

BACTOTYPE® PCR Amplification Kit

Chlamydia sp.



Gebrauchsanweisung

Technologie

Die Produktgruppe BACTOTYPE® PCR Amplification Kit umfasst optimierte Systeme zum Nachweis von pathogenen Bakterien mittels Polymerasekettenreaktion (PCR):

Hohe Sensitivität und Spezifität: Alle Komponenten sind genauestens aufeinander abgestimmt

Einfache und praktikable Anwendung: Die Reagenzien sind inklusive Gel-Beladungspuffer vorpipettiert

Zuverlässige Ergebnisse: Das Testkit enthält eine interne Amplifikationskontrolle

Das Testkit enthält zwei Primerpaare, die zum einen genus-spezifisch für die Gattungen *Chlamydia* und *Chlamydophila* und zum anderen spezies-spezifisches für den Erreger *Chlamydia psittaci* sind. Die PCR-Produkte werden auf einem herkömmlichen Agarosegel ausgewertet. Die ready-to-load Reagenzien erlauben eine direkte Auftragung auf das Gel ohne Zugabe von Gel-Beladungspuffer. Falsch-negative Ergebnisse werden durch eine interne Amplifikationskontrolle minimiert. Der Arbeitsaufwand im Labor reduziert sich damit auf ein Minimum. Mit Ausnahme der Taq DNA Polymerase enthält das Testkit alle benötigten Reagenzien.

Nur für Forschungszwecke geeignet // **Stand 05/2009**

Pathogener Erreger

Chlamydien sind eine heterogene Gruppe von Bakterien, die bei Mensch und Tier ein breites Spektrum an Erkrankungen verursachen können. Basierend auf der Analyse der ribosomalen RNA-Sequenzen wurde 1999 eine neue taxonomische Einteilung in die beiden Genera *Chlamydia* und *Chlamydophila* mit insgesamt neun Spezies vorgeschlagen. Die aviären Isolate von *Chlamydia psittaci* haben ein nachgewiesenes zoonotisches Potential und sind für die Tiermedizin relevant. Bei Vögeln bezeichnet man Chlamydieninfektionen bei Psittaziden als Psittakose (Anzeigepflicht!) und bei Nicht-Psittaziden als Ornithose (Meldepflicht!). Das BACTOTYPE® PCR Amplification Kit *Chlamydia sp.* ersetzt den Nachweis des Erregers durch Immunfluoreszenz nach zeitintensiver Kultur infizierter Zellen und liefert sensitive und spezifische Ergebnisse bereits nach einem Arbeitstag.

Bestellinformation

BACTOTYPE® <i>Chlamydia sp.</i>	10 Reaktionen	Artikelnummer 04-104/10
BACTOTYPE® <i>Chlamydia sp.</i>	50 Reaktionen	Artikelnummer 04-104/50

Inhalt

	10 Reaktionen	50 Reaktionen
PCR Mix I (gelbe Verschlusskappe) PCR Puffer, dNTPs, Primergemisch (<i>Chlamydia</i> - und <i>Chlamydophila</i> -spezifisch sowie Amplifikationskontrolle), DNA für Amplifikationskontrolle, NaN ₃	221 µL	935 µL
Magnesiumchlorid I (grüne Verschlusskappe) MgCl ₂ , Gel-Beladungspuffer	80 µL	300 µL
PCR Mix II (lila Verschlusskappe) PCR Puffer, dNTPs, Primergemisch (<i>Chlamydophila psittaci</i> -spezifisch und Amplifikationskontrolle), DNA für Amplifikationskontrolle, NaN ₃	221 µL	935 µL
Magnesiumchlorid II (schwarze Verschlusskappe) MgCl ₂ , Gel-Beladungspuffer	80 µL	300 µL
Positivkontrolle (rote Verschlusskappe) nicht-infektiöse DNA mit <i>Chlamydia</i> - und <i>Chlamydophila</i> -spezifischen Sequenzen, NaN ₃	25 µL	25 µL
Nuklease-freies Wasser (blaue Verschlusskappe)	1.0 mL	1.0 mL

Lagerung

Die Reagenzien zur Amplifikation sollten im Dunkeln bei -20°C gelagert werden. Bei vorschriftsmäßiger Lagerung ist das Testkit mindestens 12 Monate haltbar. Wiederholtes Auftauen und Einfrieren sollte vermieden werden.

