

## Triplex ASFV qPCR Kit

### Zawartość zestawu

Składnik	Nr kat. E0470-01 24 reakcje po 25 µl	Nr kat. E0470-02 96 reakcji po 25 µl
Triplex ASFV Master Mix brązowa probówka	1 x 480 µl	4 x 480 µl
PC — positive control czarna nakrętka	1 x 40 µl	1 x 150 µl
NC — negative control przezroczysta nakrętka	1 x 40 µl	1 x 150 µl
Ex-DNA niebieska nakrętka	1 x 120 µl	1 x 480 µl

### Przechowywanie

Zestaw należy przechowywać w ciemności w temperaturze -20° C.

Należy unikać wielokrotnego rozmrażania i zamrażania zestawu (powyżej 2x), ponieważ może to wpłynąć negatywnie na czułość zestawu.

## Opis

- Triplex ASFV qPCR Kit jest przeznaczony do wykrywania DNA wirusa ASF (ang. *African Swine Fever Virus*) w krwi pełnej, surowicy, osoczu, wymazach (z jamy ustnej, nosa, nosogardzieli), próbkach tkanek, narządów świń oraz dzików.
- Wysoka czułość zestawu pozwala na detekcję wirusa ASF zarówno w pojedynczych próbkach, jak i próbkach zmieszanych (pulowanych) w ilości maksymalnie 5 próbek indywidualnych.
- Zestaw zawiera specyficzne startery dla wysoce konserwowanego fragmentu genu p72 wirusa ASF. Zamplifikowany fragment genu p72 jest wykrywany przy pomocy sondy znakowanej barwnikiem FAM.
- Dodatkowo zestaw zawiera dwie kontrole wewnętrzne, na które składają się:
  - a. startery i sonda znakowana barwnikiem HEX dla fragmentu świńskiego genu ACTB kodującego beta-aktynę (kontrola endogenna),
  - b. startery, sonda znakowana barwnikiem Cy5 i egzogeny fragment kwasu nukleinowego - Ex-DNA (kontrola egzogenna).

Kontrole wewnętrzne umożliwiają weryfikację poprawności procesu izolacji DNA i reakcji PCR. Użycie egzogennej kontroli wewnętrznej pozwala dodatkowo na ocenę jakości próbki i możliwej inhibicji reakcji PCR.

- Triplex ASFV qPCR Kit pozwala na analizę próbek zarówno z użyciem egzogennej kontroli wewnętrznej Ex-DNA (analiza trójkanałowa: FAM, HEX, Cy5), jak i bez niej (analiza dwukanałowa: FAM i HEX). Zaleca się jednak dokonywanie analiz z użyciem egzogennej kontroli wewnętrznej. W celu analizy próbek z użyciem egzogennej kontroli wewnętrznej należy dodać Ex-DNA 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 Ex-DNA w procesie izolacji DNA.

- DNA do reakcji real time PCR powinno być dobrej jakości i oczyszczone przy pomocy dedykowanych, komercyjnie dostępnych zestawów wykorzystujących technologię ziół krzemionkowych lub kulek magnetycznych.
- W skład Triplex ASFV Master Mix wchodzi: onTaq polimeraza DNA, bufor reakcyjny, deoksynukleotydy (dNTPs), startery wraz z sondami do detekcji zamplifikowanych fragmentów DNA oraz barwnik referencyjny ROX.
- onTaq Polimeraza DNA to enzym najnowszej generacji typu "hot start", który jest blokowany w niskich temperaturach, co umożliwia przygotowanie reakcji w temperaturze pokojowej. Aktywność polimerazy przywracana jest podczas 15-minutowego początkowego etapu denaturacji.
- Barwnik referencyjny ROX zawarty w Triplex ASFV Master 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.
- Kontrola pozytywna – PC zawiera fragment DNA wirusa ASF, fragment świńskiego genu ACTB i egzogeny fragment kwasu nukleinowego - Ex-DNA. Reakcja kontroli pozytywnej pozwala na ocenę działania zestawu, w tym prawidłowego przygotowania reakcji PCR. Sygnał fluorescencji dla DNA wirusa ASF w kanale FAM posiada  $C_T = 29 \pm 3$ , dla genu ACTB w kanale HEX posiada  $C_T = 29 \pm 3$ , natomiast dla kontroli egzogennej w kanale Cy5 posiada  $C_T = 28 \pm 3$ .

