

MolliScience[®] MGMS duplex qPCR Kit

Használati utasítás

MolliScience[®] MGMS duplex qPCR Kit

1. Általános információk

1

- **A kit felhasználása:** A kit a *Mycoplasma gallisepticum* (MG) és a *Mycoplasma synoviae* (MS) baktériumok DNS-ének kimutatására, valamint a két faj elkülönítésére szolgáló *in vitro* molekuláris vizsgálatra alkalmas. A fajspecifikus genetikai markerek segítségével a kit minden MS és MG törzset (a vad-típusú és a vakcinatörzseket egyaránt) azonosít. A vizsgálat közvetlenül alkalmazható klinikai mintákból (pl. szövet, tampon, váladék, sejttenyészet, FTA-kártya) izolált DNS-mintákon, valamint színtenyészeteken is. A kit kizárólag állategészségügyi célra használható, és csak szakképzett laboratóriumi személyzet alkalmazhatja.
- **A módszer alapelve:** A kit fluoreszcens jelölésű próbákat alkalmazó, multiplex valós idejű (real-time) PCR technológián alapul. A primerek és próbák két fajspecifikus gént céloznak meg (MS-, illetve MG-specifikus régiókat). Az amplifikáció során a különböző fluorofórokkal jelölt próbák a felszaporodott célszekvencia mennyiségével arányos fluoreszcens jelet bocsátanak ki (FAM: MG-specifikus reakciót jelzi, HEX: MS-specifikus reakciót jelzi). A valós idejű PCR-készülék a fluoreszcens jelet ciklusról ciklusra (real-time) követi, és ebből határozza meg a célszekvenciák jelenlétét a mintában.
- **Biztonsági előírások:**
 - Kizárólag ***in vitro*** alkalmazásra. Lenyelni **tilos** és **nem szabad** szájjal pipettázni!
 - Minden mintát potenciálisan fertőzőnek kell tekinteni; szigorúan tartsa be a biológiai biztonsági előírásokat.
 - A minták és reagensek kezelése közben viseljen védőköpenyt, védőkesztyűt és védőszemüveget.
 - A kontamináció (szennyeződés) megelőzése érdekében használjon szűrős pipettahegyeket és mintánként cseréljen hegyet.
 - A vizsgálat során keletkezett biológiai és kémiai hulladékot a hatályos helyi jogszabályoknak megfelelően ártalmatlanítsa.
 - A veszélyes összetevőkről a biztonsági adatlapok (SDS) nyújtanak részletes tájékoztatást.
 - A kit komponensei gyermekektől elzárva tartandók!

2.A kit tartalma és tárolási feltételek

Komponens	Kupak színe	Leírás	Mennyiség (1 kit)	Tárolás
MGMS duplex qPCR Reaction Mix 1	fehér	Folyékony, használatra kész reakcióelegy: puffer, dNTP-k és polimeráz.	2 × [600 µL] (100 rx kit)	-20 °C
MGMS duplex qPCR Reaction Mix 2	sárga	Folyékony, használatra kész reakcióelegy primerekkel és fluoreszcens jelölésű próbákkal (FAM, HEX).	1 × [500 µL] (100 rx kit)	-20 °C
MGMS duplex qPCR Reaction Mix 3	kék	Nukleázmentes víz, ami templát nélküli kontrollként (NTC) is szolgál.	1 × 1 mL (100 rx kit)	-20 °C (vagy 2-8 °C)
MGMS duplex qPCR Positive Control	piros	Használatra kész DNS-kontroll (MS és MG specifikus).	1 × [50 µL] (100 rx kit)	-20 °C

• Tárolás és szavatosság:

- Rövid távú tárolás (1-4 nap): A kit minden komponense 2-8 °C-on tárolandó.
- Hosszú távú tárolás (>4 nap): Minden komponens **-20 °C**-on tárolandó. Az MGMS duplex qPCR Reaction Mix 3 (nukleázmentes víz) 2-8 °C-on is tartható.
- Kerülje az ismételt fagyasztás-felolvasztás ciklusokat; szükség esetén ossza szét egyszer használatos mennyiségekre a csövek tartalmát.
- Az MGMS duplex qPCR Reaction Mix 2-t fénytől védve kell tárolni.
- A komponensek kizárólag a csomagoláson feltüntetett lejárati dátumig használhatók fel.
- Különböző gyártási tételekből (LOT szám) származó reagenseket ne keverjen össze.

