

راهنمای کیت BK RQ

جهت تشخیص و کمیت سنجی ویروس BK
به روش Real-Time PCR

جهت کار با دستگاه Rotor-Gene یا StepOne
مخصوص تحقیقات

NG-WI- ASL-09-200

ویرایش ۲/۰

اسفند ۱۳۹۵



فهرست مندرجات:

۱. مقدمه.....	۲
۲. محتویات کیت.....	۳
۳. شرایط نگهداری و پایداری کیت.....	۳
۴. سایر موارد مورد نیاز.....	۴
۵. نکات قابل توجه.....	۴
۶. نمونه مناسب و شرایط نگهداری و انتقال آن.....	۵
۷. عوامل مزاحم.....	۵
۸. استخراج DNA.....	۶
۹. کنترل داخلی.....	۶
۱۰. محاسبه تیترو ویروس.....	۶
۱۱. دستور کار PCR.....	۷
۱۲. تنظیم دستگاه Rotor-Gene.....	۸
۱۳. تنظیم دستگاه StepOne.....	۸
۱۴. تنظیم سایر دستگاه ها.....	۹
۱۵. آنالیز نتایج Rotor-Gene.....	۱۱
۱۶. آنالیز نتایج StepOne.....	۱۳
۱۷. محدوده خطی.....	۱۳
۱۸. میزان حساسیت.....	۱۳

کیت **BK RQ** برای تشخیص و کمیت سنجی DNA ویروس BK در نمونه پلاسما یا ادرار می باشد. این کیت برای کار با دستگاه های Rotor-Gene و StepOne طراحی شده و مخصوص مصارف تحقیقاتی است.

۱. مقدمه

ویروس BK به گونه پولیوما ویروس ها (polyomaviruses) تعلق دارد. ژنوم این ویروس متشکل از DNA دو رشته ای (dsDNA) می باشد. ویروس BK به طور گسترده ای یافت می شود و در حدود ۹۰٪ بزرگسالان آنتی بادی آن را دارند. عفونت اولیه در دوران کودکی اتفاق می افتد و پس از آن به صورت نهفته (latent) تا پایان عمر در بدن فرد باقی می ماند.

عفونت در افراد سالم فاقد علائم بوده یا دارای علائم خفیف می باشد اما در افرادی که پیوند کلیه یا مغز استخوان دریافت می کنند می تواند عواقب ناگواری داشته باشد. از جمله می توان به نفروپاتی مرتبط با پولیوما ویروس (PVAN) و پس زدن پیوند اشاره کرد. در چنین مواردی بررسی کمی تیتر ویروس در پلاسما یا ادرار بیمار الزامی است و تیتر بالاتر از ده هزار کپی در میلی لیتر در پلاسما یا بالاتر از ده میلیون کپی در میلی لیتر در ادرار می تواند نشانه آغاز نفروپاتی باشد.

کیت حاضر امکان بررسی نمونه جهت تشخیص و تعیین تیتر ویروس BK را به روش Real-Time PCR فراهم می کند که در مقایسه با سایر روشهای سنجش تیتر ویروس، دارای بیشترین حساسیت و وسیع ترین دامنه اندازه گیری می باشد. در این روش با استفاده از پروبهای فلورسنت می توان کینتیک واکنش را بررسی نمود و بر اساس آن تعداد ویروس را در نمونه تعیین نمود بدون اینکه پس از پایان واکنش نیاز به انجام مراحل بعدی باشد. با توجه به اینکه در این

روش نیازی به بررسی محصول PCR وجود ندارد، امکان ایجاد آلودگی نیز به لحاظ تئوری وجود نخواهد داشت.

این کیت برای استفاده با دستگاه Rotor-Gene یا دستگاه StepOne طراحی شده است. این کیت همچنین حاوی کنترل داخلی می باشد که از گزارش منفی کاذب حاصل از مهار PCR پیشگیری می کند.

۲. محتویات کیت

این کیت شامل یک دفترچه راهنما، یک لوح فشرده و مواد زیر می باشد:

برچسب	محتوا	حجم
BK Mix	میکس آماده برای PCR*	۳۶۰ میکرولیتر
BK S1	استاندارد ۱: صد هزار کپی در میکرولیتر	۱۵۰ میکرولیتر
BK S2	استاندارد ۲: ده هزار کپی در میکرولیتر	۱۵۰ میکرولیتر
BK S3	استاندارد ۳: هزار کپی در میکرولیتر	۱۵۰ میکرولیتر
BK S4	استاندارد ۴: صد کپی در میکرولیتر	۱۵۰ میکرولیتر
Water	آب مخصوص PCR	۲۰۰ میکرولیتر

* ۱، ۲ یا ۴ عدد، به ترتیب برای کیت های ۲۴، ۴۸ و ۹۶ واکنشی

۳. شرایط نگهداری و پایداری کیت

تمامی مواد کیت باید در دمای ۲۰ درجه زیر صفر حمل و نگهداری شوند. در این صورت این مواد تا پایان زمان انقضا کیت که روی کیت و نیز روی هر لوله درج شده است پایدار و قابل استفاده می باشند.

