

Protocole pour la RT-PCR en temps réel du virus Nipah (NiV) avec Lyoph-P&P Nipah (adapté à une plateforme TaqMan)

RUO (Research Use Only)

Contenu du flacon

Lyoph-P&P Nipah contient un mélange d'amorces et sondes (Lyoph-P&P) pour la détection du virus Nipah (NiV).

Stockage

Les flacons contenant le mix d'amorces et sondes (Lyoph-P&P) doivent être conservés après réception à -20°C à l'abri de la lumière. Stable 4 ans dans les conditions décrites.

Design

Systèmes inclus dans Lyoph-P&P Nipah :

- A Revised Diagnostic Quantitative RT-PCR for the Detection of Nipah Virus Infection. Patel et al., Methods Mol Biol, 2023. DOI: 10.1007/978-1-0716-3283-3_2

Instructions

Ce protocole a été validé avec le kit et l'automate RT-qPCR suivants :

- SuperScript™ III Platinum™ One-Step qRT-PCR Kit (ThermoFisher)
- Thermocycleur CFX (BIORAD)

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

I. Reconstitution de Lyoph-P&P

- Écrire la date sur le flacon avant de l'ouvrir.
- Remettre en suspension les Lyoph-P&P comme suit : **(ces étapes sont indispensables pour assurer une homogénéisation adéquate)** :
 - ✓ Ajouter de l'eau ou du buffer RE comme décrit dans le Tableau 1
 - ✓ Pipeter de haut en bas le volume dans le flacon 10 à 20 fois
 - ✓ Laisser le P&P reconstitué à température ambiante pour 10 minutes
 - ✓ Effectuer une deuxième étape de pipetage après l'incubation

Tableau 1. Reconstitution de Lyoph-P&P selon le format du flacon (indiqué sur l'étiquette)

Format du flacon (nombre de tests/flacon)	8+1	16+2	24+2	32+3	48+3	96+5
H ₂ O ou RE buffer (µL)	63	126	182	245	357	707

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

Tableau 2. Préparation du mix de RT-qPCR. *Reconstitution réalisée comme indiqué dans le Tableau 1.

	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 ₂ O pour Ctrl-)	5
Volume final	25

III. Profil thermique et RT-qPCR (avec SuperScript™ III Platinum™ One-Step qRT-PCR Kit - ThermoFisher)

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

Lecture: FAM-BHQ1

Les Lyoph-P&P régénérés peuvent être aliquotés et congelés à -20°C. Chaque aliquot doit être décongelé une seule fois puis jeté.