

Primerdesign™ Ltd

Virusul West Nile

Regiunea netranslatată 5' (5'UTR)

Set genesig® Advanced

150 de teste

GENESIG

Kits by Primerdesign

Numai pentru uz general în laborator și cercetare

Introducere în virusul West Nile

Virusul West Nile aparține familiei de virusuri Flaviviridae. Infectează în principal păsările, dar poate infecta multe alte specii, inclusiv oamenii. Conține un genom ARN monocatenar, cu sens pozitiv, de 11-12 kb, care este învelit într-o nucleocapsidă formată din blocuri proteice de 12 kDA. Virusul în sine este un viron de 45-50 nm, având o suprafață proteică relativ netedă.

Transmiterea se realizează prin intermediul țânțarilor vectori. Țânțarii transferă virusul de la păsări, care sunt gazde de amplificare. Oamenii și alte specii tind să nu transmită boala, deoarece concentrațiile virale sunt scăzute, însă la păsări nivelurile virale sunt relativ ridicate, ceea ce permite transmiterea. În cazuri rare, transmiterea poate avea loc și prin transfuzie de sânge, transplant de organe și alăptare. Virusul este învelit într-o membrană derivată din gazdă, membrana fiind modificată de două glicoproteine virale. Virusul este preluat de celulele vertebrate prin atașarea mediată de receptor la suprafața celulară, urmată de injectarea genomului în celula gazdă. Proteinele și ribozomii gazdei se utilizează pentru replicare și, odată ce virusul progenitură este împachetat, acesta se desprinde de celula gazdă, permițând răspândirea.

Puțini oameni prezintă simptome, însă cei care le prezintă suferă de o formă ușoară, cunoscută sub numele de febră West Nile, sau, în cazuri mai rare, de o formă gravă, cunoscută sub numele de encefalită West Nile sau meningită West Nile, în funcție de partea corpului afectată. Simptomele ușoare pot include diaree, febră, dureri de cap, dureri musculare, greață, erupții cutanate, dureri în gât, ganglioni limfatici umflați și vărsături. Forma mai severă poate include simptome precum dezorientare, comă, slăbiciune musculară, rigiditatea gâtului, convulsii și crize. De asemenea, se știe că virusul West Nile infectează celulele nervoase, iar după infectare, virusul poate continua să infecteze alte celule nervoase din apropiere. În unele cazuri, virusul este capabil să pătrundă în sistemul nervos central, declanșând paralizia flască acută.

Nu există un tratament specific pentru virusul West Nile. Simptomele formei ușoare ar trebui să se atenueze în câteva zile, însă forma mai severă va necesita, de obicei, tratament în regim de spitalizare, care implică administrarea de lichide intravenoase, ajutor respirator și îngrijire medicală generală. Forma gravă poate duce la leziuni cerebrale, slăbiciune musculară și deces. Singura măsură de prevenire în acest moment este evitarea înțepăturilor de țânțari.

Specificitate

Setul Primerdesign genesig pentru genomul virusului West Nile (WNV) este conceput pentru cuantificarea in vitro a genomilor WNV. Setul este conceput pentru a avea un profil larg de detectare. În mod specific, primerii sunt omologi 100% cu peste 95% din secvențele de referință ale bazei de date NCBI disponibile la momentul proiectării.

Dinamica variației genetice înseamnă că noi informații despre secvență pot deveni disponibile după proiectarea inițială. Primerdesign revizuieste periodic profilurile de detecție ale seturilor noastre și, atunci când este necesar, lansează noi versiuni.

Kitul nostru pentru virusul West Nile (NDV) a fost conceput pentru cuantificarea specifică și exclusivă in vitro a tuturor liniilor acestor specii. Secvențele de primeri și sonde din acest kit au o omologie de 100% cu peste 95% din secvențele de referință din baza de date NCBI, pe baza unei analize bioinformatică cuprinzătoare.

Dacă aveți nevoie de informații suplimentare sau aveți o întrebare specifică despre profilul de detectare al acestui set, vă rugăm să trimiteți un e-mail la adresa enquiry@primerdesign.co.uk și echipa noastră de bioinformatică vă va răspunde la întrebare.

