




VisionArray HPV PreCise Master Mix

REF ES-0007-50  50 testów

Do amplifikacji specyficznych sekwencji HPV



Wyrób medyczny do diagnostyki *in vitro*
zgodnie z dyrektywą 98/79/WE

1. Przeznaczenie

VisionArray HPV PreCise Master Mix jest przeznaczony do amplifikacji i biotynylacji specyficznych sekwencji regionu L1 genomu ludzkiego wirusa brodawczaka (Human Papilloma Virus, HPV) metodą reakcji łańcuchowej polimerazy (PCR).

VisionArray HPV PreCise Master Mix jest przeznaczony do wzmacniania typów HPV, w tym, ale nie wyłącznie, tych wykrytych przez odpowiednie macierze na szkiełkach VisionArray HPV Chips, oraz genomowe sekwencje ludzkiego genu HLA-DQA1, jako kontroli pozytywnej reakcji PCR.

VisionArray HPV PreCise Master Mix musi być stosowany z zestawem VisionArray Detection Kit i odpowiednimi macierzami VisionArray HPV Chips. Zautomatyzowana analiza musi być przeprowadzona za pomocą VisionArray Software.

Produkt jest przeznaczony do diagnostyki *in vitro* (zgodnie z dyrektywą UE 98/79/EC). Interpretacja wyników musi być dokonana przez wykwalifikowanego patologa w kontekście historii klinicznej pacjenta, w odniesieniu do dalszych danych klinicznych i patologicznych pacjenta.

2. Znaczenie kliniczne

Należy zapoznać się z instrukcją obsługi odpowiedniej macierzy na szkiełku.

3. Zasada testu

Poprzez reakcję łańcuchową polimerazy (PCR) sekwencje DNA można selektywnie amplifikować. Podstawowa zasada PCR opiera się na powtarzającym się okręgu 3 kroków: denaturacja, annealing i elongacja. Powtarzanie tych etapów prowadzi do wykładniczej amplifikacji sekwencji docelowych.

Pierwszym krokiem każdego cyklu jest denaturacja, gdzie ogrzewanie mieszaniny reakcyjnej prowadzi do pojedynczych nici DNA. Podczas annealingu, komplementarne primery/startery łączą się z pojedynczymi niciami DNA. Startery flankują sekwencję docelową i służą, jako punkt wyjściowy do integracji nukleotydów podczas fazy elongacji, tworząc identyczne kopie matrycowego DNA. Primery użyte w zestawie są wyznakowane cząsteczką biotyny. Dlatego każdy nowy produkt PCR jest automatycznie biotynylowany, co później umożliwia wykrycie przeciwciałem.

VisionArray HPV PreCise Master Mix jest udoskonaleniem systemu GP5/GP6 (Snijders et al., 1990) i jest skierowany przeciwko genowi L1, wysoce konserwatywnemu regionowi genomu HPV. W zależności od genotypu HPV, amplifikacja prowadzi do produktów PCR o długości fragmentu 139-148 bp.

Startery przeciwko ludzkiemu genowi HLA-DQA1 są zalecane, jako pozytywna kontrola przez WHO w podręczniku laboratoryjnym ludzkiego wirusa brodawczaka i dlatego są one również zawarte w VisionArray HPV PreCise Master Mix.

Aby uniknąć zanieczyszczenia produktami amplifikacji PCR, nukleotydy uracylu są włączone do zestawu VisionArray HPV PreCise Master Mix. Wykonując etap Uracyl-DNA-Glycosylase przed PCR mogą być usunięte wszystkie sekwencje zawierające zasady uracylu i tym samym możliwe zanieczyszczenia produktów PCR z poprzednich reakcji VisionArray PCR. Uracyl-DNA-Glycosylase jest inaktywowana powyżej 95°C, więc reakcje PCR można przeprowadzić jak zwykle.

4. Dostarczone odczynniki

VisionArray HPV PreCise Master Mix składa się z:

- VisionArray HPV Primer
- PreCise Taq DNA Polymerase
- Uracyl-DNA Glycosylase
- H₂O
- MgCl₂
- PCR-Buffer
- dNTP/dUTP Solution

VisionArray HPV PreCise Master Mix jest dostępny w jednym rozmiarze:

- ES-0007-50: 0.75 ml (50 reakcji po 15 µl każda)

5. Materiały wymagane, ale nie dostarczane

Odczynniki:

- H₂O (czysta do PCR)
- VisionArray Detection Kit (VK-0003)

Wyposażenie:

- Probówki do PCR
- Termocyklery
- Pipety
- VisionArray HPV Chips (VA-0001; VA-0002)
- VisionArray SingleScan Software (E-4301) lub VisionArray MultiScan Software (E-4302)

6. Przechowywanie i obsługa

VisionArray HPV PreCise Master Mix musi być przechowywany w temperaturze -16 ...- 22 °C w pozycji pionowej. Jeśli zostaną spełnione te warunki przechowywania, produkt będzie działał, bez utraty wydajności, przynajmniej do daty ważności wydrukowanej na etykiecie.