• Kezelés:

- A reagenseket felhasználás előtt jégen/ szobahőmérsékleten olvassza fel.
- Felolvasztás után vortexelje, majd rövid ideig centrifugálja le a csöveket.

3.A vizsgálatához szükséges további eszközök és reagensek

- **Valós idejű PCR-készülék:** valós idejű fluoreszcencia-detektálására alkalmas PCR készülék (pl. Rotor-Gene, Bio-Rad CFX96, ABI 7500), amely képes a használt fluorofórok (FAM, HEX vagy azokkal egyenértékű festékek) gerjesztésére és mérésére.
- **Fogyóeszközök:** a készülékkel kompatibilis PCR-csövek, stripek vagy lemezek, optikai kupakkal vagy lezáró fóliával.
- **Pipetták és pipettahegyek:** állítható térfogatú mikropipetták (pl. 0,5-10 µL, 2-20 µL, 20-200 µL), steril, szűrővel ellátott hegyekkel.
- **Általános laboreszközök:** mikrocentrifuga, vortex, hűtőszekrény (2-8 °C), fagyasztó (-20 °C vagy alacsonyabb hőmérséklet).
- **DNS-izoláláshoz kit:** nukleinsav-tisztításra alkalmas kit vagy reagensek (pl. szűrőoszlopos kit, mágneses gyöngyök) állati eredetű mintákhoz.
- **Számítógép/szoftver:** a PCR-készülék vezérléséhez és az adatalemzéshez (amennyiben a készülék megköveteli).

4. Mintavétel és előkészítés a DNS-izoláláshoz

- **Mintatípusok:** A kit sokféle állategészségügyi minta vizsgálatára alkalmas, ideértve a mintavételi pálcával vett mintákat (szájpadrólási hasadék, légcső, légzsák, kloáka stb.), a különböző szövetekből (légcső, tüdő, légzsák, ivarszervek, ízület, tojás stb.), FTA-kártyákat, valamint a tenyésztett sejtekből izolált DNS-t.
- **Mintagyűjtési irányelvek:** Alkalmazzon steril mintavételi technikát. Folyadékból legalább 0,5 mL-t, szövetből 1-2 g-ot gyűjtsön; a mintákat egyértelműen és azonosíthatóan jelölje meg.
- **Mintakezelés és tárolás:** Szállítás során a mintákat tartsa hűtve (2-8 °C) és dolgozza fel azokat a lehető leghamarabb. Hosszabb tárolás (>24 óra) esetén fagyassza le (-20 °C vagy -80 °C) a mintákat. Kerülje az ismételt fagyasztási-olvasztási ciklusokat.
- **Tampon minták előkezelése:** Helyezze a mintavevő tampont a pufferbe (pl. PBS), majd vortexeléssel mossa ki belőle a sejteket. Centrifugálja le a mintát, és a cső alján maradt sejtekből végezze el a DNS-izolálást.
- **Szövet minták előkészítése:** Homogenizáljon körülbelül 25-30 mg szövetet pufferben (pl. PBS). Centrifugálja le a mintát, majd a kapott üledékből végezze el a DNS-izolálást.
- **Sejtenyészet előkészítése:** Centrifugálással ülepítse a sejteket, és a kapott üledékből végezze el a DNS-izolálást.
- **Minták egyesítése (pooling),** amennyiben szükséges: Legfeljebb 5 darab, azonos típusú mintát mosson össze egyetlen pufferes csőben. A pooling pontos menetét és a minták listáját mindig dokumentálja.
- **DNS-izolálás:** Használjon olyan validált protokollt, amely tiszta, PCR-gátló anyagoktól mentes DNS-t eredményez. A nem megfelelő izolálás gátlást vagy fals-negatív eredményt okozhat. Az izolált DNS-t rövid távon (néhány napig) 2-8 °C-on, hosszabb távon -20 °C-on tárolja. Kerülje a minta ismételt fagyasztását és felolvasztását.
- **Óvintézkedések:** Mindig alkalmazzon megfelelő kontrollokat. A kontamináció elkerülése érdekében a munkát erre a célra kijelölt területen végezze. Cseréljen gyakran kesztyűt, és minden mintához használjon új, steril pipettahegyet.

