SureCycle®

Real-time PCR System zur System Verifizierung

Die real-time Polymerase Kettenreaktion (PCR) ist ein etabliertes Verfahren zum Nachweis von DNA-Abschnitten. Die Anwendungsgebiete sind vielfältig und reichen von der Lebensmitteldiagnostik über der klinischen Infektionsdiagnostik bis hin zur forensischen Analytik. Jede PCR Reaktion ist im Wesentlichen über die Primer Sequenz und ein PCR Protokoll mit spezifischen Temperatur - und Zeitintervallen definiert. Reproduzierbare Ergebnisse können daher nur bei einer korrekten Temperatursteuerung des Thermocyclers erzielt werden.

Lebensmittelhersteller und Lebensmittellabore unterliegen intern und extern hohen Qualitätsstandards. Externe internationale Standards werden von der International Organization for Standardization (ISO) entwickelt und publiziert. Für die Herstellung sicherer Lebens-und Futtermittel ist die Pathogen-Analytik von besonderer Bedeutung. Falsch negative und falsch positive Ergebnisse können weitreichende Konsequenzen sowohl für die Konsumenten als auch für die LM-Hersteller haben. Daher ist die regelmäßige Überprüfung der korrekten Funktion des Thermocyclers unerlässlich.

Die ISO 20836:2005 beschreibt die regelmäßige Durchführung von Performance Tests für Thermocycler. Anhand eines direkten physikalischen oder indirekten biochemischen Leistungstests kann die korrekte Funktion des Cyclers in Kombination mit dem gewählten Plastikmaterial getestet werden. Der biochemisch basierte Test soll gemäß ISO 20836:2005 mit einem temperatur-sensitiven nicht-robusten real-time PCR System durchgeführt werden. Das neue SureCycle® System ist speziell für die Verifizierung von real-time PCR Systemen in Anlehnung an die ISO 20836:2005 entwickelt worden. Mit Hilfe des SureCycle® Systems können auch kleinste Temperaturschwankungen des Thermocyclers erkannt werden. Im Gegensatz zu herkömmlichen Sonden-basierten Kits zur Überprüfung der korrekten Temperatursteuerung wurde SureCycle® entwickelt, um das gesamte real-time PCR System, d.h. Thermocycler in Kombination mit dem gewählten Plastikmaterial zu überprüfen.

Das SureCycle® System ist ein temperatur-sensitives real-time PCR Verfahren, bei dem die Primerbindungen instabilisiert werden. Bei jeder PCR Reaktion binden die Primer Sequenzen an den komplementären Strang, um den Start der PCR Reaktion zu initiieren. Diese Bindung wird destabilisiert und demzufolge die Annealing- und Denaturierungsreaktion temperatur-sensitiv. Ein solches System reagiert empfindlich auf einen kurzzeitigen Temperaturanstieg über die eingestellte Denaturierungs-oder Annealingtemperatur sog. 'overshooting'. Der Test ist ebenso sensitiv gegenüber einer unzureichenden Denaturierung der doppelsträngigen DNA (dsDNA) verursacht durch eine zu niedrige Denaturierungstemperatur sog. 'undershooting'. Beides, 'overshooting' bei der Annealingtemperatur und 'undershooting' bei der Denaturierungstemperatur reduziert die Effizienz der PCR. Zur Überprüfung der Temperatur während der Annealing- und Denaturierungsreaktion werden zwei Thermalprofile verwendet: SureCycle® Profil 1 Denaturation und SureCycle® Profil 2 Annealing (Siehe Tabelle 1)

SureCycle® Profil 1 Denaturierung

Mit dem Profil 1 wird die optimale Denaturierungstemperatur von

Tabelle 1: Programmierung der Thermoprofile

	SureCycle® Profil 1 Denaturierung	SureCycle® Profil 2 Annealing
Initial Denaturation (HOLD)	1 min, 95°C	1 min, 95°C
Cycles	45	45
Denaturation	15 sec, **95°C**	15 sec, **92°C**
Annealing/Extension	30 sec, **63°C**	30 sec, **60°C**
Cooling	10 sec, 40 °C	10 sec, 40 °C
Temperature Transition Rate/ Ramp Rate	Maximum	Maximum

Tabelle 2: Pipettierschema zur System-Verifizierung für einen Blockcycler. 4x4 Wells in der Mitte der Platte (rot markiert) und 4x4 Wells der Eckpositionen wurden belegt. Die Cp-Werte bei optimaler Denaturierungstemperatur werden gezeigt. Der Soll-Bereich liegt zwischen Cp 26,0 und 30,0. Alle Cp-Werte liegen im Soll-Bereich.

