



Leucemia Felina

KIT PARA LA DETECCIÓN DEL VIRUS DE LA LEUCEMIA FELINA POR PCR EN TIEMPO REAL

LF 50 – Find IT Leucemia Felina - Sistema para 50 reacciones.

LF 100 – Find IT Leucemia Felina - Sistema para 100 reacciones.

CONTENIDO DEL KIT

1.- Find-It Leucemia Felina SuperMix PCR-TR 2X*. (2 viales con 250µl) (oligonucleótidos y sondas TaqMan, ADNTaqPolimerasa, amortiguador, dNTP's, MgCl₂, ADN del control interno y H₂O).

2.- ADN estándar de cuantificación* (1ng/µl) (25µl)

3.- H₂O (500µl)

La sonda TaqMan para la detección del virus de leucemia Felina está marcada con FAM/TAMRA (Verde). La sonda del control interno está marcada con HEX/BHQ1 (Amarillo)

El control interno está incluido en la Super Mix RT-PCR-TR. Este control interno es un segmento de ADN que siempre amplifica en la reacción y permite al usuario monitorear la posible presencia de inhibidores de la reacción y descartar falsos negativos.

*Almacenamiento a -20°C

PROCEDIMIENTO DEL ENSAYO

1.- Añada hasta 10 µl de la muestra de ADN o del control positivo en un tubo. Cuando sea necesario complemente a un volumen de 10 µl con H₂O DEPC.

2.- Añada 10 µl de la Super Mix PCR-TR 2X

3.- Someta el tubo a amplificación-detección en un equipo termociclador de Tiempo Real. Programación del equipo: **42°C por 30min, 95°C por 10min, 40 ciclos de 95°C por 15seg y 60°C por 45seg.**

Asegúrese que el equipo detecta en los canales 495 -520 nm (verde) y 535 - 556 nm (amarillo).

CONSTRUCCIÓN DE LA CURVA DE CUANTIFICACIÓN

Para cuantificar el número de copias presentes del genoma del virus de Leucemia Felina, se recomienda amplificar 4 diferentes cantidades conocidas del ADN control estándar. Para esto, se deben realizar 4 diluciones decuples seriadas a partir de la concentración inicial del ADN control estándar, para lo cual se colocan en 4 tubos 45µl de H₂O y se toman 5µl del ADN control estándar agregándolo al primer tubo, se homogeniza la mezcla utilizando un agitador tipo vortex y se toman 5µl para agregarlo al 2º tubo y así sucesivamente. Una vez finalizada la serie de diluciones, se desechan 5µl de la última dilución como se muestra en la figura 1. Para realizar la curva estándar de amplificación, se toman 10µl de cada dilución, se le agregan 10µl de la Super Mix RT-PCR-TR y se somete a las condiciones recomendadas de amplificación.

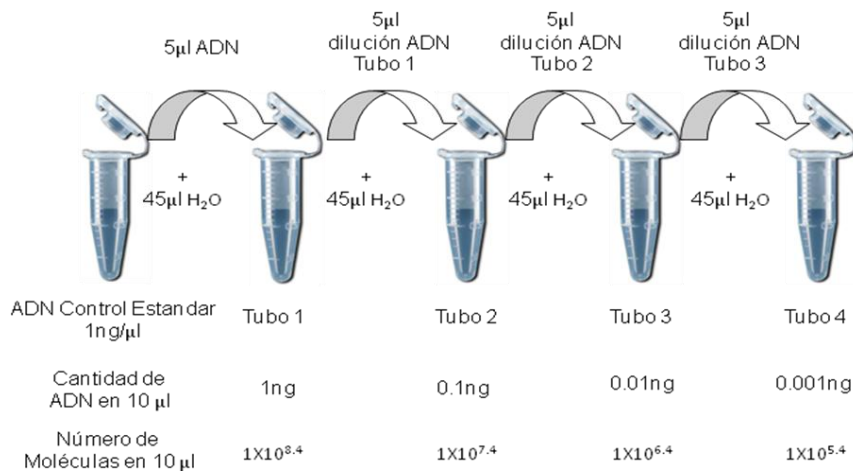


Figura 1. Se muestra como realizar las diluciones del ADN control para obtener una curva de calibración. Se indica la cantidad de ADN que queda en cada dilución y el No de moléculas.

ANÁLISIS DE DATOS

Una muestra es considerada positiva siempre que la fluorescencia emitida sea mayor a la de los controles negativos.

Una muestra es considerada negativa siempre que la fluorescencia emitida sea menor o igual a la de los controles negativos.

Una muestra puede ser cuantificable siempre que la fluorescencia emitida se encuentre en el rango de fluorescencia de la curva estándar.

MATERIAL REQUERIDO NO PROPORCIONADO

Kit para la extracción de ADN

Micropipetas y puntas para micropipetas

Vortex

Microtubos para las reacciones de RT-PCR-TR

Termociclador en Tiempo Real.