5.A reakció összeállítása és a PCR feltételei

1. **Reagensek előkészítése:** olvassa fel a MGMS duplex qPCR Reaction Mix 1-3 és a Positive Control komponenseket. Vortexelje, majd röviden centrifugálja le azokat.

2. **A master mix elkészítése:**

Komponens	Térfogat 1 mintához (μL)	Térfogat "n" mintához (μL)
MGMS duplex qPCR Reaction Mix 1	10	$1,1 \times 10 \times n$
MGMS duplex qPCR Reaction Mix 2	4	$1,1 \times 4 \times n$
MGMS duplex qPCR Reaction Mix 3	4	$1,1 \times 4 \times n$

3. **A master mix szétosztása:** Jelölje meg a PCR-csőveket vagy a PCR-lemezt. Adagoljon 18 μL master mixet minden reakciózsebbe.

4. **Minták és kontrollok hozzáadása:** A pipetázást óvatosan végezze a buborékképződés és a kontamináció elkerülése érdekében. Az MGMS duplex qPCR Positive Control-t mindig utolsónként adja a rendszerhez.

- a. Adjon **2 μL** nukleázmentes vizet (MGMS duplex qPCR Reaction Mix 3) az negatív kontroll (NTC) helyére.
- b. Adjon **2 μL**-t a mintákból kinyert DNS-kivonatból a megfelelő helyre.
- c. Adjon **2 μL** MGMS duplex qPCR Positive Control-t a kijelölt helyre.

5. **Lezárás és centrifugálás:** Zárja le a lemezt vagy a csöveket optikai tisztaságú kupakkal vagy öntapadó fóliával. Centrifugálja röviden a lemezt/csöveket (pl. 1-2 percig $1000-2000 \times g$ erővel), hogy a folyadék összegyűljön a reakciózsebek alján és a légbuborékok távozzanak.

6. **PCR hőprofil:** Helyezze a lemezt vagy a csöveket a valós idejű PCR-készülékbe, majd indítsa el az alábbi programot:

Lépés	Hőmérséklet	Időtartam	Ciklusszám
1. Enzim aktiválás	95 °C	2 perc	1
2. Denaturáció	95 °C	5 másodperc	40
3. Anellálás/ extenzió	60 °C	20 másodperc* (fluoreszcencia leolvasással)	

***Adatgyűjtés:** A fluoreszcens jelek detektálása a FAM és HEX csatornákon történjen, minden anellálás/ extenzió lépés végén.

Az anellálás/ extenzió lépés időtartamát szükség szerint igazítsa a használt PCR-készülék hőmérséklet-változtatási (ramp) sebességéhez.

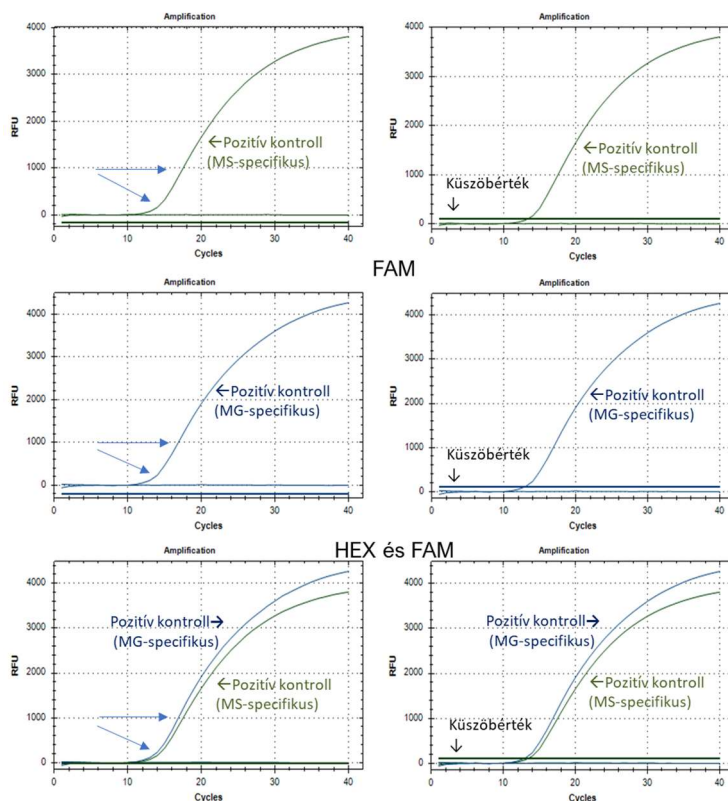
7. Készülék beállítások:

- Válassza ki a fluorofóroknak megfelelő csatornákat a leolvasáshoz.
- Applied Biosystems (ABI) készülékek használata esetén tiltsa le a passzív referenciafestéket (ROX).
- Alkalmazza a készülék alapértelmezett hőmérséklet-változtatási (ramp) sebességét.
- A páralecsapódás megelőzése érdekében győződjön meg róla, hogy a fedélfűtés be van kapcsolva (amennyiben a készülék megköveteli/elérhető).

8. **Óvintézkedések:** A PCR-reakció lefutását követően a lemezeket vagy csöveket ne nyissa fel. Rendszeresen használjon DNS lebontó hatású tisztítószeret a pipetták, eszközök és a munkafelületek dekontaminálására.

7. Kontrollreakciók és értelmezés – az eredmények validálása

- **Pozitív Kontroll:** A pozitív kontroll mindkét célszekvenciát tartalmazza (MS és MG specifikus szekvenciák; MGMS duplex qPCR Positive Control). Használja minden PCR futásban! Érvényes futás esetén a pozitív kontrollnak a FAM és a HEX csatornában egyaránt egyértelmű, tipikus amplifikációs görbét kell mutatnia.
- **Negatív Kontroll:** Minden futásban használjon legalább egy templát nélküli kontrollt (NTC; MGMS duplex qPCR Reaction Mix 3). Az NTC reakcióban egyik célcsatornában sem jelentkezhet amplifikáció.
- **Fluoreszcencia-küszöbérték (threshold) beállítása:** Állítsa a küszöbértéket az alapvonal (baseline) zajszintje fölé. Ideális esetben a küszöböt csatornánként (FAM és HEX külön-külön), az amplifikációs görbék log-lineáris fázisában kell elhelyezni (az alábbi ábrán a kék nyilakkal jelzett tartomány).



- **A PCR futás validálása:** A PCR futás akkor fogadható el, ha:
 - A pozitív kontroll (MGMS duplex qPCR Positive Control) a várt Ct-tartományban amplifikálódik (a kithez mellékelt minőségi tanúsítványban szereplő validációs értékek szerint).
 - A negatív kontroll (NTC; MGMS duplex qPCR Reaction Mix 3) egyik fluoreszcencia-csatornában sem mutat amplifikációt.
- **A kontrollok eredményének értelmezése:** Az eredményeket a FAM és HEX csatornában tapasztalt amplifikáció jelenléte (+) vagy hiánya (–) határozza meg.

Kontroll	FAM (MG-specifikus)	HEX (MS-specifikus)	Értelmezés
Negatív	–	–	Negatív (nincs amplifikáció)
Pozitív	+	+	MG és MS pozitív egyaránt

(+) Pozitív: Az amplifikáció detektálható, a Ct-érték a 40-es cut-off (határérték) értéken belül van. (–) Negatív: Nincs amplifikáció, a fluoreszcens jel nem éri el a küszöbértéket a 40. ciklusig. Az eredményeket kvalitatív (minőségi) jelleggel (pozitív/negatív) kell jelenteni, célfajonként és mintánként elkülönítve.