Conținutul setului

- Mix primer-sondă specific pentru WNV (150 de reacții **MARO**)
Etichetat FAM
- Șablon de control pozitiv la WNV (pentru curba Standard **ROȘU**)
- Mix primer-sondă de control intern al extragerii (150 de reacții **MARO**)
Etichetat VIC ca standard
- Control intern al extragerii de ADN (150 de reacții **MARO**)
- Mix primer-sondă de control endogen (150 de reacții **MARO**)
Etichetat FAM
- Apă fără RNază/DNază (**ALB**)
pentru omogenizarea mixurilor primer-sondă
- Soluție tampon de pregătire a șablonului (**GALBEN**)
pentru omogenizarea șablonului de control intern, șablonului de control pozitiv și pregătirea curbei standard

Reactivi și echipamente care vor fi furnizate de utilizator

Set de extracție Programarea

instrumentului de PCR în timp real

Acest set este recomandat pentru utilizarea cu setul de extracție genesig Easy DNA/RNA. Cu toate acestea, este conceput pentru a funcționa bine cu toate procesele care produc ARN și ADN de înaltă calitate cu inhibitori PCR minimi.

oasig™ liofilizat OneStep sau Precision®PLUS OneStep 2X RT-qPCR Master Mix

Conține amestecul de bază OneStep RT-qPCR complet

Vârfuri și pipete

Vortex și centrifuge

Eprubete de reacție PCR de 1,5 ml cu pereți subțiri

Depozitarea și stabilitatea setului

Acest set este stabil la temperatura camerei, dar trebuie păstrat la -20°C la sosire. Odată ce componentele liofilizate au fost omogenizate, acestea nu vor fi expuse la temperaturi mai mari de -20°C mai mult de 30 de minute la un moment dat și se va evita congelarea/decongelarea repetată inutilă. În aceste condiții, setul este stabil timp de șase luni de la data omogenizării.

Dacă se prepară o serie de diluare cu o curbă standard, aceasta poate fi păstrată congelată pentru o perioadă îndelungată. Dacă observați orice degradare în această diluție în serie, se poate prepara o nouă curbă standard din martorul pozitiv.

Primerdesign nu recomandă utilizarea setului după data de expirare înscrisă pe ambalaj.

Material de eșantion adecvat

Pot fi utilizate toate tipurile de material de eșantion potrivite pentru amplificarea PCR. Vă rugăm să vă asigurați că eșantioanele sunt adecvate în ceea ce privește puritatea, concentrația și integritatea ARN-ului/ADN-ului (un control PCR intern este furnizat pentru a testa inhibitorii PCR nespecifici). Se execută întotdeauna cel puțin un martor negativ cu eșantioanele. Pentru a pregăti un martor negativ, înlocuiți proba de ARN șablon cu apă fără RNază/DNază.

Domeniul dinamic de testare

În condiții PCR optime, seturile de detecție genesig WNV au o eficiență foarte mare de pregătire de >95% și pot detecta mai puțin de 100 de copii ale șablonului țintă.

Notificări și derogări ale răspunderii

Acest produs este dezvoltat, proiectat și vândut numai în scopuri de cercetare. Nu este destinat diagnosticului uman sau medicamentelor sau pentru a fi administrat oamenilor, cu excepția cazului în care este clar exprimat în acest scop de către Food and Drug Administration din SUA sau de către autoritățile de reglementare corespunzătoare din țara în care este utilizat. Pe durata perioadei de garanție, seturile de detecție Primerdesign genesig permit recuperarea precisă și reproductibilă a datelor, combinată cu o sensibilitate excelentă. Pentru datele obținute prin încălcarea liniilor directoare generale privind BPL și a recomandărilor producătorului, dreptul de a solicita despăgubiri în temeiul garanției este expirat. PCR este o tehnologie brevetată acoperită de mai multe brevete americane și străine. Aceste brevete sunt deținute de Roche Molecular Systems Inc. și au fost sublicențiate de PE Corporation în anumite domenii. În funcție de aplicația dvs. specifică, este posibil să aveți nevoie de o licență de la Roche sau PE pentru a practica PCR. Informații suplimentare privind achiziționarea licențelor pentru practicarea procesului PCR pot fi obținute contactând directorul de licențiere la Roche Molecular Systems, 1145 Atlantic Avenue, Alameda, CA 94501 sau Applied Biosystems business group al Applied Biosystems Corporation, 850 Lincoln Centre Drive, Foster City, CA 94404. În plus, testul de 5' de nuclează și alte metode omogene de amplificare utilizate în legătură cu procesul PCR pot fi acoperite de brevetele americane 5.210.015 și 5.487.972, deținute de Roche Molecular Systems, Inc. și de brevetul american 5.538.848, deținut de The Perkin-Elmer Corporation.

