

# BACTOTYPE® PCR Amplification Kit

## *Mycobacterium paratuberculosis*



## 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

Die Primer des Testkits sind spezifisch für ein Genfragment von *Mycobacterium avium ssp. paratuberculosis*. Das PCR-Produkt wird 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 08/2006**

### Pathogener Erreger

Das Testkit wurde zum Nachweis von *Mycobacterium avium ssp. paratuberculosis* entwickelt, dem Erreger der Paratuberkulose (Johne'sche Krankheit) bei Haus- und Wildwiederkäuern. Die Paratuberkulose ist eine weltweit stark zunehmende Infektionskrankheit, die praktisch alle Wiederkäuer befällt und speziell bei Rindern zu den meldepflichtigen Tierkrankheiten in Deutschland zählt. Der Erreger gehört zu den säurefesten Stäbchen aus der Ordnung der *Actinomycetales*, lebt im Darm infizierter Tiere und kann in der Umwelt bis zu einem Jahr überleben. *M. paratuberculosis* wächst sehr langsam, so dass bei kultureller Anzucht ein negatives Ergebnis erst nach bis zu 12 Wochen feststeht. Das BACTOTYPE® PCR Amplification Kit *Mycobacterium paratuberculosis* liefert sensitive und spezifische Ergebnisse bereits nach einem Arbeitstag.

### Bestellinformation

BACTOTYPE® <i>Mycobacterium paratuberculosis</i>	10 Reaktionen	Artikelnummer 04-106/10
BACTOTYPE® <i>Mycobacterium paratuberculosis</i>	50 Reaktionen	Artikelnummer 04-106/50

**Inhalt**

	10 Reaktionen	50 Reaktionen
<b>PCR Mix</b> (gelbe Verschlusskappe) PCR Puffer, dNTPs, Primergemisch (speziesspezifisch und Amplifikationskontrolle), DNA für Amplifikationskontrolle, NaN <sub>3</sub>	221 µL	935 µL
<b>Magnesiumchlorid</b> (grüne Verschlusskappe) MgCl <sub>2</sub> , Gel-Beladungspuffer	80 µL	300 µL
<b>Positivkontrolle</b> (rote Verschlusskappe) nicht-infektiöse DNA mit erregerspezifischen Sequenzen, NaN <sub>3</sub>	25 µL	25 µL
<b>Nuklease-freies Wasser</b> (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 (NaN<sub>3</sub>). 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 *Mycobacterium paratuberculosis* aus Flüssigkulturmedium oder Festkulturabschwemmungen 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 vortexen 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.

### 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 erregerspezifischen Sequenzen.

## 3. Negativkontrolle

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

**Tabelle 1: Pipettierschema**

	Probe (x1)	Positivkontrolle	PCR Kontrolle
PCR Mix	17.0 µL	17.0 µL	17.0 µL
Magnesiumchlorid	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

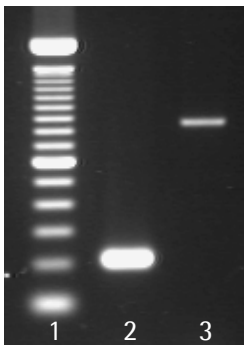
Die Größe der Amplifikate wird durch Vergleich mit dem DNA-Längenstandard bestimmt. Eine Fotodokumentation ist für Archivierungszwecke empfehlenswert.

Schützen Sie Augen und Haut vor UV-Bestrahlung!

**Positives Ergebnis:** Ein Fragment von 209 bp (Basenpaaren) ist vorhanden (erregerspezifische Bande). 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

209 bp erregerspezifische Bande

Spur 1: 100 bp DNA Leiter (Invitrogen)

Spur 2: erregerspezifische Bande (209 bp); DNA Probe positiv

Spur 3: nur Amplifikationskontrolle sichtbar (838 bp); DNA Probe negativ

Bitte fragen Sie uns, wenn Sie weitere Informationen wünschen.