8. Adatalemzés és az eredmények értelmezése

- **Amplifikációs görbék ellenőrzése:** A futás befejeztével vizsgálja meg az amplifikációs ábrákat. Ellenőrizze, hogy a görbék exponenciális fázisa jól kivehető, és mutatják a tipikus szigmoid karaktert (S-alakú).
- **Fluoreszcencia-küszöbérték (threshold) beállítása:** Állítsa a küszöbértéket az alapvonal (baseline) zajszintje fölé. Ideális esetben a küszöböt csatornánként (FAM és HEX külön-külön), az amplifikációs görbék log-lineáris fázisában kell elhelyezni.
- **Ciklus-küszöbérték (Ct/Cq):** Határozza meg, hogy az egyes görbék melyik ciklusban lépik át a küszöböt. Alacsonyabb Ct-érték magasabb kezdeti DNS-kópiaszámot (kiindulási mintakoncentrációt) jelez.
- **Kontrollok ellenőrzése:** A futás validálásához kövesse a 7. fejezetben leírtakat.
- **Eredményértékelési szempontok:**
 - **Pozitív eredmény:** A minta az adott célfajra pozitív, ha a megfelelő fluoreszcencia-csatornában tipikus, szigmoid amplifikációs görbe figyelhető meg, a meghatározott határértéken belül (Ct < 40).
 - **Negatív eredmény:** A minta negatív, ha a csatornában nem történik amplifikáció (a fluoreszcens jel a teljes futás alatt a küszöbérték alatt marad, így a Ct-érték nem határozható meg).
 - **Kevert fertőzés:** Ha mindkét csatornában (FAM és HEX) értékelhető, a kritériumoknak megfelelő amplifikáció látható, a mintát mindkét célfajra pozitívként (kevert fertőzés) kell jelenteni.

- **Eredmények értelmezése:** Az eredményeket a FAM és HEX csatornában tapasztalt amplifikáció jelenléte (+) vagy hiánya (–) határozza meg.

Csatorna	Negatív Kontroll	Pozitív Kontroll	Minta	Értelmezés
FAM HEX	- -	+ +	- -	A kontrollok megfelelően működtek. A minta negatív.
FAM HEX	- -	+ +	+ -	A kontrollok megfelelően működtek. A minta kizárólag MG-t tartalmaz.
FAM HEX	- -	+ +	- +	A kontrollok megfelelően működtek. A minta kizárólag MS-t tartalmaz.
FAM HEX	- -	+ +	+ +	A kontrollok megfelelően működtek. A minta MG-t és MS-t is tartalmaz.
FAM HEX	- -	+/- -	+/- -	Amplifikációs hiba. A pozitív kontroll nem működött megfelelően. Az eredmények nem értékelhetők. Végezzen hibaelhárítást, majd ismételje meg a futást.
FAM HEX	- -	- +/-	- +/-	
FAM HEX	+ -/+	+ +	+/- +/-	Lehetséges kontamináció. Az eredmények nem értékelhetők. Végezzen hibaelhárítást, majd ismételje meg a futást.
FAM HEX	-/+ +	+ +	+/- +/-	

(+) Pozitív: Az amplifikáció detektálható, a Ct-érték a 40-es cut-off (határérték) értéken belül van. (–) Negatív: Nincs amplifikáció, a fluoreszcens jel nem éri el a küszöbértéket a 40. ciklusig. Az eredményeket kvalitatív (minőségi) jelleggel (pozitív/negatív) kell jelteni, célfajonként és mintánként elkülönítve.

- **Dokumentáció és adatkezelés:** Rögzítsen minden Ct-értéket, az eredmények értelmezését, valamint minden esetlegesen fellépő rendellenességet (pl. kontrollhiba, szokatlan amplifikációs görbe) a laboratórium minőségirányítási rendszerének előírásai szerint.

9. Hibaelhárítási útmutató

Probléma	Lehetséges ok	Javasolt intézkedés
Egyik reakciózsebben sincs amplifikáció	A reagensek degradálódtak; a PCR reakció összeállítási hibája; készülékhiba.	Ellenőrizze, hogy a reagensek fel lettek-e olvasztva és alaposan összekeverve. Ellenőrizze a Reaction Mixek pipettázását. Győződjön meg róla, hogy a PCR-gép fedele (ahol ez szükséges) és a fűtőblokk fűt. Ismételje meg a vizsgálatot friss reagensekkel.
Az MGMS duplex qPCR Positive Control nem működik (nincs jel)	Hibás összeállítás; az MGMS duplex qPCR Positive Control DNS degradálódott; a PCR-ciklusok paramétereinek hibája, a gép meghibásodása.	Ellenőrizze a pipettázást. Használjon friss egység MGMS duplex qPCR Positive Control-t. Ellenőrizze a hőprofil/ ciklusparamétereket a készüléken.
A negatív kontroll amplifikációt mutat	A reagensek, a pipetták vagy a fogyóeszközök kontaminációja.	Cserélje ki a reagenseket és a pipettahegyeket. Tisztítsa meg a munkaterületet nátrium-hipoklorit-oldattal vagy DNS-dekontamináló szerrel. A reakciókeveréket tiszta, kontaminációmentes területen állítsa össze.
Gyenge jel a vártan pozitív mintában	Alacsony a templát mennyisége vagy a DNS részlegesen degradálódott; PCR-gátlás (inhibíció).	Ellenőrizze a nukleinsav izolálás minőségét. A gátlóanyagok csökkentésére hígítsa fel a DNS mintát, és vizsgálja újra.
Nagy a szórás a replikátumok között	Pipettázási hiba vagy egyenetlen felkeverés.	Gondoskodjon a master mix és a minták alapos, de kíméletes összekeveréséről. Használjon kalibrált pipettákat. Az összes technikai replikátumot egyszerre, ugyanabban a PCR-futásban vizsgálja.
Késői amplifikáció minden reakciózsebben	Nem specifikus amplifikáció vagy alacsony szintű kontamináció.	Ha a Ct-értékek a határértéken kívül esnek ($Ct \geq 40$), és nem szabályos szigmoidok a görbék, tekintse őket negatívnak. Javítsa a lemezlezárás és a reakciókeverék homogenizálásának minőségét.

