

BACTOTYPE® PCR Amplification Kit

Pasteurella multocida



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 zwei Genfragmente von *Pasteurella multocida*.

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

Pasteurella multocida wird als Teil der physiologischen Bakterienflora des oberen Respirationstraktes von Schweinen beschrieben. Tritt er als Sekundärerreger in der Schleimhaut der Lunge auf, die von anderen Bakterien oder Viren befallen ist, so induziert er Pneumonien. Rhinitis atrophicans – auch Schnüffelkrankheit genannt – ist eine der Hauptkrankheiten des Respirationstraktes und steht in engem Zusammenhang mit *P. multocida*. Die Isolate synthetisieren ein chromosomal codiertes Toxin (ToxA), das als essentieller Virulenzfaktor der progressiven Rhinitis atrophicans gilt. Nicht-toxigene Isolate verursachen diese Krankheit nicht. Die kulturelle Anzucht, die Speziesidentifizierung sowie der Toxinnachweis von *P. multocida* sind sehr zeitaufwändig und kostenintensiv. Das BACTOTYPE® PCR Amplification Kit *Pasteurella multocida* liefert sensitive und spezifische Ergebnisse bereits nach einem Arbeitstag.

Bestellinformation

BACTOTYPE® <i>Pasteurella multocida</i>	10 Reaktionen	Artikelnummer 04-109/10
BACTOTYPE® <i>Pasteurella multocida</i>	50 Reaktionen	Artikelnummer 04-109/50

Inhalt

	10 Reaktionen	50 Reaktionen
PCR Mix (gelbe Verschlusskappe) PCR Puffer, dNTPs, Primergemisch (speziesspezifisch und Amplifikationskontrolle), DNA für Amplifikationskontrolle, NaN ₃	221 µL	935 µL
Magnesiumchlorid (grüne Verschlusskappe) MgCl ₂ , Gel-Beladungspuffer	80 µL	300 µL
Positivkontrolle (rote Verschlusskappe) nicht-infektiöse DNA mit erregerspezifischen 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 *Pasteurella multocida* aus Gewebe- und Tupferproben 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.

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 Testkits 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 1-3 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

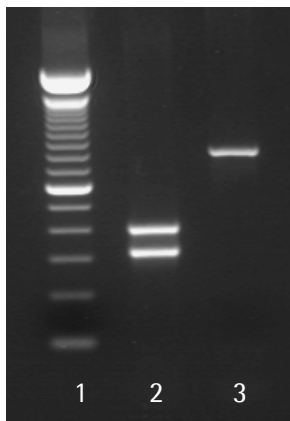
Die Größe der Amplifikate wird durch Vergleich mit dem DNA-Längenstandard bestimmt. Eine Fotodokumentation ist für Archivierungszwecke empfehlenswert.

Schützen Sie Augen und Haut vor UV-Bestrahlung!

Positives Ergebnis: Ist der getestete *P. multocida* Stamm ein Toxinbildner („D-Stamm“), wird neben der erregerspezifischen Bande von 415 bp bevorzugt die Bande für den Toxinnachweis (331 bp) amplifiziert. Bildet der Stamm kein Toxin, fehlt die Bande für den Toxinnachweis (331 bp) vollständig und es ist nur die erregerspezifische Bande (415 bp) sichtbar. Bei niedriger Erregerkonzentration kann es vorkommen, dass die 838 bp Bande ebenfalls sichtbar ist. Der Test ist in diesen Fällen dennoch gültig.

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

415 bp erregerspezifische Bande

331 bp toxinspezifische Bande

Spur 1: 100 bp DNA Leiter (Invitrogen)

Spur 2: erregerspezifische (415 bp) und toxinspezifische Bande (331 bp); DNA Probe positiv

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

Bitte fragen Sie uns, wenn Sie weitere Informationen wünschen.