

Interpretation of results

Pocillo	Amplificación (Cq)	Interpretación	Soluciones
Muestra PAC	25 or menos	Aceptado *	
	Por encima de 25 (o sin Cq)	No aceptado	Repita el ensayo de PCR en tiempo real
Muestra NAC	No Cq	Aceptado *	
	Menos de 35	No aceptado	El pocillo de NAC está contaminado. Debe identificar y eliminar las posibles fuentes de contaminación. Repita el ensayo.
Muestra de ADN	35 or menos	Aceptado*	
	Por encima de 35 (o no Cq)	No aceptado	El nemátodo de interés no está presente. Asumiendo que el ADN de nemátodo estuviera presente en la muestra, no detecte el nemátodo objetivo puede ser debido a inhibidores o a una extracción de ADN fallida. Para eliminar los inhibidores, se recomienda diluir la muestra 20 veces. Si la detección falla, es posible que la realización de una dilución adicional sea necesaria. Si ha ocurrido un problema durante la extracción del ADN, recomendamos repetir la extracción de ADN utilizando el kit de extracción y purificación de planta de ClearDetections. Adicionalmente, se puede confirmar la presencia de ADN de nemátodo en una muestra, independientemente de la especie, utilizando el kit general de diagnóstico de PCR en tiempo real para nemátodos de ClearDetections.

* La detección de nemátodos deberá ser confirmada mediante análisis de la curva de fusión de la muestra PAC. Una temperatura de fusión que difiera más de 1 °C de la temperatura de fusión de PAC indica que la muestra no contiene ADN del nemátodo de interés.

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.



Kit de diagnóstico de PCR en tiempo real para especies específicas de nemátodos fitopatógenos

RT-N-D-XXXX

Exclusivo para uso general en laboratorio e investigación

Introduction

El kit de identificación y detección de ADN de nemátodos de ClearDetections contiene un ensayo de PCR en tiempo real para la detección simple, rápida y fiable de ADN de diferentes especies de nemátodos fitopatógenos. Este ensayo diagnostica de forma precisa la presencia de diferentes especies de nemátodos utilizando ADN de suspensiones de nemátodos. Tenga en cuenta que ADN de baja calidad afectará los resultados de este ensayo.

El rendimiento de cada ensayo de PCR en tiempo real de ClearDetections para la identificación y detección de nemátodos ha sido optimizado para ser utilizado en combinación con el kit de 'Extracción & purificación de ADN de nemátodo' (EX-N-B-SNDE y EX-N-T/P-NDEP) y con el 'kit de identificación y detección de ADN general de nemátodos' (RT-N-D-GENS). Recomendamos encarecidamente la utilización de ambos kits y todos los controles disponibles. Para más información, por favor contáctenos vía e-mail en 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	Condiciones de almacenamiento
PCR mix de ClearDetections †	PMD_NOP	Temp. amb.*
Cebadores de ADN específicos de nemátodos	PS_XXXX_XX	-20°C**
Control de amplificación positivo (PAC)	PAC_XXXX_XX	Temp. amb.*
Tampón de resuspensión	RSB_2	Temp. amb.

* Suministrado como reactivo liofilizado. Debe ser almacenado en su embalaje original a temperatura ambiente y en un lugar seco. Después de resuspenderlo, almacene el reactivo a -20°C hasta su próximo uso.

** Durante el envío, los cebadores de ADN específicos de diferentes especies de nemátodos son estables a temperatura ambiente. Después de su llegada, almacene los cebadores a -20°C. Si se almacenan correctamente, los componentes del kit se pueden utilizar hasta la fecha de caducidad impresa en la caja.

Reactivos y equipamiento suministrado por el usuario

- Centrífuga para tubos de microcentrífuga y/o placas de 96 pocillos
- Pipetas y correspondientes puntas para volúmenes de 5-1000 µl
- Tubos de microcentrífuga o placas de 96 pocillos para dilución de ADN
- Placas de PCR & sellos o tubos de PCR apropiados 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 los extractos de ADN es un paso esencial para reducir la presencia de componentes inhibidores de PCR en tiempo real. Trazas de inhibidores pueden ser encontrados en muestras de ADN de las que se aíslan los nemátodos, como tejido vegetal infectado y suelos turbosos. 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. No diluya muestras previamente diluidas.

Resuspensión de componentes de la PCR en tiempo real:

1. Golpee suavemente los viales que contienen el mix de PCR para asentar cualquier contenido que puede haberse movido durante el envío.
2. Desenrosque la tapa de el/los vial(es) de mezcla y deseche sus tapones de goma.
3. Añada 680 µL de tampón de resuspensión a cada vial.
4. Cierre el/los vial(es) e incube a temperatura ambiente durante 5 minutos.
5. Permita el descongelamiento de los cebadores y centrifugue brevemente el tubo de cebadores.
6. Añada 105 µL de los cebadores seleccionados específicos de nemátodo en el mix de PCR de ClearDetections, y mezcle suavemente pipeteando arriba y abajo. Marque el vial una vez añadidos los cebadores específicos.

7. Centrifugue brevemente el tubo que contiene ADN de PAC liofilizado antes de abrirlo.
8. Desenrosque la tapa de los tubos de PAC y añada 300 µL de tampón de resuspensión para disolver el PAC.
9. Incube durante 5 minutos a temperatura ambiente.
10. Mezcle utilizando el vortex y centrifugue brevemente el contenido del tubo de PAC.

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

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

PCR en tiempo real específica de especies de nemátodos

1. Diseñe la disposición de su placa de PCR. Recomendamos usar dos pocillos para cada muestra, más dos pocillos más para los siguientes controles:
 - Control de amplificación negativo (NAC)
 - Control de amplificación positivo (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 via vortex los tubos PAC, y centrifugue brevemente el contenido de los tubos PAC.
5. Pipetee 5 µL de agua exenta de nucleasas en cada pocillo NAC. A continuación, pipetee 5 µL en cada pocillo PAC. Cargue 5 µL de cada muestra de ADN diluido en su pocillo designado.

Nota: Tenga cuidado de no contaminar pocillos adyacentes.

Nota: El volumen final de cada pocillo es de 20 µL.

6. Selle la placa y centrifugue 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.

7. 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 (35 ciclos)	Desnaturalización del ADN	10 segundos
	Hibridación de cebadores	60 segundos
	Elongación*	30 segundos
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.