

Link do produktu: <http://www.novazym.sklep.pl/ampli-lamp-reticuloendotheliosis-rev-reagent-set-96-rxn-p-487.html>



Ampli-LAMP Reticuloendotheliosis (REV) Reagent Set 96 rxn

Dostępność	Dostępny
Czas wysyłki	3 dni
Numer katalogowy	REV-001

Opis produktu

Ampli-LAMP Reticuloendotheliosis (REV) Reagent Set 96 rxn

Opis jednostki chorobowej:

Wirus retikuloendoteliozy, czyli ostrego nowotworu komórek siateczki (ang. Reticuloendotheliosis virus, REV) należy do wirusów RNA z rodziny Gammaretroviridae liczącej wiele szczepów wirusów, w tym wirusa REV z defektem genetycznym (REV-T), bez defektu (REV-A), syncytialny wirus oddechowy kurczaków (ang. chick syncytial virus, CSV), i wirusa martwicy śledziony (ang. spleen necrosis virus, SNV) (Witter and Fadly, 2003).

Uważa się, że wirus REV jest odpowiedzialny za choroby immunosupresyjne i runting disease u wielu gatunków ptaków, jak: kur, indyków, kaczek, gęsi, bażantów, pawi i innych (Bohls et al., 2006; Witter and Fadly, 2003).

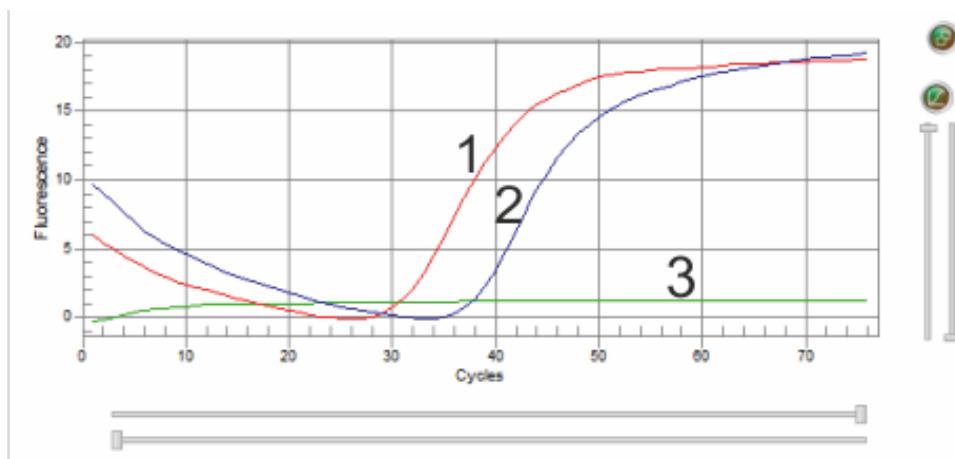
Wirus łatwo integruje z genomem gospodarza i wiąże się z onkogenezą układu hematopoetycznego. Transpozycja regionów długich powtórzeń koścowych (ang. long terminal repeat, LTR) wirusa może zachodzić w obrębie odcinków MDV (ang. Marek's Disease Virus) i FPV (ang. Fowl Pox Virus) w genomie (Hertig et al., 1997; Isfort et al., 1992; Jones et al., 1996; Kost et al., 1993; Witter et al., 1997).

W związku z potencjałem chorobotwórczym wirus retikuloendoteliozy może być poważnym zagrożeniem dla przemysłu drobiowego. Zestaw odczynników pozwala w bardzo prosty i szybki sposób zidentyfikować wirusa REV z tkanek zainfekowanych kurczaków, za pomocą wiarygodnym wynikiem może zapewnić monitoring wirusowej epidemii i określić stopień jej zaawansowania.

