

Protocole pour l'utilisation de Nipah Armored RNA comme contrôle positif Nipah virus (NiV) (adapté à une plateforme TaqMan)

RUO (Research Use Only)

Contenu du flacon

L'Armored RNA (ArRNA) Nipah est un contrôle positif à utiliser en combinaison avec le système RT-qPCR Lyophil-P&P Nipah pour la détection du virus Nipah (NiV). La séquence d'ARN cible est encapsidée grâce à un protocole *in vitro* afin d'obtenir une particule virus-like ; l'ArRNA peut donc être extrait et testé par RT-qPCR comme un échantillon clinique.

Stockage

Les flacons contenant l'Armored RNA (ArRNA) doivent être conservés après réception à -20°C à l'abri de la lumière. Stable 4 ans dans les conditions décrites.

Instructions

Ce protocole a été validé avec le kit et les automates d'extraction et de RT-qPCR suivants :

- EZ1 Virus Mini Kit v2.1 (QIAGEN) sur EZ1 (QIAGEN)
- SuperScript™ III Platinum™ One-Step qRT-PCR Kit (ThermoFisher)
- Thermocycleur CFX (BIORAD)

L'utilisation d'autres kits ou d'autres automates d'extraction et de RT-qPCR pourrait nécessiter une adaptation du protocole.

I. Reconstitution de l'ArRNA

- Écrire la date sur le flacon avant de l'ouvrir.
- Remettre en suspension l'ArRNA comme suit : (ces étapes sont indispensables pour assurer une homogénéisation adéquate)
 - ✓ Ajouter 500µL d'eau dans le flacon
 - ✓ Pipeter de haut en bas le volume dans le flacon 10 à 20 fois pour assurer une homogénéisation adéquate
 - ✓ Laisser l'ArRNA réhydraté à température ambiante pendant 10 minutes
 - ✓ Effectuer une deuxième étape de pipetage après l'incubation

II. Préparation de la solution de travail

- Extraire 400µL de la solution stock sur l'automate EZ1 (QIAGEN) avec EZ1 Virus Mini Kit v2.1
- Choisir 60µL comme volume d'élution
- Diluer 60µL d'extrait dans 440µL de PBS afin d'obtenir la solution de travail

- Si le contrôle positif est utilisé plusieurs jours après l'extraction, la solution de travail doit être aliquotée pour éviter plusieurs cycles de congélation/décongélation et être conservée à -80°C pour une stabilité optimale.

III. RT-qPCR

- Préparer le mix de PCR avec le système RT-qPCR Lyoph-P&P (Lyophilized primers and probe), précédemment reconstitué comme décrit dans le SoP 'Protocole pour la RT-qPCR en temps réel avec Lyoph-P&P (adapté à une plateforme TaqMan)' (Tableau 1)
- Réaliser la RT-qPCR avec le profil thermique décrit dans le Tableau 2

Tableau 1. Préparation du mix de RT-qPCR (avec SuperScript™ III Platinum™ One-Step qRT-PCR Kit - ThermoFisher)

	Volume/PCR test (μL)
2X Reaction mix	12.5
Lyoph-P&P reconstitué	7
SSIII/Taq enzyme mix	0.5
Total (1 PCR test)	20
RNA (H_2O pour Ctrl-)	5
Volume final	25

Lecture : FAM-QSY

Tableau 2. Profil thermique

50°C	15min	
95°C	2min	
95°C	15sec	45 cycles
60°C	45sec (lecture)	

En utilisant ce protocole, un flacon d'ArRNA permet de réaliser 100 runs de RT-qPCR.