

Produktbeschreibung

Das Mycotype® **Basidio**^{QS} Microarray Detection Kit beinhaltet optimierte Reagenzien zur Detektion der wichtigsten Hausfäulepilze. Im ersten Schritt erfolgt die spezifische Amplifikation des DNA-Zielbereichs von holzzerstörenden Basidiomyceten mit Hilfe der Polymerasekettenreaktion (PCR). Im zweiten Schritt erfolgt die art- und gattungsspezifische Identifizierung der Pilze mit Hilfe der DNA-Chip-Technologie.

Die hier angewandte DNA-Chip-Technologie basiert auf der *Arrayed Ligation Reaction* (ALR), wobei zusätzlich zur Hybridisierungsreaktion eine spezifische Enzymreaktion auf der planaren Chip-Oberfläche stattfindet. Durch diese Ligationsreaktion werden die immobilisierten DNA-Sonden mit den Ligationsoligonukleotiden verknüpft. Die Detektion und Auswertung erfolgt über die Fluoreszenzfarbstoffmarkierung der Ligationsoligonukleotide mit Hilfe eines Scanners. Bei den DNA-Chips handelt es sich um Einmalprodukte, die nach der Durchführung der Analyse nicht erneut verwendet werden können. Eine ausführliche Beschreibung der Technologie ist dem Kapitel 5 zu entnehmen.

Das Mycotype® **Basidio**^{QS} Microarray Detection Kit wurde so konzipiert, dass es eine leicht handhabbare, routinefähige und sichere Diagnostik von Hausfäulepilzen bei geringem Zeitaufwand ermöglicht. Insbesondere wurde darauf geachtet, die Bestimmung von mehreren gleichzeitig auftretenden Pilzarten in einer Praxisprobe zu realisieren (Multiplex-Analyse von Mischproben) und eine deutliche Reduzierung der bisher für molekularbiologische Untersuchungen erforderlichen Analysezeit zu erzielen. Durch den zweistufigen Prozess der spezifischen Amplifikation mit Basidiomyceten-spezifischen Primern und der Differenzierung der Pilze mit art- und gattungsspezifischen DNA-Sonden wird eine hohe analytische Spezifität in der Diagnostik gewährleistet.

Das Mycotype® **Basidio**^{QS} Microarray Detection Kit enthält eine interne PCR-Kontrolle und eine interne ALR-Kontrolle (Quality Sensor "QS"), die hilfreiche Informationen über die Effizienz der PCR und ALR sowie über die Anwesenheit von Reaktionsinhibitoren liefern.

Die Nachweisgrenze für das Mycotype® **Basidio**^{QS} Microarray Detection Kit liegt bei 10 pg genomischer DNA. Der optimale Bereich ist unter Standardbedingungen **0.5-5 ng DNA**.

Die Validierung und Evaluierung des Testkits wurden an den PCR-Cyclern BioRad PTC-200, Eppendorf Mastercycler ep-S und Techne TC-512 sowie an den Scannern PerkinElmer ScanArray® Gx Plus und Ditabis Microarray Scanner MArS durchgeführt. Die Entwicklung, die Herstellung und der Vertrieb der Biotype® Produkte ist zertifiziert nach DIN EN ISO 9001 ff.

This product and its use are covered by one or more of the following patents owned by Oxford Gene Technology IP Limited (together "OGT"): European Patent Nos. 0 820 524 and 1 308 523, US Patents Nos. 6,150,095, 6,307,039, 6,770,751 and 7,192,707 and pending patents. The purchaser is licensed to practise methods and processes covered by these patents using this product for the purpose of botanical, medical, forensic, veterinary, environmental and food diagnosis, prognosis and monitoring only.

Inhaltsverzeichnis

1. Beschreibung des Mycotype® Basidio ^{OS}	3
2. Übersicht der Arbeitsschritte	6
3. Kurzanleitung	7
4. Ausführliche Versuchsanleitung.....	10
4.1 Probennahme	10
4.2 DNA-Isolierung.....	10
4.3 PCR Amplifikation	13
4.4 Analyse der PCR-Produkte (optional)	13
4.5 Reinigung der PCR-Produkte	14
4.6 Fragmentierung und Denaturierung der PCR-Produkte	14
4.7 Arrayed Ligation Reaction (ALR)	14
4.8 Waschen der DNA-Chips	15
4.9 Auslesen der DNA-Chips	15
4.10 Auswertung	16
5. Das Prinzip des Mycotype® Basidio ^{OS}	18
5.1 PCR Amplifikation	18
5.2 DNA Fragmentierung	18
5.3 Arrayed Ligation Reaction (ALR)	19
6. Anhang.....	20

1. Beschreibung des Mycotype® Basidio^{QS}

Tabelle 1. Nachweisbare Hausfäulepilze

Wissenschaftlicher Name	Deutscher Name
<i>Antrodia sinuosa</i>	Schmalsporiger Weißer Porenschwamm
<i>Antrodia vaillantii</i>	Breitsporiger Weißer Porenschwamm
<i>Antrodia xantha</i>	Gelber Porenschwamm
<i>Bjerkandera adusta</i>	Angebrannter Rauchporling
<i>Coniophora arida</i>	Trockener Kellerschwamm
<i>Coniophora marmorata</i>	Marmorierter Kellerschwamm
<i>Coniophora olivacea</i>	Olivbrauner Kellerschwamm
<i>Coniophora puteana</i>	Brauner Kellerschwamm
<i>Daedalea quercina</i>	Eichenwirrling
<i>Donkioporia expansa</i>	Ausgebreiteter Hausporling
<i>Fomitopsis pinicola</i>	Rotrandiger Baumschwamm
<i>Gloeophyllum abietinum</i>	Tannenblätling
<i>Gloeophyllum sepiarium</i>	Zaunblätling
<i>Gloeophyllum trabeum</i>	Balkenblätling
<i>Laetiporus spp.</i>	Schwefelporlinge
<i>Leucogyrophana mollusca</i>	Sklerotien Hausschwamm
<i>Leucogyrophana pinastri</i>	Gelbrandiger Hausschwamm
<i>Neo/ Lentinus lepideus</i>	Schuppiger Sägeblätling
<i>Oligoporus placenta</i>	Rosafarbener Saftporling
<i>Phellinus ferruginosa</i>	Rostbrauner Feuerschwamm
<i>Pleurotus spp.</i>	Seitlinge
<i>Schizophyllum commune</i>	Gemeiner Spaltblätling
<i>Serpula lacrymans</i>	Echter Hausschwamm
<i>Serpula himantioides</i>	Wilder Hausschwamm
<i>Stereum spp.</i>	Schichtpilze
<i>Tapinella panuoides</i>	Muschelkrempling
<i>Trametes (Coriolus) versicolor</i>	Schmetterlingsporling

