

März 2011

Gebrauchsinformation *cador* BVDV RT-PCR Kit



96 (Katalog-Nr. 280355)

Für den Nachweis von BVDV-RNA in
Rinderproben

Zul.-Nr: FLI-B 467



280355



QIAGEN GmbH, QIAGEN-Straße 1, D-40724 Hilden



Sample & Assay Technologies

QIAGEN Sample and Assay Technologies

QIAGEN ist der führende Anbieter von Probenvorbereitungs- 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 in:

der Reinigung von DNA, RNA und Proteinen

Nukleinsäure- und Protein-Assays

microRNA-Forschung und RNAi

der Automatisierung von Probenvorbereitungs- 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.

Inhaltsverzeichnis

Kit-Inhalt	4
Symbole	4
Darreichungsform	5
Lagerung	5
Haltbarkeit	6
Vorgesehener Verwendungszweck	6
Tierarten, für die das Mittel bestimmt ist	6
Art und Beschaffenheit des Probenmaterials	6
Sicherheitsinformationen	7
Qualitätskontrolle	7
Produktgewährleistung und Zufriedenheitsgarantie	8
Technischer Service	8
Einleitung	9
Prinzip der Real-Time-PCR	9
Erreger-Informationen	9
Vom Anwender bereitzustellende Ausrüstung und Reagenzien	10
Wichtige Hinweise	11
Allgemeine Vorsichtsmaßnahmen	11
Isolierung viraler RNA	11
Carrier-RNA	12
Interne Kontrolle	12
Protokoll 1: PCR	14
Protokoll 2: Auswertung	18
Hilfe zur Fehlersuche	20
Bestellinformationen (unverbindliche Angaben)	23
Notizen	25
Notizen	26

Kit-Inhalt

cador BVDV RT-PCR Kit			
Katalog-Nr.		REF	280355
Anzahl der Reaktionen			96
Blau	BVDV Master: Enzyme, Oligonukleotide, PCR-Puffer		8 x 12 Reaktionen
Rot	BVDV 1 Control: In-vitro-Transkript in Puffer	CONTROL	200 µl
Rot	BVDV 2 Control: In-vitro-Transkript in Puffer	CONTROL	200 µl
Grün	BVDV IC: In-vitro-Transkript in Puffer	IC	2 x 1000 µl
Gelb	BVDV Mg-Sol: Magnesiumsulfat-Lösung	Mg-Sol	400 µl
Weiß	H ₂ O		1000 µl
	Gebrauchsinformation		1

Symbole

 <N> Inhalt reicht für <N> Tests

 Zur Verwendung bis

REF Katalognummer

LOT	Chargenbezeichnung
	Temperaturbereich
	Hersteller
IC	Interne Kontrolle
Mg-Sol	Magnesium-Lösung
CONTROL	Kontrolle
COMP	Komponenten
CONT	Inhalt
NUM	Anzahl
MAT	Materialnummer
	Gebrauchsinformation

Darreichungsform

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

Lagerung

Die Komponenten des *cador* BVDV RT-PCR Kits 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.

Haltbarkeit

Die Komponenten des *cador* BVDV RT-PCR Kits sind bis zu dem auf dem Etikett angegebenen Verfallsdatum haltbar.

Vorgesehener Verwendungszweck

Der *cador* BVDV RT-PCR Kit ist für den Nachweis von BVDV in Proben von Rindern durch die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) vorgesehen. Der *cador* BVDV RT-PCR Kit kann auf allen PCR-Thermocyclern durchgeführt werden, die die Detektion von FAM und VIC[®] erlauben.

Tierarten, für die das Mittel bestimmt ist

Fürs Rind.

Art und Beschaffenheit des Probenmaterials

Das Ausgangsmaterial ist virale RNA, die aus bovinem Plasma, Serum, Hautproben (Ohrgewebe), Milchsediment (Zellen) oder aus EDTA-Blut isoliert wurde. Für alle Probenmaterialien ist ein Pool von bis zu 150 Einzelproben möglich. Bei einer Direktlyse von Hautproben ist eine Poolgröße von bis zu 10 Proben möglich.

Sicherheitsinformationen

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

Weitere Informationen können Sie den entsprechenden Sicherheits-Datenblättern entnehmen (material safety data sheets, MSDSs). Unter 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 Qualitätsmanagement-System von QIAGEN wurde jede Charge des *cador* BVDV 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 Geräte/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).

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 zum cador BVDV 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/goto/TechSupportCenter oder wenden Sie sich an den Technischen Service von QIAGEN oder an Ihren lokalen Distributor (siehe die Rückseite oder besuchen Sie www.qiagen.com).

Einleitung

Der *cador* BVDV RT-PCR Kit ist ein gebrauchsfertiges System für den Nachweis von BVDV-RNA durch die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) mit Real-Time-PCR-Systemen.