## Wymagane materiały niedostarczone wraz z zestawem

1. Pipety
2. Sterylne, wolne od nukleaz końcówki do pipet
3. Sterylne, wolne od nukleaz probówki 1.5 ml
4. Pojedyncze mikroprobówki PCR, mikroprobówki PCR w paskach lub płytki PCR 96-dołkowe
5. Odzież ochronna: fartuch, jednorazowe rękawiczki, okulary
6. Mikrowirówka na probówki 1.5 ml
7. Wirówka z adapterami do płytek PCR 96-dołkowych i mikroprobówek w paskach
8. Statyw chłodzący lub lód
9. Termocykler real-time PCR

## Protokół

### Przygotowanie reakcji PCR:

Składnik reakcji	Kontrola negatywna 1 reakcja	Próbka DNA 1 reakcja	Kontrola pozytywna 1 reakcja	Stężenie końcowe
Triplex ASFV Master Mix	20 µl	20 µl	20 µl	1 x
PC—positive control	-	-	5 µl	
NC—negative control	5 µl	-	-	
Próbka oczyszczonego DNA	-	5 µl	-	
Objętość reakcji	25 µl	25 µl	25 µl	

#### Uwagi:

1. Jeśli producent urządzenia real time PCR nie zaleca inaczej, reakcje należy nastawiać w objętości 25 µl.
2. Wszystkie roztwory należy rozmrozić, delikatnie wymieszać i krótko odwirować. Triplex ASFV Master Mix powinien być trzymany na lodzie. Należy unikać wielokrotnego (powyżej 2x) rozmrażania i zamrażania Triplex ASFV Master Mix, ponieważ może to wpłynąć negatywnie na czułość reakcji.
3. Reakcje mogą być przygotowywane w temperaturze pokojowej. Triplex ASFV Master Mix zawiera polimerazę typu „hot start”, która nie jest aktywna w temperaturze pokojowej.
4. Rozporcjować po 20 µl mieszaniny reakcyjnej do próbek lub dołków płytki PCR.
5. Dodać 5 µl NC-negative control (kontrola negatywna), 5 µl oczyszczonego DNA (próbka DNA) lub 5 µl PC-positive control (kontrola pozytywna).
6. W każdym cyklu testowym, obok badanych próbek DNA, należy nastawić co najmniej jedną kontrolę negatywną i pozytywną. Kontrola negatywna powinna być przygotowywana pierwsza, następnie próbki DNA, a na końcu kontrola pozytywna, aby zminimalizować ryzyko zanieczyszczenia.
7. Krótko zwirować, aby osadzić roztwory na dnie próbek i usunąć pęcherzyki powietrza.
8. Przygotowane reakcje umieścić w termocyklerze zaprogramowanym zgodnie z poniższą tabelą.

### Warunki reakcji PCR:

Etap	Temperatura	Czas	Ilość cykli
Denaturacja wstępna	95°C	15 min	1
Denaturacja	95°C	15 s	40
Przyłączenie starterów/ wydłużanie	60°C	1 min	

#### Uwagi:

1. Należy stosować standardowe tempo zmian temperatury reakcji PCR (ang. standard ramp, standard mode).
2. onTaq Polimeraza DNA jest aktywowana podczas denaturacji wstępnej (wymaga 15-minutowej inkubacji w 95°C).
3. Analiza fluorescencyjna w kanałach FAM, HEX i Cy5 powinna być wykonywana przez urządzenie na końcu etapu wydłużania. W kanale FAM wykrywany jest DNA wirusa ASF, w kanale HEX DNA genu świńskiej beta-aktyny, natomiast w kanale Cy5 egzogenna kontrola wewnętrzna.