Mărci comerciale

Primerdesign™ este o marcă comercială a Primerdesign Ltd.

genesig® este o marcă comercială înregistrată a Primerdesign Ltd.

Procesul PCR este acoperit de brevetele americane 4,683,195 și 4,683,202 și echivalente străine deținute de Hoffmann-La Roche AG. BI, ABI PRISM® GeneAmp® și MicroAmp® sunt mărci comerciale înregistrate ale Applied Biosystems Corporation). BIOMEK® este o marcă comercială înregistrată a Beckman Instruments, Inc.; iCycler™ este o marcă comercială înregistrată a Bio-Rad Laboratories, Rotor-Gene este o marcă comercială a Corbett Research. LightCycler™ este o marcă comercială înregistrată a Idaho Technology Inc. GeneAmp®; TaqMan® și AmpliTaqGold® sunt mărci comerciale înregistrate ale Roche Molecular Systems, Inc. Achiziția reactivilor Primerdesign™ nu poate fi interpretată ca o autorizație sau o licență implicită de a practica PCR sub niciun brevet deținut de Hoffmann-La Roche Inc.

Principiile testului

PCR în timp real

Este furnizat un mix de primer și sondă specific WNV, care poate fi detectat prin canalul FAM.

Mixul de primer și sondă furnizat exploatează așa-numitul principiu TaqMan®. În timpul amplificării prin PCR, primerii sens și antisens încrucișează cu ADN-ul de WNV. O sondă fluorogenă este inclusă în același mix de reacție care constă dintr-o sondă ADN marcată cu un colorant 5' și un inhibitor al colorantului 3'. În timpul amplificării prin PCR, sonda este scindată și colorantul care raportează și inhibitorul colorantului sunt separate. Creșterea rezultată a fluorescenței poate fi detectată pe o serie de platforme qPCR.

Control pozitiv

Pentru determinarea numărului de copii și ca un control pozitiv pentru configurarea PCR, setul conține un șablon de control pozitiv.

Acesta poate fi folosit pentru a genera o curbă standard a numărului de copii WNV/valoarea Cq. În mod alternativ, controlul pozitiv poate fi utilizat la o singură diluție în care nu este necesară o analiză cantitativă completă a eșantioanelor. De fiecare dată când se utilizează setul, cel puțin o reacție de control pozitiv trebuie să fie inclusă în test. Un rezultat pozitiv indică faptul că primerii și sondele pentru detectarea genei WNV țintă au funcționat corect în acel scenariu experimental particular. Dacă se obține un rezultat negativ, rezultatele testului sunt invalide și trebuie repetate. Trebuie să se asigure că acest control pozitiv nu contaminează nicio altă componentă a setului care ar duce la rezultate fals pozitive. Acest lucru poate fi realizat prin manipularea acestei componente într-un mediu Post PCR. De asemenea, se va avea grijă să se evite contaminarea încrucișată a altor eșantioane atunci când se adaugă controlul pozitiv în test. Acest lucru poate fi evitat prin sigilarea tuturor celorlalte eșantioane și controale negative înainte de pipetarea controlului pozitiv în godeul de control pozitiv.

Control negativ

Pentru a valida orice constatări pozitive, se va include o reacție de control negativă de fiecare dată când se utilizează setul. Pentru această reacție, în locul șablonului se va utiliza apa fără RNază/DNază. Un rezultat negativ indică faptul că reactivii nu s-au contaminat în timpul configurării testului.