Der BVDV Master beinhaltet Reagenzien und Enzyme für die reverse Transkription und spezifische Amplifikation eines hoch konservierten Abschnitts des BVDV-Genoms (200 bp). Die Detektion der Amplifikate erfolgt durch die Messung der FAM[™]-Fluoreszenz (BVDV-1 und BVDV-2) im Real-Time-PCR-Gerät. Daneben enthält der *cador* BVDV RT-PCR Kit zum Nachweis einer möglichen PCR-Inhibition ein zweites heterologes Amplifikationssystem. Dieses wird als interne Kontrolle (IC) durch die Messung der VIC[®]-Fluoreszenz nachgewiesen. Dabei wird die Nachweisgrenze der analytischen BVDV-RT-PCR nicht herabgesetzt. Es werden zwei externe Positivkontrollen (BVDV 1 Control und BVDV 2 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 mithilfe von Fluoreszenzfarbstoffen statt. Diese sind 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 öffnen zu müssen (Mackay, 2004).*

Erreger-Informationen

Das Virus der bovinen Virusdiarrhö (BVDV: Bovine Viral Diarrhea Virus) ist ein wirtschaftlich bedeutender tierpathogener Infektionserreger und wird in die zwei Genotypen BVDV 1 und BVDV 2 eingeteilt. Beide Genotypen (BVDV1 und BVDV2) sind pathogen. BVDV-Infektionen des Rindes können verschiedene Verlaufsformen haben, die von subklinischen Verläufen mit Leistungsminderung über Durchfallerkrankungen bis zum hämorrhagischen Syndrom oder zur Schleimhautdiarrhö-Krankheit ("Mucosal Disease") reichen. Bei der Infektion trächtiger Rinder kann es zu Fruchtbarkeitsstörungen und Aborten kommen. Die Erreger werden über Kot und Schleimhautsekrete ausgeschieden und oral aufgenommen. Sie lassen sich in Blut-, Gewebe- und Milchproben nachweisen. Bei einer Infektion mit einem nicht-zytopathogenen Biotyp während der Trächtigkeit kann der betroffene Fetus eine lebenslange Immuntoleranz ausbilden und wird zum symptomlosen Dauerausscheider (persistently infected).

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

Tiere; PI-Tiere). Durch Identifikation der PI-Tiere können permanente Quellen der Reinfektion ausgeschlossen werden.

Vom Anwender bereitzustellende Ausrüstung und Reagenzien

RNA-Isolierungskit

Pipetten (einstellbar)

Sterile Pipettenspitzen mit Filter

Laborschüttler (Vortex)

Tischzentrifuge mit Rotor für 2-ml-Reaktionsgefäße

PCR-Thermocycler, der die Detektion von FAM und VIC[®] ermöglicht, z. B. Rotor-Gene Q (QIAGEN) oder Geräte von Stratagene oder Applied Biosystems.

PCR-Reaktionsgefäße

Eis oder Kühlblock

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 arbeiten und Proben auf Eis oder in Kühlblock stellen.

Isolierung viraler RNA

Der *cador* BVDV RT-PCR Kit ist in der Lage, RNA aus Proben zu analysieren, die mit geeigneten Verfahren für virale RNA isoliert worden ist.

QIAGEN bietet eine Vielzahl an Optionen im Bereich manuelle und automatisierte Probenvorbereitung und Nukleinsäure-Isolierung. Mehr Informationen erhalten Sie unter www.qiagen.com.

Bei Extraktionen, bei denen Ethanol-haltige Waschpuffer verwendet werden, stellen Sie sicher, dass vor der Elution ein zusätzlicher Zentrifugationsschritt zur Beseitigung von Ethanol-Rückständen durchgeführt wird. Dies verhindert mögliche PCR-Inhibitionen. Dieser zusätzliche Schritt wird in den Protokollen relevanter Kit-Handbücher als empfohlener optionaler Schritt aufgeführt.

Die in Blutentnahmeröhrchen enthaltenen Antikoagulanzen können inhibierend auf die PCR wirken, werden aber von den aufgeführten Kits für die Nukleinsäure-Isolierung gut eliminiert. Es wird empfohlen, auf die Benutzung von heparinisiertem Blut zu verzichten.

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

Carrier-RNA

Der Einsatz von Carrier-RNA ist für die Effizienz der RNA-Isolierung und damit für die DNA-/RNA-Ausbeute von entscheidender Bedeutung. Um eine höhere Stabilität von lyophilisierter Carrier-RNA zu erzielen, empfehlen wir diese nach dem Auflösen zu aliquotieren, bei –15 bis –30 °C zu lagern und nach Auftauen zu verbrauchen.

