



Microsynth

PCR Kit für den Nachweis von *Erwinia amylovora* (Feuerbrand)

Anleitung

Microsynth AG
Schützenstrasse 15
9436 Balgach
Schweiz

Phone ++41 71 722 8333

Fax ++ 41 71 722 8758

administration@microsynth.ch

www.microsynth.ch



PCR Kit für den Nachweis von *Erwinia amylovora* (Feuerbrand)

Inhalt

	96 PCR tube – Kit Artikel No. 1000-96	384 PCR tube – Kit Artikel No. 1000-384	1536 PCR tube – Kit Artikel No. 1000-1536
DNA Extraktionspuffer	1 x 100ml	1 x 400ml	4 x 400ml
PCR tubes	96 tubes	384 tubes	1536 tubes
dNTP's je 25mM, 22 µl	1 tube	4 tubes	16 tubes
Positive Kontrolle, 300 µl	2 tubes	2 tubes	6 tubes
1 Beschreibung			

Die PCR tubes enthalten eine lyophilisierte Mischung von Primern, PCR Salzen und interne Kontroll- DNA.

Versand und Lagertemperatur

Versand: Raumtemperatur. Mehrere bei Microsynth durchgeführte Tests haben klar gezeigt, dass die Stabilität des Kits nicht beeinträchtigt wird durch eine Versandzeit von mindestens 10 Tagen bei Raumtemperatur.

Lagerung: PCR Tubes, dNTP's und Positive Kontrolle bei -15 to -25 °C.
DNA Extraktionspuffer bei 2 - 8 °C.

Stabilität

Bei der angegebenen Lagertemperatur mindestens 1.5 Jahre

Benötigte Ausrüstung

Heizblock
Pipetten und Spitzen mit integriertem Filter
1.5 ml oder 2ml Schraubverschlussröhrchen
Agarosegelelektrophorese
Zentrifuge
PCR Gerät
Hot Start PCR Polymerase

Vorwort

Microsynth empfiehlt die folgenden, allgemeinen PCR Regeln einzuhalten, damit Cross-Kontaminationen verhindert werden. Obwohl wir beobachtet haben, dass Cross-Kontamination kein Problem ist mit diesem Kit, sollten für alle Pipettierungen Spitzen mit integriertem Filter verwendet werden. Die folgenden 3 Schritte werden normalerweise in drei getrennten Räumen durchgeführt:

Extraktionsraum: Schneiden von Pflanzenmaterial und Zugabe von Extraktionspuffer, erhitzen und verdünnen

PCR Raum: Zugabe von Mastermix und DNA-Extrakt in die PCR Tubes*

Gelelektrophorese-Raum: PCR Geräte und Gelelektrophorese. Die PCR Tubes werden erst hier geöffnet, auf keinen Fall schon im PCR Raum, weil genau dies Cross-Kontaminationen verursachen kann.

*Es ist eine gute Idee, den Mastermix in einem Laminar Flow zu machen (falls vorhanden) und den DNA-Extrakt ausserhalb des Laminar Flows oder ausserhalb dieses Bereichs dazuzugeben.

Prinzip

Der Kit basiert auf einer nested PCR auf Plasmid pEA29, publiziert von Maria M. Lopez, Instituto Valenciano de Investigaciones Agrarias, 46113 Moncada, Spanien und wurde von Microsynth weiterentwickelt. Die Hauptvorteile können wie folgt beschrieben werden:

Geschwindigkeit. Der Nachweis von *E. amylovora* Bakterien ist innerhalb von 6 Stunden möglich.

Keine Vorkultivierung von *E. amylovora* Bakterien – direktes PCR von Zweigen, Blättern, Früchten oder Blüte.

Die PCR Reaktion führt 67 Zyklen durch, diese hohe Amplifikation übersteigt bei weitem die normalen PCR Prozeduren von 35 Zyklen und ergibt dadurch eine sehr hohe Sensitivität, auch bei einer sehr kleinen Ausgangsmenge von DNA. Wegen dem Einsatz einer extrem tiefen DNA Menge stört auch die Anwesenheit von PCR Hemmstoffen nicht, weil diese verdünnt wurden.

