

Oktober 2009

# Gebrauchsinformation *cad*or BTV RT-PCR Kit



96 (Katalog Nr. 280425)

Fürs Rind und Schaf

Zul. Nr.: FLI B 496



280425



QIAGEN GmbH, QIAGEN Strasse 1, D-40724 Hilden



Sample & Assay Technologies

## **QIAGEN Sample and Assay Technologies**

QIAGEN ist der führende Anbieter von Proben- und Testtechnologien zur Isolierung und Analyse jeder biologischen Probe. Unsere hochwertigen Produkte und der exzellente Service garantieren Erfolg von der Probenvorbereitung bis zum Ergebnis.

### **QIAGEN setzt Standards für:**



- Aufreinigung von DNA, RNA und Proteinen
- Testsysteme für Nukleinsäuren und Proteine
- microRNA Forschung und RNAi
- Automatisierung von Proben- und Testtechnologien

Wir stellen Ihnen die neuesten Technologien zur Verfügung, damit Sie schnell und sicher die besten Ergebnisse erzielen können. Weitere Informationen finden Sie unter [www.qiagen.com](http://www.qiagen.com) .




# **Inhaltsverzeichnis**

<b>Wirksame Bestandteile</b>	<b>4</b>
<b>Symbole</b>	<b>4</b>
<b>Darreichungsform</b>	<b>5</b>
<b>Art der Aufbewahrung</b>	<b>5</b>
<b>Datum des Verfalls</b>	<b>5</b>
<b>Anwendungszweck</b>	<b>6</b>
<b>Tierarten, für die das Mittel bestimmt ist</b>	<b>6</b>
<b>Art und Beschaffenheit des Probenmaterials</b>	<b>6</b>
<b>Sicherheitsinformationen</b>	<b>6</b>
<b>Qualitätskontrolle</b>	<b>6</b>
<b>Produktgewährleistung und Zufriedenheitsgarantie</b>	<b>7</b>
<b>Technischer Service</b>	<b>7</b>
<b>Einleitung</b>	<b>8</b>
Prinzip der Real-Time PCR	8
Erreger-Informationen	8
<b>Vom Anwender bereitzustellende Ausrüstung und Reagenzien</b>	<b>9</b>
<b>Wichtige Hinweise</b>	<b>10</b>
Allgemeine Vorsichtsmaßnahmen	10
Isolierung viraler RNA	10
Interne Kontrolle	10
<b>Protokoll 1: PCR und Auswertung</b>	<b>12</b>
<b>Troubleshooting</b>	<b>17</b>
<b>Literatur</b>	<b>20</b>
<b>Bestellinformationen (unverbindliche Angaben)</b>	<b>21</b>

## Wirksame Bestandteile

<b>cador BTV RT-PCR Kit</b>			
<b>Katalog Nr.</b>		<b>REF</b>	<b>280425</b>
<b>Anzahl der Reaktionen</b>			<b>96</b>
Blau	BTV Master: Enzyme, Oligonucleotide, PCR- Puffer		8 x 12 Reaktionen
Rot	BTV Control: in-vitro Transkript in Puffer	<b>CONTROL</b>	200 µl
Grün	BTV IC: In-vitro Transkript in Puffer	<b>IC</b>	1000 µl
Gelb	BTV Mg-Sol: Magnesium Sulfat Lösung	<b>Mg-Sol</b>	1000 µl
Weiss	H <sub>2</sub> O		1000 µl
	Gebrauchsinformation		1

## Symbole

 <N>	Inhalt reicht für <N> Tests
	Zur Verwendung bis
<b>REF</b>	Katalognummer
<b>LOT</b>	Chargenbezeichnung
	Temperaturbereich



Hersteller

**Mg-Sol**

Magnesium-Lösung

**CONTROL**

Kontrolle

**COMP**

Komponenten

**CONT**

Inhalt

**NUM**

Anzahl

**MAT**

Materialnummer



Gebrauchsinformation

## Darreichungsform

Die Komponenten des *cador* BTV RT-PCR Kit sind wässrige Lösungen zur Verwendung in der PCR.

## Art der Aufbewahrung

Die Komponenten des *cador* BTV RT-PCR Kit sollten bei -15 bis -30°C gelagert werden. Wiederholtes Auftauen und Einfrieren (> 2 x) sollte vermieden werden, da dadurch die Sensitivität verringert wird. Bei unregelmäßigem Gebrauch sollten deshalb die Reagenzien aliquotiert werden. Falls die Komponenten bei 2-8°C gelagert werden, darf ein Zeitraum von 5 Stunden nicht überschritten werden.

## Datum des Verfalls

Die Komponenten des *cador* BTV RT-PCR Kit sind bis zu dem auf dem Etikett angegebenen Datum haltbar.

## Anwendungszweck

Der *cador* BTV RT-PCR Kit ist für den Nachweis von BTV (bluetongue virus; Blauzungenvirus) in Proben vom Rind oder Schaf durch die Polymerase-Kettenreaktion (PCR). Der *cador* BTV RT-PCR Kit kann auf allen PCR Instrumenten durchgeführt werden, die die Anregung und Detektion von FAM und JOE erlauben.

## Tierarten, für die das Mittel bestimmt ist

Fürs Rind und Schaf.

## Art und Beschaffenheit des Probenmaterials

Das Ausgangsmaterial ist virale RNA, die aus Blut isoliert wurde. Ein Pool von bis zu 10 Einzelproben möglich.

## Sicherheitsinformationen

Tragen Sie beim Umgang mit Chemikalien immer einen Laborkittel, Einmal-Handschuhe und eine Schutzbrille.

Beachten Sie die Sicherheitsvorschriften beim Umgang mit flüssigem Stickstoff.

