

Interpretación de resultados

Pocillo	Amplificación (Cq)	Interpretación	Soluciones
PAC de Foc RT4 o COX	Cq de 25 o menor	Aceptado	
	Por encima de 25 (o sin Cq)	No aceptado	Repita el ensayo
NAC de Foc RT4 o COX	Sin Cq	Aceptado	
	Cq menor que 40	No aceptado	El pocillo de NAC está contaminado. Debe identificar y eliminar las posibles fuentes de contaminación. Repita el ensayo.
Muestra con tejido de banana (gen COX)	Cq de 35 o menor	Aceptado	
	Cq mayor que 35 (o sin Cq)	No aceptado	Suponiendo que hay tejido vegetal, no detectar el gen Banana COX podría indicar que hay inhibidores o que la extracción de ADN ha fallado. Para eliminar los inhibidores se recomienda diluir la muestra 20 veces. Si ha ocurrido un problema durante la extracción del ADN, repita la extracción.
Muestra con Foc RT4	Cq de 35 o menor	Aceptado	
	Cq entre 35 y 40	Poco concluyente	Compare la curva de fusión con las muestras de PAC / NAC. Si la curva tiene una forma similar a la del PAC, pero por debajo del umbral, Foc RT4 podría estar presente. Pruebe una dilución más concentrada de la muestra. Si la curva muestra un fondo parecido a NAC, no se detecta Foc RT4. Si la curva no es similar a PAC o NAC, los resultados no son concluyentes. Repita el ensayo de PCR con una mayor concentración de ADN.
	Cq mayor que 40	Foc TR4 no detectado	

Avisos y exenciones de responsabilidad

A pesar del máximo cuidado en el desarrollo y preparación de este protocolo, ClearDetections no puede asumir ninguna responsabilidad por errores, omisiones y / o cambios futuros en este documento.

Este kit está diseñado exclusivamente para uso general en laboratorio e investigación. Para conocer los avisos legales y la exención de responsabilidad, visite el sitio web, www.cleardetections.com, o comuníquese con ClearDetections en info@cleardetections.com.

• Version 3.1 (Agosto 2021) • ClearDetections BV, Nieuwe Kanaal 7H, 6709PA Wageningen, The Netherlands • info@cleardetections.com



Manual para el kit de diagnóstico de PCR en tiempo real

Fusarium oxysporum f. sp. cubense (Foc) Raza Tropical 4 (RT4)

RT-F-D-0901/0902

Exclusivo para uso general en laboratorio e investigación

Introducción

El kit de identificación de PCR en tiempo real todo incluido de ClearDetections contiene un ensayo de PCR en tiempo real para la detección simple, precisa y rápida de *Fusarium oxysporum f. sp. cubense* Raza Tropical 4 (Foc RT4) en muestras de ADN purificado obtenidas de diversas fuentes. Para la extracción de ADN del tejido de la planta de banano, considere utilizar el kit de ClearDetections EX-P-T / P-PDEP. La especificidad de los cebadores (*primers*) de ClearDetections para Foc TR4 se basa en una mutación única en la región del espaciador intergénico (IGS). Se recomienda encarecidamente el uso de un control positivo (PAC) y negativo (NAC) para verificar la extracción y purificación de ADN con éxito. Para el tejido de la planta de banano, se recomienda incluir un ensayo de PCR en tiempo real diseñado para la detección del gen de la citocromo C oxidasa (COX), presente en el tejido del banano, y que se utilizará como control de extracción. Esta opción está incluida en el kit RT-F-D-0902. Para obtener más información o preguntas, comuníquese con nuestros expertos técnicos a través de info@cleardetections.com.

Le recomendamos que lea todo el manual antes de iniciar el procedimiento.
No dude en contactarnos en info@cleardetections.com si tiene preguntas sobre este protocolo, la configuración del laboratorio o las especificaciones del equipo.

Componentes del kit, condiciones de almacenamiento y vida útil

Componentes	Código	Almacenamiento
Mix de PCR ClearDetectionsFoc RT4 con todo incluido †	PMD_0901_50	Temp amb*
Control de amplificación positivo Foc TR4 (Foc RT4 PAC)	PAC_0901_02	Temp amb*
Tampón de resuspensión	RSB_2	Temp amb*
ClearDetections Banana COX PCR mix con todo incluido** †	PMD_2601_50	Temp amb*
Control positivo de amplificación del gen Banana Cox (COX PAC)**	PAC_2601_02	Temp amb*

* Suministrado como reactivo liofilizado. Debe almacenarse en su embalaje original a temperatura ambiente en un ambiente seco. Después de resuspenderlo, guárdelo a -20°C hasta su próximo uso. Si se almacenan correctamente, los componentes del kit se pueden utilizar hasta la fecha de caducidad impresa en la caja.