Zusätzlich benötigte Reagenzien

- Taq DNA Polymerase
BACTOTYPE® Testkits werden mit der JumpStart™ Taq DNA Polymerase (Sigma-Aldrich, Art. Nr. D4184) validiert. Nur bei Verwendung dieser Polymerase garantieren wir eine optimale Funktion der BACTOTYPE® Produkte. Für Bestellungen oder weitere Informationen zu der o.g. Taq Polymerase kontaktieren Sie bitte Sigma-Aldrich.
- Agarose und Ethidiumbromid (für Gelelektrophorese)
- 100 bp DNA Leiter (für Gelelektrophorese)

Warenzeichen und Patente

- BACTOTYPE® ist ein eingetragenes Warenzeichen der Biotype AG.
- JumpStart™ ist ein eingetragenes Warenzeichen von Sigma-Aldrich.
- Die PCR ist patentrechtlich geschützt. Patentinhaber sind die Firmen Hoffmann-La Roche Inc. und F. Hoffmann-La Roche (Roche).

Produktgarantie

Der gesamte Inhalt des BACTOTYPE® PCR Amplification Kit wurde einer intensiven Qualitätssicherung durch die Labor Diagnostik Leipzig unterzogen. Bitte melden Sie jedes aufgetretene Problem.

Hinweise

Die Einhaltung dieses Protokolls ist unbedingt erforderlich!

Um Kontaminationen jeglicher Art auszuschließen, empfehlen wir alle Pipettiervorgänge mit gestopften Pipettenspitzen durchzuführen. DNA Probenvorbereitung, Amplifikation und Elektrophorese sollten in getrennten Räumlichkeiten stattfinden. Beachten Sie die Sicherheitsbestimmungen für das Arbeiten in Laboratorien und tragen Sie Handschuhe.

Der PCR Mix und die Positivkontrolle enthalten Natriumazid (NaN₃). Natriumazid ist ein Gefahrstoff: Sehr giftig beim Verschlucken, entwickelt bei Berührung mit Säure sehr giftige Gase (R28-32-50/53, S1/2- 28-45-60-61). Ebenso ist Ethidiumbromid ein Gefahrstoff. Bitte lesen Sie das entsprechende Sicherheitsdatenblatt und tragen Sie Nitrilhandschuhe.

Für BACTOTYPE® Komponenten sind die Sicherheitsdatenblätter bei der Labor Diagnostik Leipzig erhältlich. Für Sicherheitsdatenblätter von Reagenzien, die nicht im Testkit enthalten sind, kontaktieren Sie bitte den jeweiligen Hersteller.

DNA Isolation

Eine erfolgreiche Amplifikation setzt die Verfügbarkeit von hochreiner DNA voraus. Für die DNA Isolierung von *Chlamydia sp.* aus Kot- und Tupferproben sowie Gewebeproben (z.B. Aborte, Plazenta) werden folgende Kitsysteme empfohlen:

- NucleoSpin® Tissue Kit; Macherey-Nagel, Düren
- QIAamp® DNA Mini Kit; QIAGEN, Hilden

Bitte folgen Sie dem entsprechenden Protokoll des Herstellers.

Protokoll

Vorbereitung der Reagenzien: Vor Verwendung der Reagenzien empfehlen wir, alle Röhrchen zu vortexten und ca. 5 s bei 3000 U/min zu zentrifugieren. Die blaue Farbe in der Magnesiumchlorid-Lösung ist durch den Gel-Beladungspuffer bedingt. Das PCR-Ergebnis wird hierdurch nicht beeinflusst. Vermeiden Sie zu intensives Zentrifugieren der Magnesiumchlorid-Lösung, das zu einer Aufkonzentrierung des Gel-Beladungspuffers im unteren Bereich des Röhrchens führen kann.

