

TargetEx ASFV qPCR Diagnostic Kit

Katalógusszám: TGX-044-01

BEVEZETÉS

A TargetEx ASFV qPCR Diagnostic Kit az afrikai sertéspestis vírus (ASFV, ASPV) örökítőanyagának kvantitatív PCR-rel (qPCR) történő kimutatására szolgál. A **multiplex** kit az ASP vírus (FAM[™]-jelölt próba) mellett képes endogén kontroll (pl. sertés, vaddisznó, varacskos disznó DNS, HEX[™]-jelölt próba) és exogén kontroll (Cy5[™]-jelölt próba) kimutatására is, biztosítva ezzel mind a minta integritását, mind a teszt teljesítményét.

A detektálási folyamat a standard protokoll alkalmazásával **50 perc alatt** befejeződik, de rendelkezésre áll egy **gyorsított protokoll** is, amely **45 percre csökkenti** a reakció időtartamát.

A készlet **számos mintatípussal kompatibilis**, beleértve szérum, teljes vér, csontvelő, különböző szervi (pl. máj, agy, bél), és egyéb szöveti mintákat is. Legfeljebb 3–5 mintát javasolt összevonni (magas DNS-koncentráció esetén ajánlott).

A készlet pozitív és negatív ASFV kontrollokat is tartalmaz, amelyek az ASFV és az endogén célgén amplifikációja során ~28-as Cq értéknél várhatóak. Továbbá a kit tartalmaz egy extrakciós (exogén) kontrollt is, amelynek célja a DNS-kivonás hatékonyságának ellenőrzése. Ez utóbbit a DNS-extrakciós módszertől függően két különböző módon lehet felhasználni:

- Az extrakció előtt spike-in formájában adható a mintához.
- A kivont DNS-mintához közvetlenül adható a PCR-reakció ellenőrzése céljából. Ebben az esetben hígított kontrollt ajánlott használni, hogy elkerüljük a keresztszenyezést (részleteket lásd a Használati utasításban).

A készlet komponensei -20 °C-on tárolandóak.
Kerülje a többszöri olvasztás-fagyasztást!

REAGENSKÉSZLET KOMPONENSEI

Komponens	Leírás	Térfogat (μL)
Reaction Mix (Reakciómix)	Master mix, tartalmazza a primereket és a próbákat, 100 reakcióra elegendő	1500*
Positive ASFV Control (Pozitív kontroll, PK)	ASPV-specifikus cél-DNS	50
Negative ASFV Control (Negatív kontroll, NK)	Endogén cél-DNS	50
Extraction Control (Extrakciós kontroll, EK)	Exogén cél-DNS	50

* A reakciókeverék 10% felesleget tartalmaz (végső térfogat: 1650 μL), hogy biztosítsa az automatizált folyadékkezelő rendszerekkel való kompatibilitást.



SZÜKSÉGES ANYAGOK ÉS ESZKÖZÖK (A GYÁRTÓ ÁLTAL NEM BIZTOSÍTOTT)

- Nukleázmentes víz
- Vortex
- Centrifuga
- Pipetták és nukleázmentes, szűrős pipettahegyek
- Steril mikrocentrifuga csövek (1,5 mL)
- 96-lyukú PCR mikrolemez/PCR stripek ragasztófoliával/kupakkal
- qPCR készülék (FAM, HEX és Cy5-csatornákkal)

ÖSSZEÁLLÍTÁSI ÚTMUTATÓ

KONTROLLOK

A megfelelő kiértékeléshez használjon kontrollokat (lásd a Kontrollok összefoglaló táblázatát). A megbízható eredmény érdekében használjon több párhuzamost. A készlet komponenseit az előkészítés során jégen tárolja.

Az Extrakciós kontroll használata:

Az alkalmazás módja a DNS-extrakció munkafolyamatától függ:

- A. **Adjon 1 µL** (1 ng) extrakciós kontrollt a mintához a DNS-kivonás előtt.
- B. Használja **10⁻⁵ ng/µL végkoncentrációban** az izolált DNS-hez adva.

REAKCIÓ ÖSSZEÁLLÍTÁS

1. A TargetEx ASFV qPCR Diagnostic Kit összes komponensét steril fülkében olvassza fel és a reakciót is ott mérje össze.
2. Minden csövet óvatosan keverjen meg vortex segítségével, majd rövid ideig végezzen centrifugálást (10-15 mp).
3. Adjon **15 µL reakciómixet** minden mérendő well-be.
4. Adjon **5 µL templát DNS-t** (~0,5-25 ng/reakció) vagy **5 µL pozitív/negatív ASFV kontrollt** vagy **5 µL nukleázmentes vizet** (NTC) minden well-be vagy strip-be. Keverje össze pipettázással. Cserélje ki a pipetta hegyét a well-ek között!
5. Zárja le a lemezt/strip-et ragasztófoliával/kupakkal, majd röviden centrifugálja.
6. Helyezze a lemezt/strip-et a qPCR készülékbe, és indítsa el a PCR programot az alábbi paraméterekkel

A qPCR-MÉRÉS PARAMÉTEREI

Lépés száma	Lépés megnevezése	Hőmérséklet (°C)	Időtartam (másodperc)
1	Kezdeti denaturáció	95	180
2	Denaturáció (ciklusonként)	95	5
3	Anelláció / Extenzió (ciklusonként)	60	10

Ismételje meg a 2. és 3. lépést 39-szer (összesen 40 ciklusban), a megfelelő fluoreszcens csatornán történő detektálással minden Anellációs / Extenziós lépés végén.