Vor Beginn jeder RNA-Isolierung muss ein Gemisch aus Lysepuffer und Carrier-RNA (und ggf. interner Kontrolle, siehe den Abschnitt „Interne Kontrolle“ auf Seite 12) gemäß folgendem Pipettierschema frisch hergestellt werden.

Anzahl der Proben	1	12
Lysepuffer (z. B. AVL)	560 µl	6.720 µl
Carrier-RNA (1 µg/µl)	5,6 µl	67,2 µl
Gesamtvolumen	565,6 µl	6787,2 µl
Volumen für die RNA-Isolierung	560 µl	je 560 µl

Setzen Sie das frisch hergestellte Gemisch aus Lysepuffer und Carrier-RNA sofort für die RNA-Isolierung ein. Eine Lagerung des Gemischs ist nicht möglich.

Interne Kontrolle

Es wird eine interne Kontrolle (BVDV IC) mitgeliefert. Mit dieser haben Sie die Möglichkeit, sowohl die Isolierung 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 (oder Lysepuffer) hinzu. Die Menge der eingesetzten internen Kontrolle ist nur abhängig vom Elutionsvolumen. Die interne Kontrolle und Carrier-RNA (siehe Abschnitt „Carrier-RNA“ auf Seite 12) dürfen nur zum Gemisch aus Lysepuffer und Probenmaterial oder direkt zum Lysepuffer zugesetzt werden.

Die interne Kontrolle darf nicht direkt zum Probenmaterial gegeben werden. Bei Zugabe zum Lysepuffer ist zu beachten, dass das Gemisch aus interner Kontrolle und Lysepuffer/Carrier-RNA frisch angesetzt werden muss und sofort einzusetzen ist (Lagerung des Gemischs bei Raumtemperatur oder bei 2–8 °C kann bereits nach wenigen Stunden zum Ausfall der internen Kontrolle und zu einer Verminderung der Aufreinigungseffizienz führen). Pipettieren Sie die interne Kontrolle und die Carrier-RNA nicht direkt zum Probenmaterial.

Optional kann die interne Kontrolle ausschließlich zur Kontrolle einer möglichen PCR-Inhibition verwendet werden. Hierfür geben Sie pro Ansatz 2 µl der internen Kontrolle und 2 µl BVDV Mg-Sol direkt zu 28 µl BVDV Master hinzu.

Verwenden Sie für jede PCR-Reaktion 30 μ l des so hergestellten Master-Mix* und fügen Sie anschließend 20 μ l der isolierten RNA-Probe hinzu. Sollten Sie einen Lauf für mehrere Proben ansetzen, so erhöhen Sie die benötigten Mengen des BVDV Masters, der BVDV Mg-Sol-Lösung und der internen Kontrolle (BVDV IC) entsprechend der Probenzahl (siehe „Protokoll 1: PCR“).

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

Protokoll 1: PCR

Wichtige Hinweise vor Beginn

Lesen Sie bitte vor dem Ansetzen der PCR den Abschnitt „Wichtige Hinweise“ auf Seite 11 ff.

Nehmen Sie sich vor dem Protokollbeginn Zeit, sich mit dem PCR-Gerät vertraut zu machen. Beachten Sie das mit dem Gerät mitgelieferte Benutzerhandbuch.

Beachten Sie beim Ansetzen der PCR, dass pro PCR-Lauf mindestens eine Positivkontrolle (BVDV 1 Control oder BVDV 2 Control) sowie eine Negativkontrolle (Wasser, für PCR-Zwecke geeignet) mitgeführt werden sollten.

Vor dem Testbeginn

Alle Reagenzien sollten vor Testbeginn vollständig bei Raumtemperatur (15–25 °C) aufgetaut, gut durchmischt (mehrfaches Auf- und Abpipettieren oder kurzes Mischen auf Laborschüttler) und anschließend kurz zentrifugiert werden. Stellen Sie danach alle Reagenzien in einen Kühlblock bei 2–8 °C oder auf Eis.

Durchführung

1. Falls die IC als Kontrolle der RNA-Isolierung verwendet werden soll, dann befolgen Sie den Schritt 1a. Falls Sie die interne Kontrolle ausschließlich zur Kontrolle einer PCR-Inhibition einsetzen wollen, befolgen Sie den Schritt 1b.

1a. Die interne Kontrolle wurde bereits zum Ansatz für die RNA-Isolierung zugegeben (siehe Abschnitt „Interne Kontrolle“ auf Seite 12). Setzen Sie in diesem Fall den Master-Mix, in einem Kühlblock bei 2–8 °C oder auf Eis, gemäß der Tabelle 1 an.

Der Reaktions-Mix beinhaltet üblicherweise alle für die PCR benötigten Komponente außer der Probe. Setzen Sie für die Gesamtanzahl der geplanten PCR-Reaktionen mindestens 10 % mehr Reaktions-Mix als nötig an.