Genus-spezifischer Nachweis von *Chlamydia/Chlamydophila sp.*:

PCR Mix I und Magnesiumchlorid I verwenden

Spezies-spezifischen Nachweis von *Chlamydophila psittaci*:

PCR Mix II und Magnesiumchlorid II verwenden

1. A) PCR Protokoll bei einer Probenanzahl ungleich der Verpackungseinheit (Multiplikator)

Sollte die Probenanzahl kleiner als die der Verpackungseinheit des Testkits sein, so pipettieren Sie wie folgt in ein PCR-Gefäß (siehe auch Pipettierschema Tabelle 1):

17.0 µL PCR Mix

+ 4.5 µL Magnesiumchlorid

+ 0.6 µL Nuklease-freies Wasser

+ 0,4 µL Taq DNA Polymerase (hier: JumpStart™ 2.5 U/ µL)

- Pipettieren Sie von diesem Master-Mix 22.5 µL in ein PCR-Gefäß und fügen 2.5 µL Ihrer DNA-Probe bzw. der Kontrolle hinzu.

- **Hinweis:** Das Reaktionsvolumen sollte immer in Abhängigkeit der verwendeten Taq Polymerase mit Nuklease-freiem Wasser auf 25 µL aufgefüllt werden.

1. B) PCR Protokoll bei einer Probenanzahl entsprechend der Verpackungseinheit

Sollte Ihre Probenanzahl der Verpackungseinheit des Testkit entsprechen, empfehlen wir die direkte Zugabe von Magnesiumchlorid, Nuklease-freiem Wasser und Taq DNA Polymerase zum PCR Mix.

Für 10 Proben (entsprechend der Verpackungseinheit von 10 Reaktionen)

PCR Mix

+ 58.5 µL Magnesiumchlorid

+ 7.8 µL Nuklease-freies Wasser

+ 5.2 µL Taq DNA Polymerase (hier: JumpStart™ 2.5 U/µL)

Für 50 Proben (entsprechend der Verpackungseinheit von 50 Reaktionen)

PCR Mix

+ 247.5 µL Magnesiumchlorid

+ 33 µL Nuklease-freies Wasser

+ 22 µL Taq DNA Polymerase (hier: JumpStart™ 2.5 U/µL)

- Pipettieren Sie von diesem Master-Mix 22.5 µL in ein PCR-Gefäß und fügen 2.5 µL Ihrer DNA-Probe bzw. der Kontrolle hinzu.

2. Positivkontrolle

Im Testkit ist eine gebrauchsfertige Positivkontrolle (rote Verschlusskappe) enthalten, die neben den DNA Proben stets mitgeführt werden sollte. Hierbei handelt es sich um nicht-infektiöse DNA mit *Chlamydia*- und *Chlamydophila*-spezifischen Sequenzen. Die Positivkontrolle ist nur mit PCR Mix I anzuwenden. Eine Positivkontrolle für *Chlamydophila psittaci* ist im Testkit nicht enthalten.

3. Negativkontrolle

Neben den DNA Proben sollte stets eine Negativkontrolle (z. B. Nuklease-freies Wasser) mitgeführt werden.

Tabelle 1: Pipettierschema

	Probe (x1)	Positivkontrolle (nur für PCR Mix I, Magnesiumchlorid I)	PCR Kontrolle
PCR Mix I oder PCR Mix II	17.0 µL	17.0 µL	17.0 µL
Magnesiumchlorid I oder II	4.5 µL	4.5 µL	4.5 µL
DNA Proben	2.5 µL	-	-
Positivkontrolle	-	2.5 µL	-
Nuklease-freies Wasser	0.6 µL	0.6 µL	3.1 µL
Taq DNA Polymerase (1 U)*	0.4 µL	0.4 µL	0.4 µL

* 1 Unit pro Amplifikation verwenden (hier: JumpStart™ 2.5 U/µL).

Die Menge der einzusetzenden DNA richtet sich nach ihrer Konzentration und kann zwischen 1 und 3 µL variiert werden. Die Menge an Nuklease-freiem Wasser ist entsprechend zu korrigieren, so dass das Gesamtvolumen des PCR-Ansatzes immer 25 µL beträgt.