Opcionális lépés: 5 másodperces Anelláció/Extenzió lépés is alkalmazható (gyors protokoll). Ez a módszer csak magas minőségű DNS-minták esetén javasolt (260/280 abszorpció arány ~1,8).



KONTROLLOK ÖSSZEFOGLALÓ TÁBLÁZATA

A kontroll típusa	Cél	Csatorna	Várható Cq érték
Pozitív kontroll (PK)	Ellenőrzi az ASPV-specifikus amplifikációt	FAM	≤ 30
Negatív kontroll (NK)	Ellenőrzi az endogén célmolekula amplifikációját	HEX	≤ 30
Extrakciós kontroll (EK)	Ellenőrzi az extrakciót és a PCR hatékonyságát	Cy5	25–35*
Templát-mentes kontroll (No template control, NTC)	A reagensek szennyeződését ellenőrzi	–	Nincs amplifikáció

*A várható Cq érték a DNS-kivonási módszertől, a minta típusától stb. függően változik.

KIÉRTÉKELÉS

ESSZÉ VALIDÁLÁS

Az eredmények értelmezése előtt győződjön meg arról, hogy a következő kritériumok teljesülnek:

- Valódi amplifikáció esetén szigmoid alakú amplifikációs görbéket kapunk.
- Állítsa be a küszöbértéket (threshold) a logaritmikusan ábrázolt amplifikációs görbe lineáris tartományában (további részletekért kövesse a műszer gyártójának útmutatásait).
- NTC: Nincs amplifikáció a templát-mentes kontrollban.
- PK: Amplifikáció a FAM-csatornán (Cq érték ≤ 30)
- NK: Amplifikáció a HEX-csatornán (Cq érték ≤ 30), nincs amplifikáció a FAM-csatornán.
- EK: Az extrakciós kontroll Cq értéke a DNS izolálási módszertől és a minta típusától függően változik; ha a Cq érték ≥ 35 (Cy5-csatorna), akkor ajánlott a lépést megismételni nagyobb mennyiségű extrakciós kontrollal.
- Ha a tesztminta Cq értéke meghaladja a 35 ciklust, ajánlott a kísérlet ismétlése nagyobb mennyiségű DNS és további kontrollok felhasználásával.



A MÉRT ADATOK JAVASOLT ÉRTELMEZÉSE

A vizsgálat ellenőrzése után az adatok értelmezéséhez használja az alábbi táblázatot:

Eredmény	ASP Vírus (FAM)	Negatív kontroll (HEX)	Extrakciós kontroll (Cy5)	Következtetés
Pozitív	+	+	+	ASPV detektálva.
Pozitív (NK hiba)	+	–	+	ASPV kimutatható, de az endogén kontroll nem megfelelő, ismételje meg az extrakciót/qPCR protokollt.
Pozitív (EK hiba)	+	+	–	ASPV kimutatható, de az extrakciós kontroll nem megfelelő – ismételje meg az extrakciót/qPCR protokollt magasabb EK koncentrációval.
Pozitív (NK és EK hiba)	+	–	–	ASPV kimutatható, de mind a negatív, mind az extrakciós kontroll sikertelen – ismételje meg az extrakciót magasabb EK-lal.
Negatív	–	+	+	ASPV nem mutatható ki.
Negatív (NK hiba)	–	–	+	Az endogén kontroll amplifikációja nem kielégítő – a minta minősége nem megfelelő, ismételje meg az extrakciót/qPCR protokollt.
Negatív (EK hiba)	–	+	–	Az extrakciós kontroll amplifikációja nem megfelelő – ismételje meg az extrakciót/qPCR protokollt magasabb EK-koncentrációval.
Érvénytelen	–	–	–	A célmolekula és a kontrollok amplifikációja nem történt meg – ismételje meg a teljes extrakciót és a qPCR munkafolyamatot.

További felmerülő kérdések esetén vegye fel velünk a kapcsolatot az info@targetex.com e-mail címen keresztül!

BIZTONSÁGI INFORMÁCIÓK

A termék az előírt használat mellett nem minősül veszélyesnek. Használjon megfelelő egyéni védőeszközöket (laborköpeny, védőszemüveg, nitril kesztyű). Kerülje a közvetlen érintkezést.

- Bőrrel érintkezés esetén azonnal öblítse le bő vízzel.
- Szembe kerülés esetén távolítsa el a kontaktlencsét, majd öblítse bő vízzel.
- Lenyelés esetén forduljon a toxikológiai központhoz.

A Toxikológiai központ elérhetősége:

- +36 80 201 199 (0–24 h, ingyenes, csak Magyarországról hívható)
- +36 1 476 6464 (0–24 h, normál díjas, külföldről is hívható)

További információ elérhető a biztonsági adatlapon (MSDS) a gyártó honlapján (www.targetex.com).

