

DÉTECTION DES BOCAVIRUS PAR RT-PCR EN TEMPS RÉEL

OBJET

Détection qualitative des bocavirus humains par amplification en temps réel de la région couvrant la partie 5' UTR et le début du gène NS1.

DOCUMENTS DE REFERENCE

Kantola et al. "Real-Time quantitative PCR detection of four Human Bocaviruses" J. Clin. Microbiol. 2010 ; 48(11) : 4044-4050.

TYPES D'ÉCHANTILLON

ADN extrait sur automate d'extraction NucliSENS® EasyMAG™ de Biomérieux.

REACTIFS

• Taqman Fast Universal PCR Master mix – Thermo Fisher Scientific *réf* 4352042

• Amorces :

Noms	Séquences (5'3')	Positions	Sens
HBoV1F	CCT ATA TAA GCT GCT GCA CTT CCT G	152-177*	+
HBoV234F	GCA CTT CCG CAT YTC GTC AG	235-259*	+
HBoV1R	AAG CCA TAG TAG ACT CAC CAC AAG	50-70**	-
HBoV3R	GTG GAT TGA AAG CCA TAA TTT GA	205-230***	-
HBoV24R	AGC AGA AAA GGC CAT AGT GTC A	128-150**	-

• Sonde :

Nom	Séquence (5'3')	Position
H1234	FAM-CCA GAG ATG TTC ACT CGC CG-NFQ-MGB	85-104**

* position sur NC007544

** position sur FJ170279

*** position sur EU918736

MODE OPERATOIRE

1. Mélange réactionnel

	Volume en µL	Concentration finale
H ₂ O	3	
TaqMan Fast Universal PCR Master Mix (2X)	12,5	1X
HBoV1F (20 µM)	0,75	600 nM
HBoV234F (20 µM)	0,75	600 nM
HBoV1R (20 µM)	0,75	600 nM
HBoV3R (20 µM)	0,75	600 nM
HBoV24R (20 µM)	0,75	600 nM
H1234 (10 µM)	0,75	300 nM
Volume total de réactifs	20	

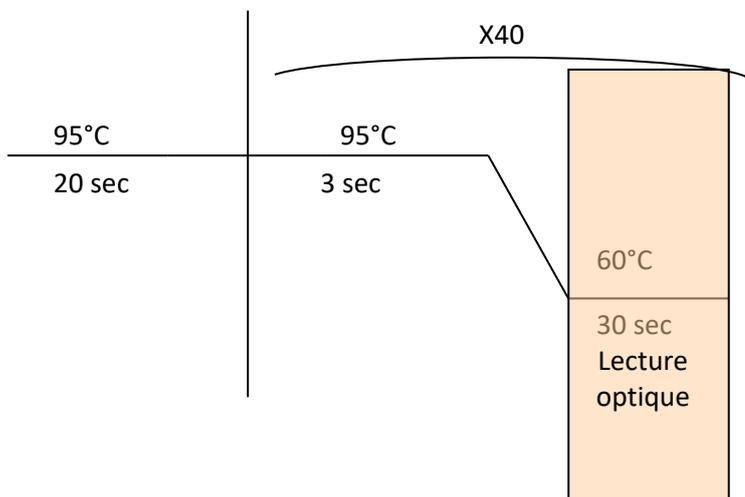
Déposer 20 µL de mélange réactionnel par puits.

2. Dépôt des acides nucléiques

Pour chaque série de temps réel, sont déposés dans des puits différents :

- 5µL d'ADN extrait pour chaque échantillon
- 5µL de témoin négatif (PBS) extrait correspondant à la série d'extraction
- 5µL de témoin positif

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 ne donne aucun signal à 530 nm (FAM).
- Le contrôle positif donne un signal à 530 nm (FAM).

5. Interprétation des résultats

Détection Bocavirus 530 nm	Ct calculé	Ct non calculé
	Résultat validé. Echantillon POSITIF	Résultat validé. Echantillon NEGATIF