Tabelle 2. Qualitätssensoren des Mycotype® Basidio^{QS}

Qualitätssensoren	Bedeutung
PCR-Positivkontrolle	Prüfung des PCR-Verlaufs
ALR-Positivkontrolle	Prüfung des ALR-Verlaufs
ALR-Negativkontrolle	Prüfung der Spezifität der ALR
Fluoreszenzmarker	Herstellungskontrolle und Positionsmarkierung

Inhalt

Mycotype® **Basidio**^{OS} Microarray Detection Kit

Kitbestandteil	4 Reaktionen	20 Reaktionen	40 Reaktionen
PCR Mix	195 µl	955 µl	2x 955 µl
DNA Polymerase	3 µl	8 µl	2x 8 µl
DNA Glycosylase	5 µl	20 µl	2x 20 µl
ALR Mix	30 µl	145 µl	2x 145 µl
DNA Ligase	17 µl	83 µl	2x 83 µl
DNA-Chips (à 4 Arrays)	1 Slid	5 Slid	2x 5 Slid
Testslide	1 Slid	1 Slid	1 Slid

Bestellinformation

Mycotype® Basidio ^{OS}	4 Reaktionen	Artikelnummer	51-27110-0004
Mycotype® Basidio ^{OS}	20 Reaktionen	Artikelnummer	51-27110-0020
Mycotype® Basidio ^{OS}	40 Reaktionen	Artikelnummer	51-27110-0040

Lagerung

Die Lagerung der Reagenzien über einen längeren Zeitraum empfehlen wir bei -20°C. Wiederholtes Auftauen und Einfrieren sollte vermieden werden. Der ALR Mix und die DNA-Chips sollten lichtgeschützt aufbewahrt werden. Die DNA-Chips sollten bis zum erstmaligen Gebrauch ungeöffnet in der Schutzverpackung bei RT gelagert werden. Nach dem Öffnen der Schutzverpackung empfehlen wir die DNA-Chips mit Trockenmittel bei -20°C in der Originalverpackung bzw. vakuumverpackt bei RT aufzubewahren. Die Haltbarkeit des Testkits ist auf dem Verpackungsetikett angegeben.

Benötigte Reagenzien und Materialien des allgemeinen Laborbedarfs:

Reagenz / Material

ALCONOX - Powdered Precision Cleaner (Alconox, Inc., US; 1125)
 DNA-Dekontaminationsmittel zum Reinigen der Geräte und Oberflächen
 Färbekorb in Edelstahl (z. B. VWR International GmbH; 631-9811)
 Fluoreszenz-Scanner für Standard-DNA-Chips (75 x 25 x 1 mm)
 Horizontalschüttler für Reaktionsgefäße (Vortexer)
 Mikropipetten (10, 20, 200 µl)
 PCR-Cycler
 Reaktionsgefäße (0.2 ml, 1.5 ml und 2.0 ml)
 Reinigungskit für PCR-Produkte (z. B. Macherey-Nagel GmbH & Co.KG; NucleoSpin® Extract II oder Qiagen GmbH; MinElute PCR Purification Kit)
 Stickstoff-Druckgasflasche oder Zentrifuge für DNA-Chips / Multititerplatten
 Thermoblock für Reaktionsgefäße (37°C / 95°C)
 Thermoblock mit Feuchtigkeitskammer (z. B. Eppendorf; Wechselblock für 4 Slides; 5368 000.010)
 Waschgefäß
 Wasserkocher oder ein alternatives Gerät zum Erhitzen von wässrigen Lösungen
 Zentrifuge für Reaktionsgefäße

Warnungen und Sicherheitshinweise

Folgende potenziell gefährliche Substanz ist in diesem Microarray Detection Kit enthalten:

Kitbestandteil	Chemikalie	Gefahr
PCR Mix	Natriumazid NaN_3	giftig beim Verschlucken, entwickelt bei Berührung mit Säure giftige Gase

Bitte beachten Sie das Sicherheitsdatenblatt. Für Biotype[®] Kitkomponenten sind die Sicherheitsdatenblätter bei uns erhältlich. Für Sicherheitsdatenblätter von Reagenzien, die nicht im Testkit enthalten sind, kontaktieren Sie bitte den jeweiligen Hersteller.

Nach dem heutigen Wissensstand sowie nach den technischen Regeln (TRBA 460) des Ausschusses für biologische Arbeitsstoffe (ABAS) gehen von den spezifisch zu identifizierenden Pilzen keine Gesundheitsgefahren aus. Hausfäulepilze verursachen jedoch Schäden an Gebäuden und Holzkonstruktionen. Um mögliche Pilzkontaminationen zu vermeiden sollten die allgemeinen Sicherheitsmassnahmen beim Umgang mit Mikroorganismen eingehalten werden.

Qualitätssicherung

Der gesamte Inhalt des Biotype[®] Testkits wird einer intensiven Qualitätssicherung durch die Biotype Diagnostic GmbH unterzogen. Die Qualität der Testkits wird kontinuierlich überprüft, um die uneingeschränkte Verwendbarkeit zu belegen. Bitte kontaktieren Sie uns in allen Fragen zur Qualitätssicherung.

Warenzeichen und Patente

Mycotype[®] ist ein eingetragenes Warenzeichen der Biotype Diagnostic GmbH. ScanArray[®] ist ein eingetragenes Warenzeichen von PerkinElmer, Inc. Die enzymatische Detektion von Sequenzvarianten auf einer planaren Oberfläche ist patentrechtlich geschützt. Patentinhaber ist Oxford Gene Technology (OGT) (Oxford, UK).