Sensitivität: 1 Zelle *E. amylovora* ist mit diesem Kit nachweisbar

Hohe Standardisierbarkeit. Jede Produktionscharge wird bei Microsynth mit unserer positiven Kontrolle kontrolliert und muss die auf dem mitgelieferten Zertifikat beschriebenen Standards erfüllen. Somit ist eine Lot-zu-Lot Schwankung ausgeschlossen. Die einzige Quelle von Schwankungen ist die Art und Weise, wie die Probe von der Pflanze genommen wird.

Vorarbeit

Löse das Pulver des DNA Extraktionspuffers in sterilem Wasser. Die Wassermenge ist auf der Flasche notiert. 5 Min. stehen lassen damit das Pulver gut gelöst ist und schütteln.

Bevor die Nukleotide geöffnet werden sollten sie 10 Sek. zentrifugiert werden, damit sich keine Flüssigkeit mehr im Deckel befindet. Zu den 22 µl (25mM jedes Nukleotid) werden 198 µl steriles Wasser dazugeben, dies gibt eine Konzentration von 2.5mM für jedes Nukleotid.

Kurzbeschreibung des PCR – Kits

Kleine 1mm – Stücke von Pflanzenmaterial in ein 1.5ml oder 2ml Plastikgefäß mit Schraubverschluss geben. 100 – 1000 µl DNA Extraktionspuffer dazugeben. Die Pflanzenstücke sollten im Puffer untergetaucht sein. 20 Min. bei 95 °C erhitzen, damit *E. amylovora* DNA extrahiert wird.

In der Zwischenzeit 24µl Mastermix (Wasser, dNTP's und PCR Polymerase) in die von Microsynth vorabgefüllten PCR Tubes geben.

DNA-Extrakt 10 Sekunden zentrifugieren und 1 µl Überstand in sterilem Wasser verdünnen.

1 µl verdünnter DNA Extrakt zu obigen 24 µl PCR Reaktion dazugeben.

PCR Reaktion starten (ca. 3 Stunden)

5 µl auf ein 1.5% Agarosegel laden und 30 Minuten laufen lassen.

Interpretation: Die tiefere 139bp Bande zeigt die interne Kontrolle. Diese muss immer sichtbar sein. Falls sie abwesend ist darf keine diagnostische Interpretation erfolgen. Die obere 383 – 399bp Bande zeigt Anwesenheit von *E. amylovora*.

Detaillierte Beschreibung dieses PCR – Kits

a) Probennahme

Kleine verdächtige Pflanzenstücke werden in ein 1.5 oder 2ml Schraubverschlussplastikgefäß gegeben. Hier ist äusserst sorgfältiges Arbeiten wichtig, vorallem gutes Reinigen von Schneidmessern. Kleine Stücke einer negativen Kontrolle müssen ebenfalls mitgeführt werden.

Das Alter des Pflanzenmaterials ist nicht so wichtig. Bei Microsynth durchgeführte Tests haben ergeben, dass auch 5 Monat alte, schon längst ausgetrocknete Zweige ein genau gleich starkes positives Ergebnis geben. Das Lokalisieren von infizierten Stellen ist aber bei frischem Material einfacher.

b) Extraktion von *E. amylovora* DNA

100 – 1000 µl des mitgelieferten DNA Extraktionspuffers zur Probe dazugeben. Diese Menge ist nicht kritisch, die Probe sollte aber mit Flüssigkeit überdeckt sein. Falls der Puffer während dem Aufheizen viskös wird, kann einfach durch Zugabe von mehr Puffer verdünnt werden. Tube für 20 Min. auf 95 °C Heizblock geben und nach 10 Min. und am Ende schütteln. Der Extrakt wird farblos, gelb oder braun sein. Die bakterielle DNA befindet sich nun im Extrakt. Jetzt kurz zentrifugieren (20 Sekunden bei 10 – 17krpm). 1 µl Überstand nehmen und in sterilem Wasser verdünnen. Je nach Probenmaterial (Blütenwaschungen mit wenig Bakterien, Zweige/Blätter mit viel Bakterien) muss eine 10fache, 100fache, 1'000fache oder 10'000 fache Verdünnung gemacht werden. Diese Verdünnung war ein Teil einer intensiven Untersuchung bei Microsynth. Bei Microsynth haben wir für Zweigmaterial bei einer 1000fachen Verdünnung optimale Ergebnisse erhalten. Nichtverdünnte Extrakte enthalten PCR Inhibitoren und zuviel Salz vom Extraktionspuffer, darum muss ein Extrakt mindestens 10fach mit Wasser verdünnt werden.