Weitere Informationen können Sie den entsprechenden Sicherheits-Datenblättern entnehmen (material safety data sheets, MSDSs). Unter [www.qiagen.com/Support/MSDS.aspx](http://www.qiagen.com/Support/MSDS.aspx) finden Sie zu diesem Kit und zu jeder Kit-Komponente das jeweilige MSDS als PDF-Datei, die Sie einsehen und ausdrucken können.

### 24-Stunden-Giftnotruf

Im Notfall können Sie 24 Stunden am Tag medizinische Informationen (in englischer, französischer und deutscher Sprache) erhalten über den:

Giftnotruf der Beratungsstelle bei Vergiftungen in Mainz (Deutschland),

Tel.: +49-(0)6131-19240

## Qualitätskontrolle

In Übereinstimmung mit dem ISO-zertifizierten Qualitäts-Management-System von QIAGEN wurde jede Charge des *cador* BTV RT-PCR Kits gegen vorgegebene Spezifikationen getestet, um eine einheitliche Produktqualität zu gewährleisten.

## Produktgewährleistung und Zufriedenheitsgarantie

QIAGEN garantiert die volle Funktionsfähigkeit aller ihrer Produkte für die in der Produktliteratur genannten Anwendungen bei genauer Einhaltung der beschriebenen Protokolle. Der Kunde muss die Eignung dieses Produkts für seine spezielle Anwendung selbst bestimmen. Sollte das Produkt trotz sachgemäßer Verwendung nicht zu zufriedenstellenden Ergebnissen führen, wird QIAGEN es kostenlos ersetzen oder den Verkaufspreis erstatten. Wir behalten uns das Recht vor, jedes Produkt zu verändern oder zu modifizieren, um dadurch dessen Funktionalität oder Design zu verbessern. Sollte ein QIAGEN Produkt nicht Ihren Erwartungen entsprechen, rufen Sie unseren Technischen Service an. Wir werden Ihnen entweder den gezahlten Betrag erstatten oder das Produkt ersetzen – so wie Sie es wünschen.

Gesonderte Konditionen gelten für die wissenschaftlichen Instrumente, Serviceprodukte und für die auf Trockeneis gelieferten Produkte von QIAGEN. Kontaktieren Sie uns für weitere Informationen.

Sie können auf Wunsch ein Exemplar der Allgemeinen Geschäftsbedingungen von QIAGEN erhalten; sie sind ebenfalls auf der Rückseite unserer Rechnungen abgedruckt. Wenn Sie Fragen zu den Spezifikationen oder zur Leistung des Produkts haben, wenden Sie sich bitte an unseren Technischen Service oder an einen der regionalen Händler (siehe die Rückseite oder besuchen Sie [www.qiagen.com](http://www.qiagen.com)).

## Technischer Service

Der Technische Service von QIAGEN garantiert Qualität auch in der wissenschaftlichen Beratung unserer Kunden. Hier stehen Ihnen erfahrene Wissenschaftler für Ihre Fragen zu QIAGEN Produkten gerne zur Verfügung. Rufen Sie uns an, wenn Sie Fragen zu *cador* BTV RT-PCR Kit oder zu anderen QIAGEN Produkten haben.

Die Erfahrungen unserer Kunden sind eine wichtige Informationsquelle bei der Entwicklung und Verbesserung unserer Produkte. Diese Informationen sind sowohl für andere Wissenschaftler, als auch für die Entwickler von QIAGEN sehr hilfreich. Rufen Sie uns an, denn Ihre Vorschläge und Ideen zu unseren Produkten und zu neuen Techniken interessieren uns.

Für technische Unterstützung sowie weitere Informationen besuchen sie bitte unseren Technischen Support unter [www.qiagen.com/Support](http://www.qiagen.com/Support) oder wenden Sie sich an eine der QIAGEN Technical Service Departments oder an Ihren lokalen Distributor (siehe die Rückseite oder besuchen Sie [www.qiagen.com](http://www.qiagen.com)).

## Einleitung

Der *cador* BTV RT-PCR Kit ist ein gebrauchsfertiges System für den Nachweis von BTV RNA durch die Polymerase-Kettenreaktion (PCR). Er kann auf allen PCR Instrumenten benutzt werden, die die Detektion von FAM und JOE erlauben. Der BTV Master beinhaltet Reagenzien und Enzyme für die reverse Transkription und spezifische Amplifikation eines 200 bp langen Abschnitts des BTV-Genoms sowie für die unmittelbare Detektion des Amplifikats im FAM-Fluoreszenz-Kanal.

Daneben enthält der *cador* BTV RT-PCR Kit zum Nachweis einer möglichen PCR-Inhibition ein zweites heterologes Amplifikationssystem. Dieses wird als interne Kontrolle (IC) im Fluoreszenz-Kanal für JOE detektiert. Dabei wird die Nachweisgrenze der analytischen BTV RT-PCR nicht herabgesetzt. Es wird eine externe Positivkontrolle (BTV Control) mitgeliefert.

