

## CEV qPCR Kit

CEV qPCR Kit jest przeznaczony do wykrywania sekwencji DNA specyficznej dla wirusa obrzęku karpia 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 CEV, znakowanej barwnikiem fluorescencyjnym FAM. Identyfikacja wirusa następuje na podstawie silnie konserwatywnego regionu w genie kodującym białko rdzenia P4a wirusa obrzęku karpia. 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. E4363-01    | Nr kat. E4363-02     |
|--|---------------------|----------------------|
|  | 50 reakcji po 25 µl | 100 reakcji po 25 µl |
| CEV Master Mix*<br>brązowa probówka            | 2 x 500 µl          | 4 x 500 µl           |
| Positive Control**<br>czarna nakrętka          | 100 µl              | 200 µl               |
| Water, nuclease free<br>przezroczysta nakrętka | 500 µl              | 2 x 500 µl           |

\* W skład CEV Master Mix wchodzi: bufor reakcyjny, dNTPs, primery i sonda znakowana barwnikiem FAM do CEV, 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 CEV.

### 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 CEV qPCR Kit pozwala na detekcję CEV zarówno w pojedynczych próbkach, jak i próbkach zmieszanych (pulowanych) w ilości maksymalnie 10 próbek indywidualnych.

## **Barwnik referencyjny ROX**

Barwnik referencyjny ROX zawarty w CEV Master Mix zestawu CEV 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 CEV-TPC |
|--|--------------------------------------|-----------------------------------|------------|----------------------------|
| CEV Master Mix   | 20 µl                                | 20 µl                             | 20 µl      | 20 µl                      |
| Water, nuclease free   | 5 µl                                 | -                                 | -          | -                          |
| Próbka oczyszczonej wody lub próbka negatywna CEV <sup>-</sup> | -                                    | 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. CEV Master Mix powinien być trzymany na lodzie, natomiast reakcje mogą być przygotowywane w temperaturze pokojowej. Należy unikać wielokrotnego (powyżej 2x) rozmrażania i zamrażania CEV 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 CEV<sup>-</sup> oczyszczonych zgodnie z procedurą izolacji DNA (kontrola negatywna ekstrakcji-NEC),
  - 5 µl oczyszczonego DNA (próbka DNA),
  - 5 µl Positive Control (kontrola pozytywna CEV-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/<br>wydłużanie | 60°C        | 60 s   |             |

**Uwagi:**

1. Zestaw CEV 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 CEV, 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 CEV-TPC  | +         | +         | prawidłowy                 |
| Próbka 1                            | -         | +         | negatywny CEV <sup>-</sup> |
| Próbka 2                            | +         | +         | pozytywny CEV <sup>+</sup> |
| Próbka 3                            | +         | -         | pozytywny CEV <sup>+</sup> |
| 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 CEV<sup>-</sup>),
  - kontrola pozytywna CEV-TPC daje sygnał w obu kanałach FAM i HEX.
2. Próbka DNA jest pozytywna (CEV<sup>+</sup>) 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 (CEV<sup>+</sup>), próbka może dawać słaby sygnał lub całkowicie nie dawać sygnału w kanale HEX. Przyczyną tego zjawiska jest współzawodnictwo między reakcjami amplifikacji DNA CEV i endogennej kontroli wewnętrznej.
3. Próbka DNA jest negatywna (CEV<sup>-</sup>) 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<sub>T</sub> (>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 CEV-TPC wskazuje na błąd w przygotowaniu reakcji PCR.