2. Übersicht der Arbeitsschritte

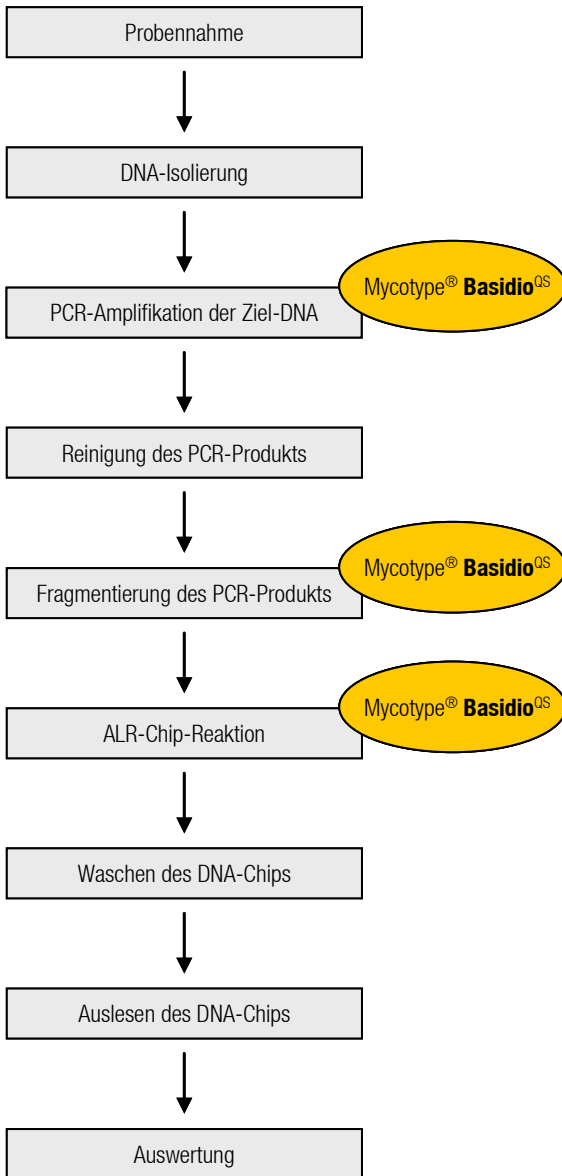


Abb. 1 Von der Probe bis zum Gutachten - Bestimmung von Hautfäulepilzen mit Hilfe des Mycotype® Basidio^{QS}

3. Kurzanleitung

Vor Versuchsbeginn sollte die ausführliche Versuchsanleitung (Kapitel 4, ab Seite 10) sorgfältig gelesen werden.

Probennahme und DNA-Isolierung

- Empfehlungen siehe Kapitel 4.1 (Seite 10)
- Die DNA sollte je nach Farbeintrübung 1:10 bis 1:50 mit 0.1x TE-Puffer verdünnt werden, falls diese durch Fällung gereinigt wurde
- Die DNA kann unverdünnt eingesetzt werden, falls diese mit Hilfe einer Zentrifugationssäule gereinigt wurde

PCR Amplifikation der Ziel-DNA

- Alle Reagenzien kurz mischen (Vortex) und zentrifugieren (ca. 5 s)

Komponente	Anzahl der PCR-Ansätze			
	1	5	9	17
PCR Mix	23.8 µl	119.0 µl	214.2 µl	404.6 µl
DNA Polymerase	0.2 µl	1.0 µl	1.8 µl	3.4 µl
<i>Volumen des PCR Master Mixes</i>	<i>24.0 µl</i>	<i>120.0 µl</i>	<i>216.0 µl</i>	<i>408.0 µl</i>

- Master Mix kurz mischen (Vortex) und zentrifugieren (ca. 5 s)
- Master Mix auf die Reaktionsgefäße verteilen und mit je 1 µl Proben-DNA versetzen
- PCR-Ansätze kurz mischen (Vortex) und zentrifugieren (ca. 5 s)

Amplifikationsparameter

Temperatur	Zeit	
94°C	4 min	
94°C	30 s	
60°C	60 s	35 Zyklen
72°C	60 s	
72°C	7 min	
10°C	∞	bis zum Ende

Analyse der PCR-Produkte (optional)

- Maximal 5 µl des PCR-Ansatzes können z. B. mit Hilfe der Agarosegelelektrophorese analysiert werden
- Ein schwaches ~650 bp großes PCR-Produkt (5 ng / 5 µl) ist ausreichend für eine erfolgreiche ALR

Reinigung der PCR-Produkte

- PCR-Produkte mit einem PCR-Reinigungskit aufreinigen und in je 22 µl Elutionspuffer eluieren
- Empfehlung siehe Kapitel 4.5 (Seite 14)

DNA-Fragmentierung

Komponente	Volumen
gereinigtes PCR Produkt	20.0 µl
DNA Glycosylase	1.0 µl

- mischen (Vortex) und kurz zentrifugieren (ca. 5 s)

- 15 min fragmentieren bei 37°C

- mind. 10 min denaturieren bei 95°C

* **Achtung:** Die 95°C-heißen Proben müssen direkt in die ALR eingesetzt werden.

Arrayed Ligation Reaction (ALR)

- Heizblock auf 58°C vorwärmen und das Feuchtigkeitsreservoir mit ddH₂O befüllen

- DNA-Chips auf die vorgesehenen Flächen positionieren

- Alle Reagenzien kurz mischen (Vortex) und zentrifugieren (ca. 5 s)

Bemerkung: DNA-Chips auf der Rückseite außerhalb der Arrays mit einem Lackstift beschriften. Markierungen auf der Mikrofluidik würden im späteren Schritt mit dem Ablösen der Folie verlorengehen!

Komponente	Anzahl der ALR-Ansätze			
	1	5	9	17
ALR Mix	5.7 µl	28.5 µl	51.3 µl	96.9 µl
DNA Ligase	3.3 µl	16.5 µl	29.7 µl	56.1 µl
<i>Volumen des ALR Master Mixes</i>	<i>9.0 µl</i>	<i>45.0 µl</i>	<i>81.0 µl</i>	<i>153.0 µl</i>

- Master Mix kurz mischen (Vortex) und zentrifugieren (ca. 5 s)

Komponente	Volumen
fragmentiertes, denaturiertes 95°C-heißes PCR Produkt	21.0 µl
ALR Master Mix	9.0 µl

- mischen (Vortex) und kurz zentrifugieren (ca. 5 s)

- Gemisch direkt in die Füllstutzen der Mikrofluidik einfüllen

* **Achtung:** Das fragmentierte und denaturierte PCR-Produkt muss bis zum Gebrauch bei 95°C temperiert werden. Der ALR-Ansatz muss mit hoher Geschwindigkeit und hohem Druck in die Füllstutzen der Mikrofluidik pipettiert werden.

- Wenn alle Arrays beladen sind, den Microarray-Heizblock *verschließen und für 20 min bei 58°C temperieren

* Alternativ kann anstelle eines Microarray-Heizblocks auch eine Hybridisierungskammer, zusammen mit einem temperierbaren Wasserbad verwendet werden.