Controlul extragerii interne a ARN-ului

Când se efectuează extragerea ARN-ului, este adesea avantajos să existe o sursă exogenă de șablon ARN care este introdusă în soluția tampon de liză. Acest ARN de control este apoi co-purificat cu eșantionul de ARN și poate fi detectat ca un control pozitiv pentru procesul de extragere. Co-purificarea cu succes și qPCR pentru ARN-ul de control indică, de asemenea, că inhibitorii PCR nu sunt prezenți la o concentrație mare.

Un mix separat de primer și sondă qPCR se furnizează împreună cu acest kit pentru a detecta ARN-ul exogen utilizând qPCR. Primerii PCR sunt prezenți la concentrații de limitare a PCR care permit multiplexarea cu primerii secvenței țintă. Amplificarea ADNc-ului martor nu interferează cu detectarea ADNc-ului țintă al WNV chiar și atunci când este prezent la un număr mic de copii. Controlul intern este detectat prin canalul VIC și oferă o valoare C_q de 28+/-3, în funcție de nivelul de diluare a probei.

Controlul endogen

Pentru a confirma extragerea unui șablon biologic valid, este inclus un mix de primer și sondă pentru a detecta o genă endogenă. Detectarea controlului endogen se face prin canalul FAM și, prin urmare, NU este posibilă efectuarea unui multiplex cu primerii de WNV. Un semnal de control endogen slab poate indica faptul că eșantionul nu a conținut suficient material biologic.

Protocol de omogenizare

Pentru a minimiza riscul de contaminare cu ADN străin, vă recomandăm ca toate pipetările să fie efectuate într-un mediu curat PCR. În mod ideal, acesta ar fi un laborator PCR desemnat sau un corp PCR. Vârfurile cu filtru sunt recomandate pentru toate etapele de pipetare.

1. **Rotiți fiecare eprubetă într-o centrifugă înainte de deschidere.**
Acest lucru va asigura că mixul liofilizat de primer și sondă se află la baza eprubetei și nu se va vărsa la deschiderea eprubetei.
2. **Omogenizați mixul primer-sondă în apa fără RNază/DNază furnizată, conform tabelului de mai jos:**
Pentru a asigura omogenizarea completă, agitați bine fiecare eprubetă.

Componentă - omogenizare în apă	Volum
Pachet Pre-PCR	
Mix primer-sondă WNV (MARO)	165 µl
Mix primer-sondă de control intern al extragerii (MARO)	165 µl
Mix primer-sondă de control endogen (MARO)	165 µl

3. **Omogenizați șablonul de control intern și șablonul de control pozitiv în soluția tampon de preparare a șablonului furnizat, conform tabelului de mai jos:**
Pentru a asigura omogenizarea completă, agitați bine fiecare eprubetă.

Componentă - omogenizare în soluția tampon de pregătire a șablonului	Volum
Folie termosigilată Pre-PCR	
Control intern al extragerii de ARN (ALBASTRU)	600 µl
Folie termosigilată Post-PCR	
Șablon de control pozitiv WNV (ROȘU) *	500 µl

* Această componentă conține șablon cu număr mare de copii și reprezintă un risc FOARTE semnificativ de contaminare. Trebuie deschis și manipulat într-un mediu de laborator separat, departe de celelalte componente.

Extragerea ARN-ului

Controlul intern al extragerii ARN-ului poate fi adăugat fie la soluția tampon de liză/extragere a ARN-ului, fie la eșantionul de ARN odată ce a fost omogenizat în soluția tampon de liză.

NU adăugați controlul intern al extragerii ARN-ului direct la eșantionul biologic neprocesat, deoarece acesta va duce la degradare și o pierdere a semnalului.

1. **Adăugați 4 µl din Controlul intern al extragerii de ARN (ALBASTRU) la fiecare soluție tampon de liză/extragere a ARN-ului pentru fiecare eșantion.**
2. **Finalizați extragerea ARN-ului conform cu protocoalele producătorilor.**

Protocol de detectare RT-qPCR OneStep

Pentru sensibilitate și performanțe optime.

