

Détection des bocavirus par PCR en temps réel

OBJET

Détection qualitative des Bocavirus humains par amplification d'un fragment de la région 5' non codante, hautement conservée dans le génome.

CONTENU

- Réactifs utilisés
- Amorces utilisées
- Mode opératoire

REACTIFS UTILISÉS

- **TaqMan[®] Fast Universal PCR Master Mix (2X)No Amperase UNG**, Applied Biosystems. *Réf : 4352042*
- **Amorces**. Applied Biosystems. *Réf : 4304970*
- **Sondes MGB**. Applied Biosystems. *Réf : 4316034*
- H₂O pour PCR

AMORCES ET SONDES UTILISÉES

Amorces :

Noms	Séquences (5'3')	Sens
HBoV1F	CCT ATA TAA GCT GCT GCA CTT CCT G	+
HBoV234F	GCA CTT CCG CAT YTC GTC AG	+
HBoV1R	AAG CCA TAG TAG ACT CAC CAC AAG	-
HBoV3R	GTG GAT TGA AAG CCA TAA TTT GA	-
HBoV24R	AGC AGA AAA GGC CAT AGT GTC A	-

Sondes :

Noms	Séquences (5'3')
H1234	(FAM)-5'-CCA GAG ATG TTC ACT CGC CG-3'-(MGB)-(BHQ1)

MODE OPERATOIRE

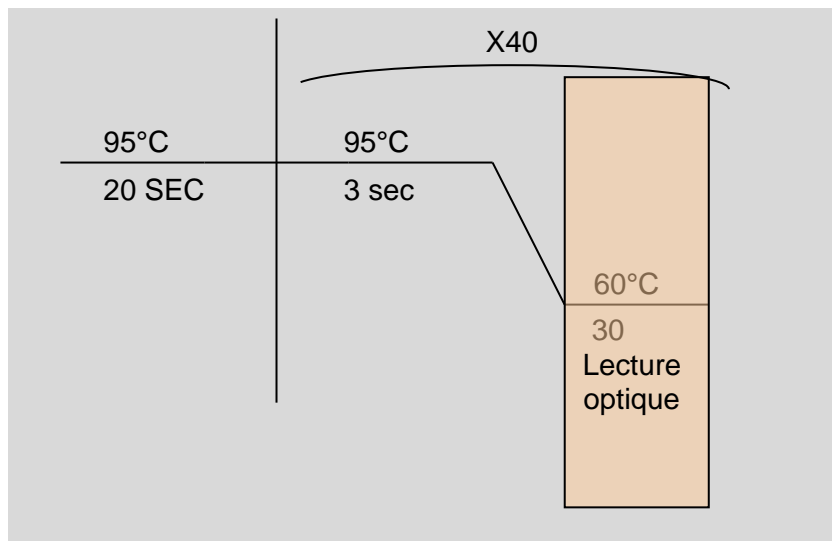
1. Extraction de l'ARN viral :

L'extraction est réalisée sur automate NucliSENS[®] EasyMAG[™] de bioMérieux.

2. Mélange réactionnel :

	Concentration initiale	Volume en µL
H ₂ O		1.75
Fast Universal PCR Master Mix	2X	10
HBoV1F	10µM	1.5
HBoV234F	10µM	1.5
HBoV1R	10µM	1.5
HBoV3R	10µM	1.5
HBoV24R	10µM	1.5
H1234	10µM	0.75
ARN		5
Volume final par tube		25

3. Cycle d'amplification :



- Reporter échantillon: FAM
- Quencher échantillon: NFQ-MGB
- Auto baseline
- Passive référence : ROX

4. Validation analytique des résultats :

Pour valider l'expérience, toutes les conditions énumérées ci-dessous doivent être impérativement remplies. Dans le cas contraire, l'ensemble de l'expérience doit être réitéré.

- Le contrôle négatif d'extraction et d'amplification ne doit donner aucun signal à 530 nm (FAM)
- Le contrôle positif d'amplification doit donner un inférieur à 32 cycles à 530 nm (FAM).