## Prinzip der Real-Time PCR

Bei dem Nachweis mittels Polymerase-Kettenreaktion (PCR) werden spezifische Bereiche aus dem Erregergenom amplifiziert. Die Detektion findet bei der Real-Time PCR mit Hilfe von Fluoreszenzfarbstoffen statt. Diese sind in der Regel an Oligonukleotid-Sonden gekoppelt, die spezifisch an das PCR-Amplifikat binden. Die Detektion der Fluoreszenzintensitäten im Verlauf der Real-Time PCR ermöglicht den Nachweis und die Quantifizierung der Produkte, ohne die Probenröhrchen nach der PCR wieder öffnen zu müssen.\*

## Erreger-Informationen

Die Blauzungenkrankeheit (Bluetongue Disease - BT) ist eine nicht ansteckende Krankheit, die beim Rind, dem Schaf und anderen Wiederkäuern vorkommt. Der Erreger ist das Blauzungenvirus (doppelsträngige RNA; *Reoviridae*-Familie), der von Mücken (*Culicoides* spp.) übertragen wird. BTV ist in 24 Serotypen klassifiziert und kommt weltweit von den tropischen bis in die moderaten Klimazonen vor. Es kann schwerwiegende Symptome verursachen wie Läsionen im Nasenschleimhautbereich, Lahmheit, hohes Fieber, Hyperämien, verstärkten Speichelfluss, zyanotische (blaue) Zunge und gestörtes Allgemeinbefinden. Beim Rind kann eine Infektion auch zum Rückgang der Milchleistung und zu Aborten führen. Sie hat eine hohe Mortalität bei den Schafen und eine niedrigere beim Rind. Seit 2006 kam es in Mitteleuropa zu mehreren Krankheitsausbrüchen von BTV 8. Derzeit gibt es keine effektive Behandlung. Zur Kontrolle der Krankheitsausbreitung werden präventive Maßnahmen wie Quarantäne, Impfung und Mückenbekämpfung angewendet.

\* Mackay, I.M. (2004) Real-time PCR in the microbiology laboratory. Clin. Microbiol. Infect. **10**, 190.

## Vom Anwender bereitzustellende Ausrüstung und Reagenzien

- RNA-Isolierungskit
- Pipetten (einstellbar)
- Sterile Pipettenspitzen mit Filter
- Vortex-Mixer
- Tischzentrifuge mit Rotor für 2 ml-Reaktionsgefäße
- PCR Instrumente, die die Detektion von FAM und JOE erlauben, z.B.: Rotor-Gene
- PCR-Reaktionsgefäße
- Kühlblock
- Optional: Styrofoam<sup>®</sup>-Box oder anderer isolierter Behälter, der bis ca. 5 mm Höhe mit flüssigem Stickstoff oder zerkleinertem Eis gefüllt ist
- Heizblock oder Wasserbad, die 95°C für die Probedenaturierung erreichen können (falls sich die Proben in PCR-Röhrchen befinden, kann alternativ das PCR Instrument verwendet werden)

# Wichtige Hinweise

## Allgemeine Vorsichtsmaßnahmen

Folgendes sollte vom Anwender immer beachtet werden:

- Sterile Pipettenspitzen mit Filter verwenden.
- Positivmaterial (Proben, Kontrollen, Amplifikate) räumlich getrennt von den übrigen Reagenzien lagern, aufreinigen und zur Reaktion zusetzen.
- Alle Komponenten vor Testbeginn vollständig bei Raumtemperatur auftauen (15–25°C).
- Anschließend die Komponenten gründlich durchmischen und kurz zentrifugieren.
- Zügig auf Eis oder im Kühlblock (72/96 well loading block) arbeiten.

## Isolierung viraler RNA

Das *cador* BTV RT-PCR Kit ist in der Lage, RNA aus Proben zu analysieren, welche mit geeigneten Verfahren für virale RNA aufgereinigt worden ist.

QIAGEN bietet eine Vielzahl von möglichen Optionen im Bereich manuelle und automatisierte Probenaufreinigung. Mehr Informationen erhalten Sie unter [www.qiagen.com](http://www.qiagen.com).

Der *cador* BTV RT-PCR Kit ist nicht geeignet für Proben, die auf der Grundlage von Phenol aufgereinigt wurden.

## Interne Kontrolle

Es wird eine interne Kontrolle (BTV IC) mitgeliefert. Mit dieser haben Sie die Möglichkeit, sowohl die Aufreinigung der RNA als auch eine mögliche Inhibition der PCR zu kontrollieren. Für diese Anwendung geben Sie die Interne Kontrolle in einem Verhältnis von 0,1 µl pro 1 µl Elutionsvolumen zum Lysat hinzu. Die Menge der eingesetzten Internen Kontrolle ist nur abhängig vom Elutionsvolumen.

**Anmerkung:** Die interne Kontrolle darf nur zum Gemisch aus Lysispuffer und Probenmaterial oder direkt zum Lysispuffer zugesetzt werden.

Die Interne Kontrolle darf nicht direkt zum Probenmaterial gegeben werden. Bei Zugabe zum Lysispuffer ist zu beachten, dass das Gemisch aus Interner Kontrolle und Lysispuffer frisch angesetzt werden muss und sofort einzusetzen ist (Lagerung des Gemischs bei Raumtemperatur kann bereits nach wenigen Stunden zum Ausfall der Internen Kontrolle führen).

**Anmerkung:** Die Interne Kontrolle des *cador* BTV RT-PCR Kits kann direkt in die Aufreinigung eingesetzt werden. Bitte achten sie darauf, in der Aufreinigung eine negative Probe mitzuführen. Das entsprechende Signal der internen Kontrolle dient als Grundlage für die Bewertung der Aufreinigung.

Optional kann die Interne Kontrolle ausschließlich zur Kontrolle einer möglichen PCR-Inhibition verwendet werden. Hierfür geben Sie wie unter dem Protokollschritt 3b (Seite13) beschrieben die interne Kontrolle direkt zum Gemisch aus BTV Master und BTV Mg-Sol hinzu.

