

KYLT[®]

SAN[®]
VET



KYLT[®] SGP & 9R DIVA

PCR NACHWEIS

i Nur für die In-vitro-Veterinärdiagnostik.

WWW.KYLT.EU | WWW.SAN-VET.COM

Passion for Innovation



GEBRAUCHSANWEISUNG

c.PCR.SGP9R.02, Rev002, December 2024

KYLT[®]

SGP & 9R DIVA

PCR Nachweis

1. ALLGEMEIN

Eigenschaft	Beschreibung
Artikelname	Kylt [®] SGP & 9R DIVA LD 100, Kylt [®] SGP & 9R DIVA LD 25
Name des Erregers	Salmonella Gallinarum, Salmonella Gallinarum Impfstamm 9R, Salmonella Pullorum
Organismus	Bakterium
Zielmolekül	DNA
Technologie	PCR
Tierart	Geflügel (Huhn)
Probenarten	■ Isolate aus kulturellen Verfahren

Das Kit wurde für den Gebrauch durch geschultes Laborpersonal nach standardisierten Verfahren entwickelt. Dieser Gebrauchsinformation ist strikt zu folgen.

2. REAL-TIME PCR

In der PCR werden die Zielgene durch spezifische Primerpaare in der Polymerase-Kettenreaktion (engl. Polymerase Chain Reaction, PCR) amplifiziert. Die amplifizierten Ziel-Sequenzen (PCR-Produkte) werden anschließend mittels Agarosegel- oder Kapillarelektrophorese anhand ihrer Größe aufgetrennt. Der erregerspezifische Status einer Probe kann durch die Berücksichtigung aller vorhandener PCR-Produkte pro Probe sowie der Negativ- und Positivkontrollen pro Lauf bewertet werden.

3. ALLGEMEIN

Eigenschaft	Deckelfarbe	100 Reaktionen Artikelnr. 31420	25 Reaktionen Artikelnr. 31421	Lager- temperatur
PCR-Mix	 Weiß	4× 280 µl	1× 280 µl	<= -18°C
Loading Dye	 Transparent	4× 60 µl	1× 60 µl	<= -18°C
Primer-Mix	 Weiß	4× Lyoph. a final 160 µl	1× Lyoph. a final 160 µl	<= -18°C
Positivkontrolle	 Rot	4× Lyoph. a final 50 µl	2× Lyoph. a final 50 µl	<= -18°C
Negativkontrolle	 Blau	1× 1 ml	1× 1 ml	<= -18°C

4. LAGERBEDINGUNGEN

- Komponenten aus verschiedenen Chargen dürfen nicht miteinander vermischt oder ausgetauscht werden.
- Falls erforderlich, bereiten Sie Aliquots der Reagenzien vor, um die Einfrier-Auftau-Zyklen auf 3 zu begrenzen.
- Die Komponenten sind innerhalb der angegebenen Haltbarkeitsdauer zu verwenden (siehe Verpackungsetikett).

5. REAGENZENVORBEREITUNG

- Vor dem ersten Gebrauch wird der **Primer-Mix** rehydriert: je 160 µl der Negativkontrolle werden zu einem Lyophilisat gegeben, für kurze Zeit inkubiert und durch kurzes Puls-Vortexen gemischt.
- Vor dem ersten Gebrauch wird die **Positivkontrolle** rehydriert: je 50 µl der Negativkontrolle werden zu einem Lyophilisat gegeben, für kurze Zeit inkubiert und durch kurzes Puls-Vortexen gemischt.

6. ERFORDERLICHE AUSSTATTUNG, GERÄTE UND VERBRAUCHSMATERIALIEN

- PCR Cycler.
- Geräte, Medien und Einwegartikel für die Agarosegel- oder Kapillarelektrophorese.
- Aufreinigungs-kit, das eine ausreichend hohe Konzentration an inhibitorfreier DNA/RNA liefert (z. B. Kyla RNA/DNA-Aufreinigungsprodukte).
- Kompatible PCR-Platten, Streifen oder einzelne Gefäße.
- Vortexer.
- Tisch-Mikrozentrifuge.
- Einstellbare Mikropipetten, die den entsprechenden Volumenbereich abdecken.
- Passende PCR-reine Pipettenspitzen mit Filtern.
- Zertifizierte Nuklease-freie (PCR-rein) Verbrauchsmaterialien.
- Puderfreie Handschuhe, die während des gesamten Setups zu tragen sind und im Falle einer Kontamination gewechselt werden müssen.

