

PathoProof™ Mastitis PCR Assay

Deutsche Kurzanleitung

Diese deutsche Kurzanleitung beschreibt die Arbeitsschritte zur DNA-Extraktion und zur Vorbereitung der Real-Time-PCR des PathoProof Mastitis PCR Assay. Die vollständige Beschreibung aller Arbeitsschritte und alle weiteren Informationen finden Sie in der englischsprachigen Bedienungsanleitung des PathoProof Mastitis PCR Assay.

1. DNA-Extraktion

Vorbereitungen

- Die Lösungen Buffer AW1 und Buffer AW2 werden als Konzentrate geliefert. Vor der ersten Verwendung muss die auf den Flaschen jeweils angegebene Menge Ethanol (96–100 %) zugefügt werden.
- Zwei Heizblöcke vorheizen: einen auf 55°C und einen auf 37°C.
- Die Lösung Buffer AE auf Raumtemperatur äquilibrieren lassen.
- Falls sich in der Lösung Buffer AL ein Niederschlag gebildet hat, muss dieser durch Inkubation bei 55°C aufgelöst werden.

Für das F-870S-Kit und das F-870L-Kit finden Sie im Folgenden je eine separate Anleitung.

1.1 DNA-Extraktion mit dem F-870S-Kit

1. Eine frische Mischung herstellen aus je 7 µl Proteinase K und 350 µl Lysis Solution 1 pro Probe.
2. Die Milchproben gründlich auf einem Vortex mischen. In jedes Reaktionsgefäß 350 µl der Mischung aus Lysis Solution 1 und Proteinase K sowie 350 µl Milch geben. Dabei darauf achten, dass keine Milchklümpchen in die Reaktionsgefäße gelangen. Bei jeder DNA-Extraktion zusätzlich zu den Milchproben mindestens eine Negativkontrolle (H₂O) mitführen.
3. Kurz auf dem Vortex mischen und dann für 5 min bei 55°C inkubieren.
4. Für 5 min bei 5 000 x g (~7500 U/min) zentrifugieren.
5. Überstand abpipettieren. Eine Fettschicht auf dem Überstand nach der Zentrifugation ist normal. Das Fett ebenfalls abpipettieren. Fettreste auf dem Pellet sind normal und müssen nicht entfernt werden.
6. Das Pellet in 100 µl Lysis Solution 2 durch Auf- und Abpipettieren resuspendieren.
7. Bei 37°C für 10 min inkubieren.
8. Eine frische Mischung herstellen aus je 20 µl Proteinase K und 200 µl Buffer AL pro Probe. Zu jedem Reaktionsgefäß

220 µl dieser Mischung geben. Für 5–10 s auf einem Vortex mischen.