# Protokoll 1: PCR und Auswertung

## Wichtige Hinweise vor Beginn

- Lesen Sie bitte vor dem Beginn des Verfahrens "Wichtige Hinweise", Seiten 10–11.
- Nehmen Sie sich vor dem Protokollbeginn Zeit, sich mit dem PCR Instrument vertraut zu machen. Beachten sie das mit dem Gerät mitgelieferten Benutzerhandbuch.
- Beachten Sie beim Ansetzen der PCR, dass pro PCR-Lauf eine Positivkontrolle (BTV Control) sowie eine Negativkontrolle (H<sub>2</sub>O) mitgeführt werden.

## Vor dem Testbeginn

- Stellen Sie sicher, dass der Kühlblock auf 2-8°C vorgekühlt ist.
- Alle Reagenzien sollten vor Testbeginn vollständig bei Raumtemperatur (15–25°C) aufgetaut, gut durchmischt (mehrfaches Auf- und Abpipettieren oder kurzes Vortexen) und anschließend anzentrifugiert werden

## Durchführung

- 1. Setzen Sie die für die geplanten Reaktionen erforderliche Anzahl PCR-Reaktionsgefäße in die Adapter des Kühlblocks ein.**
- 2. Denaturieren Sie die Proben für 5 Minuten bei 95°C. Pipettieren Sie unmittelbar danach 10 µl jeder Probe in die vorgekühlten PCR-Reaktionsgefäße in dem Kühlblock. Entsprechend müssen als Positivkontrolle 10 µl der Positivkontrolle (BTV Control) und als Negativkontrolle 10 µl H<sub>2</sub>O eingesetzt werden.**

**Optional:** Schockgefrieren Sie die Proben nach der Denaturierung durch Platzierung der Reaktionsgefäße mit der Probe in einen Behälter, dessen Boden mitflüssigem Stickstoff oder zerkleinertem Eis bedeckt ist. Setzen Sie die Reaktionsgefäße nach dem Schockgefrieren in den Kühlblock.

Das Schockgefrieren der Proben nach der Denaturierung kann die Sensitivität erhöhen, da die Renaturierung der doppelsträngigen RNA verhindert ist. Die Positivkontrolle (BTV Control) und die Negativkontrolle müssen nicht schockgefroren werden.

- 3. Wollen Sie mit der Internen Kontrolle sowohl die Aufreinigung der RNA als auch eine mögliche Inhibition der PCR kontrollieren, so folgen Sie dem Schritt 3a. Wollen Sie die Interne Kontrolle ausschließlich zur Kontrolle einer PCR-Inhibition einsetzen, gehen Sie gemäß dem Schritt 3b vor.**

**3a. Die Interne Kontrolle wurde bereits zur Isolation gegeben worden (siehe "Interne Kontrolle", Seite 10). In diesem Fall bereiten Sie den Master Mix gemäß der Tabelle 1 vor.**

Das Reaktionsgemisch beinhaltet alle für die PCR benötigten Komponenten außer der Probe.

**Tabelle 1. Ansetzen des Master Mixes (Interne Kontrolle wird zur Kontrolle der RNA-Aufreinigung und der möglichen PCR-Inhibitionen verwendet)**

<b>Anzahl der Proben</b>	<b>1</b>	<b>12</b>
BTV Master	13 $\mu$ l	156 $\mu$ l
BTV Mg-Sol	2 $\mu$ l	24 $\mu$ l
BTV IC	0 $\mu$ l	0 $\mu$ l
<b>Gesamtvolumen</b>	<b>15 <math>\mu</math>l</b>	<b>180 <math>\mu</math>l</b>

**3b. Die interne Kontrolle muss direkt zum Gemisch aus BTV Master und BTV Mg-Sol gegeben werden. In diesem Fall bereiten Sie den Master Mix gemäß der Tabelle 2 vor.**

Das Reaktionsgemisch beinhaltet alle für die PCR benötigten Komponenten außer der Probe.

**Tabelle 2. Ansetzen des Master Mixes (Interne Kontrolle wird ausschließlich zur Kontrolle einer PCR-Inhibition eingesetzt)**

<b>Anzahl der Proben</b>	<b>1</b>	<b>12</b>
BTV Master	13 $\mu$ l	156 $\mu$ l
BTV Mg-Sol	2 $\mu$ l	24 $\mu$ l
BTV IC	1 $\mu$ l	12 $\mu$ l
<b>Gesamtvolumen</b>	<b>16 <math>\mu</math>l</b>	<b>192 <math>\mu</math>l*</b>

\* Die durch die Zugabe der internen Kontrolle bedingte Volumenerhöhung wird beim Ansetzen der PCR-Reaktion vernachlässigt. Die Sensitivität des Nachweissystems wird nicht beeinträchtigt.

**4. Pipettieren Sie in jedes PCR-Reaktionsgefäß 15  $\mu$ l des Master Mixes.**

Dieser Schritt sollte innerhalb 15 Minuten nach der Probendenaturierung (Schritt 2) durchgeführt werden.

**5. Verschließen Sie die PCR-Reaktionsgefäße.**

**6. Zur Detektion der BTV-RNA erstellen Sie ein Temperaturprofil gemäß des Cycling-Protokolls in der Tabelle 3.**

Einzelheiten zur Programmierung der verschiedenen real time PCR Instrumente entnehmen Sie bitte dem jeweils mitgelieferten Handbuch.

**Tabelle 3: Cycling-Protokoll**

			<b>Kommentare</b>
<b>Reverse Transkription</b>	30 min	50°C	RNA wird revers transkribiert in eine cDNA.
<b>Initiale PCR-Aktivierung:</b>	10 min	95°C	Initiale Denaturierung der Template-cDNA.
<b>Amplifikation der cDNA</b>			
<b>Touchdown-Zyklen:</b>			
Denaturierung	30 s	95°C	
Annealing	60 s	70°C, -1°C jeder Zyklus	
Extension	20 s	72°C	PCR-Produkt ist 200 bp.
Anzahl der Zyklen	10		
<b>3-Schritt-Cycling:</b>			
Denaturierung	30 s	95°C	
Annealing	60 s	60°C	
Extension	20 s	72°C	PCR-Produkt ist 200 bp.
Anzahl der Zyklen	35		

**7. Führen Sie nach dem Lauf die Datenauswertung durch. Folgende Ergebnisse können auftreten (8a, 8b und 8c).**

Beispiele für positive und negative PCR-Reaktionen sind in Abbildung 1 und Abbildung 2 wiedergegeben.

