

KHV qPCR Kit

KHV qPCR Kit jest przeznaczony do wykrywania sekwencji DNA specyficznej dla herpeswirusa koi w próbkach DNA karpia koi i karpia hodowlanych. Oczyszczony materiał genetyczny wirusa jest amplifikowany za pomocą real-time PCR i wykrywany przy pomocy sondy specyficznej dla KHV, znakowanej barwnikiem fluorescencyjnym FAM. Identyfikacja wirusa następuje na podstawie silnie konserwatywnego regionu w segmencie ORF 89 herpeswirusa koi. Dodatkowo zestaw zawiera startery i sondę znakowaną barwnikiem HEX umożliwiające wykrywanie fragmentu genu glukokinazy karpia i stanowiącego endogenną kontrolę wewnętrzną poprawności izolacji DNA i reakcji PCR.

Zawartość zestawu

Składnik	Nr kat. E4362-01	Nr kat. E4362-02
	50 reakcji po 25 µl	100 reakcji po 25 µl
KHV Master Mix* brązowa probówka	2 x 500 µl	4 x 500 µl
Positive Control** czarna nakrętka	100 µl	200 µl
Water, nuclease free przezroczysta nakrętka	500 µl	2 x 500 µl

* W skład KHV Master Mix wchodzi: bufor reakcyjny, dNTPs, primery i sonda znakowana barwnikiem FAM do KHV, primery i sonda znakowana barwnikiem HEX do kontroli wewnętrznej, barwnik referencyjny ROX oraz onTaq Polimeraza DNA.

** W skład Positive Control wchodzi syntetyczny fragment DNA wirusa KHV.

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 DNA, przygotowanie próbki DNA

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

Barwnik referencyjny ROX

Barwnik referencyjny ROX zawarty w KHV Master Mix zestawu KHV qPCR 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.

Protokół Przygotowanie reakcji PCR

Składnik reakcji	Kontrola negatywna amplifikacji -NAC	Kontrola negatywna ekstrakcji-NEC	Próbka DNA	Kontrola pozytywna KHV-TPC
KHV Master Mix	20 µl	20 µl	20 µl	20 µl
Water, nuclease free	5 µl	-	-	-
Próbka oczyszczonej wody lub próbka negatywna KHV ⁻	-	5 µl	-	-
Próbka DNA	-	-	5 µl	-
Positive Control	-	-	-	5 µl
Objętość reakcji	25 µl	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. KHV Master Mix powinien być trzymany na lodzie, natomiast reakcje mogą być przygotowywane w temperaturze pokojowej. Należy unikać wielokrotnego (powyżej 2x) rozmrażania i zamrażania KHV Master Mix, ponieważ może to wpłynąć negatywnie na czułość reakcji.
3. Przygotować reakcje PCR zgodnie z powyższą tabelą.
4. Dodać:
 - 5 µl wody (kontrola negatywna amplifikacji-NAC),
 - 5 µl wody lub próbki negatywnej KHV⁻ oczyszczonych zgodnie z procedurą izolacji DNA (kontrola negatywna ekstrakcji-NEC),
 - 5 µl oczyszczonego DNA (próbka DNA),
 - 5 µl Positive Control (kontrola pozytywna KHV-TPC).
5. 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

Etap	Temperatura	Czas	Ilość cykli
Denaturacja wstępna	95°C	15 min	1
Denaturacja	95°C	15 s	40
Przyłączenie starterów/ wydłużanie	60°C	60 s	

Uwagi:

1. Zestaw KHV qPCR Kit umożliwia stosowanie wyłącznie standardowego programu amplifikacji PCR.
2. Analiza fluorescencyjna w kanałach FAM, HEX powinna być wykonywana przez urządzenie na końcu etapu wydłużania. W kanale FAM wykrywany jest fragment DNA KHV, natomiast w kanale HEX endogenna kontrola wewnętrzna – fragment DNA genu glukokinazy karpi.

Interpretacja wyników

Rodzaj próbki	Kanał FAM	Kanał HEX	Wynik
Kontrola negatywna amplifikacji-NAC	-	-	prawidłowy
Kontrola negatywna ekstrakcji-NEC	-	-/+	prawidłowy
Kontrola pozytywna targetu KHV-TPC	+	+	prawidłowy
Próbka 1	-	+	negatywny KHV
Próbka 2	+	+	pozytywny KHV ⁺
Próbka 3	+	-	pozytywny IAV ⁺
Próbka 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 (dla oczyszczonej wody) lub daje sygnał wyłącznie w kanale HEX (dla próbki negatywnej KHV),
 - kontrola pozytywna KHV-TPC daje sygnał w obu kanałach FAM i HEX.
2. Próbka DNA jest pozytywna (KHV⁺) 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 (KHV⁺), próbka może dawać słaby sygnał lub całkowicie nie dawać sygnału w kanale HEX. Przyczyną tego zjawiska jest współzawodnictwo między reakcjami amplifikacji DNA KHV i endogennej kontroli wewnętrznej.
3. Próbka DNA jest negatywna (KHV⁻) 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 KHV-TPC wskazuje na błąd w przygotowaniu reakcji PCR.