Tabelle 1. Ansetzen des Master-Mix (interne Kontrolle wurde bereits zum Ansatz für die RNA-Isolierung zugegeben)

Anzahl der Proben	1	12
BVDV Master	28 µl	336 µl
BVDV Mg-Sol	2 µl	24 µl
BVDV IC	0 µl	0 µl
Gesamtvolumen	30 µl	360 µl

- 1b. Die interne Kontrolle muss direkt zum BVDV Master gegeben werden. Setzen Sie in diesem Fall den Master-Mix, in einem Kühlblock bei 2–8 °C oder auf Eis, gemäß der Tabelle 2 an.**

Der Reaktions-Mix beinhaltet üblicherweise alle für die PCR benötigten Komponenten außer der Probe. Setzen Sie für die Gesamtanzahl der geplanten PCR-Reaktionen mindestens 10 % mehr Reaktions-Mix als nötig an.

Tabelle 2. Ansetzen des Master-Mix mit der internen Kontrolle

Anzahl der Proben	1	12
BVDV Master	28 µl	336 µl
BVDV Mg-Sol	2 µl	24 µl
BVDV IC	2 µl	24 µl
Gesamtvolumen	32 µl*	384 µl*

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

- 2. Pipettieren Sie in jedes Reaktionsgefäß bzw. in jedes benötigte Well der 96-Well-Reaktionsplatte 30 µl des Master-Mix. Anschließend geben Sie 20 µl des Eluats aus der RNA-Isolierung hinzu (siehe Tabelle 3). Entsprechend sollen als Positivkontrolle 20 µl von mindestens einer der Positivkontrollen (BVDV 1 Control oder BVDV 2 Control) und als Negativkontrolle 20 µl Wasser (für PCR-Zwecke geeignet) eingesetzt werden. Achten Sie darauf, dass die beiden Lösungen durch mehrfaches Auf- und Abpipettieren gut durchmischt werden.**

Die externen Positivkontrollen (BVDV 1 Control und BVDV 2 Control) werden wie eine bereits aufgereinigte Probe behandelt und im gleichen Volumen eingesetzt (20 µl). Sie dienen als positives Referenzsignal.

Tabelle 3. Ansetzen der PCR-Reaktion

Komponente	Volumen
Master-Mix	30 µl
Probe (Eluat aus RNA-Isolierung)	20 µl
Gesamtvolumen	50 µl

* Neben den angegebenen Volumina ist es auch möglich, jeweils die Volumina zu halbieren. Auf dem Rotor-Gene Q in Kombination mit der Rotor-Disc kann das Gesamtvolumen auf 20 µl reduziert werden.

- 3. Verschließen Sie die Reaktionsgefäße mit den dazugehörigen Deckeln. Lagern Sie die Reaktionsansätze bei 2–8 °C in einem Kühlblock oder auf Eis, bis der Thermocycler programmiert ist (Schritte 4 bis 9).**
- 4. Erstellen Sie zur Detektion der BVDV-RNA ein Temperaturprofil gemäß dem Cycling-Protokoll in der Tabelle 4.**

Einzelheiten zur Programmierung der verschiedenen Real-Time-PCR-Thermocycler entnehmen Sie bitte dem jeweils mitgelieferten Handbuch.

Tabelle 4. Cycling-Protokoll für Rotor-Gene Q

			Kommentare
Reverse Transkription	30 min	50 °C	RNA wird revers in eine cDNA transkribiert.
Initiale PCR-Aktivierung:	10 min	95 °C	Initiale Denaturierung der Template-cDNA.
Amplifikation der cDNA			
3-Schritt-Cycling:			
Denaturierung	30 s	95 °C	
Annealing	60 s	55 °C	
Extension	20 s	72 °C	
Anzahl der Zyklen	45		

Tabelle 5. Cycling-Protokoll für PCR-Geräte auf MT-Plattenbasis

			Kommentare
Reverse Transkription	30 min	50 °C	RNA wird revers in eine cDNA transkribiert.
Initiale PCR-Aktivierung:	10 min	95 °C	Initiale Denaturierung der Template-cDNA.
Amplifikation der cDNA			
2-Schritt-Cycling:			
Denaturierung	30 s	95 °C	
Annealing	60 s	55 °C	
Anzahl der Zyklen	45		

5. Die Auswertung erfolgt entsprechend dem „Protokoll 2: Auswertung“ auf Seite 18.

Protokoll 2: Auswertung

Folgende Ergebnisse können auftreten:

Im Fluoreszenzkanal FAM wird ein Signal detektiert.

a. Das Ergebnis der Analyse ist positiv: Die Probe enthält BVDV-RNA.

