



STEC qPCR Screening Kit

Zawartość zestawu

Składnik	Nr kat. E0480-01 96 reakcji po 25 µl
STEC Master Mix	2 x 960 µl
PC – positive control	1 x 100 µl
Water, nuclease free	1 x 500 µl

Przechowywanie

Wszystkie składniki zestawu należy przechowywać w ciemnym miejscu, w temperaturze -20°C. Unikać wielokrotnego rozmrażania i zamrażania (> 2x), ponieważ może to zmniejszyć czułość testu.

Opis

- STEC qPCR Screening Kit to gotowy do użycia zestaw do wykrywania DNA werotoksycznych szczepów *Escherichia coli* (STEC) w żywności i z próbek środowiskowych po wzbogacaniu.
- Zestaw zawiera wszystkie odczynniki i startery potrzebne do amplifikacji fragmentów genomowego DNA *E. coli*. Szczepy STEC są identyfikowane na podstawie obecności specyficznej sekwencji genu odpowiedzialnego za wytwarzanie toksyny Shiga (*stx1* lub *stx2*, w tym podtyp *stx2f*). Intymina (gen *eae*) jest dodatkowym markerem wirulencji. Detekcja danej sekwencji odbywa się przy użyciu specyficznych sond znakowanych barwnikami fluorescencyjnymi. Geny *stx1/stx2* są wykrywane jednocześnie w kanale FAM, natomiast gen *eae* w kanale Cy5.
- Dodatkowo zestaw posiada wewnętrzny system kontroli amplifikacji pozwalający na zidentyfikowanie potencjalnych inhibitorów reakcji. Kontrola wewnętrzna składa się ze starterów, sondy znakowanej barwnikiem HEX i egzogenego fragmentu DNA zawartego w STEC Master Mix. Amplifikacja kontroli wewnętrznej nie ma wpływu na wykrywanie szczepów STEC, ale jest wskaźnikiem poprawności reakcji PCR.
- STEC Master Mix zawiera onTaq Polimerazę DNA, zoptymalizowany bufor reakcyjny, ROX i deoksynukleotydy (dNTPs).
- 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 STEC Master Mix umożliwia normalizację fluorescencji w niektórych urządzeniach real-time PCR. Użycie barwnika referencyjnego ROX jest konieczne we wszystkich termocyklarach firmy Applied Biosystems i opcjonalne w przypadku termocyklarów 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.
- DNA do reakcji real-time PCR powinno być dobrej jakości i oczyszczone przy pomocy dedykowanych, komercyjnie dostępnych zestawów wykorzystujących technologię złożeń krzemionkowych lub kulek magnetycznych.

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

Protokół

Przygotowanie reakcji PCR

Składnik reakcji	Kontrola negatywna	Próbka DNA	Kontrola pozytywna
STEC Master Mix	20 µl	20 µl	20 µl
PC – positive control	-	-	5 µl
Próbka DNA		5 µl	
Water, nuclease free	5 µl	-	-
Objętość reakcji	25 µl	25 µl	25 µl

Uwagi

1. Jeśli producent urządzenia real-time PCR nie zaleca inaczej, reakcję należy nastawiać w objętości 25 µl.
2. Wszystkie roztwory należy rozmrozić, delikatnie wymieszać i krótko odwirować. STEC Master Mix powinien być trzymany na lodzie. Należy unikać wielokrotnego (powyżej 2x) rozmrażania i zamrażania STEC Master Mix, ponieważ może to wpłynąć negatywnie na czułość reakcji.
3. Reakcje mogą być przygotowywane w temperaturze pokojowej. STEC Master Mix zawiera polimerazę typu „hot start”, która nie jest aktywna w temperaturze pokojowej.
4. 20 µl mieszaniny reakcyjnej należy rozporcjować do probówek lub dołków płytki PCR i dodać:
 - 5 µl wody (kontrola negatywna),
 - 5 µl próbki DNA (≤500 ng/reakcję) oczyszczonej zgodnie z protokołem zestawu do izolacji DNA (próbka DNA),
 - 5 µl PC (kontrola pozytywna).
5. 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.
6. Krótko zwirować, aby osadzić roztwory na dnie probówek i usunąć pęcherzyki powietrza. Pęcherzyki mogą mieć wpływ na odczyt fluorescencji.
7. Przygotowane reakcje umieścić w termocyklerze zaprogramowanym zgodnie z tabelą na następnej stronie.
8. Przeprowadzić analizę danych.

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
Denaturacja wstępna	95°C	15 min	1
Denaturacja	95°C	15 s	40
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. onTaq Polimeraza DNA jest aktywowana podczas wstępnej 15-minutowej denaturacji w 95°C.
3. Analiza fluorescencji w kanałach FAM i HEX powinna być wykonywana przez urządzenie na końcu etapu wydłużania. W kanale FAM oraz Cy5 wykrywane jest DNA próbki, natomiast w kanale HEX DNA kontroli wewnętrznej.

Interpretacja wyników

Rodzaj próbki	Kanał FAM	Kanał Cy5	Kanał HEX	Wynik
Kontrola negatywna	-	-	+	prawidłowy
Kontrola pozytywna	+	+	+	prawidłowy
DNA 1	-	-	+	negatywny
DNA 2	+	+	+/-	pozytywny dla stx1/stx2 oraz eae*
DNA 3	+	-	+/-	pozytywny dla stx1/stx2, negatywny dla eae**
DNA 4	-	+	+/-	negatywny dla stx1/stx2, pozytywny dla eae
DNA 5	-	-	-	nieprawidłowy

* dalsze testowanie za pomocą STEC qPCR Identification Kit

** dalsze testowanie za pomocą STEC qPCR Identification Kit, jeśli jest to wymagane

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 daje sygnał jedynie w kanale HEX,
 - kontrola pozytywna daje sygnał w kanale FAM, Cy5 oraz HEX.
2. W sytuacjach, gdy reakcja jest silnie dodatnia w kanale FAM i/lub Cy5, próbka może dawać słaby sygnał lub całkowicie nie dawać sygnału w kanale HEX. Przyczyną tego zjawiska jest współzawodnictwo między reakcjami amplifikacji DNA próbki i DNA kontroli wewnętrznej.
3. W przypadku gdy wystąpi pozytywna reakcja jedynie w kanale FAM lub Cy5 oraz spełnione są warunki z punktu 1, z próbką należy postępować zgodnie z obowiązującymi procedurami wewnętrznymi.
4. Obecność sygnału fluorescencji w kanale HEX dla danej próbki świadczy o poprawności przebiegu reakcji 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 i Cy5 może wskazywać na całkowitą inhibicję 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.

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