از ذوب و انجماد مکرر این مواد و بیش از سه بار خودداری کنید زیرا باعث

کاهش حساسیت و عدم کارایی آنها می شود.

۴. سایر موارد مورد نیاز

برای استفاده از این کیت به تجهیزات و اقلام زیر نیاز دارید:

- دستگاه Real-Time PCR به همراه تجهیزات جانبی آن
- سانتریفوژ مخصوص میکروتیوب
- ورتکس (Vortex Mixer)
- بلوک حرارتی رومیزی (Dry Block Heater)
- سمپلر متغیر و سر سمپلر فیلتردار (Nuclease free)
- کیت استخراج DNA
- تیوب ۱/۷ میلی لیتری و میکروتیوب مخصوص Real-Time PCR
- دستکش لاتکس یا نیتریل بدون پودر
- بلوک آلومینیومی (بلوک سرد)

۵. نکات قابل توجه

برای پیشگیری از تولید نتایج کاذب به نکات زیر توجه کنید:

- هنگام کار با نمونه بیمار، همیشه فرض را بر آلوده بودن نمونه بگذارید و خطرات بالقوه آن را در نظر داشته باشید.
- در فضای pre-PCR یا Clean Room سه ناحیه را مشخص و از هم تفکیک کنید. این سه فضا شامل فضای نگهداری نمونه و استخراج، فضای آماده سازی مواد (برای افزودن میکس به لوله های PCR) و فضای آماده سازی واکنش (برای افزودن نمونه DNA به لوله PCR) می باشند. هر یک

از سه فضای فوق باید وسایل مخصوص به خود، به ویژه سمپلر، را داشته باشند. از جابجایی وسایل بین این سه فضا پرهیز کنید.

- سطوح کار را همیشه قبل از شروع و پس از خاتمه کار با الکل ۷۰ درجه تمیز کنید.
- پیش از باز کردن درپوش لوله های درون کیت، آنها را کاملاً ذوب نموده و با چند تکان ملایم از مخلوط و یکنواخت شدن محتویات هر لوله اطمینان حاصل کنید. سپس برای چند ثانیه آنها را در دور پایین سانتریفوژ کنید.
- در حین کار، محتویات کیت را همیشه روی یخ خرد شده نگهداری کنید. از استفاده از یخهای قالبی و سایر موارد به غیر از یخ خرد شده پرهیز کنید.
- در حین کار، میکروتیوب های PCR را روی بلوک سرد گذاشته، و از گذاشتن آنها بر یخ خرد شده خودداری کنید.

۶. نمونه مناسب و شرایط نگهداری و انتقال آن

نمونه مناسب برای آزمایش ویروس BK با این کیت، پلاسمای خون محیطی (peripheral blood) می باشد که در لوله استریل حاوی ماده ضد انعقاد جمع آوری شده است. ماده ضد انعقاد می تواند EDTA یا سیترات باشد. خون کامل را می توان تا ۷۲ ساعت در ۴ درجه نگهداری و به آزمایشگاه منتقل نمود. هنگام دریافت نمونه در آزمایشگاه باید پس از سانتریفوژ پلاسمای آن را جدا نموده و در دمای ۲۰ درجه زیر صفر نگهداری نمود. نمونه پلاسما در چنین شرایطی تا چندین هفته پایدار بوده و تیترو ویروس در آن ثابت می ماند.

حداقل نمونه توصیه شده برای آزمایش ۲۰۰ میکرولیتر پلاسما می باشد که نیازمند نیم میلی لیتر خون کامل می باشد.

۷. عوامل مزاحم

هپارین با غلظت بیش از ۱۰ واحد در میلی لیتر باعث مهار PCR می شود. به همین دلیل لوله حاوی هپارین به عنوان ضد انعقاد مناسب نیست و نباید استفاده شود. همچنین نمونه بیماران تحت درمان با هپارین نیز برای PCR مناسب نمی باشد.

مقادیر بالای بیلیروبین (تا حداکثر ۴/۵ میلی گرم در دسی لیتر) و چربی (تا حداکثر ۱۰۰۰ میلی گرم در دسی لیتر) و نیز همولیز خون برای این آزمایش مزاحمتی ایجاد نمیکند.

۸. کنترل داخلی

برای ارزیابی احتمال مهار PCR و جلوگیری از نتایج منفی کاذب، BK Mix حاوی کنترل داخلی می باشد. در صورت موفق بودن واکنش، کنترل داخلی منجر به تولید فلورسانس با تابش زرد (VIC/Yellow) و CT بین ۲۸ تا ۳۵ می شود.