In diesem Fall ist die Detektion eines Signals im Kanal VIC unwesentlich, da hohe Ausgangskonzentrationen an BVDV-RNA (positives Signal im Kanal FAM) zu einem reduzierten bis ausbleibenden Fluoreszenzsignal der internen Kontrolle im Kanal VIC führen können (Kompetition).

Im Fluoreszenzkanal FAM wird kein Signal detektiert, sondern nur im Kanal VIC (Signal der internen Kontrolle).

b. In der Probe ist keine BVDV-RNA nachweisbar. Sie kann daher als negativ angesehen werden.

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

Weder im Kanal FAM noch im Kanal VIC wird ein Signal detektiert.

c. Eine Aussage ist nicht möglich.

Hinweise zu Fehlerquellen und deren Beseitigung sind im Kapitel „Hilfe zur Fehlersuche“ aufgeführt.

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

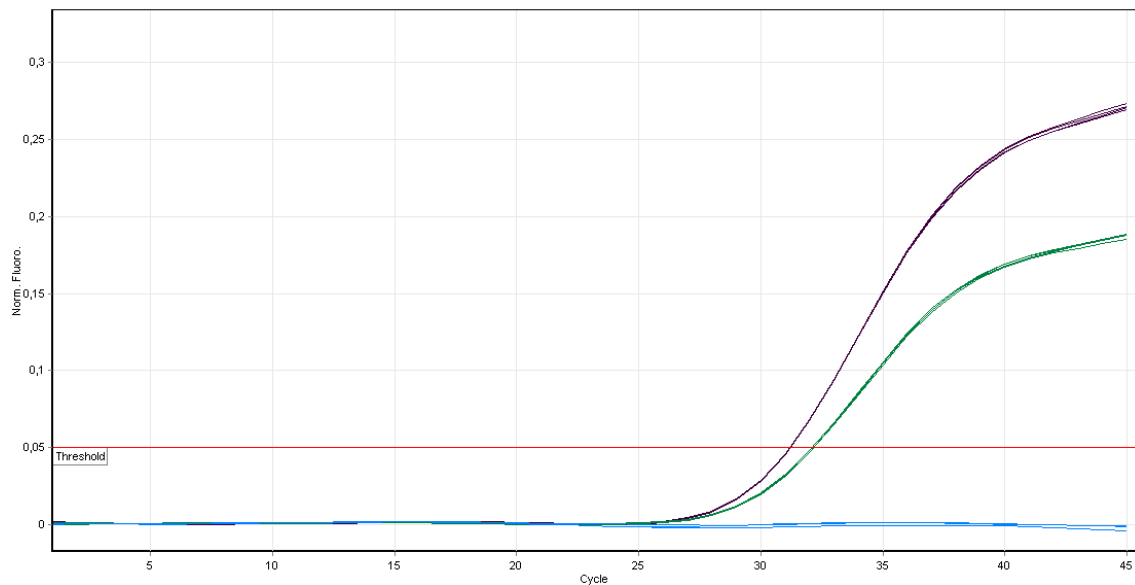


Abb. 1. Nachweis der Positivkontrolle (BVDV 1 Control) durch die Detektion im Kanal FAM. NTC: Negativkontrolle.