c) PCR Amplifikation

Die mitgeschickten PCR Tubes enthalten Salz, Primer und eine Kontroll-DNA in lyophilisierter Form. Die Kontroll-DNA zeigt eine erfolgreich abgelaufene PCR Reaktion bzw. Abwesenheit von PCR-Hemmstoffen. Die Nukleotide werden in einem separatem Tube mitgeschickt. Die Taq-Polymerase muss vom Kunden selbst gekauft werden. Microsynth hat einige Polymerasen getestet, nicht alle haben ein gutes Resultat ergeben. Wir empfehlen darum dringend, nur die in dieser Beschreibung aufgelisteten Polymerasen zu verwenden!

Herstellung eines Mastermix mit Wasser, dNTP's und PCR Polymerase. Das Volumen des Mastermix soll sich nach der Anzahl durchgeführten Reaktionen (inklusive positive und negative Kontrolle) richten.

Mastermix für 1 Tube:

21.7 µl steriles Wasser

2 µl verdünnte Nukleotide (2.5mM jedes Nukleotid)

0.3 µl Taq-Polymerase 5 Units pro µl

24 µl dieses Mastermix zu jedem PCR Tube dazugeben, auf Vortex mischen und 1 µl verdünnter Probenextrakt oder 1 µl positive Kontrolle dazugeben. Dies gibt ein Endvolumen von 25 µl. Gut mischen und im Deckel liegende Flüssigkeit allenfalls herunterzentrifugieren.

PCR Zyklen:

Schritt 1	94 °C	15 Min.
Schritt 2	94 °C	30 Sek.
Schritt 3	72 °C	60 Sek.
Schritt 4	Goto Schritt 2, 25x	
Schritt 5	94 °C	30 Sek.
Schritt 6	56 °C	30 Sek.
Schritt 7	72 °C	45 Sek.
Schritt 8	Goto Schritt 5, 40x	
Schritt 9	15 °C	for ever
Schritt 10	End	

(Total ca. 3 Stunden)

d) Agarose Gelelektrophorese

Während der PCR Amplifikation ein 1.5% Gel mit Ethidiumbromid oder ähnlichem interkalierendem Farbstoff giessen. Falls mehrere Gele pro Woche / Monate gebraucht werden empfehlen wir, ein grosses Gel zu giessen und jeweils nur soviel abzuschneiden, wie gerade gebraucht wird. Das nichtgebrauchte Gel kann gut während Wochen dunkel bei Raumtemperatur gelagert werden, wenn es einer Folie vor Verdunstung geschützt eingepackt wird.

Die zwei PCR Banden sind kurz, darum genügt eine Gellänge von 45mm. 5 µl der PCR Reaktion auf das Gel laden und laufen lassen, bis Bromphenolblau 26mm von der Tasche gewandert ist (normalerweise 30 Min. bei 200 Volt, 140mA). Beide Banden werden in der Nähe von Bromphenolblau sein. Tip: Es ist kein Problem, den Elektrophoresepuffer bis zu 5 mal zu gebrauchen, bevor er entsorgt wird.

e) Interpretation des Resultates

Die positive Kontrolle wird ein starke Bande von *E. amylovora* DNA bei 399bp und eine schwächere Bande bei 139bp zeigen (interne Kontrolle).

Die negative Kontrolle wird nur das 139bp Fragment zeigen. Falls die obere Bande sichtbar ist, ist dies ein Zeichen für Cross-Kontamination und es sollte keine PCR Reaktion interpretiert werden.