۹. استخراج DNA

برای استخراج DNA از نمونه پلاسما از روشها و کیت‌های مختلفی می توان استفاده نمود. ما استفاده از کیت‌های زیر را توصیه می کنیم:

- High Pure Viral Nucleic Acid Kit (Cat# 11858874001, Roche Applied Science, Mannheim, Germany)
- QIAamp DNA Blood Mini Kit (Cat. no. 51104, Qiagen GmbH, Hilden, Germany)

- QIAamp UltraSens ® Virus Kit (Cat. no. 53704, Qiagen GmbH, Hilden, Germany)
- QIAamp MiniElute Virus Spin Kit (Cat. no. 57704, Qiagen GmbH, Hilden, Germany)

۱۰. دستور کار PCR

ابتدا تمامی لوله ها را روی یخ خرد شده قرار دهید تا بطور کامل محتویات آنها ذوب شوند. با چند تکان ملایم از مخلوط شدن مواد داخل آنها اطمینان حاصل کرده و برای چند ثانیه آنها را در دور پایین سانتریفوژ کنید.

تعداد مورد نیاز لوله PCR روی بلوک سرد بگذارید. علاوه بر تعداد نمونه های مورد آزمایش، ۴ لوله برای استانداردها و یک لوله برای کنترل منفی نیز در نظر بگیرید.

به هر لوله ۱۵ میکرولیتر از میکس **BK Mix** اضافه کنید. سپس ۱۰ میکرولیتر از DNA استخراج شده و یا **استاندارد** یا آب به هر لوله اضافه کنید و درپوش لوله ها را ببندید. سپس آن ها را مطابق شماره ها داخل دستگاه قرار دهید.

توجه: در صورت استفاده از دستگاه **StepOne** لوله ها را ابتدا به مدت کوتاهی سانتریفوژ نموده و سپس داخل دستگاه قرار دهید.

توجه: هنگام استفاده از دستگاه روتورژن، رینگ محافظ را نیز در پایان اضافه کنید.

۱۱. تنظیم دستگاه Rotor-Gene

ابتدا اطمینان حاصل کنید که رینگ محافظ را روی روتور قرار داده اید!

روی کامپیوتر جانبی دستگاه روتورژن، از لوح فشرده همراه کیت فایل BK 0.2 و BK 0.1 (با توجه به لوله های استفاده شده) را باز کنید.

در منوی بالای صفحه دکمه استارت (دکمه سبز رنگ) را کلیک کنید. روی پنجره باز شده نیز دکمه استارت را کلیک کنید و فایل آزمایش را در محل مورد نظر ذخیره کنید تا دستگاه روشن شود.

در پنجره نمونه ها (samples) نام هر نمونه را وارد کنید. در ستون نوع نمونه با عنوان type، برای نمونه بیمار unknown و برای استانداردها standard را انتخاب کنید. سپس غلظت استانداردها را در ستون سمت راست با عنوان given concentration وارد کنید. برای نمونه کنترل منفی نیز می توانید NTC یا Negative Control را انتخاب کنید.

۱۲. تنظیم دستگاه StepOne

لوح فشرده همراه کیت را در کامپیوتر جانبی دستگاه قرار دهید. نرم افزار دستگاه را باز کنید (StepOne software 2.*). از منوی Set Up روی دکمه Template کلیک کنید و فایل داخل لوح فشرده را انتخاب کنید.

از منوی سمت چپ Plate Setup و سپس دکمه Assign Targets and Samples را انتخاب کنید. یک کنترل منفی به همراه چهار استاندارد و ده نمونه از پیش تعریف شده اند. استانداردها، کنترل منفی و تعداد نمونه مورد نظر خود را در ردیف دلخواه کپی کنید. برای اینکار از گزینه های کلیک راست (copy, paste, clear) می توانید استفاده کنید. همچنین با استفاده از منوی Define Targets and Samples می توانید تعداد نمونه های مورد بررسی را نیز اضافه کنید و نام نمونه ها را نیز مطابق نام بیماران تغییر دهید. در پایان تنظیمات دکمه Start Run را کلیک کنید و فایل آزمایش را در

محل مورد نظر ذخیره کنید تا دستگاه شروع به کار کند.

۱۳. تنظیم سایر دستگاه ها

چنانچه این کیت را برای استفاده با سایر دستگاههای Real-Time PCR استفاده می کنید، دستگاه را مطابق برنامه زیر تنظیم نمایید:

Step	Temperature and time	Cycles
1	95°C x 10 min	1
2	95°C x 20 sec	45
	59°C x 60 sec	

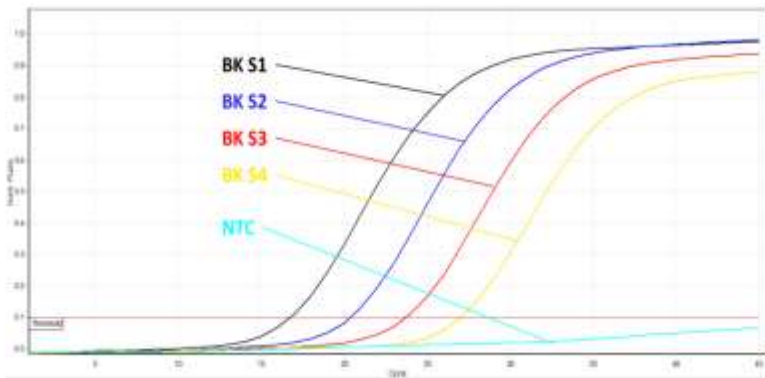
اندازه گیری تابش فلورسانس باید در دمای ۵۹ درجه و برای رنگهای FAM و VIC تنظیم شود.

