

Duplex ASFV Fast qPCR Kit

Zawartość zestawu

Składnik	Nr kat. E0473-01 24 reakcje po 25 µl	Nr kat. E0473-02 96 reakcji po 25 µl
Duplex ASFV Fast Master Mix	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 Fast 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.
- Duplex ASFV Fast qPCR Kit umożliwia stosowanie standardowego lub szybkiego programu amplifikacji PCR zależnie od preferencji, używanego urządzenia real-time PCR.
- 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.
- 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.
- W skład Duplex ASFV Fast Master Mix wchodzi: Perpetual Taq polimeraza DNA, bufor reakcyjny, deoksynukleotydy (dNTPs), startery wraz z sondami do detekcji zamplifikowanych fragmentów DNA oraz barwnik referencyjny ROX.
- Perpetual Taq Polimeraza DNA to enzym typu "hot start", który jest blokowany w niskich temperaturach za pomocą przeciwciał, co umożliwia przygotowanie reakcji w temperaturze pokojowej. Aktywność polimerazy przywracana jest podczas 2-minutowego początkowego etapu denaturacji.
- Barwnik referencyjny ROX zawarty w Duplex ASFV Fast 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, jak i świńskiego genu ACTB i umożliwia ocenę działania zestawu, w tym prawidłowego przygotowania reakcji PCR. Sygnał fluorescencji dla DNA wirusa ASF w kanale FAM posiada $C_T = 29 \pm 2$, a dla genu ACTB w kanale HEX posiada $C_T = 29 \pm 2$.
- Produktem uzupełniającym dla zestawu Duplex ASFV Fast qPCR Kit, który można dodatkowo zamówić, jest ASFV Positive Extraction Control (nr kat. E0474). ASFV Positive Extraction Control jest roztworem referencyjnym zawierającym syntetyczny fragment DNA wirusa ASF oraz syntetyczny fragment genu ACTB świni i może być wykorzystany jako kontrola dodatnia izolacji wirusa ASF.

Wymagane materiały niedostarczone wraz z zestawem

1. Pipety
2. Sterylne, wolne od nuklez końcówki do pipet
3. Sterylne, wolne od nuklez 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 Fast 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 Fast Master Mix powinien być trzymany na lodzie. Należy unikać wielokrotnego (powyżej 2x) rozmrażania i zamrażania Duplex ASFV Fast Master Mix, ponieważ może to wpłynąć negatywnie na czułość reakcji.
3. Reakcje mogą być przygotowywane w temperaturze pokojowej. Duplex ASFV Fast 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	Program standardowy	Program szybki	Ilość cykli
Denaturacja wstępna	95°C 2 min	95°C 2 min	1
Denaturacja	95°C 15 s	95°C 10 s	40
Przyłączanie starterów/ wydłużanie	60°C 60 s	60°C 30 s	

Uwagi:

1. Duplex ASFV Fast qPCR Kit umożliwia stosowanie standardowego lub szybkiego programu amplifikacji PCR zależnie od preferencji, używanego urządzenia real-time PCR.
2. Perpetual Taq Polimeraza DNA jest aktywowana podczas denaturacji wstępnej.
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.