7. KONTROLLREAKTIONEN

- Jeder PCR-Lauf muss eine **Positivkontrolle** enthalten, um die Spezifität und Effizienz der Reagenzien und der Reaktion selbst sowie die Leistung der Real-Time-PCR und des Real-Time-PCR-Thermocyclers zu überwachen.
- Jeder PCR-Lauf muss eine **Negativkontrolle** enthalten, um sicherzustellen, dass keine Kontaminationen vorhanden sind.

8. REAKTIONS-SETUP

- Die verwendeten Reagenzien werden vor jedem Gebrauch kurz durch Vortexen gemischt und zentrifugiert.
- Die Gesamtzahl der Reaktionen entspricht der Anzahl der Proben plus einer Positivkontrolle und einer Negativkontrolle pro Lauf. Wenn Sie dieses Setup mit einem Kylv Standard kombinieren, fügen Sie bitte die entsprechende Anzahl von Reaktionen hinzu.
- Bereiten Sie den Master-Mix unter Verwendung der unten aufgeführten Komponenten vor.
- Den fertigen Master-Mix vortexen, zentrifugieren und davon jeweils 18 µl in jedes der PCR-Gefäße oder Plattenvertiefungen ("Kavitäten") geben.

Reagenz	Volumen (µl)	
	pro Reaktion	Beispiel n = 7
2x PCR-Mix	10 µl	70 µl
10x Loading Dye	2 µl	14 µl
Primer-Mix	6 µl	42 µl
Gesamtvolumen Master-Mix	18 µl	126 µl (18 µl pro Reaktion vorlegen)
DNA (Negativkontrolle / Probe / Positivkontrolle)	2 µl	
Gesamtvolumen pro Reaktion	20 µl	

- Eine Blasenbildung sollte beim Pipettieren der Mixe, Proben und Kontrollen vermieden werden.
- Den 2x PCR-Mix, Primer-Mix und den vorbereiteten Master-Mix nach Gebrauch sofort wieder bei der richtigen Temperatur lagern.
- 2 µl der **Negativkontrolle** in die entsprechende Kavität geben und nach Möglichkeit einzeln verschließen.
- 2 µl **Probe** in die entsprechende Kavität geben und nach Möglichkeit einzeln verschließen.
- 2 µl **Positivkontrolle** in die entsprechende Kavität geben.
- Sobald alle Reaktionen angesetzt sind, werden alle Kavitäten verschlossen und zentrifugiert.
- Die Platte wird in den PCR Thermocycler gestellt und die Amplifikation mit den unten angegebenen Einstellungen gestartet.
- Bitte befolgen Sie die Anweisungen Ihres Real-Time PCR-Thermocyclers, wie vom Hersteller empfohlen.

Schritt	Beschreibung	Temperatur	Dauer
1	Aktivierung Polymerase	94 °C	3 Min.
2	Denaturierung	94 °C	30 Sek.
3	Annealing	64 °C	30 Sek.
4	Extension	72 °C	30 Sek.
5	Finale Extension	72 °C	7 Min.
6	Kühlung nach der PCR (optional)	7 °C	Halten