Waschen der DNA-Chips

- Mikrofluidik der DNA-Chips abziehen

- DNA-Chips in einen Färbekorb aus Edelstahl stellen und 1 min in 95°C heißes Wasser eintauchen

- DNA-Chips für 2 min in 50°C 0.3 % (w/v) Alconox-Lösung (bestehend aus 1/3 Vol. 1 % (w/v) Alconox sowie 2/3 Vol. 95°C ddH₂O) leicht hin- und herschwenken

- DNA-Chips dreimal hintereinander ca. 1 min in frisches 95°C ddH₂O eintauchen

- DNA-Chips mit gasförmigem Stickstoff säubern und trocknen

- Alternativ können die DNA-Chips im Färbekorb mit einem Papiertuch als Unterlage in einen Ausschwingrotor für Mikrotiterplatten gestellt und 1 min bei 150 x g zentrifugiert werden

Auslesen und Auswertung

- Scanner mit Hilfe des Kalibrierungsslides kalibrieren
- Dazu eine beliebige Fläche der Größe eines Mycotype® **Basidio**^{QS}-Arrays (~5.2 x 6.2 mm) auswählen und das Kalibrierungsslide mit den Einstellungen für Cyanine 5 (Cy5, 633 nm) einlesen
- Die PMT- und Laserstärke des Scanners so einstellen, dass der gemittelte RFU-Wert den dem Kit beigefügten Angaben entspricht
- DNA-Chips mit den Einstellungen für Cyanine 5 (Cy5, 633 nm) einlesen und den Bereich des Scanfelds auf die Größe des/der Arrays begrenzen
- Bild im 16-Bit TIF-Format speichern
- Signalintensitäten mit der MycoProof **Basidio** Software auswerten (für nähere Ausführungen siehe Kapitel 4.10, Seite 16)

4. Ausführliche Versuchsanleitung

4.1 Probennahme

Um eine optimale Analyse der Hausfäuleproben zu gewährleisten, wird folgende Vorgehensweise bei der Probennahme empfohlen:

- Probennahme an einer charakteristischen Befallsstelle durch qualifizierte Mitarbeiter (Sachkundige od. Sachverständige) möglichst steril durchführen (vgl. EPA 815-B-04-001)
- Bevorzugte Beprobung von sichtbaren Pilzstrukturen (Fruchtkörpern, Oberflächenmyzelien) an frischen, unverschmutzten Befallsstellen
- Dokumentation des Orts der Probennahme (Fotos, holzschutzsachverständige Beschreibung)
- Verschiedene Proben eines Untersuchungsobjektes müssen unbedingt getrennt verpackt werden
- Probenmenge nicht zu gering wählen
- Luftundurchlässige Verpackung meiden, geeignet sind z. B. Papierkuverts bzw. Briefumschläge, sehr feuchtes Material kann in reichlich Zeitungspapier eingewickelt werden; trockenes Material kann jedoch auch in Fotodosen oder Kunststofftüten verpackt werden.
- Die Proben ohne Verzögerung im Labor analysieren. Falls eine Probenlagerung erforderlich ist, sollte diese im Kühlschrank (4°C) erfolgen.

4.2 DNA-Isolierung

Nachfolgend sind Methoden zur Isolierung der Pilz-DNA aus dem Probenmaterial beschrieben. Diese Methoden wurden validiert und eignen sich für die Durchführung des Mycotype® **Basidio**^{OS}. Es wird empfohlen das „NucleoSpin® Plant II“-Kit (Macherey-Nagel GmbH & Co.KG) zu verwenden.

Reinigung der Werkbank

Um Kontaminationen zu vermeiden, sollte die DNA-Isolation soweit möglich unter einer Sicherheitswerkbank der Klasse II durchgeführt werden. Zur Desinfektion wird nach bzw. vor der DNA-Isolation „Braun Meliseptol rapid“ (B. Braun Petzold GmbH) auf die zu dekontaminierende Oberfläche gesprüht und mindestens 10 min einwirken gelassen. Anschließend wird die Oberfläche 15 min mit UV-Licht bestrahlt.

Für weitere Anleitungen der GLP (Good Laboratory Practice) siehe: United States Environmental Protection Agency (EPA): Quality Assurance/Quality Control Guidance for Laboratories Performing PCR Analyses on Environmental Samples, (www.epa.gov/nerlcwww/qa_qc_pcr10_04.pdf) EPA 815-B-04-001, October 2004

DNA-Isolierung mit Hilfe einer Zell-Kugelmühle

- Ausgangsmaterial: Fruchtkörper, Myzelien oder pilzgeschädigtes Holz
 Geräteanforderung: Zell-Kugelmühle; z. B. Schwingmühle MM 400 (Retsch GmbH) o. Homogenisator Precellys® 24 (PEQLAB Biotechnologie GmbH)
 Reagenzien: NucleoSpin® Plant II (Macherey-Nagel GmbH & Co.KG)

Achtung: Um Kontaminationen zu vermeiden, müssen die Geräte DNA-frei und entsprechend gereinigt sein (siehe Seite 12, Reinigung der Geräte)

Die detaillierte Durchführung ist dem Handbuch des NucleoSpin® Plant II (Macherey-Nagel-07/2009, Rev.03) Kapitel 5.2 ab Seite 19 zu entnehmen.

- Probenmaterial ggf. mit Hilfe eines sterilen Skalpells auf 1.0 bis 5.0 mm große Stücke zerkleinern
- 10 bis 100 mg Myzel bzw. Fruchtkörper oder 50 bis 200 mg pilzgeschädigtes Holz einwiegen
- Problematische Proben sollte ggf. in Flüssigstickstoff mit Hilfe einer Zell-Kugelmühle vorzerkleinert werden. Dazu das eingewogene Probenmaterial mit 150 mg Silicon Glas Kugeln oder 6 Stahlkugeln (Ø 8 mm) in 1.5 ml Reaktionsröhrchen 3 bis 5 min zermahlen (Retsch: 30 Hz; PEQLAB: 60 Hz).
- 200 µl des Puffers PL1 sowie falls noch nicht erfolgt 150 mg Silicon Glas Kugeln oder 6 Stahlkugeln (Ø 8 mm) zugeben und 3 bis 5 min zermahlen (Retsch: 30 Hz; PEQLAB: 60 Hz)
- Die zermahlene Probe in ein neues 1.5 ml Reaktionsröhrchen überführen
- 10 µl RNase A oder Proteinase K (5-10 mg/ml Stammlösung) zugeben und für 10 min bei 65°C inkubieren
- 100 µl Chloroform zugeben (**Achtung:** unter einem Laborabzug arbeiten), das Gemisch 10 s mischen (Vortex) und 15 min bei 20,000x g zentrifugieren, um die Phasen zu trennen
- Überstand in ein neues 1.5 ml Reaktionsgefäß überführen
- Das weitere Vorgehen ist dem Handbuch des NucleoSpin® Plant II (Macherey-Nagel-07/2009, Rev.03) Kapitel 5.1 ab Schritt 3 Seite 16 zu entnehmen.

DNA-Isolierung mit Hilfe eines Handmörserers

- Ausgangsmaterial: Fruchtkörper, Myzelien oder pilzgeschädigtes Holz
 Geräteanforderung: Handmörser mit Pistill (DNA dekontaminiert)
 Reagenzien: NucleoSpin® Plant II (Macherey-Nagel GmbH & Co.KG)

Achtung: Um Kontaminationen zu vermeiden, müssen die Geräte DNA-frei und entsprechend gereinigt sein (siehe Seite 12, Reinigung der Geräte)

Die detaillierte Durchführung ist dem Handbuch des NucleoSpin® Plant II (Macherey-Nagel-07/2009, Rev.03) Kapitel 5.2 ab Seite 19 zu entnehmen.

