

Blue Triplex ASFV Fast qPCR Kit

Zawartość zestawu

Składnik	Nr kat. E0475-01 24 reakcje po 25 µl	Nr kat. E0475-02 96 reakcji po 25 µl
Blue Triplex ASFV Fast 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 250 µl	1 x 1000 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

- Blue Triplex 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). Zestaw umożliwia analizę próbek pulowanych składających się z 10 próbek indywidualnych (co zostało zwalidowane), przy czym rekomenduje się analizę próbek pulowanych składających się z maksymalnie 5 próbek indywidualnych.
- Blue Triplex 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 dwie kontrole, endo i egzogenną kontrolę wewnętrzną, 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 egzogenne fragmenty 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.

- Blue Triplex ASFV Fast 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). W celu analizy próbek z użyciem egzogennej kontroli wewnętrznej należy dodać Ex-DNA do

buforu lizującego lub pobranej próbki w ilości 0,1 µl na każdy 1 µl objętości elucji. Oznacza to, że w przypadku elucji buforem elucyjnym o objętości 100 µl należy zastosować 10 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 złoża krzemionkowych lub kulek magnetycznych.
- W skład Blue Triplex ASFV Fast Master Mix wchodzi: Perpetual Taq polimeraza DNA, bufor reakcyjny, deoksynukleotydy (dNTPs), startery wraz z sondami do detekcji zamplifikowanych fragmentów DNA i barwnik referencyjny ROX. Dodatkowo Blue Triplex ASFV Fast Master Mix zawiera obojętny niebieski barwnik, który poprawia widoczność mieszaniny reakcyjnej i ułatwia kontrolę procesu pipetowania do probówek lub dołków płytki PCR.
- 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.
- Kontrola pozytywna – PC zawiera fragment DNA wirusa ASF, fragment świńskiego genu ACTB i egzogenne fragmenty kwasu nukleinowego - Ex-DNA. Reakcja kontroli pozytywnej pozwala na ocenę działania zestawu, w tym prawidłowego przygotowania reakcji PCR.

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
Blue Triplex 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. Blue Triplex ASFV Fast Master Mix powinien być trzymany na lodzie. Należy unikać wielokrotnego (powyżej 2x) rozmrażania i zamrażania Blue Triplex ASFV Fast Master Mix, ponieważ może to wpłynąć negatywnie na czułość reakcji.
3. Reakcje mogą być przygotowywane w temperaturze pokojowej. Blue Triplex 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
Przylączenie starterów/ wydłużanie	60°C 60 s	60°C 30 s	

Uwagi:

1. Blue Triplex 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, 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 ⁻)
Próbka 2	+	+	+	pozytywny (ASFV ⁺)
Próbka 3	+	-	+	pozytywny (ASFV ⁺)
Próbka 4	+	+	-	pozytywny (ASFV ⁺)
Próbka 5	+	-	-	pozytywny (ASFV ⁺)
Próbka 6	-	-	+	słaba jakość próbki/mała ilość DNA
Próbka 7	-	+	-/wysokie C _T	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⁺) 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⁺), 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⁻) 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_T 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.