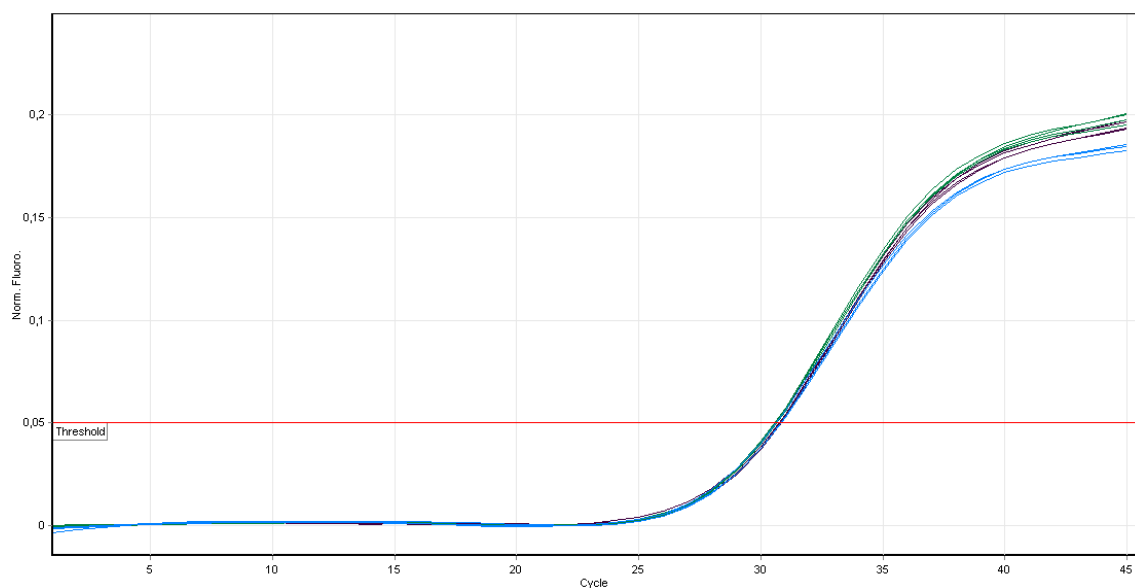


Abb. 2. Nachweis der internen Kontrolle (IC) im VIC-Fluoreszenzkanal. Die Abbildung zeigt die gleichzeitige Amplifikation der Positivkontrolle (BVDV 1 Control). NTC: No template control (BVDV-Negativkontrolle); es wird die Amplifikation der internen Kontrolle in einer BVDV-negativen Probe dargestellt.

Hilfe zur Fehlersuche

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 Rückseite oder www.qiagen.com).

Kommentare und Vorschläge

Kein FAM-Fluoreszenzsignal bei den Positivkontrollen (BVDV 1 Control und BVDV 2 Control)

- | | |
|---|--|
| a) Wahl des Kanals bei der PCR-Datenanalyse entspricht nicht den Protokollangaben | Wählen Sie für die Datenanalyse den Kanal FAM für die analytische BVDV-RT-PCR und den Kanal VIC für die RT-PCR der internen Kontrolle |
| b) Programmierung des Temperaturprofils ist fehlerhaft | Vergleichen Sie das Temperaturprofil mit den Protokollangaben (siehe „Protokoll 1: PCR“). |
| c) Fehlerhaftes Zusammenstellen der PCR-Reaktion | Überprüfen Sie Ihre Arbeitsschritte (siehe „Protokoll 1: PCR“). |
| d) Fehlerhafte Lagerungsbedingungen für eine oder mehrere Kit-Komponenten oder das Haltbarkeitsdatum des Kits wurde überschritten | Bitte überprüfen Sie sowohl Lagerungsbedingungen als auch Haltbarkeitsdatum (siehe Kit-Etikett) der Reagenzien und verwenden Sie ggf. einen neuen Kit. Stellen Sie sicher, dass die Lagerungsbedingungen für die Kit-Komponenten den angeführten Vorschriften entsprechen. |

Schwaches oder ausbleibendes Signal bei der internen Kontrolle (VIC-Fluoreszenzsignal) bei gleichzeitiger Abwesenheit eines FAM-Fluoreszenzsignals der spezifischen BVDV-RT-PCR

- | | |
|--|--|
| a) PCR-Bedingungen entsprechen nicht dem Protokoll | Überprüfen Sie die PCR-Bedingungen (siehe „Protokoll 1: PCR“). |
|--|--|

Kommentare und Vorschläge

- | | |
|---|--|
| b) PCR wurde inhibiert | <p>Stellen Sie sicher, dass Sie ein für anschließende PCR-Anwendungen geeignetes Verfahren zur RNA-Isolierung/-Aufreinigung verwenden und halten Sie sich exakt an die Herstellervorschrift.</p> <p>Vergewissern Sie sich, dass bei der RNA-Isolierung/-Aufreinigung der zusätzliche empfohlene Zentrifugationsschritt zur vollständigen Entfernung von Ethanol-Resten vor der Elution durchgeführt wurde.</p> |
| c) Es liegen RNA-Verluste vor, die durch das Verfahren der RNA-Isolierung/-Aufreinigung bedingt sind | <p>Sollte die interne Kontrolle zum Ansatz für die RNA-Isolierung zugegeben worden sein, kann ein Ausbleiben des Signals bei der internen Kontrolle bedeuten, dass verfahrensbedingte RNA-Verluste vorliegen. Stellen Sie sicher, dass Sie ein für anschließende PCR-Anwendungen geeignetes Verfahren zur RNA-Isolierung/-Aufreinigung verwenden und halten Sie sich exakt an die Herstellervorschrift.</p> |
| d) Fehlerhafte Lagerungsbedingungen für eine oder mehrere Kit-Komponenten oder das Haltbarkeitsdatum des Kits wurde überschritten | <p>Bitte überprüfen Sie sowohl Lagerungsbedingungen als auch Haltbarkeitsdatum (siehe Kit-Etikett) der Reagenzien und verwenden Sie ggf. einen neuen Kit. Stellen Sie sicher, dass die Lagerungsbedingungen für die Kit-Komponenten den angeführten Vorschriften entsprechen.</p> |