BK Mix موجود در کیت حاوی ROX می باشد. غلظت نهایی ROX در واکنش 300nM می باشد.

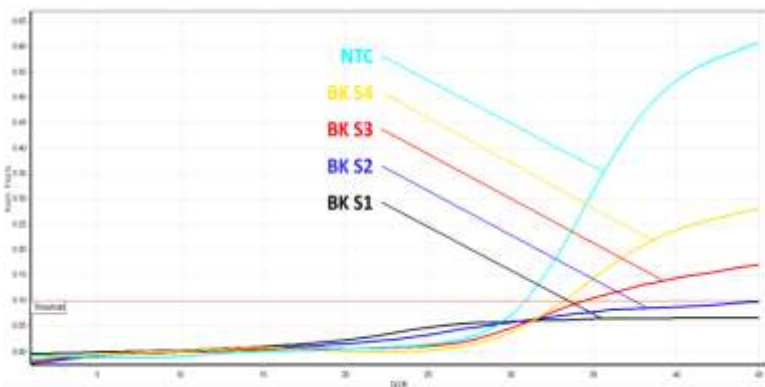
۱۴. آنالیز نتایج Rotor-Gene

برای آنالیز نتایج به راهنمای Rotor-Gene مراجعه کنید. به طور خلاصه از منوی Quantitation, Analysis را انتخاب کرده و روی Green دوبار کلیک کنید. در پنجره autofind threshold حداقل را روی ۰/۰۲ یا بالاتر از فلورسانس زمینه قرار داده و دکمه OK را بزنید تا پس از رسم منحنی استاندارد نتایج در جدول پایین صفحه نشان داده شوند. همچنین می توانید به طور ساده آستانه (threshold) را روی ۰/۱ قرار دهید. سپس در منوی Analysis مجدداً Quantitation و سپس Yellow را کلیک کنید. در پنجره autofind threshold دکمه cancel را بزنید و آستانه را روی ۰/۱ قرار دهید.

برای مشاهده نمودار مورد انتظار استاندارد، کنترل منفی و کنترل داخلی، تصاویر یک و دو را ملاحظه فرمایید.



تصویر ۱: منحنی استانداردهای BK در کانال سبز دستگاه Rotor-Gene



تصویر ۲: منحنی کنترل داخلی در کانال زرد دستگاه Rotor-Gene

توجه داشته باشید که افزایش تابش سبز (Green) مربوط به ویروس BK و افزایش تابش زرد (Yellow) حاصل از کنترل داخلی می باشد.

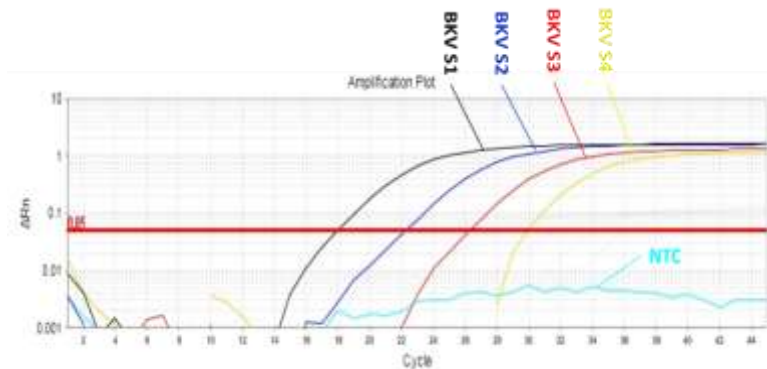
توجه داشته باشید نمونه تنها زمانی مثبت در نظر گرفته میشود که دارای منحنی سیگموییدی و فاز لگاریتمی باشد و تنها در این حالت CT معتبر بوده و قابل استناد و تفسیر می باشد. در غیاب منحنی سیگموییدی، نمونه منفی محسوب میشود و CT آندر صورت وجود، فاقد ارزش میباشد.