Toate etapele de pipetare și de pregătire a plăcilor experimentale trebuie efectuate pe gheață. După ce se realizează turnarea pe placă, treceți imediat la protocolul de amplificare OneStep. Incubarea prelungită a amestecurilor de reacție la temperatura camerei poate duce la apariția unor artefacte PCR ce reduc sensibilitatea detecției.

1. **Pentru fiecare eșantion de ARN pregătiți un amestec de reacție conform tabelului de mai jos: Includeți suficiente reacții pentru controale pozitive și negative.**

Componentă	Volum
oasig OneStep sau PrecisionPLUS OneStep 2X RT-qPCR Master Mix	10 μ l
Mix primer-sondă WNV (MARO)	1 μ l
Mix primer-sondă de control intern al extragerii (MARO)	1 μ l
Apă fără RNază/DNază (ALB)	3 μ l
Volum final	15 μl

2. **Pentru fiecare eșantion de ARN pregătiți o reacție de control endogenă conform tabelului de mai jos (opțional):**

Această reacție de control va oferi informații vitale cu privire la calitatea eșantionului biologic.

Componentă	Volum
oasig OneStep sau PrecisionPLUS OneStep 2X RT-qPCR Master Mix	10 μ l
Mix primer-sondă de control endogen (MARO)	1 μ l
Apă fără RNază/DNază (ALB)	4 μ l
Volum final	15 μl

3. **Se pipetează 15 μ l din aceste amestecuri în godeuri individuale în conformitate cu configurarea plăcii experimentale qPCR.**
4. **Se pipetează 5 μ l de șablon ARN în fiecare godeu, conform plăcii experimentale configurate.**
Pentru godeurile de control negativ, utilizați 5 μ l de apă fără RNază/DNază. Volumul final în fiecare godeu este de 20 μ l.

5. Dacă este inclusă o curbă standard pentru analiza cantitativă, pregătiți un amestec de reacție conform tabelului de mai jos:

Componentă	Volum
oasig OneStep sau PrecisionPLUS OneStep 2X RT-qPCR Master Mix	10 μ l
Mix primer-sondă WNV (MARO)	1 μ l
Apă fără RNază/DNază (ALB)	4 μ l
Volum final	15 μl

6. Pregătirea seriei de diluții cu curbe standard.

- 1) Se pipetează 90 μ l de soluție tampon pentru prepararea șablonului în 5 eprubete și se etichetează 2-6
- 2) Se pipetează 10 μ l din șablonul de control pozitiv (ROȘU) în eprubeta 2
- 3) Agitați bine
- 4) Schimbați vârful pipetei și se pipetează 10 μ l din eprubeta 2 în eprubeta 3
- 5) Agitați bine

Repeți pașii 4 și 5 pentru a finaliza seria de diluții

Curbă standard	Număr exemplar
Eprubeta 1 Control pozitiv (ROȘU)	2 x 10 ³ pe μ l
Eprubeta 2	2 x 10 ² pe μ l
Eprubeta 3	2 x 10 ¹ pe μ l
Eprubeta 4	2 x 10 ⁰ pe μ l
Eprubeta 5	20 pe μ l
Eprubeta 6	2 pe μ l

7. Se pipetează 5 μ l de șablon standard în fiecare godeu pentru curba standard conform plăcii configurate de dumneavoastră
Volumul final în fiecare godeu este de 20 μ l.

Protocol de amplificare RT-qPCR OneStep

Condiții de amplificare folosind oasig OneStep sau PrecisionPLUS OneStep 2X RT-qPCR Master Mix.

	Etapă	Durață	Temp
	Transcriere inversă	10 min	55 °C
	Activare enzime	2 min	95 °C
Cicluri x50	Denaturare	10 s	95 °C
	COLECTAREA DATELOR *	60 s	60 °C

* Datele fluorogene vor fi colectate pe durata acestei etape prin canalele FAM și VIC