9. Bei 55°C für 10 min inkubieren. Für einige Sekunden zentrifugieren.
10. 200 µl Ethanol (96–100 %) zugeben und in mehreren kurzen Intervallen für 15 s auf dem Vortex mischen. Nach dem Mischen die Reaktionsgefäße kurz zentrifugieren, um die Tröpfchen von der Innenseite des Deckels mit dem Rest der Flüssigkeit zu vereinigen. Es ist entscheidend, dass die Probe, Buffer AL und das Ethanol gründlich gemischt werden, bis eine homogene Lösung entstanden ist. Keine anderen Alkohole als Ethanol verwenden – dies kann die DNA-Ausbeute verringern.
11. Vorsichtig die Mischung aus Schritt 10 (ohne eventuell vorhandene Klümpchen) auf eine QIAamp® Mini Spin Column (in einem Collection Tube) geben, ohne dabei den oberen Rand zu benetzen. Den Deckel schließen und bei 20 000 x g (~14 000 U/min) für 1 min zentrifugieren. Die QIAamp Mini Spin Column in ein sauberes Collection Tube (im Lieferumfang enthalten) setzen und das benutzte Collection Tube samt Filtrat verwerfen. Den Deckel der Spin Column schließen, um Aerosolbildung zu vermeiden.
12. Vorsichtig die QIAamp Mini Spin Column öffnen und 500 µl Buffer AW1 zugeben, ohne dabei den oberen Rand zu benetzen. Den Deckel schließen und bei 20 000 x g (~14 000 U/min) für 1 min zentrifugieren. Die QIAamp Mini Spin Column in ein sauberes Collection Tube (im Lieferumfang enthalten) setzen und das benutzte Collection Tube samt Filtrat verwerfen.
13. Vorsichtig die QIAamp Mini Spin Column öffnen und 500 µl Buffer AW2 zugeben, ohne dabei den oberen Rand zu benetzen. Den Deckel schließen und bei 20 000 x g (~14 000 U/min) für 3 min zentrifugieren.
14. Die QIAamp Mini Spin Column in ein sauberes 1,5-ml-Mikrozentrifugenröhrchen (nicht im Lieferumfang enthalten) setzen und das benutzte Collection Tube samt Filtrat verwerfen. Vorsichtig die QIAamp Mini Spin Column öffnen und 100 µl Buffer AE zugeben. Für 1 min bei Raumtemperatur inkubieren und anschließend bei 20 000 x g (~14 000 U/min) für 3 min zentrifugieren, um die DNA zu eluieren.
15. Zur Vereinfachung der Vorbereitung der Real-Time-PCR kann die DNA von den 1,5-ml-Röhrchen in PCR-Streifen überführt werden
16. Zur Lagerung der gereinigten DNA empfehlen wir eine Temperatur von -20°C.

1.2 DNA-Extraktion mit dem F-870L-Kit

Zur Zentrifugation der QIAamp-96-Platten werden die QIAGEN-Zentrifugen 4-15C oder 4-16 verwendet, mit einer Zentrifugationsgeschwindigkeit von 6 000 U/min (5 788 x g).

Die Maximalgeschwindigkeit der Zentrifuge wird automatisch so begrenzt, dass die erforderliche Beschleunigung nicht überschritten werden kann.

1. Eine frische Mischung herstellen aus je 7 µl Proteinase K und 350 µl Lysis Solution 1 pro Probe.
2. Die Milchproben gründlich auf einem Vortex mischen. Im Ständer vorgesteckte Collection Microtubes mit je 350 µl der Mischung aus Lysis Solution 1 und Proteinase K sowie mit 350 µl Milch füllen. Dabei darauf achten, dass keine Milchklümpchen in die Reaktionsgefäße gelangen. Bei jeder DNA-Extraktion mindestens eine Negativkontrolle (H₂O) zusätzlich zu den Milchproben mitführen. Die Collection Microtubes mit den mitgelieferten Deckeln verschließen.
3. Kurz auf dem Vortex mischen und dann für 5 min bei 55°C inkubieren.
4. Für 5 min mit 6 000 U/min zentrifugieren.
5. Überstand abpipettieren. Eine Fettschicht auf dem Überstand nach der Zentrifugation ist normal. Das Fett ebenfalls abpipettieren. Fettreste auf dem Pellet sind normal und müssen nicht entfernt werden. Die Collection Microtubes mit neuen Deckeln verschließen.
6. Das Pellet in 100 µl Lysis Solution 2 durch Auf- und Abpipettieren resuspendieren.
7. Bei 37°C für 10 min inkubieren.
8. Eine frische Mischung herstellen aus je 20 µl Proteinase K und 200 µl Buffer AL pro Probe. Je 220 µl der Mischung zu jeder Probe zugeben. Dabei darauf achten, den Rand der Collection Microtubes nicht zu benetzen. Die Collection Microtubes mit neuen Deckeln verschließen.
9. Durch kräftiges Schütteln für 15 s gründlich mischen. Für eine effiziente Lyse ist es entscheidend, dass Proben und Buffer AL gründlich gemischt werden, bis eine homogene Lösung entstanden ist. Die Collection Microtubes im Ständer mit beiden Händen halten und durch Auf- und Abwärtsbewegungen kräftig schütteln.
10. Bei 55°C für 10 min inkubieren. Kurz mit 3 000 U/min zentrifugieren, um an den Deckeln haftende Flüssigkeit mit dem Rest zu vereinigen. Die Zentrifuge stoppen, sobald 3 000 U/min erreicht sind.
11. Je 200 µl Ethanol (96–100 %) zugeben. Die Collection Microtubes mit neuen Deckeln verschließen. Für 15 s kräftig schütteln. Kurz mit 3 000 U/min zentrifugieren, um an den Deckeln haftende Flüssigkeit mit dem Rest zu vereinigen. Die Zentrifuge stoppen, sobald 3 000 U/min erreicht sind.
12. Die QIAamp-96-Platte auf einen S-Block setzen. Die Platte zur späteren Identifizierung kennzeichnen. Vorsichtig die Mischung aus Schritt 11 (ohne eventuell vorhandene Klümpchen) auf die QIAamp-96-Platte geben. Dabei darauf achten, nicht den oberen Rand der Öffnungen zu benetzen, um eine Aerosolbildung während der Zentrifugation zu verhindern.
13. Die QIAamp-96-Platte mit einem Blatt AirPore-Tape verschließen. S-Block und QIAamp-96-Platte in das Gestell setzen und das Gestell dann in den Rotorbecher einsetzen.