نتایج را با توجه به نکات زیر تفسیر کنید:

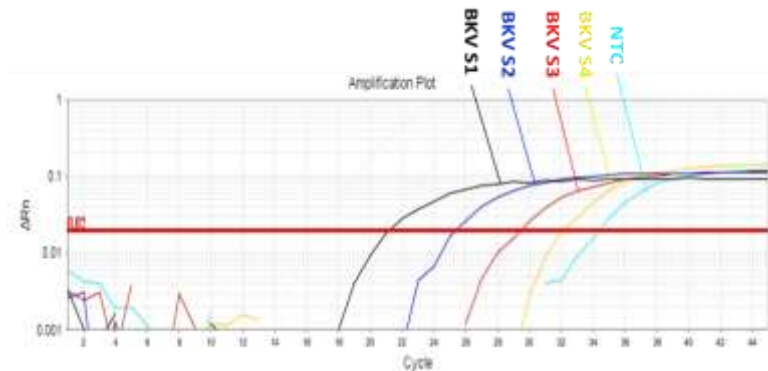
- در صورتی که نمونه در کانال سبز مثبت و دارای منحنی سیگموییدی و CT کمتر از ۴۰ باشد، بدون در نظر گرفتن نتیجه آن در کانال زرد می توان آن را **مثبت** تلقی نمود و تیترا محاسبه شده توسط دستگاه را گزارش نمود.
- در صورتی که یک نمونه در کانال سبز منفی باشد ولی در کانال زرد مثبت و دارای منحنی سیگموییدی و CT بین ۲۸ تا ۳۵ باشد، نمونه **منفی** در نظر گرفته می شود.
- در صورتی که یک نمونه در هر دو کانال سبز و زرد منفی باشد، نتیجه **نامعتبر** بوده و آزمایش باید **تکرار** شود.

۱۵. آنالیز نتایج StepOne

برای آنالیز نتایج به راهنمای StepOne مراجعه کنید. به طور خلاصه دکمه Analysis را کلیک کنید. برای BK/FAM آستانه (threshold) را روی ۰/۱ و برای IC/VIC آستانه را روی ۰/۰۵ قرار دهید. برای مشاهده نمودار مورد انتظار استانداردها، کنترل منفی و کنترل داخلی، تصاویر سه و چهار را ملاحظه فرمایید.



تصویر ۳: منحنی استانداردهای BK در کانال FAM دستگاه StepOne



تصویر ۴: منحنی کنترل داخلی در کانال VIC دستگاه StepOne

توجه داشته باشید که افزایش تابش FAM مربوط به ویروس BK و افزایش تابش VIC حاصل از کنترل داخلی می باشد.

توجه داشته باشید نمونه تنها زمانی مثبت در نظر گرفته میشود که دارای منحنی سیگموییدی و فاز لگاریتمی باشد و تنها در این حالت CT معتبر بوده و قابل استناد و تفسیر می باشد. در غیاب منحنی سیگموییدی، نمونه منفی محسوب میشود و آن در صورت وجود فاقد ارزش میباشد.

نتایج را با توجه به نکات زیر تفسیر کنید:

- در صورتی که نمونه در کانال BK/FAM مثبت و دارای منحنی سیگموییدی و CT کمتر از ۴۰ باشد، بدون در نظر گرفتن نتیجه آن در کانال IC/VIC می توان آن را مثبت تلقی نمود و تیترا محاسبه شده توسط دستگاه را گزارش نمود.
- در صورتی که یک نمونه در کانال BK/FAM منفی باشد ولی در کانال IC/VIC مثبت و دارای منحنی سیگموییدی و CT بین ۲۸ تا ۳۵ باشد، نمونه منفی در نظر گرفته می شود.

- در صورتی که یک نمونه در هر دو کانال BK/FAM و IC/VIC منفی باشد، نتیجه **نامعتبر** بوده و آزمایش باید **تکرار** شود.

۱۶. محاسبه تیترو ویروس

هر کیت حاوی چهار استاندارد با غلظت مشخص می باشد که با استفاده از آنها منحنی استاندارد رسم شده و تیترو ویروس در نمونه بیمار معین می شود. استانداردهای کیت با واحد کپی در میکرولیتر مشخص شده اند. برای تبدیل نتایج به صورت کپی در میلی لیتر، از معادله زیر استفاده کنید:

$$\text{Result (copy/ml)} = \frac{\text{Result (copy/}\mu\text{l)} \times \text{elution volume (}\mu\text{l)}}{\text{sample volume (ml)}}$$

به طور مثال چنانچه ۲۰۰ میکرولیتر نمونه استخراج و DNA حاصل در ۵۰ میکرولیتر بافر حل شود، نتایج باید در عدد ۲۵۰ ضرب شوند تا به کپی در میلی لیتر (copy/ml) تبدیل شوند.

۱۷. محدوده خطی

محدوده خطی این کیت با استفاده از نمونه کلون شده حاوی بخشی از ژنوم ویروس بررسی شده و شامل بازه ده میلیون کپی در میکرولیتر تا ده کپی در میکرولیتر می باشد.

۱۸. میزان حساسیت

حساسیت تشخیصی این کیت با استفاده از نمونه کلون شده حاوی بخشی از ژنوم ویروس بررسی شده و معادل دو کپی در میکرولیتر می باشد. یعنی در ۹۵٪ مواردی که تیترو نمونه مورد آزمایش بیش از این میزان باشد، توسط این کیت

تشخیص داده خواهد شد. در صورت کاهش تیتر نمونه به کمتر از این میزان همچنان کیت قادر به تشخیص خواهد بود اما با ضریب اطمینان به مراتب کمتر.