Cp-Werte	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	28,1	27,9									28,1	28,0
B	27,9	28,1									28,1	28,1
C												
D						28,0	28,0					
E						28,0	28,0					
F												
G	28,1	28,0									28,0	28,0
H	28,0	28,0									28,1	27,9

Mittelwert 28,0 | Mittelwert D6/D7/E6/E7 28,0 | Soll-Bereich ±2 Cp: 26,0 - 30,0

95°C, sowie eine suboptimale Annealing-Temperatur von 63°C überprüft.

In diesem Fall werden ein positives Ergebnis für das Denaturierungssystem im VIC-Kanal und ein negatives Ergebnis im Annealing-System (FAM-Kanal) erwartet. Als Soll-Wert (Cp-Wert) wird der Mittelwert der Referenzreaktionen berechnet. Der Sollbereich der Kontrollreaktionen beträgt ± 2 Cp des Mittelwertes der Referenzreaktionen. Befinden sich die Mittelwerte aller Kontrollreaktionen innerhalb des Soll-Bereiches, gilt die Verifizierung als bestanden. Liegen ein oder mehrere Cp-Werte aller anderen Kontrollreaktionen außerhalb dieses Soll-Bereiches, ist die Verifizierung nicht bestanden. In diesem Fall sollte eine vollständige Überprüfung aller Kavitäten erfolgen.

Die Tabelle 2 und 3 sowie Abbildung 1 und 2 zeigen beispielhaft die Plattenbelegung und die Ergebnisse am LightCycler® 480II der Firma Roche im Profil 1.

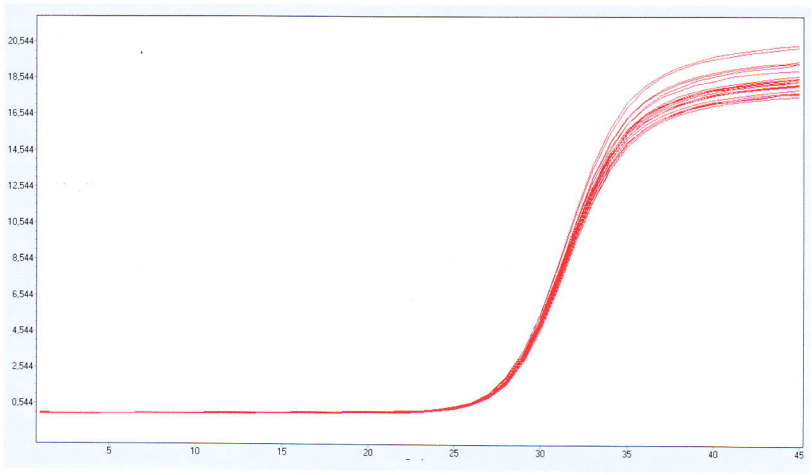

Abbildung 1: Fluoreszenz-Daten im VIC-Kanal (Profil 1)

SureCycle® Profil 2 Annealing

Im Profil 2 Annealing werden eine suboptimale Denaturierungsreaktion von 92°C und die optimale Annealing/Extension-Temperatur von 60°C überprüft. Bei diesem Temperaturprofil werden im Denaturierungs-System (VIC-Kanal) negative Ergebnisse und im Annealing-System (FAM-Kanal) positive Ergebnisse erwartet. Analog zum Profil 1 wird auch für diesen Test ein Soll-Bereich aus definierten Referenzreaktionen festgelegt.

Die Tabelle 4 und 5 sowie Abbildung 3 und 4 zeigen beispielhaft die Plattenbelegung und die Ergeb-

Tabelle 3: Analog zu Tabelle 2 empfohlenes Pipettierschema. Die Ergebnisse sind wie erwartet negativ im Annealingsystem.

Cp-Werte	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	neg	neg									neg	neg
B	neg	neg									neg	neg
C												
D						neg	neg					
E						neg	neg					
F												
G	neg	neg									neg	neg
H	neg	neg									neg	neg

Mittelwert #DIV/0! | Mittelwert D6/D7/E6/E7 #DIV/0! | Soll-Bereich ±2 Cp: -

Tabelle 4: Cp-Werte FAM-Kanal mit optimaler Annealingtemperatur (Profil 2).