Für 4 min mit 6 000 U/min zentrifugieren.

14. Das AirPore-Tape abnehmen. Vorsichtig 500 µl Buffer AW1 in jede Öffnung geben. Die QIAamp-96-Platte mit einem neuen Blatt AirPore-Tape verschließen. Für 4 min mit 6 000 U/min zentrifugieren.
15. Das AirPore-Tape abnehmen. Vorsichtig 500 µl Buffer AW2 in jede Öffnung geben. Die Platte nicht verschließen. Für 15 min mit 6 000 U/min zentrifugieren. Die während der Zentrifugation entstehende Wärme sorgt dafür, dass eventuell noch vorhandenes Ethanol in der Probe (aus Buffer AW2) verdampft und so spätere Reaktionen nicht mehr inhibieren kann.
16. Die QIAamp-96-Platte auf einen Ständer mit vorgesteckten Elution Microtubes setzen (im Lieferumfang enthalten). Vorsichtig 100 µl Buffer AE in jede Öffnung geben, um die DNA zu eluieren. Die QIAamp-96-Platte mit einem neuen Blatt AirPore-Tape verschließen und für 1 min bei Raumtemperatur inkubieren. Für 4 min mit 6 000 U/min zentrifugieren. Die Öffnungen der Elution Microtubes zur Lagerung mit den mitgelieferten Deckeln verschließen.
17. Zur Lagerung der gereinigten DNA empfehlen wir eine Temperatur von -20°C.

2. Vorbereitung der Real-Time-PCR

Wichtige Vorbemerkungen

- Führen Sie für jede der vier PCR-Reaktionen eines Real-Time-PCR-Laufs mindestens eine Negativkontrolle (ohne Template) mit.
- Wenn für keine der Proben ein Bakterienbefall erwartet wird, ist es ratsam, den PathoProof Amplification Standard und/oder eine positive DNA-Extraktionskontrolle (zum Beispiel eine Milchprobe, die bereits zuvor mit dem PathoProof Mastitis PCR Assay positiv getestet wurde) bei jedem Real-Time-PCR-Lauf mitlaufen zu lassen.
- Beachten Sie, dass die Analyseläufe mit demselben Real-Time-PCR-Gerät, demselben Gefäßtyp und derselben Verschlussmethode (Versiegelungsfolien oder Deckel) durchgeführt werden müssen, die für die Kalibrierungsläufe verwendet wurden.