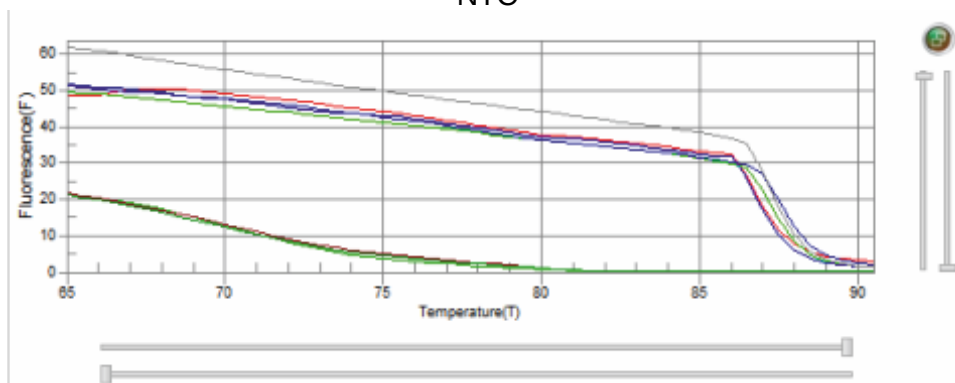
Prezentowany zestaw Ampli-LAMP jest dedykowany do analizy jakościowej wirusa retikuloendoteliozy. Nadaje się do pracy z większością aparatów do Real-Time PCR wyposażonych w bloki grzejne oraz kanał odczytu poziomu fluorescencji (kanał FAM), podobnie jak z urządzeniami Genie II i Genie III.

Zestaw zawiera:

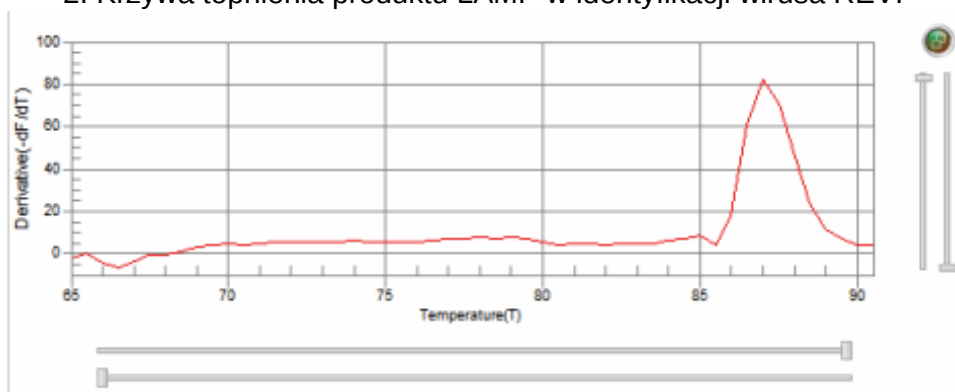
1. Isothermal Master Mix (reaction buffer, $MgCl_2$, dNTPs, pyrophosphatase, GspSSD polymerase, fluorescent dye ? 6-FAM derivative).
2. Primers (mix, F3, B3, FIP, BIP, LF, LB each in 10 ?M concentration)
3. Reverse Transcriptase for Lamp reaction
4. Random primers



1. Krzywa amplifikacji produktu LAMP w identyfikacji wirusa REV (próbę pobraną z w?troby). Jeden cykl reakcji odpowiada 30 sek. amplifikacji w procesie izotermicznym. (1) PTC, (2) próba badana, (3) - NTC



2. Krzywa topnienia produktu LAMP w identyfikacji wirusa REV.



3. Krzywa topnienia produktu LAMP. Temperatura topnienia dla w?a?ciwego produktu reakcji wynosi 87°C.

REV RT-LAMP - zasada działania testu

Test opiera się na reakcji odwrotnej transkrypcji i amplifikacji w warunkach stałej temperatury (ana. Reverse transcription isothermal amplification). W porównaniu do standardowej amplifikacji PCR, test operujący na reakcji RT-LAMP

REV RT-LAMP - warunki temperatury i czasu reakcji

RT-LAMP REV reaction conditions:

REAL-TIME PCR			
Stage	Temperature	Time	Cycles number
Reverse transcription	45 °C	30 min	1
Amplification	60 °C	30 sec	99
		Fluorescence measurement of amplification product after each reaction cycle i real-time	
Product melting	65 ? 95 °C	0,5 °C / 5 sec	
		Fluorescence measurement after each 0.5 °C temperature change.	