Cp-Werte	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	26,8	26,8									26,6	26,7
B	26,9	26,8									26,8	26,7
C												
D						27,0	26,9					
E						26,9	27,0					
F												
G	26,7	26,8									26,8	26,6
H	26,7	26,8									26,6	26,7

Mittelwert 26,8 | Mittelwert D6/D7/E6/E7 27,0 | Soll-Bereich ±2 Cp: 25,0 - 29,0

Tabelle 5: Ergebnisse VIC-Kanal (Profil 2) bei nicht optimaler Denaturierungstemperatur.

Cp-Werte	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	neg	neg									neg	neg
B	neg	neg									neg	neg
C												
D						neg	neg					
E						neg	neg					
F												
G	neg	neg									neg	neg
H	neg	neg									neg	neg

Mittelwert #DIV/0! | Mittelwert D6/D7/E6/E7 #DIV/0! | Soll-Bereich ±2 Cp: -

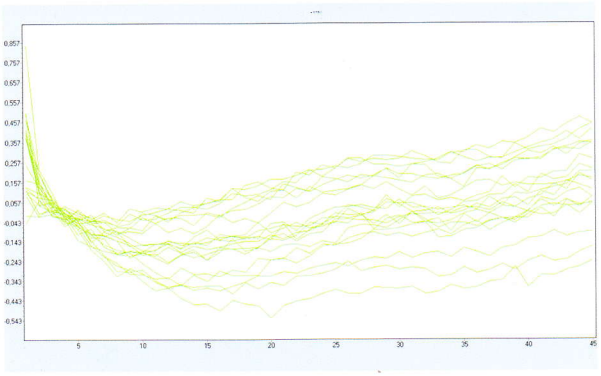

Abbildung 2: Fluoreszenz-Daten im FAM-Kanal (Profil 1)

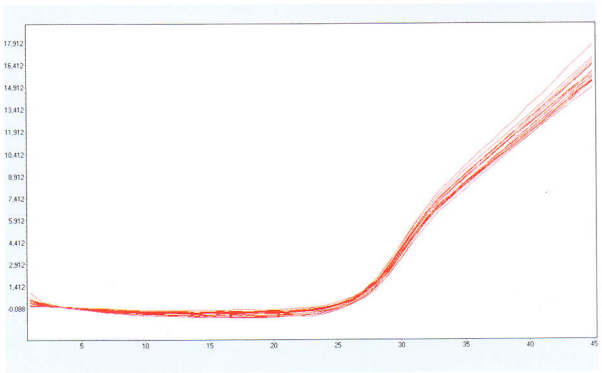

Abbildung 3: Fluoreszenz-Daten im FAM-Kanal (Profil 2)

nisse am LightCycler® 480 II der Firma Roche im Profil 2.

Das SureCycle® System bietet ein zuverlässiges Tool zur Verifizierung des Thermocyclers in Kombination mit den gewählten PCR-Materialien. Die Überprüfung ist einfach und zeitsparend durchführbar und kann auf allen marktüblichen Block-und Rotorcyclern, unabhängig von Hersteller und Baujahr, angewendet werden. Spezielles Equipment wie Thermo-Sensoren, spezielle Software oder Messgeräte sind für die Durchführung nicht erforderlich. Falsch positive und falsch negative Ergebnisse können somit sicher vermieden werden.

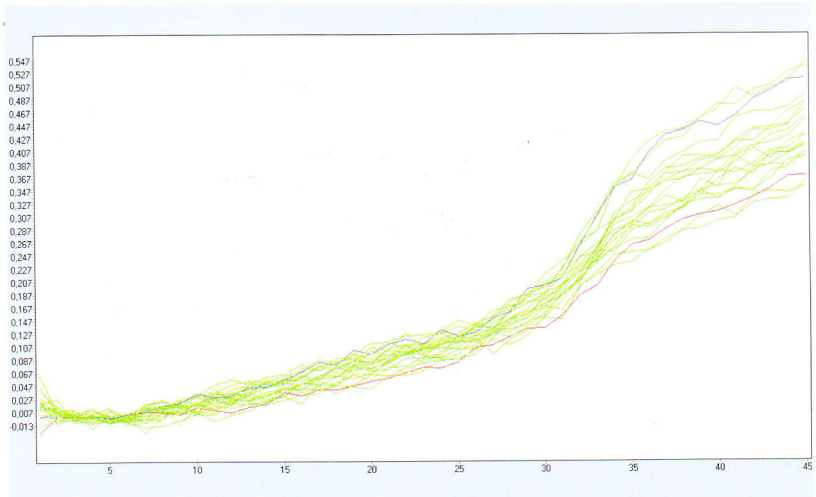

Abbildung 4: Fluoreszenz Daten VIC-Kanal (Profil 2)