



Duplex TBEV qRT-PCR Kit

Zawartość zestawu

Składnik	Nr kat. E0461-01 50 reakcji po 20 µl	Nr kat. E0461-02 100 reakcji po 20 µl
TBEV Buffer Mix brązowa probówka	2 x 360 µl	4 x 360 µl
TBEV Enzyme Mix pomarańczowa nakrętka	45 µl	90 µl
IC-internal control niebieska nakrętka	1 x 500 µl	2 x 500 µl
PC-positive control czarna nakrętka	1 x 100 µl	1 x 200 µl
RNase free water przezroczysta nakrętka	1 x 500 µl	1 x 500 µl

Przechowywanie

Wszystkie składniki zestawu należy przechowywać w temperaturze -20°C. Unikać wielokrotnego rozmrażania i zamrażania (> 2), ponieważ może to zmniejszyć czułość testu. Odczynnik należy zamrozić w mniejszych porcjach, jeśli jest używany tylko sporadycznie.

Opis

- Duplex TBEV qRT-PCR Kit jest gotowym do użycia zestawem do wykrywania RNA wirusa TBEV (wirus kleszczowego zapalenia mózgu) w próbkach tkanek zwierzęcych (kleszcz, człowiek).
- Zestaw umożliwia wykrywanie wszystkich trzech podtypów wirusa TBEV: europejskiego, syberyjskiego i dalekowschodniego.
- Zestaw zawiera niezbędne odczynniki do amplifikacji fragmentu genomu wirusa TBEV, którego wykrywanie opiera się na specyficznej sondzie znakowanej barwnikiem FAM.
- Dodatkowo zestaw zawiera drugi, heterologiczny system amplifikacji do monitorowania poprawności procesu izolacji RNA i identyfikacji możliwej inhibicji reakcji PCR. Kontrola wewnętrzna składa się z egzogenego fragmentu kwasu nukleinowego, starterów i sondy znakowanej barwnikiem HEX. Amplifikacja kontroli wewnętrznej nie zakłóca procesu amplifikacji RNA wirusa TBEV i potwierdza poprawność procesu izolacji RNA oraz reakcji PCR.
- Kontrola wewnętrzna (IC-internal control) może być dodana na etapie izolacji RNA (**pkt a**) - wtedy stanowi zarówno kontrolę procesu oczyszczania RNA (kontrolę ekstrakcji), jak i inhibicji reakcji PCR lub wyłącznie na etapie PCR (**pkt b**) - do oceny jakości oczyszczonego RNA i inhibicji reakcji PCR.
 - a. Kontrolę wewnętrzną IC należy dodać do buforu lizującego lub mieszaniny buforu lizującego i pobranej próbki (nie dodawać bezpośrednio do pobranej próbki) w ilości 0,1 µl na każdy 1 µl objętości elucji. Oznacza to, że w przypadku elucji buforem elucyjnym o objętości 50 µl należy zastosować 5 µl IC w procesie izolacji RNA. Zaleca się używanie nośnikowego (carrier) RNA przy izolacji wirusowego RNA. Nośnikowe RNA zwiększa wydajność wiązania RNA do membran krzemionkowych w obecności niewielkich ilości materiału genetycznego w próbce oraz zmniejsza prawdopodobieństwo degradacji wirusowego RNA.
 - b. Kontrolę wewnętrzną IC należy dodać do mieszaniny reakcyjnej w ilości 0,5 µl na każde 25 µl reakcji PCR.
- TBEV Buffer Mix zawiera zoptymalizowany bufor reakcyjny, dNTPs, startery, sondy i barwnik referencyjny ROX, natomiast TBEV Enzyme Mix zamiera smART Odwrotną Transkryptazę i onTaq Polimerazę DNA.
- onTaq Polimeraza DNA jest zmodyfikowanym enzymem typu „hotstart”, który jest blokowany w niskich/umiarkowanych temperaturach, co umożliwia przygotowanie reakcji w temperaturze pokojowej.
- Barwnik referencyjny ROX zawarty w TBEV Buffer Mix umożliwia normalizację fluorescencji w niektórych urządzeniach real-time PCR. Użycie barwnika referencyjnego ROX jest konieczne we wszystkich termocyklerach firmy Applied Biosystems i opcjonalne w przypadku termocyklerów firmy Agilent. ROX kompensuje zmiany sygnału fluorescencyjnego między dołkami z powodu niewielkich różnic w objętości reakcji i fluktuacji fluorescencji. Obecność barwnika ROX nie koliduje z PCR w czasie rzeczywistym na urządzeniach niewymagających tego barwnika referencyjnego.
- RNA z tkanek należy wyizolować przy pomocy dowolnego zestawu dedykowanego do oczyszczania całkowitego RNA i RNA wirusowego.