## Interpretacja wyników:

Rodzaj próbki	Kanał FAM	Kanał HEX	Kanał Cy5	Wynik, interpretacja
Kontrola negatywna	-	-	-	prawidłowy
Kontrola pozytywna	+	+	+	prawidłowy
Próbka 1	-	+	+	negatywny (ASFV <sup>-</sup> )
Próbka 2	+	+	+	pozytywny (ASFV <sup>+</sup> )
Próbka 3	+	-	+	pozytywny (ASFV <sup>+</sup> )
Próbka 4	+	+	-	pozytywny (ASFV <sup>+</sup> )
Próbka 5	+	-	-	pozytywny (ASFV <sup>+</sup> )
Próbka 6	-	-	+	słaba jakość próbki/mała ilość DNA
Próbka 7	-	+	-/wysokie C <sub>T</sub>	Częściowa inhibicja PCR
Próbka 8	-	-	-	nieprawidłowy

1. Wyniki należy analizować w kanałach FAM, HEX i Cy5 (jeśli zastosowano egzogenną kontrolę wewnętrzną) lub wyłącznie w kanałach FAM i HEX (jeśli nie użyto egzogennej kontroli wewnętrznej w procesie izolacji DNA).
2. Test można uznać za ważny/prawidłowy jeśli: kontrola pozytywna daje sygnał w kanałach FAM i HEX (analiza dwukanałowa) lub FAM, HEX i Cy5 (analiza trójkanałowa), natomiast kontrola negatywna nie daje sygnału w żadnym kanale z wyżej wymienionych.
3. Próbka DNA jest pozytywna (ASFV<sup>+</sup>) i test można uznać za prawidłowy jeśli:
  - Spełnione są warunki punktu 2,
  - Próbka daje sygnał w kanale FAM przy dowolnej konfiguracji sygnałów w kanałach HEX i Cy5.W sytuacjach, gdy reakcja jest silnie dodatnia (ASFV<sup>+</sup>), próbka może dawać słaby sygnał lub całkowicie nie dawać sygnału w kanale HEX i/lub Cy5. Przyczyną tego zjawiska jest współzawodnictwo między reakcjami amplifikacji DNA wirusa ASF a fragmentami DNA endo i egzogennej kontroli wewnętrznej.
4. Próbka DNA jest negatywna (ASFV<sup>-</sup>) i test można uznać za prawidłowy jeśli:
  - Spełnione są warunki punktu 2,
  - Próbka daje sygnał wyłącznie w kanale HEX (jeśli nie użyto Ex-DNA) lub w kanale HEX i Cy5 (jeśli użyto Ex-DNA).
5. Brak sygnału fluorescencji w kanale HEX i Cy5, przy jednoczesnym braku sygnału w kanale FAM może wskazywać na całkowitą inhibicję reakcji PCR lub niedodanie DNA do reakcji PCR. W takim wypadku zaleca się 10-krotne rozcieńczenie próbki lub powtórzenie izolacji DNA i ponowne wykonanie reakcji PCR.
6. Brak sygnału fluorescencji w kanale Cy5 może być spowodowany:
  - Nieefektywną izolacją DNA,
  - Efektem współzawodnictwa: silnym sygnałem w kanale FAM w przypadku wysokiego stężenia DNA wirusa ASF w próbce,
  - Inhibicją reakcji PCR,
  - Niedodaniem Ex-DNA w procesie izolacji DNA.
7. Wyższe wartości C<sub>T</sub> w kanale Cy5 dla danej próbki w stosunku do większości innych próbek, może wskazywać na częściową inhibicję reakcji PCR. W takim wypadku zaleca się 10-krotne rozcieńczenie próbki lub powtórzenie izolacji DNA i ponowne wykonanie reakcji PCR.
8. Brak sygnału w kanale HEX, przy jednoczesnej obecności sygnału w kanale Cy5 wskazuje na słabą jakość próbki/małą ilość DNA w próbce.
9. Brak sygnału dla kontroli pozytywnej wskazuje na błąd w przygotowaniu reakcji PCR.