**8a. Im Fluoreszenz-Kanal für FAM wird ein Signal detektiert.  
Das Ergebnis der Analyse ist positiv: Die Probe enthält BTV-RNA.**

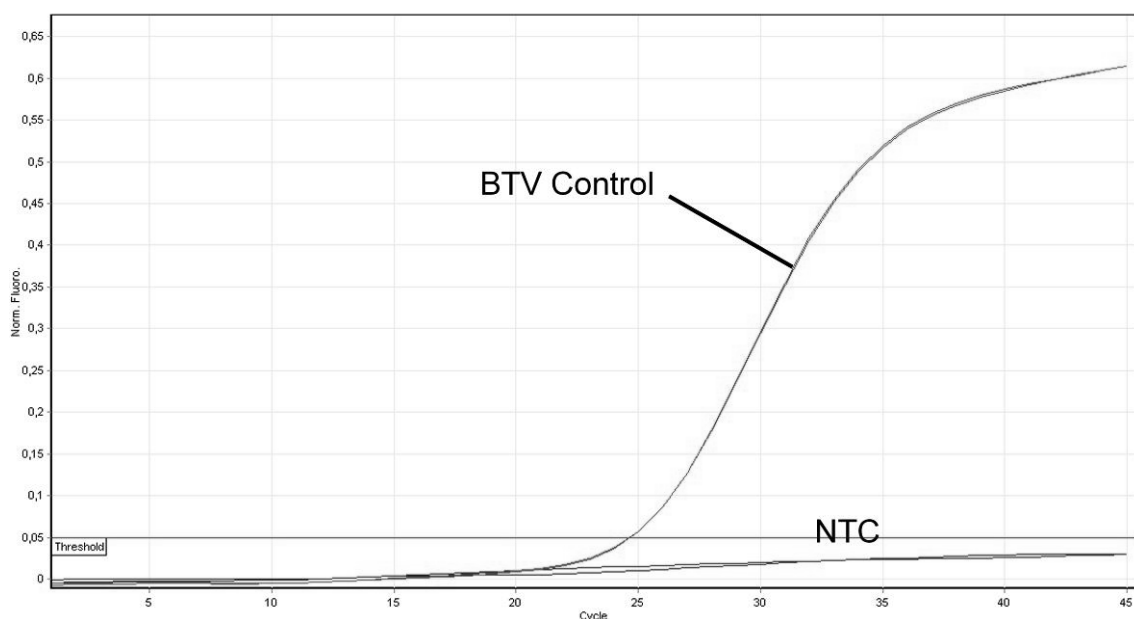
In diesem Fall ist die Detektion eines Signals im Kanal für JOE unwesentlich, da hohe Ausgangskonzentrationen an BTV-RNA (positives Signal im FAM-Kanal) zu einem reduzierten bis ausbleibenden Fluoreszenz-Signal der Internen Kontrolle im JOE-Kanal führen können (Kompetition).

- 8b. Im FAM-Fluoreszenz-Kanal wird kein Signal detektiert, sondern nur im JOE-Kanal (Signal der Internen Kontrolle).  
In der Probe ist keine BTV-RNA nachweisbar. Sie kann daher als negativ angesehen werden.**

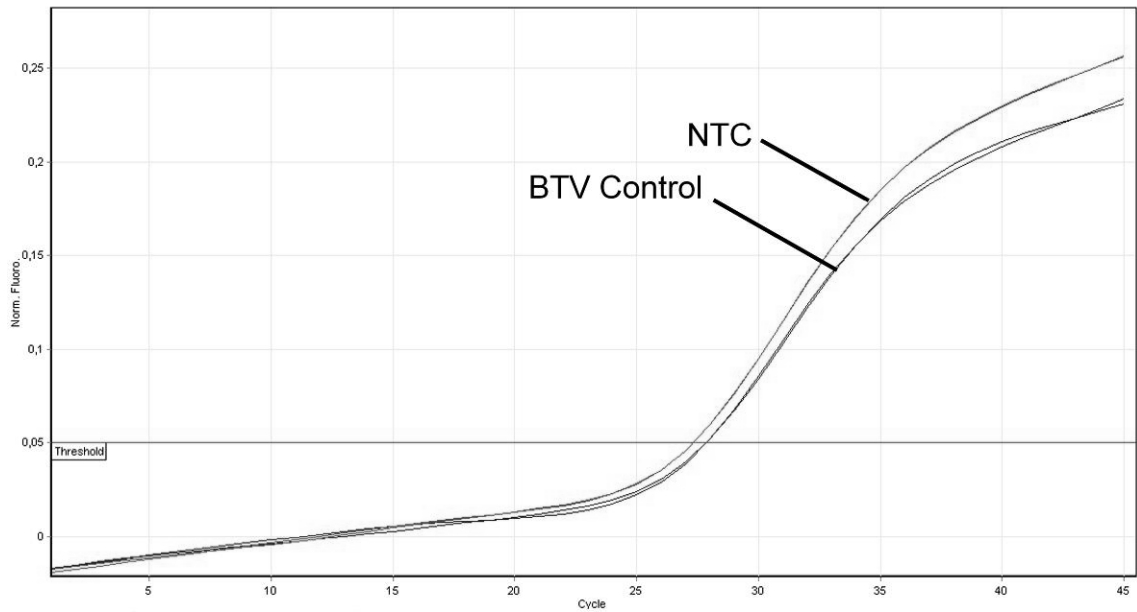
Bei negativer BTV RT-PCR schließt das detektierte Signal der internen Kontrolle die Möglichkeit einer RT-PCR-Inhibition aus.