Zminimalizuj liczbę cykli zamrażania i rozmrażania do maksymalnie 10 cykli, przechowując w działających podwielokrotnościach. Po otwarciu fiolki użyj produktu w ciągu 6 miesięcy.

Okres czasu przetrzymywania produktów PCR w temperaturze pokojowej powinien być jak najkrótszy.

7. Ostrzeżenia i środki ostrożności

- Przeczytaj instrukcję użytkowania przed użyciem!
- Nie stosować odczynników po przekroczeniu daty ważności!
- Należy unikać jakiegokolwiek zanieczyszczenia odczynników krzyżowego czy bakteryjnego.
- Nigdy nie pipetuj roztworów ustami!
- Karta charakterystyki substancji niebezpiecznych jest dostępna na żądanie dla profesjonalnego użytkownika.
- W celu uniknięcia zanieczyszczeń konieczne jest oddzielenie etapów roboczych z DNA i bez DNA, a także użycie czystych powierzchni do przygotowania głównej mieszanki PCR.

8. Ograniczenia

- Do zastosowań w diagnostyce *in vitro*.
- Tylko do użytku profesjonalnego.
- Interpretacja wyników musi być dokonana przez wykwalifikowanego patologa w kontekście historii klinicznej pacjenta w odniesieniu do dalszych danych klinicznych i patologicznych.
- Ważne jest stosowanie wskazanych ilości składników, aby uniknąć zaburzenia procesu reakcji.
- Wielokrotne rozmrażanie i zamrażanie próbek DNA może prowadzić do zaburzenia reakcji wykrywania.

9. Substancje zakłócające

- Niska wydajność reakcji PCR spowodowana hamowaniem w materiale wyjściowym (np. krwi).
- Wysokie stężenia EDTA w buforach do płukania mogą prowadzić do zahamowania PCR.

10. Przygotowanie próbek

Próbki tkankowe utrwalone w formalinie i zatopione w parafinie (FFPE), wymazy z szyjki macicy/próbki ze szczoteczki, jak również próbki typu ThinPrep można wykorzystać jako materiał wyjściowy do genotypowania HPV.

Po ekstrakcji konieczny jest pomiar stężenia DNA w celu sprawdzenia jakości i ilości DNA. Każda próbka powinna mieć stężenie DNA co najmniej 15 ng / μ l o wysokim stopniu czystości (260/280: ~ 1,8).

Należy unikać zanieczyszczeń DNA podczas procedury ekstrakcji. Podczas używania mikrotomu skrawki tkanek należy po cięciu natychmiast umieścić w próbówce reakcyjnej. Ostrze mikrotomu należy wymieniać między różnymi próbkami tkanek. To samo dotyczy już utrwalonych próbek tkanek zamontowanych na szkiełkach. Skrobak należy zmieniać między różnymi próbkami.

11. Obróbka wstępna produktu

Pierwszym krokiem jest określenie ilości wymaganych reakcji PCR (n), które wynikają z ilości próbek DNA plus kontrola negatywna (mieszanka reakcyjna bez matrycy DNA).

Schemat pipetowania:

Lp.	Odczynniki	1x (finalne stężenie)	nx
1	<u>VisionArray HPV PreCise Master Mix</u>	15 μ l (1x)	
2	Próbka DNA	2,5-5 μ l	
3	H ₂ O	do 25 μ l	
	Objętość całkowita	25 μl	

- Podziel VisionArray HPV PreCise Master Mix do próbek PCR wolnych od DNA/DNazy.
- Pipetuj próbkę DNA do Master Mix (Nr. 2 w schemacie pipetowania). Dla negatywnej kontroli dodaj 10 μ l wody wolnej od DNA/DNazy.
- Jeśli to konieczne dodaj wodę do osiągnięcia całkowitej objętości 25 μ l (Nr. 3 w schemacie pipetowania).
- Przenieś próbki do podgrzanego i wykalibrowanego termocyklera.

12. Procedura testu

Protokół amplifikacji opisany w tej instrukcji został ustalony w 0,2 ml fiolkach do PCR przy użyciu zalecanych enzymów w systemie Biometra TProfessional Thermocycler System. Jeśli to konieczne modyfikacje mogą być przeprowadzone w zależności od producenta, kiedy inne termocyklery są stosowane. Dlatego ten protokół powinien być przetestowany przed użyciem pod kątem zgodności. Zastosowany termocykler musi być skalibrowany zgodnie z wytycznymi producenta.