Alle Reagenzien während der gesamten PCR-Vorbereitung auf Eis stellen. Die PathoProof Primer Mixes 1–4 während des Pipettierens mit Aluminiumfolie vor Lichteinstrahlung schützen. Den PathoProof Master Mix und die PathoProof Mixes 1–4 kurz auf dem Vortex mischen und anschließend kurz zentrifugieren, um die Flüssigkeit wieder auf dem Gefäßboden zu vereinigen.

1. Aus PathoProof Master Mix und je einem der vier PathoProof Mixes vier separate PCR-Lösungen in vier Mikrozentrifugenröhrchen vorbereiten. Zur Berechnung der jeweils einzusetzenden Volumina die folgenden Formeln verwenden.

Formeln für < 20 Proben

PCR-Lösung 1:

- Volumen PathoProof Master Mix = $(N + 2) \times 10 \mu\text{l}$
- Volumen PathoProof Primer Mix 1 = $(N + 2) \times 5 \mu\text{l}$

PCR-Lösung 2:

- Volumen PathoProof Master Mix = $(N + 2) \times 10 \mu\text{l}$
- Volumen PathoProof Primer Mix 2 = $(N + 2) \times 5 \mu\text{l}$

PCR-Lösung 3:

- Volumen PathoProof Master Mix = $(N + 2) \times 10 \mu\text{l}$
- Volumen PathoProof Primer Mix 3 = $(N + 2) \times 5 \mu\text{l}$

PCR-Lösung 4:

- Volumen PathoProof Master Mix = $(N + 2) \times 10 \mu\text{l}$
- Volumen PathoProof Primer Mix 4 = $(N + 2) \times 5 \mu\text{l}$

N = Anzahl der Proben

Einschließlich einer oder mehrerer der folgenden Kontrollen:

- PCR-Negativkontrolle (für jeden Lauf erforderlich)
- PathoProof Amplification Standard (Positivkontrolle)
- negative DNA-Extraktionskontrolle
- positive DNA-Extraktionskontrolle

Um Pipettierverluste auszugleichen, ergeben die Formeln etwas mehr Volumen, als theoretisch notwendig ist

Formeln für ≥ 20 Proben

PCR-Lösung 1:

- Volumen PathoProof Master Mix = $N \times 11 \mu\text{l}$
- Volumen PathoProof Primer Mix 1 = $N \times 5.5 \mu\text{l}$

PCR-Lösung 2:

- Volumen PathoProof Master Mix = $N \times 11 \mu\text{l}$
- Volumen PathoProof Primer Mix 2 = $N \times 5.5 \mu\text{l}$

PCR-Lösung 3:

- Volumen PathoProof Master Mix = $N \times 11 \mu\text{l}$
- Volumen PathoProof Primer Mix 3 = $N \times 5.5 \mu\text{l}$

PCR-Lösung 4:

- Volumen PathoProof Master Mix = $N \times 11 \mu\text{l}$
- Volumen PathoProof Primer Mix 4 = $N \times 5.5 \mu\text{l}$

N = Anzahl der Proben

Einschließlich einer oder mehrerer der folgenden Kontrollen:

- PCR-Negativkontrolle (für jeden Lauf erforderlich)
- PathoProof Amplification Standard (Positivkontrolle)
- negative DNA-Extraktionskontrolle
- positive DNA-Extraktionskontrolle

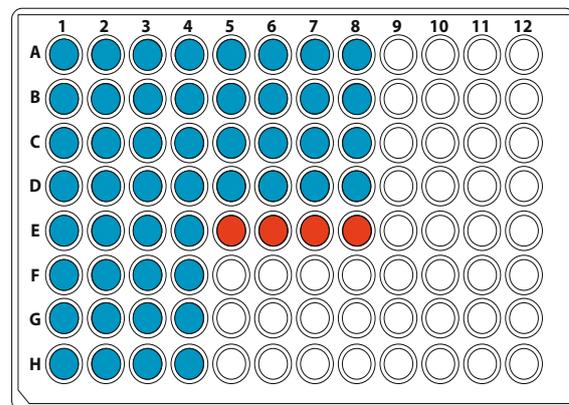
Um Pipettierverluste auszugleichen, ergeben die Formeln etwas mehr Volumen, als theoretisch notwendig ist