- 8c. Weder im FAM-Kanal noch im JOE-Kanal wird ein Signal detektiert.  
Eine Aussage ist nicht möglich.**

Hinweise zu Fehlerquellen und deren Beseitigung sind unter "Troubleshooting", Seite 17, aufgeführt.



**Abbildung 1. Nachweis der Positivkontrolle (BTV Control) im Kanal für FAM .  
NTC : non-template control (Negativkontrolle).**



**Abbildung 2. Nachweis der internen Kontrolle (IC) im Fluoreszenz-Kanal für JOE bei gleichzeitiger Amplifikation der Positivkontrolle (BTV Control). NTC : non-template control (Negativkontrolle).**

## Troubleshooting

In diesem Kapitel finden Sie nützliche Hinweise, die Ihnen bei der Lösung eventuell auftretender Probleme helfen können. Außerdem beantwortet das Team vom Technischen Service bei QIAGEN gerne Ihre Fragen zu den Angaben und zum Protokoll in diesem Handbuch bzw. auch zu molekularbiologischen Anwendungen allgemein (Möglichkeiten der Kontaktaufnahme siehe die Rückseite oder [www.qiagen.com](http://www.qiagen.com)).

### Kommentare und Vorschläge

---

#### **Kein Signal bei der Positivkontrolle (BTV Control) im Fluoreszenz-Kanal für FAM.**

- |  |   |
|--|---|
| a) Die Wahl des Fluoreszenz -Kanals bei der PCR-Datenanalyse entspricht nicht den Protokollangaben   | Wählen Sie für die Datenanalyse den Fluoreszenz-Kanal FAM für die analytische BTV RT-PCR und den Fluoreszenz-Kanal Cycling JOE für die RT-PCR der internen Kontrolle. |
| b) Die Programmierung des Temperaturprofils des Rotor-Gene Instruments ist fehlerhaft.   | Vergleichen Sie das Temperaturprofil mit den Protokollangaben (siehe " Protokoll 1: PCR und Auswertung", Seite 12).   |
| c) Fehlerhaftes Zusammenstellen der PCR-Reaktion   | Überprüfen Sie Ihre Arbeitsschritte mit Hilfe des Pipettierschemas (siehe "Protokoll 1: PCR und Auswertung", Seite 12) und wiederholen Sie ggf. die PCR.              |
| d) Die Lagerungsbedingungen für eine oder mehrere Kit-Komponenten entsprachen nicht den in "Art der Aufbewahrung" angeführten Vorschriften (Seite 5) | Bitte überprüfen Sie sowohl Lagerungsbedingungen als auch Haltbarkeitsdatum (siehe Kit-Etikett) der Reagenzien und verwenden Sie ggf. einen neuen Kit.                |
| e) Das Haltbarkeitsdatum des <i>cador</i> BTV RT-PCR Kits wurde überschritten  | Bitte überprüfen Sie sowohl Lagerungsbedingungen als auch Haltbarkeitsdatum (siehe Kit-Etikett) der Reagenzien und verwenden Sie ggf. einen neuen Kit.                |

## Kommentare und Vorschläge

---

### **Schwaches oder ausbleibendes Signal der internen Kontrolle im Fluoreszenz-Kanal JOE bei gleichzeitiger Abwesenheit eines Signals im Kanal FAM**

- a) Die PCR-Bedingungen entsprechen nicht dem Protokoll      Überprüfen Sie die PCR-Bedingungen (siehe oben) und wiederholen Sie ggf. die PCR mit korrigierten Einstellungen.
- b) Die PCR wurde inhibiert      Stellen Sie sicher, dass Sie ein geeignetes Aufreinigungsverfahren benutzen und halten Sie sich exakt an die Herstellervorschrift.  
  
Falls Sie eine RNA verwenden, die aus einer Zellkultur extrahiert wurde, benutzen Sie für die PCR nicht zu viel der Template-RNA. Falls nötig, verdünnen Sie die aufgereinigte RNA und wiederholen Sie den Ansatz.
- c) Es liegen aufreinigungsbedingte RNA-Verluste vor      ⓘ Sollte die Interne Kontrolle zur Aufreinigung zugegeben worden sein, kann ein Ausbleiben des Signals der Internen Kontrolle bedeuten, dass aufreinigungsbedingte RNA-Verluste vorliegen. Stellen Sie sicher, dass Sie ein geeignetes Aufreinigungsverfahren anwenden und halten Sie sich an die Herstellervorschrift.
- d) Die Lagerungsbedingungen für eine oder mehrere Kit-Komponenten entsprechen nicht den in "Art der Aufbewahrung" angeführten Vorschriften (Seite 5)      ⓘ Bitte überprüfen Sie sowohl Lagerungsbedingungen als auch Haltbarkeitsdatum (siehe Kit-Etikett) der Reagenzien und verwenden Sie ggf. einen neuen Kit.
- e) Das Haltbarkeitsdatum des *cador* BTV RT-PCR Kits wurde überschritten      ⓘ Bitte überprüfen Sie sowohl Lagerungsbedingungen als auch Haltbarkeitsdatum (siehe Kit-Etikett) der Reagenzien und verwenden Sie ggf. einen neuen Kit.