** Incluido en el kit de diagnóstico de PCR en tiempo real RT-F-D-0902-050 para Foc RT4 en tejido de plantas de banano.

Reactivos y equipamiento suministrado por el usuario

- Centrífuga para tubos de microcentrifuga 1.5 mL y / o para placas de 96 pocillos
- Pipetas y puntas con filtro correspondientes para volúmenes de 5-1000 µl
- Tubos de microcentrifuga o placas de 96 pocillos para dilución de ADN
- Placas y sellos de PCR o tubos de PCR adecuados para PCR en tiempo real
- Máquina de PCR en tiempo real con canal FAM o SYBR / FAM †
- Agua exenta de nucleasas
- Vórtex

† Las mezclas de ClearDetections PCR no contienen un colorante de referencia pasivo. Si corresponde, desactive cualquier opción de colorante de referencia pasivo en su software de PCR en tiempo real. No dude en contactarnos para recibir asesoramiento y apoyo si esta situación se le aplica a usted.

Preparación de la muestra

La dilución de la muestra de ADN es un paso esencial para reducir la presencia de inhibidores de la PCR en tiempo real. Pueden encontrarse rastros de inhibidores en muestras de ADN obtenidas, por ejemplo, de material vegetal de banano (infectado o no). La dilución de cada extracto de ADN de 10 a 20 veces (en agua exenta de nucleasas) garantizará, generalmente, un rendimiento adecuado de la PCR.

Resuspensión de los componentes de la PCR en tiempo real:

1. Golpee suavemente los viales que contienen la mezcla de PCR Foc RT4 (y Banana COX) para asentarse cualquier contenido que pueda haberse movido durante el envío.
2. Desenrosque la tapa de el/los vial(es) de mezcla y deseche sus tapones de goma.
3. Añada 790 µL de tampón de resuspensión a cada vial.
4. Cierre los viales e incube 5 minutos a temperatura ambiente.
5. Gire brevemente hacia abajo el /los tubo(s) PAC antes de abrirlos.
6. Desenrosque las tapas de los tubos PAC Foc RT4 (y Banana COX) y agregue 300 µL de tampón de resuspensión a cada tubo.

4.

7. Cierre los tubos e incube 5 minutos a temperatura ambiente.

8. Mezcle agitando con vórtex y centrifugue el contenido de los tubos.

Nota: La mezcla incorrecta de los componentes dará como resultado un rendimiento deficiente del ensayo.

9. Continúe con el ensayo de PCR en tiempo real.

Consejo: Es posible realizar alícuotas de todos los reactivos resuspendidos para evitar la contaminación accidental del abastecimiento maestro.

Foc RT4 y Banana COX PCR

1. Diseñe el disposición de su placa de PCR. Recomendamos usar dos pocillos para cada muestra que se analizará para Foc RT4 y Banana COX DNA, más cuatro pocillos para los siguientes controles:

- Control de amplificación negativo Foc RT4 (Foc RT4 NAC)
- Control de amplificación positivo Foc TR4 (Foc RT4 PAC)
- Control de amplificación negativo Banana COX (Banana COX NAC)
- Control de amplificación positivo Banana COX (Banana COX PAC)

2. Mezcle el mix de PCR en el vial pipeteando arriba y abajo.

3. Pipetee 15 µL de cada mezcla en los pocillos designados.

4. Agite vía vórtex los tubos Foc RT4 y Banana COX PAC durante 1 - 2 segundos y centrifugue brevemente el contenido de los tubos PAC.

5. Pipetee 5 µL de cada PAC en cada pocillo de PAC.

Nota: Tenga mucho cuidado de no contaminar los pocillos vecinos.

6. Pipetee 5 µL de agua libre de nucleasas en cada pocillo de NAC.

7. Pipetee 5 µL de cada muestra de ADN diluida en su pocillo designado.

Nota: El volumen final en cada pocillo debe ser de 20 µL.

8. Selle la placa y centrifugar durante 1 minuto a máxima velocidad.

Nota: No deben quedar gotas en el sello o a los lados de cada pocillo y evite la presencia de burbujas de aire.

9. Transfiera la placa a la máquina de PCR en tiempo real e inicie el siguiente programa :

Etapas		Tiempo	Temperatura
Activación enzimática		3 minutos	95°C
Amplificación (40 ciclos)	Desnaturalización del ADN	10 segundos	95°C
	Hibridación de cebadores	60 segundos	63°C
	Elongación *	30 segundos	72°C
Curva de fusión*		0,2 - 0,5 ° C	72°C – 95°C

* Mida la señal fluorescente, utilizando el canal FAM o SYBR / FAM, después de cada ciclo y después de cada incremento de temperatura de la curva de fusión de PCR.

Nota: Los tiempos de ejecución, las temperaturas y los volúmenes se han optimizado estrictamente y no deben modificarse.