Probléma	Lehetséges ok	Javasolt intézkedés
Nem szabályos lefutású amplifikációs görbék	A készülék szoftverének beállításai vagy primer-dimer képződés.	Ellenőrizze az adatalemzési beállításokat (alapvonal és küszöbérték). Ellenőrizze a primerek/próbák integritását. Ismételje meg a PCR-t friss reagensekkel.

Ha a probléma a fenti lépések ellenére is fennáll, részletes futásadatokkal forduljon technikai támogatási szolgáltatásunkhoz. Segítségkérés előtt mindig készítse el és csatolja a futáslapot, a Ct-értékeket, valamint a készülék szoftver adatait és log fájljait.

10. Technikai adatok

- **Reakció-térfogat:** összesen 20 µL (18 µL Master Mix + 2 µL DNS/minta).
- **Reaction Mix összetétele:** Hot-start DNS-polimeráz, dNTP, MgCl₂, primerek, próbák.
- **Fluorofórok:** MG-specifikus jel: FAM (ex=495 nm/em=520 nm), MS-specifikus jel: HEX/VIC (538/554 nm).
- **PCR ciklus paraméterek:** A futás teljes ideje kb. 1 óra. A javasolt programot lásd az 5. fejezetben.
- **Analitikai érzékenység:** Reakciónként 1–10 specifikus DNS templát (a validáció során meghatározott érték a minőségi tanúsítvány szerint, „Certificate of Analysis”).
- **Specifitás:** A primerek és a próbák kifejezetten a *Mycoplasma gallisepticum* és a *Mycoplasma synoviae* törzsekre specifikusak. Szorosan rokon organizmusokkal vagy a baromfiféléket fertőző egyéb gyakori kórokozókkal keresztreakció nem tapasztalható (részletek a validációs jelentésben, „Validation report”).
- **Készülék:** A módszert a BioRad CFX96 platformon validálták.
- **Tárolási hőmérséklet:** –20 °C (hosszútávon). A felolvasztott reagensek használat közben jégen vagy 2-8 °C-on tarthatók (legfeljebb 4 napig).
- **Szavatossági idő:** Rendeltetésszerű tárolás mellett a gyártástól számított 12 hónap. A pontos lejárati dátumot lásd a tételcímken.
- **Szabályozás:** Nem alkalmazható humán diagnosztikára. Kizárólag állategészségügyi, *in vitro* célra használható.
- **Validációs jelentés:** A teljes körű validációs dokumentáció (amely részletesen tárgyalja az analitikai specifitást, érzékenységet, ismételhetőséget és robusztusságot) igény esetén beszerezhető a gyártótól (Email: info@molliscience.com).

11. Gyártó és Elérhetőségek

- **Gyártó:** MolliScience Kft., Magyarország, 2051 Biatorbágy, Március 15. utca 1.
- **Honlap:** www.molliscience.com
- **Technikai Támogatás:** Email: info@molliscience.com
- **Értékesítéssel kapcsolatos megkeresések:** Email: info@molliscience.com
- **Védjegy:** MolliScience® egy bejegyzett védjegy.

A kompatibilis termékekről és a rendelés részleteiről a legfrissebb tájékoztatásért tekintse meg a cég katalógusát vagy honlapját.