## Kommentare und Vorschläge

---

### Signale bei den Negativkontrollen im Fluoreszenz-Kanal FAM der analytischen RT-PCR

- a) Es liegt eine Kontamination während der Vorbereitung der PCR vor
- ① Wiederholen Sie die PCR mit noch unbenutzten Reagenzien in Replikaten.
  - ① Verschließen Sie die einzelnen PCR-Gefäße nach Möglichkeit jeweils unmittelbar nach Zugabe der zu untersuchenden Probe.
  - ① Pipettieren Sie die Positivkontrollen grundsätzlich zuletzt.
  - ① Stellen Sie sicher, dass Arbeitsflächen und -geräte regelmäßig dekontaminiert werden.
- b) Es liegt eine aufreinigungsbedingte Kontamination vor
- ① Wiederholen Sie die Aufreinigung und PCR der zu untersuchenden Proben unter Verwendung noch unbenutzter Reagenzien.
  - ① Stellen Sie sicher, dass Arbeitsflächen und -geräte regelmäßig dekontaminiert werden.

## Literatur

QIAGEN führt eine umfangreiche und aktuelle Online-Datenbank mit wissenschaftlichen Publikationen, die QIAGEN Produkte auswerten. Detaillierte Suchoptionen erlauben Ihnen durch eine einfache Schlüsselwortsuche oder durch Spezifizierung von Applikation, Forschungsgebiet, Titel o. a., die benötigten Artikel schnell zu finden.

Die vollständige Literaturliste finden Sie online in der QIAGEN Reference Database unter [www.qiagen.com/RefDB/search.asp](http://www.qiagen.com/RefDB/search.asp) oder kontaktieren Sie den QIAGEN Technical Service oder Ihren lokalen Distributor.

## Bestellinformationen (unverbindliche Angaben)

Produkt	Inhalt	Kat. Nr.
cador BTV RT-PCR Kit (96)	Für 96 Reaktionen: BTV Master, BTV Control, BTV IC, BTV Mg-Sol, H <sub>2</sub> O	280425
<b>QIAamp RNA Blood Mini Kit — für Aufreinigung zellulärer RNA aus frischem Vollblut</b>		
QIAamp RNA Blood Mini Kit (50)	Für 50 RNA-Präparationen: 50 QIAamp Mini Spinsäulen, 50 QIAshredder Spinsäulen, Collection Tubes (1,5 ml und 2 ml), Rnase-freie Reagenzien und Puffer	52304
QIAamp Viral RNA Mini Kit (50)	Für 50 RNA-Präparationen: 50 QIAamp Mini Spinsäulen, 50 QIAshredder Spinsäulen, Collection Tubes (1,5 ml und 2 ml), Rnase-freie Reagenzien und Puffer.  Für ein Sonderprotokoll für dsRNA aus Vollblut bitte kontaktieren Sie uns oder das NRL am Friedrich-Loeffler-Institut.	52904
QIAamp Viral RNA Mini Kit (250)	Für 250 RNA-Präparationen: 50 QIAamp Mini Spinsäulen, 50 QIAshredder Spinsäulen, Collection Tubes (1,5 ml und 2 ml), Rnase-freie Reagenzien und Puffer  Für ein Sonderprotokoll für dsRNA aus Vollblut bitte kontaktieren Sie uns oder das NRL am Friedrich-Loeffler-Institut.	52906
<b>BioRobot Universal System — für voll-automatisierte Anwendungen im 96-well-Format mit mittlerem bis hohem Durchsatz (Kontaktieren Sie uns für Sonderprotokolle)</b>		
BioRobot Universal System	Roboter-Arbeitsstation, computergesteuerte Vakuumpumpe, Computer, QIAsoft 5 Operating System	9001094
<b>BioSprint 96 System zur semi-automatisierten RNA - Aufreinigung im 96-well-Format mit hohem Durchsatz</b>		
BioSprint 96	9000852	

<b>Produkt</b>	<b>Inhalt</b>	<b>Kat. Nr.</b>
BioSprint 96 One-For-All Vet Kit (384)	Zur Aufreinigung von RNA und DNA aus Vollblut, Serum, Plasma, zellfreien Flüssigkeiten, Tupfern und Gewebelysaten	947057
<b>Rotor-Gene Q und Zubehör</b>		
Rotor-Gene Q 5plex	Real-time PCR Cyler mit 5 Kanälen (grün, gelb, orange, rot, dunkelrot), Laptop, Software, Zubehör	Bitte anfragen
Rotor-Gene Q 5plex HRM	Real-time PCR Cyler und ein High-Resolution-Melt-Analysator mit 5 Kanälen (grün, gelb, orange, rot, dunkelrot) plus HRM-Kanal, Laptop, Software, Zubehör	Bitte anfragen
Rotor-Gene Q 6plex	Real-time PCR Instrument mit 6 Kanälen (blau, grün, gelb, orange, rot, dunkelrot), inklusive Laptop, Software, Zubehör	Bitte anfragen
Loading Block 72 x 0.1 ml Tubes	Aluminum-Block für eine manuelle Einstellung der Reaktion mit einer 1-Kanal-Pipette in 72 x 0,1 ml Reaktionsgefäßen	9018901
Loading Block 96 x 0.2 ml Tubes	Aluminum-Block für eine manuelle Einstellung der Reaktion in einer 8 x 12 Standardreihe unter Verwendung von 96 x 0,2 ml Reaktionsgefäßen	9018905
Strip Tubes and Caps, 0.1 ml (250)	250 Streifen mit 4 Gefäßen und Deckeln für 1000 Reaktionen	981103
Strip Tubes and Caps, 0.1 ml (2500)	10 x 250 Streifen mit 4 Gefäßen und Deckeln für 10.000 Reaktionen	981106
PCR Tubes, 0.2 ml (1000)	1000 dünnwandige Reaktionsgefäße für 1000 Reaktionen	981005
PCR Tubes, 0.2 ml (10000)	10 x 1000 dünnwandige Reaktionsgefäße für 1000 Reaktionen	981008

Warenzeichen/Markennamen: QIAGEN®, QIAamp®, BioRobot®, *cador*® (QIAGEN Group); FAM®, JOE™ (Applied Biosystems Corporation or its subsidiaries); Rotor-Gene® (Corbett Research); Styrofoam® (Dow Chemical Company); SYBR® (Molecular Probes, Inc.).