BK RQ Kit Manual

**For Real-Time PCR Detection and Quantitation of
BK Virus**

For use with Rotor-Gene or StepOne
Research use only

NG-WI-ASL-09-200
Version 2.0
March 2017



Table of Contents:

1. Introduction	2
2. Kit Contents	3
3. Storage and Stability	3
4. Additionally Required Materials	3
5. General Precautions	4
6. Specimen, storage and transport	4
7. Interfering substances	4
8. DNA isolation	5
9. Internal control (IC)	5
10. Quantitation	6
11. PCR Protocol	6
12. Programming of the Rotor-Gene	6
13. Programming of StepOne(/Plus)	6
14. Programming other machines	7
15. Data Analysis: Rotor-Gene	9
16. Data Analysis: StepOne	10
17. Linear Range	10
18. Sensitivity	11

BK RQ kit is intended for the quantitative detection of BK virus DNA with Rotor-Gene or StepOne machines. This kit is for research use only.

1. Introduction

BK virus is a member of polyomaviruses genus with a double stranded DNA genome. The virus is widespread with a seroprevalence of up to 90% in adults. Infection usually happens during the childhood and is either asymptomatic or with mild symptoms. Following initial infection, virus persists as a lifelong latent infection. BKV can cause significant consequences in renal or bone marrow transplant patients including polyomavirus associated nephropathy (PVAN) and also graft loss. Quantitative monitoring of BKV load in plasma or urine of transplant recipients is essential and a load of 10,000 copies/ml of plasma or 10 million copies/ml of urine for 3 weeks or more is an early indication of PVAN.

BK RQ kit provides a ready-to-use Real-Time PCR system for detection and quantitation of BK virus DNA with Rotor-Gene or StepOne machines. Currently the Real-Time PCR provides the highest sensitivity and widest dynamic range among other methods. In this method application of fluorescent probes allows detection of amplified product. Analysis of fluorescent kinetics also leads to quantification of the target sequence in the reaction without requiring post-amplification analysis, reducing the possibility of contamination with the PCR product.

This kit also incorporates an Internal Control to identify possible PCR inhibition.

2. Kit Contents

The kit contains a manual, a CD with RotorGene and StepOne templates and following reagents:

Label	Content	Quantity
BK Mix	PCR Master mix*	360 μ l
BK S1	Standard 1: 100,000 copy/ μ l	150 μ l
BK S2	Standard 2: 10,000 copy/ μ l	150 μ l
BK S3	Standard 3: 1,000 copy/ μ l	150 μ l
BK S4	Standard 4: 100 copy/ μ l	150 μ l
Water	PCR Grade Water	200 μ l

* 1, 2 and 4 tubes for 24, 48 and 96 reaction kits.

3. Storage and Stability

The kit components should be shipped and stored at -20°C and are stable until the expiry date mentioned. Avoid repeated freeze-thaws more than few times to prevent reduced sensitivity.

4. Additionally Required Materials

To use this kit, you need the following items:

- Real-Time PCR machine and accessory computer
- Table top microtube centrifuge
- Vortex Mixer
- Dry Block Heater
- Adjustable pipettors and nuclease free filtered tips
- DNA extraction kit
- Nuclease free 1.7ml microtubes and PCR microtubes
- Disposable powder-free gloves

5. General Precautions

In order to prevent false results, always pay attention to the following points:

- **Treat all samples as potentially infectious.**
- Within the pre-PCR work area assign three separate spaces for: a) Sample storage and extraction, b) Reagent preparation where the PCR mix is aliquoted into tubes and c) Reaction preparation area for addition of extracted DNA to the tubes.
- Always wipe the working surfaces with 70% Ethanol before and after work.
- Thaw kit components on **crushed ice** completely, mix by flickering followed by a quick spin and **store on crushed ice while working.**
- Do not place PCR tubes on crushed ice. Use cooling blocks instead.

6. Specimen, Storage and Transport

Peripheral blood should be collected in sterile condition in proper and sterile tubes. We recommend EDTA or citrate plasma for BK virus detection. Whole blood or plasma should be shipped at +4°C. Upon receipt plasma should be separated from whole blood and can be stored at +4°C for few days or aliquoted and stored at -20°C for up to few weeks.

7. Interfering Substances

Heparin (more than 10 IU/ml) affects the PCR. Blood collected in heparin containing tubes should not be used. Samples of heparinized patients must not be used as well.

Elevated levels of bilirubin (≤ 4.5 mg/dl) and lipids (≤ 1000 mg/dl) and hemolytic samples do not influence the extraction and PCR.

8. Internal Control (IC)

To examine the possible PCR inhibition and to prevent false negative results, an *Internal Control* is included in the BK Mix. Internal control should generate a CT of 28-35 in Yellow/VIC Channel.