- Probenmaterial ggf. mit Hilfe eines sterilen Skalpells auf 1.0 bis 5.0 mm große Stücke zerkleinern
- 10 bis 100 mg Myzel bzw. Fruchtkörper oder 50 bis 200 mg pilzgeschädigtes Holz einwiegen
- Eingewogene Probe in einen DNA-freien Handmörser überführen, 200 µl des Puffers PL1 zugeben und mindestens 30 s zermahlen (problematische Proben ggf. in Flüssigstickstoff zermahlen; sehr festes Probenmaterial sollte einige Minuten quellen gelassen werden)
- Das Probenmaterial bis zur vollständigen Homogenität mindestens 30 s zermahlen
- homogenisierte Probe in ein 1.5 ml Reaktionsgefäß überführen (falls die Probe zu viskos sein sollte, ggf. 100 µl des Puffers PL1 zugeben)
- 10 µl RNase A oder Proteinase K (5-10 mg/ml Stammlösung) zugeben und für 10 min bei 65°C inkubieren
- 100 µl Chloroform zugeben (**Achtung:** unter einem Laborabzug arbeiten), das Gemisch 10 s mischen (Vortex) und 15 min bei 20,000x g zentrifugieren, um die Phasen zu trennen
- Überstand in ein neues 1.5 ml Reaktionsgefäß überführen
- Das weitere Vorgehen ist dem Handbuch des NucleoSpin® Plant II (Macherey-Nagel-07/2009, Rev.03) Kapitel 5.1 ab Schritt 3 Seite 16 zu entnehmen.

Reinigung der Geräte

Unmittelbar nach der Isolation die verwendeten Geräte (z. B. Handmörser, Edelstahlbecher, Pinzette, etc.) unter der Werkbank in Desinfektionslösung (z. B. 3 % Korsorex basic, BODE Chemie GmbH) einlegen. Nach 15 min die Geräte herausnehmen und mit Wasser gründlich abspülen. Anschließend werden die verwendeten Geräte unter dem Laborabzug in 0.6 % Natriumhypochloridlösung für mindestens 15 min inkubiert. Zur Neutralisation werden die Geräte in 0.1 %iger Natrium-Thiosulfatlösung eingetaucht. Abschließend werden die Geräte mit Wasser gründlich abgespült und mit einem Papiertuch getrocknet.

Alternativ zur Natriumhypochlorid-Reinigung können die Geräte und auch die Oberflächen mit DNA-ExitusPlus (AppliChem GmbH) behandelt werden. Dazu die Geräte bzw. Oberflächen einsprühen oder in ein Tauchbad legen, 15 min bei RT einwirken lassen und anschließend mit Wasser abspülen.

Die Biotype Diagnostic GmbH übernimmt keine Haftung für die Chemikalien- und Temperaturbeständigkeit der Geräte. Dieses ist beim Hersteller zu erfragen.

4.3 PCR Amplifikation

Als Template-DNA dient die aus Schritt 4.2 gewonnene DNA. Falls die DNA mit Hilfe eines Fällungsschritts gereinigt wurde, sollte diese je nach Farbeintrübung 1:10 bis 1:50 mit 0.1x TE-Puffer verdünnt werden. Falls die DNA mit Hilfe einer Zentrifugations-säule gereinigt wurde, kann diese unverdünnt eingesetzt werden. Durch die Säulen-reinigung werden PCR-Inhibitoren wie z. B. Huminsäuren oder Polysaccharide wie Inulin, Pektin oder Xylan entfernt.

Die folgende Tabelle zeigt die Volumina der einzusetzenden PCR Reagenzien bei 1 µl Probenvolumen (Template-DNA) in einem Reaktionsvolumen von 25 µl. Bei der Analyse mehrerer Proben sollte ein PCR Master Mix hergestellt werden. Fügen Sie zu der Probenanzahl eine weitere Reaktion hinzu, um Pipettierfehler zu kompensieren. Das Testkit enthält für vier Reaktionen zusätzliche Reagenzien für eine weitere Reaktion. Alle Reagenzien sollten vor dem Ansetzen des PCR Master Mixes gemischt (Vortex) und kurz zentrifugiert werden (ca. 5 s).

Komponente	Anzahl der PCR-Ansätze			
	1	5	9	17
PCR Mix	23.8 µl	119.0 µl	214.2 µl	404.6 µl
DNA Polymerase	0.2 µl	1.0 µl	1.8 µl	3.4 µl
<i>Volumen des PCR Master Mixes</i>	<i>24.0 µl</i>	<i>120.0 µl</i>	<i>216.0 µl</i>	<i>408.0 µl</i>

Der PCR Master Mix wird gemischt (Vortex), kurz zentrifugiert (ca. 5 s), auf die Reaktionsgefäße verteilt und mit der jeweiligen Proben-DNA versetzt. Vor der PCR werden die PCR-Ansätze gemischt (Vortex) und kurz zentrifugiert (ca. 5 s).

Amplifikationsparameter

Temperatur	Zeit	
94°C	4 min	
94°C	30 s	
60°C	60 s	35 Zyklen
72°C	60 s	
72°C	7 min	
10°C	∞	bis zum Ende

Zur Unterbrechung der Analyse kann das PCR-Produkt bei -20°C gelagert werden.

4.4 Analyse der PCR-Produkte (optional)

Um die PCR Amplifikation zu kontrollieren, ist es möglich maximal 5 µl eines 25 µl-PCR-Ansatzes, z. B. mit Hilfe der Agarosegelelektrophorese, zu analysieren. Das zu erwartende Amplifikat der Pilz-DNA hat eine Größe von ~650 bp. Wenn eine geringe Produktbildung (5 ng / 5 µl) nachzuweisen ist, liegt ausreichend Target-DNA für eine erfolgreiche ALR-Analyse vor. Es ist zu beachten, dass auch bei nicht nachzuweisendem PCR-Produkt, eine erfolgreiche ALR-Analyse möglich sein kann.

Bemerkung: Das Testkit enthält die 1.5-fache Menge an PCR-Reagenzien, um für die Hälfte der Reaktionen eine Wiederholung der PCR zu gewährleisten.

4.5 Reinigung der PCR-Produkte

Nach der PCR werden die Produkte mit einem kommerziellen PCR-Reinigungskit gereinigt und in je 22 µl Elutionspuffer eluiert. Um den Verlust an PCR-Produkten sowohl der Pilz-DNA, als auch der PCR-Positivkontrolle möglichst gering zu halten, wird die Verwendung des NucleoSpin[®] Extract II (Macherey-Nagel GmbH & Co.KG) oder des MinElute PCR Purification Kit (Qiagen GmbH) empfohlen.

Zur Unterbrechung der Analyse kann das gereinigte PCR-Produkt bei -20°C gelagert werden.