PCR Amplifikationsparameter

Wir empfehlen unbedingt die Verwendung der Sigma JumpStart™ Taq DNA Polymerase.

Temperatur	Zeit	
94°C	3 min	Hot Start*
94°C	30 s	
60°C (RAMPING 1°C/s**)	30 s	35 Zyklen
72°C	30 s	
72°C	5 min	
10°C	∞	Bis zum Ende

* Bei der Verwendung von „hot start“-Polymerasen sollten die vom Hersteller vorgegebenen Aktivierungszeiten eingehalten werden (für JumpStart™ Taq DNA Polymerase: 3 min).

** Dieser Wert ist bei den Thermocyclern gerätespezifisch einzustellen. Eine Kontrolle und ggf. Korrektur wird empfohlen.

4. Elektrophorese

Die Analyse der PCR-Produkte erfolgt mit einem 2%igen Agarosegel und Anfärbung mit Ethidiumbromid (0.5-1.0 µg/mL) in TAE-Puffer.

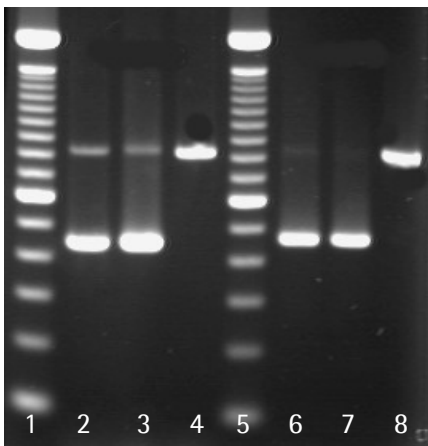
10 µL des PCR-Ansatzes werden pro Bahn aufgetragen. Die Zugabe von Gel-Beladungspuffer entfällt, da dieser bereits im Master-Mix enthalten ist. Zum Größenvergleich wird ein Längenstandard im niedermolekularen Bereich empfohlen (100 bp DNA Leiter). Die Elektrophorese sollte gerätespezifisch durchgeführt werden.

5. Auswertung und Interpretation der Ergebnisse

Die Größe der Amplifikate wird durch Vergleich mit dem DNA-Längenstandard bestimmt. Eine Fotodokumentation ist für Archivierungszwecke empfehlenswert.

Schützen Sie Augen und Haut vor UV-Bestrahlung!

- Positives Ergebnis:** Ein Fragment von 449 bp (Basenpaaren) (*Chlamydia* und *Chlamydophila*) bzw. 467 bp (*Chlamydophila psittaci*) ist vorhanden. Im unten dargestellten Fall gehört der Erreger zur Gattung *Chlamydia/Chlamydophila*. Durch die spezies-spezifische Bande ist gleichzeitig nachgewiesen, dass es sich um *Chlamydophila psittaci* handelt. Bei niedriger Erregerkonzentration kann es vorkommen, dass die Bande von 838 bp (Amplifikationskontrolle) ebenfalls sichtbar ist. Der Test ist in diesen Fällen dennoch gültig. Die erregerspezifische Bande muss jedoch deutlich erkennbar sein.
- Negatives Ergebnis:** Ist nur die Bande von 838 bp (Amplifikationskontrolle) sichtbar, ist das Resultat negativ.
- Ungültiges Ergebnis:** Sollte keine der oben genannten Banden erkennbar sein, ist der Test nicht auswertbar und muss wiederholt werden. Möglicherweise wurde die PCR inhibiert.



838 bp Amplifikationskontrolle

467 bp spezies-spezifische Bande (*Chlamydophila psittaci*)

449 bp genus-spezifische Bande (*Chlamydia* und *Chlamydophila*)

Spur 1/5: 100 bp DNA Leiter (Invitrogen)

Spur 2/3: genus-spezifische Bande | *Chlamydia* und *Chlamydophila* (449 bp); DNA Probe positiv

Spur 6/7: spezies-spezifische Bande | *Chlamydophila psittaci* (467 bp); DNA Probe positiv

Spur 4/8: nur Amplifikationskontrolle sichtbar (838 bp); DNA Probe negativ

Bitte fragen Sie uns, wenn Sie weitere Informationen wünschen.