9. DNA Isolation

DNA isolation can be performed using different kits from various manufacturers. We recommend using either of:

- High Pure Viral Nucleic Acid Kit (Cat. no. 11858874001, Roche Applied Science, Mannheim, Germany)
- QIAamp DNA Blood Mini Kit (Cat. no. 51104, Qiagen GmbH, Hilden, Germany)
- QIAamp UltraSens ® Virus Kit (Cat. no. 53704, Qiagen GmbH, Hilden, Germany)
- QIAamp MiniElute Virus Spin Kit (Cat. no. 57704, Qiagen GmbH, Hilden, Germany).

10. PCR Protocol

Thaw the reagents on ice completely followed by a brief mixing and a quick spin. Place required number of tubes on cold block. Consider one tube for each sample plus four for standards and one for the negative control.

Pipette 15ul of BK Mix directly to each tube followed by adding 10ul of standard or isolated DNA.

Cap the tubes and visually inspect to make sure all are capped securely. Place tubes in the machine.

Note: Working with StepOne instrument, spin tubes briefly before loading on the block.

Note: If using Rotor-Gene attach the locking ring.

11. Programming Rotor-Gene

Before you start the machine, make sure you have attached the locking ring on the rotor!

Open the CD provided with the kit and double click on BK template 0.2 or BK 0.1 depending on the tubes used. Program starts. Click on Start button (Green button on the top menu). On the pop up window click start again and save program on desired location.

12. Programming StepOne

Open the StepOne software (V 2.*). On the Set Up menu click on Template and select the file on CD provided with the kit. Click on Plate Setup. One negative control, 4 standards and 10 samples are defined. You may change plate set up using right click options (copy, paste, clear). You may also add/remove samples or change sample names on “Define Targets and Samples” menu. When finished, click on “Start Run” and save the experiment on desired location. Instrument will start shortly.

13. Programming Other Machines

If you apply this kit to other Real-Time PCR machines, program it according to the following table:

Step	Temperature and time	Cycles
1	95°C x 10 min	1
2	95°C x 20 sec	45
	59°C x 60 sec	

Fluorescence should be collected at 59°C for FAM and VIC dyes. The BK Mix contains ROX with the final concentration of 300nM in reaction.

14. Data Analysis: Rotor-Gene

Before analyzing results, make sure in the sample menu all the standards have been defined as "standard" and the relative concentrations have been entered. Patient samples should be defined as "unknown" and Negative control or no template control as "Negative Control" or "NTC" respectively.

Analyze data according to manufacturer recommendations. Perform quantitative analysis for **BK (Green channel)** and qualitative analysis for **Internal Control (Yellow channel)**. Briefly, click on analysis menu and then under Quantitation tab double click on cycling A. Green.

In the pop up for Automatic Threshold increase the minimum or lower bound until it surpasses the negative control or the NTC fluorescence, and then click on OK.

Repeat the above for Cycling A. Yellow but, cancel the Automatic Threshold and manually put threshold on 0.1.

Figures 1 and 2 represent typical graphs for Rotor-Gene machine.

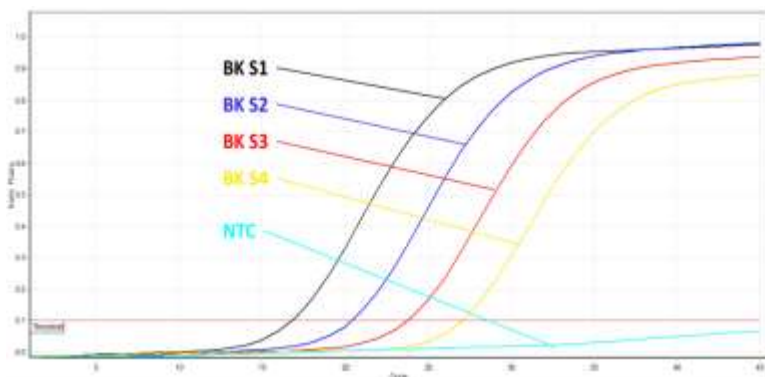


Figure 1. Typical BK Graph in Green Channel for Rotor-Gene

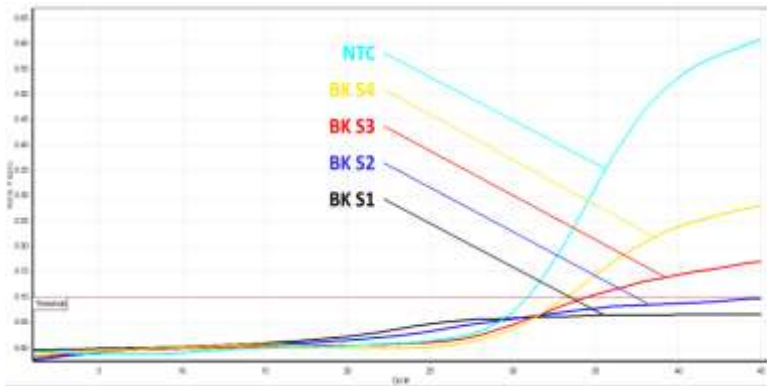


Figure 2. Typical IC Graph in Yellow Channel for Rotor-Gene

Note that a sample is considered Positive only if it has a sigmoid graph and log phase, and only then CT is reliable and can be used.

