

IHNV qRT-PCR Kit

(zestaw diagnostyczny wykrywający fragmenty genomu wirusa IHNV)

IHNV qRT-PCR Kit jest przeznaczony do wykrywania sekwencji RNA specyficznych dla wirusa zakaźnej martwicy układu krwiotwórczego ryb. Oczyszczony materiał genetyczny wirusa jest amplifikowany za pomocą real-time RT-PCR i wykrywany przy pomocy sondy specyficznej dla IHNV, znakowanej barwnikiem fluorescencyjnym FAM. Identyfikacja wirusa następuje na podstawie silnie konserwowanego rejonu w segmencie kodującym białko nukleoproteiny N. Dodatkowo zestaw zawiera kontrolę wewnątrz (startery, sondę znakowaną barwnikiem HEX, egzogeny fragment kwasu nukleinowego—Internal Control), co pozwala na jednoczesną weryfikację procedury izolacji RNA i inhibicji reakcji PCR.

Zawartość zestawu

Składnik	Nr kat. E4361-01 100 reakcji po 25 µl	Nr kat. E4361-02 500 reakcji po 25 µl
IHNV Master Mix * brązowa probówka	4 x 500 µl	20 x 500 µl
Internal Control niebieska nakrętka	2 x 500 µl	10 x 500 µl
Positive Control ** czarna nakrętka	200 µl	1000 µl
RNase free Water przezroczysta nakrętka	1200 µl	5 x 1200 µl

Przechowywanie

Wszystkie składniki zestawu należy przechowywać w temperaturze -20°C.

* Unikać wielokrotnego rozmrażania i zamrażania (> 2), ponieważ może to zmniejszyć czułość testu. Odczynnik należy zamrozić w mniejszych porcjach, jeśli jest używany tylko sporadycznie.

** Kontrolę pozytywną należy przechowywać oddzielnie, z dala od pozostałych składników zestawu.

Rodzaje próbek RNA, przygotowanie próbki RNA

RNA z tkanek, narządów, płynu jajnikowego/nasiennego ryb, hodowli komórkowych należy wyizolować przy pomocy zestawów dedykowanych do oczyszczania RNA wirusowego. Należy postępować zgodnie z instrukcją zalecaną przez producenta zestawu. Wysoka czułość zestawu pozwala na detekcję IHNV zarówno w pojedynczych próbkach, jak i próbkach zmieszanych (pulowanych) w ilości maksymalnie 10 próbek indywidualnych.

Barwnik referencyjny ROX

Barwnik referencyjny ROX zawarty w IHNV Master Mix zestawu IHNV qRT-PCR Detection Kit 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 wewnętrzna (ang. Internal Control)

Zestaw zawiera system kontroli wewnętrznej, który umożliwi monitorowanie procesu izolacji RNA, a także inhibicji samego procesu PCR.

System kontroli wewnętrznej składa się z:

- primerów i sondy znakowanej barwnikiem HEX obecnymi w mieszaninie reakcyjnej IHNV Master Mix,
- egzogenego fragmentu kwasu nukleinowego zawartego w Internal Control.

Kontrola wewnętrzna (Internal Control) może być dodana na etapie izolacji RNA (**pkt A**) - wtedy stanowi zarówno kontrolę procesu oczyszczania RNA (kontrolę ekstrakcji), jak i inhibicji reakcji PCR lub wyłącznie na etapie PCR (**pkt B**) - do oceny jakości oczyszczonego RNA i inhibicji reakcji PCR.

- A. Kontrolę wewnętrzną (Internal Control) należy dodać 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 Internal Control w procesie izolacji RNA. Zaleca się używanie nośnikowego (carrier) RNA przy izolacji wirusowego RNA. Nośnikowe RNA zwiększa wydajność wiązania RNA do membran krzemionkowych w obecności niewielkich ilości materiału genetycznego w próbce oraz zmniejsza prawdopodobieństwo degradacji wirusowego RNA.
- B. Kontrolę wewnętrzną (Internal Control) należy dodać do mieszaniny reakcyjnej w ilości 0,5µl na każde 25 µl reakcji PCR.

**Protokół
Przygotowanie reakcji PCR:**

Składnik reakcji	Kontrola negatywna amplifikacji -NAC	Kontrola negatywna ekstrakcji-NEC	Kontrola pozytywna ekstrakcji-PEC	Próbka RNA	Kontrola pozytywna IHNV-TPC
IHNV Master Mix	20 µl	20 µl	20 µl	20 µl	20 µl
Internal Control (opcjonalnie)	-	-	-	0,5 µl	0,5 µl
RNase free Water	5 µl	-	-	-	-
Próbka oczyszczonej H ₂ O/	-	5 µl	-	-	-
oczyszczonej kontroli wewnętrznej/	-	-	5 µl	-	-
oczyszczonego RNA	-	-	-	5 µl	-
Positive Control	-	-	-	-	5 µl
Objętość reakcji	25 µl	25 µl	25 µl	25-25.5 µl	25-25.5 µl

Uwagi:

- Jeśli producent urządzenia real time PCR nie zaleca inaczej, reakcje należy nastawiać w objętości 25 µl.
- Wszystkie roztwory należy rozmrozić, delikatnie wymieszać i krótko odwirować. IHNV Master Mix powinien być trzymany na lodzie, natomiast reakcje mogą być przygotowywane w temperaturze pokojowej. Należy unikać wielokrotnego (powyżej 2x) rozmrażania i zamrażania IHNV Master Mix, ponieważ może to wpłynąć negatywnie na czułość reakcji.
- Przygotować reakcje PCR zgodnie z powyższą tabelą.
- Dodać:
 - 5 µl wody (kontrola negatywna amplifikacji-NAC),
 - 5 µl wody oczyszczonej zgodnie z procedurą izolacji RNA (kontrola negatywna ekstrakcji-NEC),
 - 5 µl kontroli wewnętrznej oczyszczonej zgodnie z procedurą izolacji RNA (kontrola pozytywna ekstrakcji-PEC),
 - 5 µl oczyszczonego RNA (próbka RNA),
 - 5 µl Positive Control (kontrola pozytywna IHNV-TPC).
- Niedodanie 0,5 µl Internal Control w reakcji kontroli pozytywnej IHNV-TPC spowoduje otrzymanie sygnału wyłącznie w kanale FAM. W celu otrzymania sygnału zarówno w kanale FAM jak i HEX, należy dodać do reakcji 0,5 µl Internal Control. Zwiększenie objętości reakcji PCR dla kontroli pozytywnej IHNV-TPC o 0,5 µl do 25,5 µl (w przypadku przygotowania jednego mixu reakcyjnego dla próbek RNA i kontroli) nie wpływa negatywnie na wydajność reakcji PCR.
- Krótko zwirować, aby osadzić roztwory na dnie probówek i usunąć pęcherzyki powietrza. Przygotowane reakcje umieścić w termocyklerze zaprogramowanym zgodnie z poniższą tabelą.

Warunki reakcji PCR:

Étap	Temperatura	Czas	Ilość cykli
Odwrotna transkrypcja	50°C	10 min	1
Denaturacja wstępna	95°C	10 min	1
Denaturacja	95°C	15 s	40
Przyłączenie starterów/ wydłużanie	60°C	60 s	

Uwagi:

1. Należy stosować standardowe tempo zmian temperatury reakcji PCR (ang. standard ramp, standard mode).
2. Analiza fluorescencyjna w kanałach FAM, HEX powinna być wykonywana przez urządzenie na końcu etapu wydłużania. W kanale FAM wykrywany jest fragment nukleoproteiny N wirusa IHNV, natomiast w kanale HEX kontrola wewnętrzna – egzogeny fragment kwasu nukleinowego.

Interpretacja wyników:

Rodzaj próbki	Kanał FAM	Kanał HEX	Wynik
Kontrola negatywna amplifikacji-NAC	-	-	prawidłowy
Kontrola negatywna ekstrakcji-NEC	-	-	prawidłowy
Kontrola pozytywna ekstrakcji-PEC	-	+	prawidłowy
Kontrola pozytywna targetu IHNV-TPC (- Internal Control) lub (+ Internal Control)	+	-	prawidłowy
	+	+	
1	-	+	negatywny IHNV ⁻
2	+	+	pozytywny IHNV ⁺
3	+	-	pozytywny IHNV ⁺
4	-	-	nieprawidłowy

Uwagi:

1. Test można uznać za ważny/prawidłowy jeśli:
 - kontrola negatywna amplifikacji-NAC nie daje sygnału zarówno w kanale FAM jak i HEX,
 - kontrola negatywna ekstrakcji-NEC nie daje sygnału zarówno w kanale FAM jak i HEX,
 - kontrola pozytywna ekstrakcji-PEC (w przypadku, gdy oczyszczono Internal Control zgodnie z procedurą izolacji RNA) daje sygnał wyłącznie w kanale HEX,
 - kontrola pozytywna IHNV-TPC daje sygnał wyłącznie w kanale FAM, gdy nie dodano do reakcji Internal Control lub w obu kanałach FAM i HEX, gdy dodano do reakcji Internal Control.
2. Próbkę RNA jest pozytywna (IHNV⁺) 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 (IHNV⁺), próbka może dawać słaby sygnał lub całkowicie nie dawać sygnału w kanale HEX. Przyczyną tego zjawiska jest współzawodnictwo między reakcjami amplifikacji RNA wirusa IHNV i kontroli wewnętrznej (Internal Control).
3. Próbkę RNA jest negatywna (IHNV⁻) 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 RNA i reakcji PCR (w przypadku dodania kontroli wewnętrznej do procesu izolacji RNA), bądź wyłącznie o braku inhibicji PCR (w przypadku dodania kontroli wewnętrznej do mieszaniny reakcyjnej 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 może wskazywać na całkowitą inhibicję reakcji PCR lub niedodanie RNA do reakcji PCR przy jednoczesnym dodaniu kontroli wewnętrznej w procesie izolacji RNA. W takim wypadku zaleca się 10-krotne rozcieńczenie próbki lub powtórzenie izolacji RNA i ponowne wykonanie reakcji PCR.
5. Brak sygnału dla kontroli pozytywnej IHNV-TPC wskazuje na błąd w przygotowaniu reakcji PCR.