RT_LAMP_REV					
					MELTING
	CycleTemp1	CycleTemp1			95°C
		60°C	65°C		
	45°C	odczyt co 30 sek		odczyt co 15 sek	
	30 min	90 cycles			

REV RT-LAMP - przygotowanie reakcji

Reagent	Volume / 1 rxn	
RT-LAMP REV Isothermal Master Mix	15 ?l	
RT-LAMP REV Primer F3/B3 10 ?M ? 0,5 ?l Primer FIP/BIP 10 ?M ? 2 ?l Primer LF/LB 10 ?M ? 1 ?l	7 ?l	
Super Verte MMLV	1 ?l	
Random primers	1 ?l	
RT-LAMP REV Positive Control / RNA matrix	1 ?l	
Total:	25 ?l	

REV RT-LAMP - zalecana izolacja RNA

Protokół izolacji RNA z kart FTA:

Fast RNA purification KIT magnetic particles & 3-Zone (Novazym Polska)

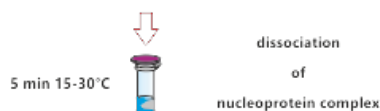
FTA card protocol

FTA SAMPLE PREPARATION:

- 1) Place a piece of FTA card (30-40 mg) in 0.5 mL reagent **3-ZONE**



- 2) Incubate sample for 5 minutes at 15 to 30°C to permit the complete dissociation of nucleoprotein complexes.



- 2) Add 0.2 mL of chloroform per 1 mL of 3-ZONE Reagent.



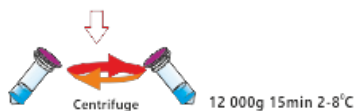
- 3) Cap sample tubes securely, and shake them vigorously by hand for 15 seconds.



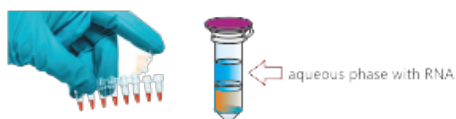
- 4) Incubate tubes at 15 to 30°C for 2 to 3 minutes.



- 5) Centrifuge the samples at 12,000 × g 15 minutes in 2 to 8°C.

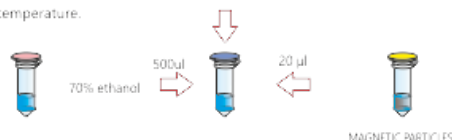


- 6) Following centrifugation, the mixture separates into a lower red, phenol-chloroform phase, an interphase, and a colorless upper aqueous phase. RNA remains exclusively in the aqueous phase. The volume of the aqueous phase is about 60% of the volume of 3-ZONE Reagent used for homogenization.



RNA PURIFICATION:

- 1) Transfer the aqueous phase to a fresh tube, add 0.5 mL of 70% ethanol and mixed well. Add 25 µl of magnetic beads and incubate 10 min. at room temperature.



- 2) Put the tubes on the magnetic rack and then remove the supernatant.



- 3) Transfer the tubes to an ordinary rack (without a magnet) and wash with 1 mL of 70% EtOH.

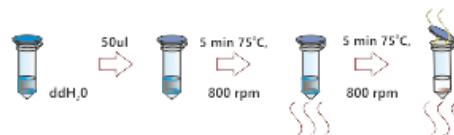
- 4) Repeat p.3



- 5) Remove residual ethanol (very carefully). Leave the open tubes for 10-15 minutes in a magnetic rack to evaporate residual ethanol.



- 6) Remove the tubes from the magnetic rack. Resuspend beads in 50 µl of deionised water (free of RNA). Incubate 5 minutes at 75 °C, 800 rpm. Then, open the tubes and incubate for another 5 minutes.



- 7) Transfer the tubes to the magnetic rack. Supernatant, containing RNA, transfer to a new, clean and RNAses free tube.

- 8) Measure of the RNA concentration.