This product is developed, designed and sold exclusively for in vitro use only.

Protokół

Przygotowanie reakcji PCR:

Składnik reakcji	Kontrola negatywna amplifikacji -NAC	Kontrola negatywna ekstrakcji-NEC	Kontrola pozytywna ekstrakcji-PEC	Próbka RNA	Kontrola pozytywna TBEV-TPC
TBEV Buffer Mix	14,2 µl	14,2 µl	14,2 µl	14,2 µl	14,2 µl
TBEV Enzyme Mix	0,8 µl	0,8 µl	0,8 µl	0,8 µl	0,8 µl
IC-internal control (opcjonalnie)	-	-	-	0,5 µl	0,5 µl
PC-positive control	-	-	-	-	5 µl
Próbka oczyszczonej H ₂ O/	-	5 µl	-	-	-
oczyszczonej kontroli wewnętrznej/	-	-	5 µl	-	-
oczyszczonego RNA	-	-	-	5 µl	-
RNase free water	5 µl	-	-	-	-
Objętość reakcji	20 µl	20 µl	20 µl	20-20,5 µl	20-20,5 µl

Uwagi:

1. Jeśli producent urządzenia real-time PCR nie zaleca inaczej, reakcje należy nastawiać w objętości 20 µl.
2. Wszystkie roztwory należy rozmrozić, delikatnie wymieszać i krótko odwirować. TBEV Enzyme Mix powinien być trzymany na lodzie, natomiast reakcje mogą być przygotowywane w temperaturze pokojowej. Należy unikać wielokrotnego (powyżej 2x) rozmrażania i zamrażania TBEV Buffer Mix, ponieważ może to wpłynąć negatywnie na czułość reakcji.
3. Przygotować reakcje PCR zgodnie z powyższą tabelą.
4. Dodać:
 - 5 µl wody (kontrola negatywna amplifikacji-NAC),
 - 5 µl wody oczyszczonej zgodnie z procedurą izolacji RNA (kontrola negatywna ekstrakcji-NEC),
 - 5 µl kontroli wewnętrznej oczyszczonej zgodnie z procedurą izolacji RNA (kontrola pozytywna ekstrakcji-PEC),
 - 5 µl oczyszczonego RNA (próbka RNA),
 - 5 µl Positive Control (kontrola pozytywna TBEV-TPC).
5. Niedodanie 0,5 µl Internal Control w reakcji kontroli pozytywnej TBEV-TPC spowoduje otrzymanie sygnału wyłącznie w kanale FAM. W celu otrzymania sygnału zarówno w kanale FAM jak i HEX, należy dodać do reakcji 0,5 µl IC-internal control. Zwiększenie objętości reakcji PCR dla kontroli pozytywnej TBEV-TPC o 0,5 µl do 20,5 µl (w przypadku przygotowania jednego mixu reakcyjnego dla próbek RNA i kontroli) nie wpływa negatywnie na wydajność reakcji PCR.
6. Krótko zwirować, aby osadzić roztwory na dnie probówek i usunąć pęcherzyki powietrza. Przygotowane reakcje umieścić w termocyklerze zaprogramowanym zgodnie z poniższą tabelą.

This product is developed, designed and sold exclusively for in vitro use only.

EURx Ltd. 80-297 Gdańsk Poland ul. Przyrodników 3, NIP 957-07-05-191, KRS 0000202039
www.eurx.com.pl, orders@eurx.com.pl, tel. +48 58 524 06 97, fax +48 58 341 74 23

Warunki reakcji PCR:

Etap	Temperatura	Czas	Ilość cykli
Odwrotna transkrypcja	50°C	10 min	1
Denaturacja wstępna	95°C	10 min	
Denaturacja	95°C	15 s	45
Przyłączanie starterów/ wydłużanie	60°C	60 s	
Chłodzenie	4°C	∞	1

Uwagi:

1. Należy stosować standardowe tempo zmian temperatury reakcji PCR (ang. standard ramp, standard mode).
2. Analiza fluorescencyjna w kanałach FAM, HEX powinna być wykonywana przez urządzenie na końcu etapu wydłużania. W kanale FAM wykrywany jest fragment genomu TBEV, natomiast w kanale HEX kontrola wewnętrzna—egzogenny fragment kwasu nukleinowego.