Ein FAM-Fluoreszenzsignal der analytischen RT-PCR bei den Negativkontrollen

- | | |
|---|---|
| a) Es liegt eine Kontamination während der Vorbereitung der PCR vor | <p>Wiederholen Sie in Replikaten die PCR mit noch unbenutzten Reagenzien.</p> <p>Verschließen Sie die einzelnen PCR-Gefäße nach Möglichkeit jeweils unmittelbar nach Zugabe der zu untersuchenden Probe.</p> <p>Pipettieren Sie die Positivkontrollen grundsätzlich zuletzt.</p> <p>Stellen Sie sicher, dass Arbeitsflächen und -geräte regelmäßig dekontaminiert werden.</p> |
|---|---|

Kommentare und Vorschläge

- | | |
|--|---|
| b) Es liegt eine Kontamination vor, die durch das Verfahren der RNA-Isolierung/-Aufreinigung bedingt ist | Wiederholen Sie die RNA-Isolierung bzw. -Aufreinigung und PCR der zu untersuchenden Proben unter Verwendung noch unbenutzter Reagenzien.

Stellen Sie sicher, dass Arbeitsflächen und -geräte regelmäßig dekontaminiert werden. |
|--|---|

Bestellinformationen (unverbindliche Angaben)

Produkt	Inhalt	Kat.-Nr.
cador BVDV RT-PCR Kit	Für 96 Reaktionen: BVDV Master, BVDV 1 Control, BVDV 2 Control, BVDV IC, BVDV Mg-Sol, H ₂ O	280355
Verwandte Produkte		
cador BVDV Type 1/2 RT-PCR Kit	Für 24 Reaktionen: BVDV Master, BVDV 1 Control, BVDV 2 Control, BDV Control, BVDV Type 1/2 , Mg-Sol, H ₂ O	280363
QIAamp Viral RNA Mini Kit – zur Reinigung viraler RNA aus Plasma, Serum und zellfreien Körperflüssigkeiten		
QIAamp Viral RNA Mini Kit (50)	Für 50 RNA-Präparationen: 50 QIAamp Mini-Spinsäulen, Carrier-RNA, Collection Tubes (2 ml), RNase-freie Puffer	52904
	Für 250 RNA-Präparationen: 250 QIAamp Mini-Spinsäulen, Carrier-RNA, Collection Tubes (2 ml), RNase-freie Puffer. Hierzu gibt es ein Protokoll mit QIAamp MinElute Virus	52906
Kontaktieren Sie uns, um ein Protokoll zur Isolierung viraler RNA aus Vollblut zu erhalten.		
RNeasy Fibrous Tissue Mini Kit – zur Reinigung der Gesamt-RNA aus faserreichem Gewebe		
RNeasy Fibrous Tissue Mini Kit (50)	Für 50 RNA-Präparationen: 50 RNeasy Mini-Spinsäulen, Collection Tubes (1,5 ml und 2 ml), Proteinase K, RNase-freie DNase I, RNase-freie Reagenzien und Puffer. (Kontaktieren Sie uns, um ein Sonderprotokoll zur RNA-Isolierung aus Ohrstanzproben zu erhalten.)	74704

Produkt	Inhalt	Kat.-Nr.
QIAGEN 96-Well-Plate Centrifugation System – für die Verarbeitung von Proben in 2 QIAGEN 96-Well-Platten		
Centrifuge 4-16C	Universell einsetzbare Laborzentrifuge mit bürstenlosem Antrieb	Bitte anfragen
Centrifuge 4K15C	Universell einsetzbare Kühl-Laborzentrifuge mit bürstenlosem Antrieb	Bitte anfragen
Plate Rotor 2 x 96	Rotor für 2 QIAGEN 96-well-Platten, für Verwendung mit QIAGEN Zentrifugen	81031
BioRobot Universal System – für vollautomatisierte Anwendungen im 96-Well-Format bei mittlerem bis hohem Durchsatz (Kontaktieren Sie uns, um angepasste Protokolle zu erhalten.)		
BioRobot Universal System	Robotische Arbeitsstation, computergesteuerte Vakuumpumpe, Computer, QIAsoft 5 Operating System, Installation, einjährige Garantie auf Ersatzteile, Arbeit und Reise	9001094
BioSprint 96 System zur semiautomatisierten RNA-Isolierung/-Aufreinigung im 96-Well-Format bei hohem Durchsatz (Kontaktieren Sie uns, um Sonderprotokolle für Ohrstanzproben zu erhalten.)		
BioSprint 96		9000852
BioSprint 96 One-For-All Vet Kit (384)	Zur Reinigung von RNA und DNA aus Vollblut, Serum, Plasma, zellfreien Flüssigkeiten, Abstrichtupfern und Gewebelysaten	947057

* Vereinbarungen über umfassenden Service sind erhältlich; bitte informieren Sie sich.