Profil termiczny:

Czas	Temperatura	Powtórzenia	Krok
10 min	25°C	x1	Inkubacja Uracil-DNA Glycosylase
10 min	95°C	x1	Aktywacja HotStart Taq Polymerase, Deaktywacja Uracil-DNA Glycosylase
20 s	95°C	x10	Denaturacja
30 s	55°C		Annealing
80 s	60°C		Elongacja
20 s	95°C	x35	Denaturacja
30 s	38°C		Annealing
80 s	60°C		Elongacja
1 min	95°C	x1	Denaturacja
∞	8°C	x1	

Wzrost temperatury: Δ 5°C/s

Profil termiczny jest zoptymalizowany dla odczynników zalecanych w tej instrukcji. Zmiany w składzie chemicznym lub konfiguracji muszą zostać zatwierdzone przez użytkownika przed użyciem.

Po zakończeniu PCR próbówka reakcyjna powinna być przechowywana w temperaturze -16 °C ... -22 °C.

13. Interpretacja wyników

VisionArray HPV PreCise Master Mix jest przeznaczony do stosowania z VisionArray HPV Chip i VisionArray HPV Detection Kit. Interpretacja wyników musi być dokonana za pomocą odpowiedniego VisionArray Software.

14. Rekomendowane procedury kontroli jakości

Aby monitorować prawidłowe działanie opracowanych próbek i odczynników testowych, każdemu testowi powinny towarzyszyć zewnętrzne zwalidowane próbki kontroli pozytywnej i negatywnej. Jeśli kontrole wewnętrzne i/lub zewnętrzne nie wykażą odpowiedniego barwienia, wyniki z próbkami pacjenta należy uznać za nieważne.

Kontrolę PCR i amplifikatów można następnie przeprowadzić przez rozdzielanie w żelu agarozowym w elektroforezie. Długość fragmentów typów HPV wynosi około 140 pz i jest obecna tylko w próbce HPV-dodatniej. Kontrola pozytywna pokazuje pasmo przy 227 pz.

Ze względu na niską temperaturę annealingu i warunki PCR, które faworyzują produkty jednoniciowe, wyraźnie oddzielone pasma nie są obecne w każdym teście. Jednak udana hybrydyzacja na matrycy szkiełek jest nadal możliwa. Tylko całkowity brak pasma w żelu wskazuje na nieudaną reakcję PCR. Więcej informacji można znaleźć w sekcji rozwiązywania problemów.

15. Charakterystyka wydajności

Należy zapoznać się z charakterystyką odpowiedniego szkiełka matrycowego *VisionArray* HPV Chip.

16. Utylizacja

Utylizacja odczynników musi odbyć się zgodnie z lokalnymi przepisami.

17. Rozwiązywanie problemów

Wszelkie odstępstwa od instrukcji obsługi mogą prowadzić do pogorszenia reakcji wykrywania sekwencji docelowej.

Problem	Możliwa przyczyna	Działanie
Utrata lub bardzo mała amplifikacja produktu	Odczynniki do PRC przeterminowane lub zdegenerowane; nieprawidłowy program termocyklera.	Sprawdź odczynniki PCR i program termocyklera.
	Zdegradowana matryca DNA; niska wydajność DNA.	DNA przechowywać w temperaturze -16...-22°C; Unikać wielokrotnego rozmrażania i zamrażania; zastosować alternatywny protokół ekstrakcji.
	Inhibitory PCR w mieszaninie reakcyjnej.	Zastosować alternatywny protokół ekstrakcji.
Amplifikaty PCR w negatywnej kontroli	Zanieczyszczenie odczynników podczas przygotowania próbek lub w konfiguracji PCR.	Użyj świeżych odczynników; unikaj zanieczyszczenia próbki.

18. Literatura

- IARC Monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans, Vol. 100, 2012; ISBN 978 92 832 1319 2
- WHO Human Papillomavirus Laboratory Manual, First edition, 2009.
- Snijders P. J. F., et al. (1990) Journal of General Virology 71:173-181.

Nasi eksperci są gotowi odpowiedzieć na Państwa pytania. Prosimy o kontakt help@zytovision.com



ZytoVision GmbH
Fischkai 1
27572 Bremerhaven/ Niemcy
Telefon: +49 471 4832-300
Fax: +49 471 4832-509
www.zytovision.com
Email: info@zytovision.com

Znaki towarowe:

VisionArray® to znaki towarowe
ZytoVision GmbH