4.6 Fragmentierung und Denaturierung der PCR-Produkte

Es wird empfohlen, zwei Heizblöcke für Reaktionsgefäße zuvor auf 37°C bzw. 95°C zu temperieren. Gegebenenfalls können die Inkubationsschritte auch in einem PCR-Cycler durchgeführt werden.

Komponente	Volumen
gereinigtes PCR Produkt	20,0 µl
DNA Glycosylase	1,0 µl
<hr/>	
- mischen (Vortex) und kurz zentrifugieren (ca. 5 s)	
- 15 min fragmentieren bei 37°C	
- mind. 10 min denaturieren bei 95°C	

Achtung: Die 95°C-heißen Proben müssen direkt in die ALR eingesetzt werden.

4.7 Arrayed Ligation Reaction (ALR)

Vorbereitung der ALR

Während der DNA-Fragmentierung und Denaturierung sollte die ALR vorbereitet werden. Dazu den Microarray-Heizblock auf 58°C vorheizen und das Feuchtigkeitsreservoir mit ddH₂O benetzen. Die DNA-Chips auf der Rückseite außerhalb der Arrays mit einem Lackstift beschriften, da die Markierungen auf der Mikrofluidik im späteren Schritt mit dem Ablösen der Folie verlorengehen würden. Die DNA-Chips auf die vorgesehenen Flächen des Microarray-Heizblocks positionieren.

In einem späteren Schritt muss der ALR-Ansatz mit hoher Geschwindigkeit und hohem Druck in die Füllstutzen der Mikrofluidik pipettiert werden. Um ein fehlerfreies Befüllen der Mikrofluidikkammern zu erreichen, wird empfohlen den Befüllvorgang mit dem mitgelieferten Testslide und Wasser zu üben.

Die folgende Tabelle zeigt die Volumina der einzusetzenden ALR Reagenzien bei 21 µl Probenvolumen (Target-DNA) in einem Reaktionsvolumen von 30 µl. Bei der Analyse mehrerer Proben sollte ein ALR Master Mix hergestellt werden. Fügen Sie zu der Probenanzahl eine weitere Reaktion hinzu, um Pipettierfehler zu kompensieren. Das Testkit enthält für vier Reaktionen zusätzliche Reagenzien für eine weitere Reaktion. Alle Reagenzien sollten vor dem Ansetzen des ALR Master Mixes gemischt (Vortex) und kurz zentrifugiert werden (ca. 5 s).

Komponente	Anzahl der ALR-Ansätze			
	1	3	5	9
ALR Mix	5.7 µl	17.1 µl	28.5 µl	51.3 µl
DNA Ligase	3.3 µl	9.9 µl	16.5 µl	29.7 µl
<i>Volumen des ALR Master Mixes</i>	<i>9.0 µl</i>	<i>27.0 µl</i>	<i>45.0 µl</i>	<i>81.0 µl</i>

Der ALR Master Mix wird gemischt (Vortex) und kurz zentrifugiert (ca. 5 s).

Durchführung der ALR

Unmittelbar nach dem 95°C-Inkubationsschritt wird das fragmentierte und denaturierte PCR-Produkt kurz zentrifugiert (ca. 5 s) und wie folgt komplementiert:

Komponente	Volumen
fragmentiertes, denaturiertes 95°C-heißes PCR Produkt	21.0 µl
ALR Master Mix	9.0 µl
- mischen (Vortex) und kurz zentrifugieren (ca. 5 s)	
- Gemisch direkt in die Füllstutzen der Mikrofluidik einfüllen	

*** Achtung:** Das fragmentierte und denaturierte PCR-Produkt muss bis zum Gebrauch bei 95°C temperiert werden. Der ALR-Ansatz muss mit hoher Geschwindigkeit und hohem Druck in die Füllstutzen der Mikrofluidik pipettiert werden.

Wenn alle Arrays beladen sind den Microarray-Heizblock* verschließen und für 20 min bei 58°C temperieren.

* Alternativ kann anstelle eines Microarray-Heizblocks auch eine Hybridisierungskammer, zusammen mit einem temperierbaren Wasserbad verwendet werden.

4.8 Waschen der DNA-Chips

Die Mikrofluidik mit Hilfe der Lasche vom DNA-Chip lösen. Das Ablösen kann zur Erleichterung in einem lauwarmen Wasserbad (~30°C) durchgeführt werden. Unmittelbar danach den DNA-Chip in einen Färbekorb aus Edelstahl stellen und für 1 min in 95°C ddH₂O eintauchen. Danach werden die DNA-Chips für 2 min in 50°C 0.3 % (w/v) Alconox-Lösung (bestehend aus 1/3 Vol. 1 % (w/v) Alconox sowie 2/3 Vol. 95°C ddH₂O) unter leichtem Schwenken gewaschen. Die DNA-Chips dreimal hintereinander ca. 1 min in frisches 95°C ddH₂O eintauchen. Abschließend werden die DNA-Chips aus dem Wasserbad gehoben und direkt mit gasförmigem Stickstoff gereinigt und getrocknet. Dieser Schritt ist erforderlich, um die Hintergrundsignale zu minimieren. Alternativ können die DNA-Chips zum Entfernen von Reaktionsrückständen zentrifugiert werden. Dazu den Färbekorb mit einem Papiertuch als Unterlage in einen Ausschwingrotor für Mikrotiterplatten stellen und 1 min bei 150 x g zentrifugieren.

Bemerkung: Die Temperierung des 95°C ddH₂O kann mit Hilfe eines handelsüblichen Wasserkochers oder Mikrowellenherds durchgeführt werden.

4.9 Auslesen der DNA-Chips

Das Auslesen der DNA-Chips erfolgt mit Hilfe von handelsüblichen Fluoreszenzscannern mit den Einstellungen für Cyanine 5 (Cy5, 633 nm). Abhängig von der Kit-

Charge kann es zu Schwankungen der Performance und damit der Signalintensität der Sonden kommen. Um eine gleichbleibend hohe Qualität der Ergebnisse zu gewährleisten, müssen die PMT- und Laserstärken des Scanners für jede DNA-Chip-Charge kalibriert werden.

Dazu in der Steuerungssoftware des Scanners eine beliebige Fläche der Größe eines Mycotype® **Basidio**^{QS}-Arrays (~5.2 x 6.2 mm) auswählen und das Kalibrierungsslide einlesen. Mit Hilfe der ALR-Software MycoProof **Basidio** die Signalintensitäten des Kalibrierungsslides auswerten. Hierbei wird der gemittelte RFU-Wert aller Pixel berechnet. Die PMT- und Laserstärke des Scanners so einstellen, dass der gemittelte RFU-Wert den dem Kit beigefügten Angaben (gelber Papierbogen) entspricht.

DNA-Chips mit den Einstellungen für Cyanine 5 (Cy5, 633 nm) einlesen und den Bereich des Scafelds auf die Größe des/der Arrays begrenzen. Das Bild im 16-Bit TIF-Format speichern.