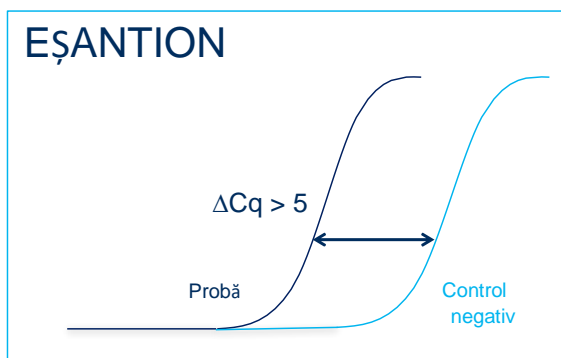
Interpretarea rezultatelor

Țintă (FAM)	Control intern (VIC)	Control pozitiv	Control negativ	Interpretare
≤ 30	+ / -	+	-	REZULTAT CANTITATIV POZITIV calculați număr exemplar
> 30	+	+	-	REZULTAT CANTITATIV POZITIV calculați număr exemplar
> 30	-	+	-	REZULTAT CALITATIV POZITIV nu raportați numărul de exemplare, deoarece acest lucru se poate datora extragerii deficitare a eșantionului
-	+	+	-	REZULTAT NEGATIV

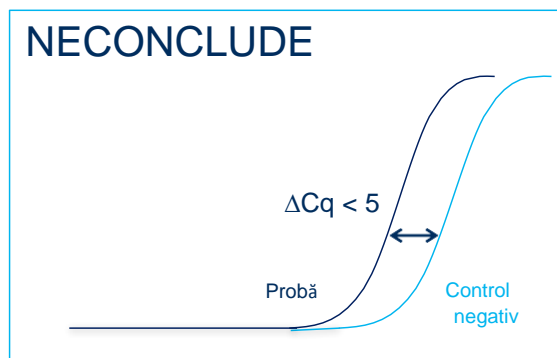
+ / -	+ / -	+	≤ 35	EXPERIMENT EȘUAT din cauza contaminării testului
+ / -	+ / -	+	> 35	*
-	-	+	-	PREGĂTIREA EȘANTIONULUI A EȘUAT
+ / -	+ / -	-	+ / -	EXPERIMENT EȘUAT

Șablonul de control pozitiv (**ROȘU**) este de așteptat să se amplifice între Cq 16 și 23. Nerespectarea acestui criteriu de control al calității este un indiciu puternic că experimentul a fost compromis.

*Acolo unde eșantionul de testat este pozitiv și controlul negativ este pozitiv cu un Cq > 35 , eșantionul trebuie reinterpretat pe baza puterii relative a semnalului celor două rezultate:



Dacă eșantionul se amplifică > 5 Cq mai devreme decât controlul negativ, atunci eșantionul trebuie reinterpretat (prin tabelul de mai sus) cu controlul negativ verificat ca negativ.



Dacă eșantionul se amplifică cu < 5 Cq mai devreme decât controlul negativ, atunci rezultatul pozitiv al eșantionului este invalidat și rezultatul ar trebui să fie determinat neconcludent din cauza contaminării testului. Se va repeta testul pe acest eșantion.

Control intern PCR

Valoarea Cq obținută cu ajutorul controlului intern va varia semnificativ în funcție de eficiența extragerii, cantitatea de ARN adăugată la reacția RT și PCR și setările individuale ale aparatului. Valorile Cq de 28 ± 3 sunt în limitele normale. Când se amplifică un eșantion de WNV cu un număr mare de exemplare ale genomului, controlul intern al extragerii poate să nu producă o diagramă de amplificare. Acest lucru nu invalidează testul și ar trebui interpretat ca un rezultat experimental pozitiv.

Controlul endogen

Semnalul obținut de la setul de primer și sondă de control endogen va varia în funcție de cantitatea de material biologic prezentă într-un eșantion dat. Un semnal precoce indică prezența unui randament bun de material biologic. Un semnal tardiv sugerează că este prezent puțin material biologic în eșantion.

Subsemnata, BROWN ROXANA-VALENTINA, traducator autorizat pentru limba engleza, in temeiul autorizatiei nr. 31054/2011, eliberata de Ministerul Justitiei, certific exactitatea traducerii efectuate din limba engleza in limba romana, ca textul prezentat a fost tradus in intregime si ca, prin traducere, in scrisului nu i-au fost denaturate continutul si sensul.