Interpretacja wyników:

Rodzaj próbki	Kanał FAM	Kanał HEX	Wynik
Kontrola negatywna amplifikacji-NAC	-	-	prawidłowy
Kontrola negatywna ekstrakcji-NEC	-	-	prawidłowy
Kontrola pozytywna ekstrakcji-PEC	-	+	prawidłowy
Kontrola pozytywna targetu TBEV-TPC (- IC)	+	-	prawidłowy
(+ IC)	+	+	
1	-	+	negatywny TBEV
2	+	+	pozytywny TBEV ⁺
3	+	-	pozytywny TBEV ⁺
4	-	-	nieprawidłowy

This product is developed, designed and sold exclusively for in vitro use only.

EURx Ltd. 80-297 Gdańsk Poland ul. Przyrodników 3, NIP 957-07-05-191, KRS 0000202039
www.eurx.com.pl, orders@eurx.com.pl, tel. +48 58 524 06 97, fax +48 58 341 74 23

Uwagi:

1. Test można uznać za ważny/prawidłowy jeśli:
 - kontrola negatywna amplifikacji-NAC nie daje sygnału zarówno w kanale FAM, jak i HEX,
 - kontrola negatywna ekstrakcji-NEC nie daje sygnału zarówno w kanale FAM, jak i HEX,
 - kontrola pozytywna ekstrakcji-PEC (w przypadku, gdy oczyszczono IC zgodnie z procedurą izolacji RNA) daje sygnał wyłącznie w kanale HEX,
 - kontrola pozytywna TBEV-TPC daje sygnał wyłącznie w kanale FAM, gdy nie dodano do reakcji IC lub w obu kanałach (FAM i HEX), gdy dodano do reakcji IC.
2. Próbką RNA jest pozytywna (TBEV⁺) i test można uznać za prawidłowy jeśli:
 - spełnione są warunki punktu 1,
 - próbka daje sygnał w kanale FAM, zarówno przy obecności, jak i braku sygnału w kanale HEX.
W sytuacjach, gdy reakcja jest silnie dodatnia (reakcja mająca w kanale FAM C_T poniżej 20 cyklu), próbka może dawać słaby sygnał lub całkowicie nie dawać sygnału w kanale HEX. Przyczyną tego zjawiska jest współzawodnictwo między reakcjami amplifikacji RNA wirusa TBEV i kontroli wewnętrznej (IC).
3. Próbką RNA jest negatywna (TBEV⁻) i test można uznać za prawidłowy jeśli:
 - spełnione są warunki punktu 1,
 - próbka daje sygnał wyłącznie w kanale HEX.
4. Obecność sygnału fluorescencji w kanale HEX dla danej próbki świadczy o poprawności przebiegu procesu izolacji RNA i reakcji PCR (w przypadku dodania kontroli wewnętrznej do procesu izolacji RNA), bądź wyłącznie o braku inhibicji PCR (w przypadku dodania kontroli wewnętrznej do mieszaniny reakcyjnej PCR). Bardzo wysokie wartości C_T (>34) w kanale HEX mogą wskazywać na częściową inhibicję reakcji PCR. Z kolei całkowity brak sygnału w kanale HEX, przy jednoczesnym braku sygnału w kanale FAM, może wskazywać na całkowitą inhibicję reakcji PCR lub niedodanie RNA do reakcji PCR przy jednoczesnym dodaniu kontroli wewnętrznej w procesie izolacji RNA. W takim wypadku zaleca się 10-krotne rozcieńczenie próbki lub powtórzenie izolacji RNA i ponowne wykonanie reakcji PCR.
5. Brak sygnału dla kontroli pozytywnej TBEV-TPC wskazuje na błąd w przygotowaniu reakcji PCR.

This product is developed, designed and sold exclusively for in vitro use only.

EURx Ltd. 80-297 Gdańsk Poland ul. Przyrodników 3, NIP 957-07-05-191, KRS 0000202039
www.eurx.com.pl, orders@eurx.com.pl, tel. +48 58 524 06 97, fax +48 58 341 74 23