- Die PCR-Lösungen kurz auf dem Vortex mischen und anschließend kurz zentrifugieren, um die Flüssigkeit auf dem Gefäßboden zu vereinigen.
- Eine 96-Well-Platte vorbereiten. Je 15 μl der PCR-Lösungen 1–4 in die vier für jede Probe vorgesehenen Wells pipettieren. Beispiel: Für Probe 1 die PCR-Lösungen 1, 2, 3 und 4 in die Wells A1, A2, A3 bzw. A4 pipettieren (Abb. 1). Geben Sie die PCR-Lösung 1 immer in die Spalten 1, 5 und 9 der Platte, PCR-Lösung 2 in Spalten 2, 6 und 10, PCR-Lösung 3 in Spalten 3, 7 und 11, und PCR-Lösung 4 in die Spalten 4, 8 und 12. Diese Reihenfolge muss für die korrekte Datenanalyse eingehalten werden. Falls der PathoProof Amplification Standard* mitgeführt wird, 15 μl der PCR-Lösungen 1–4 in die für den PathoProof Amplification

Standard vorgesehenen Wells geben. Die letzten vier zu füllenden Wells immer für PCR-Negativkontrollen (ohne Template) reservieren (siehe Abb. 1).

- Je 5 μl des Eluats aus dem DNA-Extraktionsprotokoll in die vier Wells für diese Probe geben. Für eine Probe immer vier aufeinanderfolgende Wells einer Reihe verwenden. Beispiel: Wells A1 bis A4 für Probe 1 reservieren. Die Wells der Platte von A nach H befüllen, also erst eine Viererreihe von oben nach unten befüllen, dann die Viererreihe rechts daneben befüllen, dann die letzte Viererreihe befüllen. Falls der PathoProof Amplification Standard* mitgeführt wird, 5 μl des Standards in vier aufeinanderfolgende Wells geben. In die letzten vier zu füllenden Wells, die für die PCR-Negativkontrollen (ohne Template) reserviert sind, nichts zugeben (Abb. 1).
- Die PCR-96-Well-Platte mit einer geeigneten durchsichtigen Versiegelungsfolie oder mit durchsichtigen Deckeln verschließen und die Flüssigkeit durch Zentrifugation mit einer Platten-Zentrifuge (3 000 U/min, 5 s) auf dem Boden der Wells vereinigen.
- Die 96-Well-Platte in ein Real-Time-PCR-Gerät setzen und ein Real-Time-PCR-Programm starten.

* Der PathoProof Amplification Standard enthält DNA von allen 12 mit dem PathoProof Mastitis PCR Assay nachgewiesenen Bakterienspezies bzw. gruppen. Er kann als Positivkontrolle für die Real-Time-PCR verwendet werden. Er wird auch für die Kalibrierung des Computerprogramms Norden Lab Mastitis Studio General Edition verwendet.



- A1 Probe 1, PCR-Lösung 1
- A2 Probe 1, PCR-Lösung 2
- A3 Probe 1, PCR-Lösung 3
- A4 Probe 1, PCR-Lösung 4
- ... usw.
- D5 Probe 12, PCR-Lösung 1
- D6 Probe 12, PCR-Lösung 2
- D7 Probe 12, PCR-Lösung 3
- D8 Probe 12, PCR-Lösung 4
- E5 Negativkontrolle (ohne Template), PCR-Lösung 1
- E6 Negativkontrolle (ohne Template), PCR-Lösung 2
- E7 Negativkontrolle (ohne Template), PCR-Lösung 3
- E8 Negativkontrolle (ohne Template), PCR-Lösung 4

Abb. 1. Schema einer PCR-96-Well-Platte und der für den PathoProof™ Mastitis PCR Assay notwendigen Probenreihenfolge.