#### **Eingeschränkte Nutzungsvereinbarung**

Mit der Nutzung dieses Produkts erkennen Käufer und Anwender des *artus* BTV RT-PCR Kits die folgenden Bedingungen an:

1. Der *cador* BTV RT-PCR Kit darf nur gemäß den Angaben im *Handbuch für den cador BTV RT-PCR Kit* und mit den Komponenten, die im Kit geliefert werden, verwendet werden. QIAGEN gewährt im Rahmen ihrer Eigentumsrechte keinerlei Lizenz, die zum Kit gehörenden Komponenten mit anderen Komponenten, die nicht zum Kit gehören, zu verwenden oder zu kombinieren, mit Ausnahme der im *Handbuch für den artus cador BTV RT-PCR Kit* und in zusätzlichen, unter [www.qiagen.com](http://www.qiagen.com) verfügbaren Protokollen beschriebenen Anwendungen.
2. Über die ausdrücklich erwähnten Lizenzanwendungen hinaus übernimmt QIAGEN keinerlei Garantie dafür, dass dieser Kit und/oder die mit ihm durchgeführte(n) Anwendung(en) die Rechte Dritter nicht verletzt.
3. Dieser Kit und seine Komponenten sind für die einmalige Verwendung lizenziert und dürfen nicht wiederverwendet, wiederaufgearbeitet oder weiterverkauft werden.
4. QIAGEN lehnt außer der ausdrücklich gewährten Lizenzgewährung jede weitere Lizenzgewährung ab, sowohl ausdrücklich als auch konkludent.
5. Käufer und Anwender des Kits stimmen zu, keinerlei Schritte zu unternehmen oder anderen die Einleitung von Schritten zu gestatten, die zu unerlaubten Handlungen im obigen Sinne führen könnten oder solche erleichtern könnten. QIAGEN kann die Verbote dieser eingeschränkten Nutzungsvereinbarung an jedem Ort gerichtlich geltend machen und wird sämtliche Ermittlungs- und Gerichtskosten, inklusive Anwaltsgebühren, zurückfordern, die ihr bei der Geltendmachung dieser eingeschränkten Nutzungsvereinbarung oder irgendeines ihrer geistigen Eigentumsrechte im Zusammenhang mit dem Kit und/oder dessen Komponenten entstehen.

Aktualisierte Nutzungs- und Lizenzbedingungen können unter [www.qiagen.com](http://www.qiagen.com) nachgelesen werden.

© 2009 QIAGEN, alle Rechte vorbehalten.

---

**www.qiagen.com**

**Australia** ■ Orders 03-9840-9800 ■ Fax 03-9840-9888 ■ Technical 1-800-243-066

**Austria** ■ Orders 0800/28-10-10 ■ Fax 0800/28-10-19 ■ Technical 0800/28-10-11

**Belgium** ■ Orders 0800-79612 ■ Fax 0800-79611 ■ Technical 0800-79556

**Canada** ■ Orders 800-572-9613 ■ Fax 800-713-5951 ■ Technical 800-DNA-PREP (800-362-7737)

**China** ■ Orders 021-51345678 ■ Fax 021-51342500 ■ Technical 021-51345678

**Denmark** ■ Orders 80-885945 ■ Fax 80-885944 ■ Technical 80-885942

**Finland** ■ Orders 0800-914416 ■ Fax 0800-914415 ■ Technical 0800-914413

**France** ■ Orders 01-60-920-926 ■ Fax 01-60-920-925 ■ Technical 01-60-920-930 ■ Offers 01-60-920-928

**Germany** ■ Orders 02103-29-12000 ■ Fax 02103-29-22000 ■ Technical 02103-29-12400

**Hong Kong** ■ Orders 800 933 965 ■ Fax 800 930 439 ■ Technical 800 930 425

**Ireland** ■ Orders 1800-555-049 ■ Fax 1800-555-048 ■ Technical 1800-555-061

**Italy** ■ Orders 02-33430411 ■ Fax 02-33430426 ■ Technical 800-787980

**Japan** ■ Telephone 03-5547-0811 ■ Fax 03-5547-0818 ■ Technical 03-5547-0811

**Luxembourg** ■ Orders 8002-2076 ■ Fax 8002-2073 ■ Technical 8002-2067

**The Netherlands** ■ Orders 0800-0229592 ■ Fax 0800-0229593 ■ Technical 0800-0229602

**Norway** ■ Orders 800-18859 ■ Fax 800-18817 ■ Technical 800-18712

**Singapore** ■ Orders 65-67775366 ■ Fax 65-67785177 ■ Technical 65-67775366

**South Korea** ■ Orders 1544 7145 ■ Fax 1544 7146 ■ Technical 1544 7145

**Sweden** ■ Orders 020-790282 ■ Fax 020-790582 ■ Technical 020-798328

**Switzerland** ■ Orders 055-254-22-11 ■ Fax 055-254-22-13 ■ Technical 055-254-22-12

**UK** ■ Orders 01293-422-911 ■ Fax 01293-422-922 ■ Technical 01293-422-999