Die untersuchten Proben werden immer die 139bp Bande zeigen. Falls diese nicht vorhanden ist zeigt dies PCR Hemmung an und es sollte keine PCR Reaktion interpretiert werden. Die PCR muss wiederholt werden, indem der DNA Extrakt weiter verdünnt wird.

8bp Variationen von weltweit untersuchten Feuerbrandproben wurden beobachtet. Die Grösse der Feuerbrandbande kann darum leicht variieren.

Falls die 381 – 399bp Bande vorhanden ist, enthält die Probe *E. amylovora* Bakterien.

Falls die 381 – 399bp Bande nicht vorhanden ist, enthält die Probe keine *E. amylovora* Bakterien.

Das *E. amylovora* Fragment kann sequenziert werden falls weitere Untersuchungen erwünscht sind. Das kürzere 139bp Fragment stört diese Sequenzierung nicht. Primer und Nukleotide sollten aber vorher weggereinigt werden. Microsynth kann diesen Reinigungs- und Sequenzierservice anbieten.

Anhang 1: Empfohlene Taq Polymerasen

FastStart Taq DNA Polymerase, Roche, Bestellnummer 12 158 264 001 (50 Units; grössere Mengen haben eine andere Bestellnummer)

HotStar Taq DNA Polymerase, Qiagen, Bestellnummer 203203 or 203205

AmpliTaq Gold, Applied Biosystems, Bestellnummer N808-0240 oder N808-0241

Die folgenden Polymerasen wurden durch Microsynth getestet und funktionieren nicht mit diesem Puffersystem: Taq DNA Polymerase, Roche, Bestellnummer 11 146 165 001 (100 Units; grössere Mengen haben eine andere Bestellnummer)

Taq DNA Polymerase, Qiagen, Bestellnummer 201203

Taq DNA Polymerase, Invitrogen, Bestellnummer 18038

Taq DNA Polymerase recombinant, Invitrogen, Bestellnummer 10342

Taq DNA Polymerase, Sigma, Bestellnummer D1806 and D8187

Taq DNA Polymerase, Promega, Bestellnummer M1661

Taq DNA Polymerase, Amersham, Bestellnummer 27-0799

Anhang 2:

Dieser PCR Kit wurde erfolgreich getestet mit Proben aus den folgenden Ländern:

Aegypten, Frankreich, Griechenland, Grossbritannien, Irland, Kanada, Neu Seeland, Niederlande, Schweden, Schweiz, Slowakei, Spanien, Tschechien, Türkei, USA, Zypern

Anhang 3: Getestete Feuerbrand Wirte

Crataegus, Cotoneaster, Eryobotria, Malus, Pyracantha, Pyrus

Zusatz für Massenuntersuchungen: Spezialrack für 1ml Wassertubes

Für Massenuntersuchungen kann Microsynth Wassertubes und ein Spezialrack liefern. Dieses Rack erleichtert den Verdünnungsschritt des erhitzten Extraktes.

Pro Rack können bis zu 24 erhitzte Extrakte und Wassertubes für die Verdünnung in einer 3 x 8 Anordnung aufgesteckt werden.

Rack kurz zentrifugieren (5 Sek. bei tiefer Tourenzahl von 1000rpm) damit sich in den Deckeln keine Flüssigkeit befindet.

Verdünnung mit einer 8-Kanalpipette machen.

Verdünnung sorgfältig mischen (Luftblase muss sich vom Deckel bis Boden bewegen wenn die Tubes sehr voll sind!)

Rack kurz zentrifugieren damit sich in den Deckeln keine Flüssigkeit befindet.

1 µl des verdünnten Extraktes in die PCR Tubes transferieren (Einzelpipette oder 8-Kanalpipette)

Material für diesen Schritt:

8-Kanalpipette mit veränderbarem Spitzenabstand (Matrix)

Zentrifugenrotor für Mikrotiterplatten

Kundenfeedback

Ihr Feedback ist sehr wichtig. Auf Anfrage sind wir bereit, einen Kit für Real-Time PCR zu entwickeln.
Version 1.05