Positionen der Subarrays:

- Array 1: x = 9.75 mm; y = 16.75 mm
- Array 2: x = 9.75 mm; y = 32.75 mm
- Array 3: x = 9.75 mm; y = 48.75 mm
- Array 4: x = 9.75 mm; y = 64.75 mm

* **Achtung:** Die Signalintensitäten der PCR-Positivkontrolle sollten in einem Bereich von 25,000 bis 55,000 RFU liegen. Andernfalls sollten die PMT- und Laserstärken des Scanners nachträglich angepasst werden.

4.10 Auswertung

Das TIF-Bild wird mit der ALR-Software MycoProof **Basidio** der Biotype Diagnostic GmbH geöffnet, worauf eine automatische Auswertung erfolgt und die Ergebnisse direkt abgelesen werden können. Details sind dem Handbuch von MycoProof **Basidio** zu entnehmen.

Um eine eindeutige Spezifität zu gewährleisten, kann ein bestimmter prozentualer Anteil des Nutzsignals eines anderen Merkmals subtrahiert werden. Folgende Sonden werden miteinander verrechnet:

- **AntVai1a** minus 1 % des Mittelwerts von SerLac2a und SerLac2b, wenn ConMar6a > 1000 RFU und SerLac > 2000 RFU
- **ConOli7a** minus 6 % des Mittelwerts von ConMar4a und ConMar6a
- **DaeQue2a** minus 6 % des Mittelwerts von AntXan1a und AntXan2a
- **GloSep1a** minus 10 % des Mittelwerts von AntSin1a und AntSin2a
- **LeuPin2a** minus 3 % des Mittelwerts von PleSpp1a und PleSpp2a
- **PleSpp1a** minus 2 % des Mittelwerts von AntXan1a und AntXan2a
- **SteSpp1a** minus 4 % des Mittelwerts von PleSpp1a und PleSpp2a
- **SteSpp1b** minus 5 % des Mittelwerts von FomPin4a und FomPin5a
- **TapPan2b** minus 4 % des Mittelwerts von LaeSpp1a und LaeSpp2a minus 2,5 % des Mittelwerts von PleSpp1a und PleSpp2a

- Ein Spot einer Positivkontrolle ist dann gültig, wenn die Sonde gefunden wurde und das Nutzsignal über 1500 RFU liegt. Ein Spot einer Negativkontrolle darf nicht gefunden werden bzw. muss unter 1500 RFU liegen, damit deren Ergebnis als gültig interpretiert wird. Ein Qualitätsmerkmal ist dann gültig, wenn alle zugehörigen Spots gültig sind. Andernfalls ist das Merkmal ungültig.
- Jedem Pilzmerkmal (z. B. *Antrodia sinuosa*) sind zwei unterschiedliche Sonden (z. B. AntSin1a, AntSin2a), die als Duplikate (Sonde / Referenzsonde) vorhanden sind, zugeordnet. Somit gehen vier Spots in die Berechnung eines Merkmals ein. Das Ergebnis eines Pilzmerkmals ist positiv, wenn mindestens eine Sonde (z. B. AntSin1a) vollständig gefunden wurde (Spot und Referenzspot) und der berechnete numerische Endwert über 1500 RFU liegt. Andernfalls ist das Merkmal negativ.

5. Das Prinzip des Mycotype® Basidio^{OS}

5.1 PCR Amplifikation

Die Identifizierung der Pilze beruht auf der Detektion eines individuellen DNA-Bereichs, der bei jeder Pilzart einzigartig ist. Dieser Bereich ist innerhalb der genomischen rDNA-Region lokalisiert. Die rDNA besteht aus mehreren für den Aufbau der Ribosomen kodierenden und somit konservierten Genabschnitten (18S rDNA, 5.8S rDNA, 28S rDNA und 5S rDNA). Diese sind durch die variablen Regionen *internal transcribed spacer* ITS I und ITS II sowie *intergenic spacer* IGS I und IGS II voneinander getrennt.

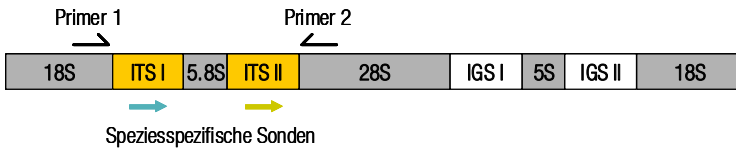


Abb. 2 Schematische Darstellung der rDNA-Zielregion mit den konservierten Genabschnitten für die ribosomalen RNAs (grau) und den variablen Spacer-Regionen ITS I und ITS II (gelb)

Die PCR-Amplifikation der DNA-Zielregion erfolgt mit Hilfe der Primer 1 und Primer 2, die innerhalb der konservierten Bereiche binden. Dieses Primerpaar ermöglicht die spezifische Amplifikation der DNA von Basidiomyceten. Die Identifizierung und Bestimmung der Pilze erfolgt mit Hilfe der ALR durch die artspezifischen und gattungsspezifischen Sonden, die innerhalb der ITS I und ITS II -Regionen binden.

5.2 DNA Fragmentierung

Um eine gleichmäßige und sensitive ALR-Reaktion zu gewährleisten, müssen die PCR-Produkte in kleinere Fragmente zerlegt werden. Dazu erfolgt durch die Uracil-DNA Glycosylase die Hydrolyse der N-glykosidischen Bindungen der in der PCR integrierten dUTPs unter Freisetzung von Uracil. Bei dem anschließenden 95°C-Inkubationsschritt werden die PCR-Produkte thermisch gespalten und denaturiert, so dass nun einzelsträngige, kurze DNA-Fragmente vorliegen.

5.3 Arrayed Ligation Reaction (ALR)

Die DNA-Chip-Technologie ermöglicht die Anordnung verschiedener, spezifischer DNA-Sonden in hoher Anzahl und Dichte auf einer kleinen, planaren Fläche. Grundlegend basieren DNA-Chip-Versuche auf dem Hybridisierungsereignis komplementärer DNA-Stränge. Bei der hier durchgeführten ALR findet zusätzlich zur Hybridisierungsreaktion eine spezifische Enzymreaktion statt, wobei ein farbmarkiertes DNA-Oligonucleotid kovalent an die DNA-Sonde und damit an den DNA-Chip gebunden wird (Abb. 3). Diese Ligationsreaktion findet jedoch nur dann statt, wenn die DNA-Zielsequenz zu der Sonde und zum Ligationisligonucleotid komplementär ist. Dadurch wird eine spezifische Identifizierung der Pilze gewährleistet. Die Detektion erfolgt über die Fluoreszenzfarbstoffmarkierung der Ligationisligonucleotide mit Hilfe eines Scanners.

