



VisionArray MYCO PreCise Master Mix

REF ES-0008-50

50 testów

Do amplifikacji specyficznych sekwencji mykobakterii



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

1. Przeznaczenie

VisionArray MYCO PreCise Master Mix jest przeznaczony do amplifikacji i biotynylacji specyficznych sekwencji ITS oraz w przypadku *M. tuberculosis*, regionu IS6110 genomu mykobakterii metodą reakcji łańcuchowej polimerazy (PCR) z próbek DNA wyekstrahowanych z np. próbek klinicznych, wymazów płucnych lub próbek hodowlanych.

VisionArray MYCO PreCise Master Mix jest przeznaczony do wzmacniania mykobakterii, w tym, ale nie wyłącznie, tych wykrytych przez odpowiednie macierze na szkiełkach VisionArray MYCO Chip 1.0 oraz jeśli są obecne w próbce DNA sekwencje genomowego ludzkiego genu HLA-DQA1, obecne jako kontrola pozytywna reakcji PCR.

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

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 amplifikować selektywnie. 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.

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

4. Dostarczone odczynniki

VisionArray MYCO PreCise Master Mix składa się z:

- VisionArray MYCO Primer Mix 1.0
- VisionArray PreCise Taq DNA Polymerase
- VisionArray Uracil-DNA Glycosylase
- H₂O
- MgCl₂
- PCR-Buffer
- dNTP/dUTP Solution

VisionArray MYCO PreCise Master Mix jest dostępny w jednym rozmiarze:

- ES-0008-50: 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 PCR
- Termocyklery
- Pipety
- VisionArray MYCO Chip 1.0 (VA-0003)
- VisionArray Analysis Package SingleScan (E-4060) lub VisionArray Analysis Package MultiScan (E-4070)

Uwaga: VisionArray Analysis Package do prawidłowego skanowania musi zawierać pliki VisionArray MYCO Chip.

6. Przechowywanie i obsługa

VisionArray MYCO 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 fiołki użyj urządzenie 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 DNA wyekstrahowane z np. próbek klinicznych, wymazów płucnych lub próbek hodowlanych mogą być zastosowane jako materiał wyjściowy do genotypowania mykobakteryjnego.

Po ekstrakcji konieczny jest pomiar stężenia DNA w celu sprawdzenia jakości i ilości DNA. Każda próbka powinna mieć stężenie DNA co najmniej 15 ng/μl 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 (mieszanina reakcyjna bez matrycy DNA).

Schemat pipetowania:

L.p.	Odczynniki	1x (finalne stężenie)	nx
1	VisionArray MYCO PreCise Master Mix	15 μl	
2	Próbka DNA	2,5-5 μl	
3	H ₂ O	do 25 μl	
	Objętość całkowita	25 μl	

- Podziel VisionArray MYCO PreCise Master Mix do próbek PCR wolnych od DNA/DNazy.
- Pipetuj próbkę DNA do mieszaniny głównej (Nr. 2 w schemacie pipetowania). Dla kontroli negatywnej dodaj 10 μl wody wolnej od DNA/DNazy.
- Jeśli to konieczne dodaj wodę do osiągnięcia całkowitej objętości of 25 μl (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 mieszaniny reakcyjnej 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 termocyklery 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	x35	Denaturacja
90 s	60°C		Annealing i Elongacja
60 s	95°C	x1	Denaturacja
∞	10°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 próbka reakcyjna powinna być przechowywana w temperaturze -16 °C ... -22 °C.

13. Interpretacja wyników

VisionArray MYCO PreCise Master Mix jest przeznaczony do stosowania ze szkiełkami VisionArray MYCO Chip i VisionArray Detection Kit. Interpretacja wyników musi być dokonana za pomocą odpowiedniego VisionArray Analysis Package.

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 rozdział w żelu agarozowym w elektroforezie. Długość fragmentów gatunków mykobakterii wynosi odpowiednio 212 – 314 bp dla fragmentów regionów ITS i 122 bp dla regionu kompleksu IS6110 *M. tuberculosis*. Kontrola pozytywna pokazuje pasmo przy 227 bp.

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

15. Charakterystyka wydajności

Zapoznaj się z charakterystyką wydajności odpowiedniego VisionArray MYCO Chip 1.0.

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 PCR 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 próbki lub w konfiguracji PCR.	Użyj świeżych odczynników; unikaj zanieczyszczenia próbki.

18. Literatura

- Griffith D.E., et al (2007) Am J Respir Crit Care Med. 175(4):367-416
- Official statement of the american thoracic society (1997), Am J Respir Crit Care Med. 156(2 Pt 2):S1-25
- Simons S., et al (2011) Emerg Infect Dis. 17(3):343-9
- Gupta R.S., et al (2018) doi: 10.3389/fmicb.2018.00067
- Oren A. and Garrity G. (2018) Int J Syst Evol Microbiol 68:1411–1417

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



42 life sciences GmbH & Co. KG
Fischkai 1
27572 Bremerhaven/Niemcy
Tefon: +49 471 4832-500
Fax: +49 471 4832-308
www.42ls.com
Email: info@42ls.com

Dystrybutor:

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
42 life sciences GmbH & Co. KG