QIAGEN Vertriebs GmbH ■** Löwengasse 47/6 ■ 1030 Wien  
Orders 0800/28-10-10 ■ Fax 0800/28-10-19 ■ Technical 0800/28-10-11

**Canada ■ QIAGEN Inc. ■** 2800 Argentia Road ■ Unit 7 ■ Mississauga ■ Ontario ■ L5N 8L2  
Orders 800-572-9613 ■ Fax 800-713-5951 ■ Technical 800-DNA-PREP (800-362-7737)

**France ■ QIAGEN S.A. ■** 3 avenue du Canada ■ LP 809 ■ 91974 COURTABOEUF CEDEX  
Orders 01-60-920-920 ■ Fax 01-60-920-925 ■ Technical 01-60-920-930

**Germany ■ QIAGEN GmbH ■** QIAGEN Strasse 1 ■ 40724 Hilden  
Orders 02103-29-12000 ■ Fax 02103-29-22000 ■ Technical 02103-29-12400

**Italy ■ QIAGEN S.p.A. ■** Via Grosio, 10/10 ■ 20151 Milano  
Orders 02-33430-411 ■ Fax 02-33430-426 ■ Technical 800-787980

**Japan ■ QIAGEN K.K. ■** Forefront Tower II ■ 13-1, Kachidoki 3 Chome ■ Chuo-ku, Tokyo 104-0054  
Telephone 03-5547-0811 ■ Fax 03-5547-0818 ■ Technical 03-5547-0811

**Switzerland ■ QIAGEN AG ■** Garstligweg 8 ■ 8634 Hombrechtikon  
Orders 055-254-22-11 ■ Fax 055-254-22-13 ■ Technical 055-254-22-12

**USA ■ QIAGEN Inc. ■** 27220 Turnberry Lane ■ Valencia ■ CA 91355  
Orders 800-426-8157 ■ Fax 800-718-2056 ■ Technical 800-DNA-PREP (800-362-7737)

1046937DE



**Sample & Assay Technologies**