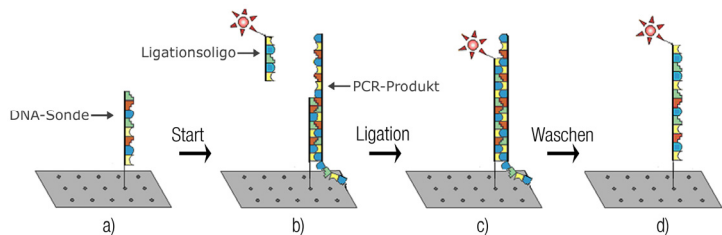


Abb. 3 Schematische Darstellung der ALR. a) Produktfertige DNA-Chips b) Hybridisierung des PCR-Produkts an die komplementäre DNA-Sonde c) Ligation des fluoreszenzmarkierten Ligationisligonucleotids an die DNA-Sonde d) Waschen der DNA-Chips.

6. Anhang

Tabelle 3. Merkmale und Sonden

Merkmal	Sonde	Referenzsonde
<i>Antrodia sinuosa</i>	AntSin1a	AntSin2a
<i>Antrodia vaillantii</i>	AntVai1a	AntVai2a
<i>Antrodia xantha</i>	AntXan1a	AntXan2a
<i>Bjerkandera adusta</i>	BjeAdu1a	BjeAdu2a
<i>Coniophora arida</i>	ConAri1a	ConAri2a
<i>Coniophora marmorata</i>	ConMar4a	ConMar6a
<i>Coniophora olivacea</i>	ConOli5a	ConOli7a
<i>Coniophora puteana</i>	ConPut1a	ConPut2a
<i>Daedalea quercina</i>	DaeQue1a	DaeQue2a
<i>Donkioporia expansa</i>	DonExp1c	DonExp1f
<i>Fomitopsis pinicola</i>	FomPin4a	FomPin5a
<i>Gloeophyllum abietinum</i>	GloAbi1e2	GloAbi1e3
<i>Gloeophyllum sepiarium</i>	GloSep1a	GloSep2a
<i>Gloeophyllum trabeum</i>	GloTra1a	GloTra2a
<i>Laetiporus spp.</i>	LaeSpp1a	LaeSpp2a
<i>Leucogyrophana mollusca</i>	LeuMol1a	LeuMol2a
<i>Leucogyrophana pinastris</i>	LeuPin1a	LeuPin2a
<i>Neo/Lentinus lepideus</i>	LenLep1a	LenLep2a
<i>Oligoporus placenta</i>	OliPla1d	OliPla2a
<i>Phellinus ferruginosa</i>	PheFer1a	PheFer2a
<i>Pleurotus spp.</i>	PleSpp1a	PleSpp2a
<i>Schizophyllum commune</i>	SchCom1a	SchCom2a
<i>Serpula lacrymans</i>	SerLac2a	SerLac2b
<i>Serpula himantioides</i>	SerHim2a	SerHim2b
<i>Stereum spp.</i>	SteSpp1a	SteSpp1b
<i>Tapinella panuoides</i>	TapPan1b	TapPan2b
<i>Trametes (Coriolus) versicolor</i>	TraVer1a	TraVer2b
PCR-Positivkontrolle	PCR-PK	
ALR-Positivkontrolle	ALR-PK	
ALR-Negativkontrolle	ALR-NK	
Fluoreszenzmarker	FLU-PK	

Tabelle 4. Layout des Microarrays

Position	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	ALR-PK	ALR-NK	AntSin1a	AntSin2a	AntVar1a	AntVar2a	AntXan1a	AntXan2a	BjeAdu1a	BjeAdu2a	-	FLU-PK
B	ALR-NK	-	ComAri1a	ComAri2a	ComMar4a	ComMar6a	ComOli5a	ComOli7a	ComPut1a	ComPut2a	DaeQue1a	DaeQue2a
C	DonExp1c	DonExp1f	FomPin4a	FomPin5a	GloAbi1e2	GloAbi1e3	GloSep1a	GloSep2a	GloTra1a	GloTra2a	LaeSpp1a	LaeSpp2a
D	LeuMol1a	LeuMol2a	LeuPin1a	LeuPin2a	LenLept1a	LenLept2a	OliPla1d	OliPla2a	PheFer1a	PheFer2a	PleSpp1a	PleSpp2a
E	SchCom1a	SchCom2a	SerLac2a	SerLac2b	SerHim2a	SerHim2b	SteSpp1a	SteSpp1b	TapPan1b	TapPan2b	TraVer1a	TraVer2b
F	AntSin1a	AntSin2a	AntVal1a	AntVal2a	AntXan1a	AntXan2a	BjeAdu1a	BjeAdu2a	ComAri1a	ComAri2a	ComMar4a	ComMar6a
G	ConOli5a	ConOli7a	ComPut1a	ComPut2a	DaeQue1a	DaeQue2a	DonExp1c	DonExp1f	FomPin4a	FomPin5a	GloAbi1e2	GloAbi1e3
H	GloSep1a	GloSep2a	GloTra1a	GloTra2a	LaeSpp1a	LaeSpp2a	LeuMol1a	LeuMol2a	LeuPin1a	LeuPin2a	LenLept1a	LenLept2a
I	PCR-PK	OliPla1d	OliPla2a	PheFer1a	PheFer2a	PleSpp1a	PleSpp2a	SchCom1a	SchCom2a	SerLac2a	SerLac2b	PCR-PK
J	FLU-PK	SerHim2a	SerHim2b	SteSpp1a	SteSpp1b	TapPan1b	TapPan2b	TraVer1a	TraVer2b	-	ALR-PK	ALR-PK

Exemplarisches Bild eines Mycotype® Basidio^{OS} Microarrays

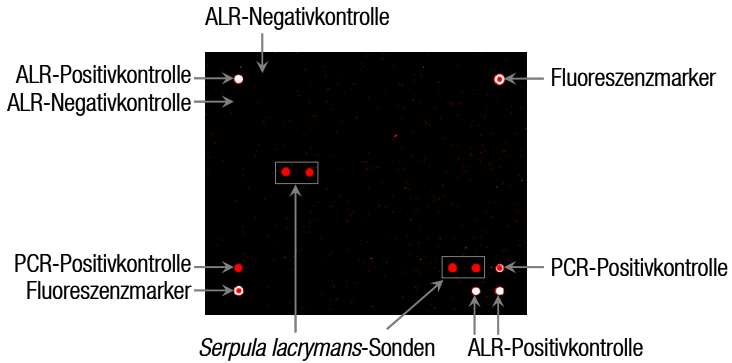


Abb. 4 Exemplarisches Bild eines Mycotype® Basidio^{OS} Microarrays nach der Analyse einer *Serpula lacrymans*-Probe. Die Positionen der Kontrollsonden sowie der *Serpula lacrymans*-Sonden sind angezeigt.

Notizen

Notizen