Notizen

Notizen

Warenzeichen/Markennamen: QIAGEN®, QIAamp®, BioRobot®, RotorGene Q, RNeasy® (QIAGEN Gruppe); ABI PRISM®, FAM™, MicroAmp®, JOE™, TAMRA™, VIC® (Applied Biosystems), GeneAmp® (Roche Molecular Systems, Inc.).

© 2009–2011 QIAGEN, alle Rechte vorbehalten.

Der Kauf dieses Produkts berechtigt den Käufer zu dessen Nutzung für die Amplifikation und Detektion von Nukleinsäuresequenzen in der tiermedizinischen In-vitro-Diagnostik. Hiermit wird kein allgemeines Patent oder eine andere Lizenz jedweder Art als das durch den Kauf erworbene spezifische Nutzungsrecht gewährt.

Eingeschränkte Nutzungsvereinbarung

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

1. Der *cador BVDV RT-PCR Kit* darf nur gemäß den Angaben in der *Gebrauchsinformation cador BVDV 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 in der *Gebrauchsinformation cador BVDV RT-PCR Kit* und in zusätzlichen, unter 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 den ausdrücklich erwähnten Lizenzanwendungen 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 seiner geistigen Eigentumsrechte im Zusammenhang mit dem Kit und/oder dessen Komponenten entstehen.

Aktualisierte Nutzungs- und Lizenzbedingungen können unter www.qiagen.com nachgelesen werden.

© 2009–2011 QIAGEN, alle Rechte vorbehalten.

www.qiagen.com

Australien ■ Bestellungen 03-9840-9800 ■ Fax 03-9840-9888 ■ Technischer Service 1-800-243-066

Belgien ■ Bestellungen 0800-79612 ■ Fax 0800-79611 ■ Technischer Service 0800-79556

Brasilien ■ Bestellungen 0800-557779 ■ Fax 55-11-5079-4001 ■ Technischer Service 0800-557779

China ■ Bestellungen 021-3865-3865 ■ Fax 021-3865-3965 ■ Technischer Service 800-988-0325

Dänemark ■ Bestellungen 80-885945 ■ Fax 80-885944 ■ Technischer Service 80-885942

Deutschland ■ Bestellungen 02103-29-12000 ■ Fax 02103-29-22000 ■ Technischer Service 02103-29-12400

Finnland ■ Bestellungen 0800-914416 ■ Fax 0800-914415 ■ Technischer Service 0800-914413

Frankreich ■ Bestellungen 0-60-920-926 ■ Fax 01-60-920-925 ■ Technischer Service 01-60-920-930 ■ Angebote 01-60-920-928

Hongkong ■ Bestellungen 800 933 965 ■ Fax 800 930 439 ■ Technischer Service 800 930 425

Irland ■ Bestellungen 1800 555 049 ■ Fax 1800 555 048 ■ Technischer Service 1800 555 061

Italien ■ Bestellungen 02-33430 -420 ■ Fax 02-33430-426 ■ Technischer Service 800-787980

Japan ■ Telefon 03-6890-7300 ■ Fax 03-5547-0818 ■ Technischer Service 03-6890-7300

Kanada ■ Bestellungen 800-572-9613 ■ Fax 800-713-5951 ■ Technischer Service 800-DNA-PREP (800-362-7737)

Luxemburg ■ Bestellungen 8002-2076 ■ Fax 8002-2073 ■ Technischer Service 8002-2067

Mexiko ■ Bestellungen 01-800-7742-639 ■ Fax 01-800-1122-330 ■ Technischer Service 01-800-7742-639

Niederlande ■ Bestellungen 0800-0229592 ■ Fax 0800-0229593 ■ Technischer Service 0800-0229602

Norwegen ■ Bestellungen 800-18859 ■ Fax 800-18817 ■ Technischer Service 800-18712

Österreich ■ Bestellungen 0800/28-10-10 ■ Fax 0800/28-10-19 ■ Technischer Service 0800/28-10-11

Schweden ■ Bestellungen 020-790282 ■ Fax 020-790582 ■ Technischer Service 020-798328

Schweiz ■ Bestellungen 055-254-22-11 ■ Fax 055-254-22-13 ■ Technischer Service 055-254-22-12

Singapur ■ Bestellungen 65-67775366 ■ Fax 65-67785177 ■ Technischer Service 65-67775366

Spanien ■ Bestellungen 91-630-7050 ■ Fax 91-630-5145 ■ Technischer Service 91-630-7050

Südkorea ■ Bestellungen 1544 7145 ■ Fax 1544 7146 ■ Technischer Service 1544 7145

UK ■ Bestellungen 01293-422-911 ■ Fax 01293-422-922 ■ Technischer Service 01293-422-999