In the absence of sigmoid graph and log phase, sample is considered Negative and CT if present is not reliable.

Consider following points when analyzing:

- A sample is **Positive** if it is positive in Green channel with a sigmoid graph and a CT of less than 40. The viral load or quantitation results in the Cycling A. Green are valid.
- A sample is **Negative** if it is negative in Green channel while it is positive in Yellow channel with a sigmoid graph and CT of 28-35.
- Results are **inconclusive** and the test should be repeated if a sample is negative in both of Green and Yellow channels.

15. Data Analysis: StepOne

Analyze data according to manufacturer recommendations. Briefly, click on Analyze and set the threshold for **BK/FAM** at 0.1 and at 0.05 for **IC/VIC**.

Figures 3 and 4 represent typical graphs for StepOne machine.

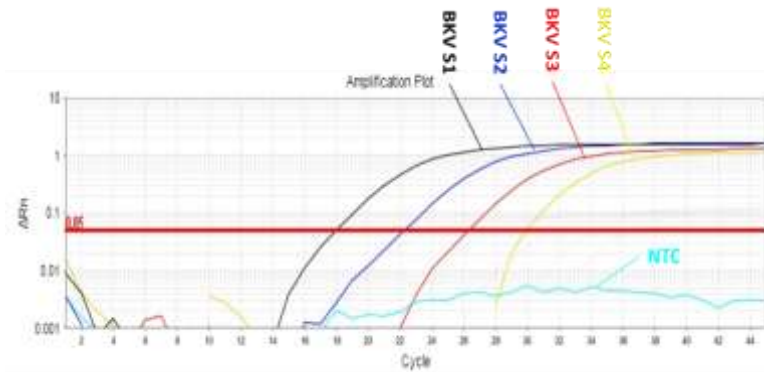


Figure 3. Typical BKV Graph in FAM Channel in StepOne

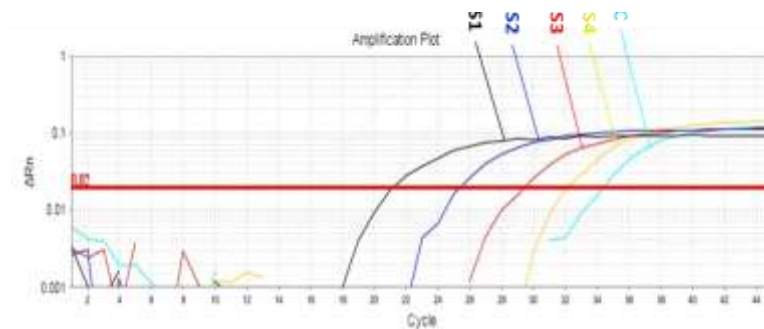


Figure 4. Typical IC Graph in VIC Channel for StepOne

Note that a sample is considered Positive only if it has a sigmoid graph and log phase, and only then CT is reliable and can be used.

In the absence of sigmoid graph and log phase, sample is considered Negative and CT if present is not reliable.

Consider following points when analyzing:

- A sample is **Positive** if it is positive in FAM/BK channel with a sigmoid graph and a CT of less than 40. The viral load or quantitation results are valid.

- A sample is **Negative** if it is negative in FAM/BK channel while it is positive in VIC/IC channel with a sigmoid graph and CT of 28-35.
- Results are **inconclusive** and the test should be repeated if a sample is negative in both of FAM/BK and VIC/IC channels.

16. Quantitation

The kit provides 4 quantitation standards with defined titers to generate a standard curve for quantification of samples viral load. Working with RotorGene machine, the standard curve from a previous run can also be imported for quantification of samples to the recent run. To do so, at least one standard must be used in the current run. Apparently using all four standards in each run will lead to more accurate results.

Quantitation standards are defined as copy/ μ l. To convert the result to copy/ml following equation should be used:

$$\text{Result (copy/ml)} = \frac{\text{Result (copy/}\mu\text{l)} \times \text{elution volume (}\mu\text{l)}}{\text{sample volume (ml)}}$$

“Sample volume” is the sample volume used for DNA isolation and “Elution volume” is the volume of buffer or water used to elute or dissolve isolated DNA.

17. Linear Range

The linear range of the kit was assessed with dilution series of the cloned target and showed to be linear in the range of 10,000,000 copy/ μ l to 10 copy/ μ l.

18. Sensitivity

The analytical detection limit of the kit was assessed with dilution series of the cloned target and showed a limit of detection equal to 2 copy/ μ l.

