

Duplex ASFV qPCR Kit

Zawartość zestawu

Składnik	Nr kat. E0471-01 24 reakcje po 25 µl	Nr kat. E0471-02 96 reakcji po 25 µl
Duplex 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

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

- Duplex 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 endogenną kontrolę wewnętrzną, na którą składają się startery i sonda znakowana barwnikiem HEX dla fragmentu świńskiego genu ACTB kodującego beta-aktynę. Kontrola wewnętrzna umożliwia weryfikację poprawności procesu izolacji DNA i reakcji PCR.
- W skład Duplex 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 Duplex 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 zawiera zarówno fragment DNA wirusa ASF, jak i świńskiego genu ACTB i pozwala na ocenę działania zestawu, w tym prawidłowego przygotowania reakcji PCR. Sygnał fluorescencji dla DNA wirusa ASF w kanale FAM posiada $C_T = 29 \pm 3$ a dla genu ACTB w kanale HEX posiada $C_T = 29 \pm 3$.
- DNA do reakcji real time PCR powinno być dobrej jakości i oczyszczone przy pomocy dedykowanych, komercyjnie dostępnych zestawów wykorzystujących technologię złóż krzemionkowych lub kulek magnetycznych.

Wymagane materiały niedostarczone wraz z zestawem

1. Pipety
2. Sterylne, wolne od nuklez 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
Duplex 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. Duplex ASFV Master Mix powinien być trzymany na lodzie. Należy unikać wielokrotnego (powyżej 2x) rozmrażania i zamrażania Duplex ASFV Master Mix, ponieważ może to wpłynąć negatywnie na czułość reakcji.
3. Reakcje mogą być przygotowywane w temperaturze pokojowej. Duplex 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
Przyłączanie 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 i HEX powinna być wykonywana przez urządzenie na końcu etapu wydłużania. W kanale FAM wykrywany jest DNA wirusa ASF, natomiast w kanale HEX DNA genu świńskiej beta-aktyny.

Interpretacja wyników:

Rodzaj próbki	Kanał FAM	Kanał HEX	Wynik
Kontrola negatywna	-	-	prawidłowy
Kontrola pozytywna	+	+	prawidłowy
Próbka 1	-	+	negatywny (ASFV ⁻)
Próbka 2	+	+	pozytywny (ASFV ⁺)
Próbka 3	+	-	pozytywny (ASFV ⁺)
Próbka 4	-	-	nieprawidłowy

Uwagi:

1. Test można uznać za ważny/prawidłowy jeśli: kontrola pozytywna daje sygnał w obu kanałach, natomiast kontrola negatywna nie daje sygnału zarówno w kanale FAM, jak i kanale HEX.
2. Próbka DNA jest pozytywna (ASFV⁺) 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 (ASFV⁺), próbka może dawać słaby sygnał lub całkowicie nie dawać sygnału w kanale HEX. Przyczyną tego zjawiska jest współzawodnictwo między reakcjami amplifikacji DNA wirusa ASF i DNA genu ACTB (kontroli wewnętrznej).
3. Próbka DNA jest negatywna (ASFV⁻) 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 DNA i reakcji PCR. Bardzo wysokie wartości C_T (>35) 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 DNA do reakcji PCR. W takim wypadku zaleca się 10-krotne rozcieńczenie próbki lub powtórzenie izolacji DNA i ponowne wykonanie reakcji PCR.
5. Brak sygnału dla kontroli pozytywnej wskazuje na błąd w przygotowaniu reakcji PCR.