} 35 Zyklen

9. AGAROSEGEL-ELEKTROPHORESE

- Es kann jede Standard-Agarosegel-Elektrophoresemethode verwendet werden, die für diese Bandengröße geeignet ist. Eine geeignete Methode wird nachstehend kurz beschrieben:
- Bereiten Sie ein 2%iges Agarosegel für die Auftrennung der DNA-Probe nach der PCR-Amplifikation vor.
- Die Vertiefungen des Agarosegels werden mit jeweils 5 µl der PCR-Reaktionen der DNA-Probe(n), der Positivkontrolle und der Negativkontrolle beladen. Mindestens eine weitere Vertiefung des Agarosegels wirds mit einer ausreichenden Menge z. B. einer 100 bp Referenz-DNA-Leiter (Marker) beladen. Die Position der Probe(n), der Kontrollen und der Sonden ist zu notieren.
- Die Elektrophorese wird bei einer Spannung von etwa 15 V/cm (der Abstand in cm bezieht sich auf den Abstand zwischen den Elektroden) für 45 bis 60 Minuten durchgeführt.
- Nach der Elektrophorese wird das Gel mit einer geeigneten Menge eines Nukleotid- bzw. interkalierenden Farbstoffs (z. B. Ethidiumbromid, GelRed Nucleic Acid Stain oder SYBR green) angefärbt und mit einer geeigneten Technik sichtbar gemacht. Für weitere Einzelheiten siehe die entsprechende Gebrauchsanweisung.

10. ALLGEMEINE AUSWERTUNG DES PCR-LAUFES UND QUALITÄTSKONTROLLE

- Das leicht gefärbte Agarosegel oder die Kapillarelektrophorese muss diskrete Banden der erwarteten Größe für die Kontrollreaktionen und die Referenz-DNA-Leiter aufweisen.
- Überprüfen Sie die Ergebnisse der Positivkontrolle und der Negativkontrolle auf Vorhandensein bzw. Fehlen der erwarteten Produktgrößen von ca. 120 bp, 175 bp und 255 bp.

11. TESTAUSWERTUNG - KONTROLLREAKTIONEN

- Der PCR-Lauf und die anschließende Elektrophorese ist nur dann valide, wenn die Banden der Kontrollreaktionen wie folgt ausgewertet werden können:

Kontrollreaktionen	Banden		
	120 bp	175 bp	255 bp
Negativkontrolle	-	-	-
Positivkontrolle	vorhanden	vorhanden	vorhanden

12. TESTAUSWERTUNG - PROBEN

Ziel	120 bp	175 bp	255 bp
<i>Salmonella Pullorum</i> positiv	-	-	Vorhanden
<i>Salmonella Gallinarum</i> positiv	-	Vorhanden	Vorhanden
<i>Salmonella Gallinarum</i> Impfstamm 9R positiv	Vorhanden	Vorhanden	Vorhanden

13. BESTELLINFORMATIONEN

Um einen schnellen und effizienten Service zu gewährleisten, senden Sie Ihre Bestellung bitte an orders.kylt-de@san-group.com und geben Sie bitte die folgenden Informationen an:

- Lieferadresse
- Rechnungsadresse
- Telefonnummer des Käufers
- Falls abweichend vom Käufer, Telefonnummer des Endnutzers
- Bestellnummer
- Artikelname- und nummer
- Anzahl und Größe der Artikel
- Geben Sie an, ob Ihr Konto von der Mehrwertsteuer befreit ist

14. REVISIONSVERLAUF

Revision	Stand	Anpassungen
Rev002	December 2024	Neues Layout/Design, geändertes Volumen der Positivkontrolle, verändertes Temperaturprofil für die Amplifikation

Produktion: SAN Group Biotech Germany GmbH · Mühlenstrasse 13 · 49685 Höltinghausen · Deutschland
www.kylt.eu · kylt-de@san-group.com

Entwicklung, Herstellung und Vertrieb von Kylt® In-Vitro Diagnostika ist ISO 9001:2015 zertifiziert.

Kylt® ist eine eingetragene Marke.

Nur für Veterinärgebrauch. Nur für in vitro-Gebrauch. Die regulatorischen Anforderungen können je nach Land variieren, dadurch sind ggf. nicht alle beschriebenen Produkte in Ihrer Region erhältlich.

© 2024 SAN Group Biotech Germany GmbH. Alle Rechte vorbehalten. Die in diesem Dokument genannten Marken sind Eigentum der SAN Group Biotech Germany GmbH bzw. der entsprechenden Markeninhaber.

