




VisionArray HPV PreCise Master Mix

REF ES-0007-50  50 test

HPV spesifik dizilerin amplifikasyonu için



Vücut dışında kullanılan (*in vitro*) tıbbi tanı cihazı
98/79/EC AB Yönetmeliğine göre

1. Kullanım amacı

VisionArray HPV PreCise Master Mix insan Papilloma Virüsü (HPV) genomlarının L1 bölgesinin spesifik kısımlarını polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) yoluyla amplifiye etmek ve biyotinlemek içindir.

VisionArray HPV PreCise Master Mix, ilgili VisionArray HPV Chips ile tespit edilen HPV tiplerini ve başka HPV tiplerini ve de PCR pozitif kontrolü olarak insan HLA-DQA1 genini amplifiye etmek için tasarlanmıştır.

VisionArray HPV PreCise Master Mix; VisionArray Detection Kit ve ilgili VisionArray HPV Chips ile birlikte kullanılmalıdır. Otomatik analiz VisionArray Analysis Package ile yapılmalıdır.

Bu ürün vücut dışında kullanılan tıbbi tanı cihazı olarak tasarlanmıştır (98/79/EC AB Yönetmeliğine göre). Sonuçların yorumlanması hastanın diğer klinik ve patolojik verileri dikkate alınarak hastanın klinik geçmişi kapsamında yetkin bir patoloj tarafından yapılmalıdır.

2. Klinik bağlantısı

İlgili çipin kullanma kılavuzuna başvurun.

3. Test prensibi

PCR yöntemiyle DNA dizileri seçici olarak amplifiye edilebilir. PCR'ın temel prensibi 3 adımın döngü halinde tekrarlanmasıdır: denatürasyon, kaynama ve uzama. Bu adımların tekrarlanması hedef dizilerin eksponansiyel olarak artışına yol açar.

Her döngünün ilk adımı denatürasyondur. Bu adımda PCR miksinin ısıtılması DNA'nın tek zincirlere ayrılmasına yol açar. Kaynama sırasında komplementer primerler tek DNA zincirine bağlanır. Primerler hedef dizinin yanında kalır ve uzama adımında nükleotidlerin bağlanması için bir başlama noktası oluşturur. Böylece DNA şablonunun kopyaları meydana getirilir. Bu kitle kullanılan primerler biyotin ile işaretlidir. Bu sayede her yeni oluşan PCR ürünü otomatik olarak biyotinlenmiş olur. Biyotinlenme daha sonra antikor ile tespit yapılmasına imkan verir.

VisionArray HPV PreCise Master Mix GP5/GP6 sisteminin (Snijders et al., 1990) iyileştirilmiş halidir ve HPV genomunda yüksek ölçüde korunmuş bir bölge olan L1 bölgesine yöneliktir. Amplifikasyon sonucunda, HPV genotipine bağlı olarak 139-148 bp fragment uzunluğunda PCR ürünleri meydana gelir.

Dünya Sağlık Örgütü'nün İnsan Papilloma Virüsü Laboratuvar Kılavuzunda pozitif kontrol olarak insan HLA-DQA1 genine yönelik primerlerin kullanılması tavsiye edilir. Bu yüzden VisionArray HPV PreCise Master Mix dahilindedir.

PCR amplifikasyon ürünleri ile kontaminasyonu önlemek için VisionArray HPV PreCise Master Mix'e urasil nükleotidleri dahil edilmiştir. PCR işleminden önce Urasil-DNA-Glikozilaz adımı uygulanması urasil bazları içeren tüm dizileri ve böylece önceki VisionArray PCR işlemlerinden kalma PCR ürünleriyle kontaminasyon olasılığı ortadan kaldırılır. Urasil-DNA-Glikozilaz 95°C'nin üzerindeki sıcaklıklarda inaktive olduğundan PCR reaksiyonu olağan şekilde yapılabilir.

4. Sağlanan reaktifler

VisionArray HPV PreCise Master Mix şunları içerir:

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

VisionArray HPV PreCise Master Mix tek şekilde temin edilir:

- ES-0007-50: 0.75 ml (50 reaksiyon; her biri 15 µl)

5. Gerekli diğer malzemeler

Reaktifler:

- H₂O (PCR-grade)
- VisionArray Detection Kit (VK-0003)

Araçlar:

- PCR tüpleri
- PCR cihazı (thermal cycler)
- Pipetler
- VisionArray HPV Chips (VA-0001; VA-0002)
- VisionArray Analysis Package SingleScan (E-4060) veya VisionArray Analysis Package MultiScan (E-4070)

Not: Taramanın başarılı olması için VisionArray Analysis Packages içinde bir VisionArray HPV Chip File bulunması gerekir.

6. Saklama ve kullanma koşulları

VisionArray HPV PreCise Master Mix -16...-22°C arasında dik olarak saklanmalıdır. Saklama koşullarına uyulduğu takdirde ürün, en azından etiketi üzerinde belirtilen son kullanma tarihine kadar performans kaybı olmadan kullanılabilir.

Ürünü çalışmaya uygun küçük parçalara bölerek donma-çözülme döngüsü sayısını en fazla 10 olacak şekilde düşürün. Tüpü açtıktan sonra 6 ay içinde kullanın.

PCR ürününün oda sıcaklığında geçirdiği süre mümkün olduğu kadar kısa olmalıdır.

7. Uyarılar ve önlemler

- Kullanmadan önce kullanma kılavuzunu okuyun!
- Son kullanma tarihi geçen ürünleri kullanmayın!
- Reaktiflerde çapraz kontaminasyon ve mikro-bakteriyel kontaminasyon oluşmasından sakının.
- Solüsyonları asla ağızınız ile pipetlemeyin!
- Profesyonel kullanıcılar için istedikleri takdirde ulaşabilecekleri bir güvenlik bilgi formu bulunmaktadır.
- Kontaminasyon olmasının önüne geçmek için DNA içeren ve içermeyen çalışma adımlarının ayrı odalarda yapılması ve PCR

master miksinin temiz çalışma tezgahları üzerinde hazırlanması gerekir.

8. Sınırlamalar

- Yalnızca vücut dışı (in vitro) tıbbi tanı amaçlı kullanım içindir.
- Yalnızca profesyonel kullanım içindir.
- Sonuçların yorumlanması hastanın diğer klinik ve patolojik verileri dikkate alınarak hastanın klinik geçmişi kapsamında yetkin bir patolog tarafından yapılmalıdır.
- Reaksiyon sürecinin bozulmasını önlemek için bileşenlerin belirtilen miktarlarda kullanılması önemlidir.
- DNA örneklerinin tekrar tekrar çözülmesi ve dondurulması tespit reaksiyonunun bozulmasına yol açabilir.

9. Etkileşimli maddeler

- DNA başlangıç materyalindeki PCR inhibitörü (mesela, kan) nedeniyle düşük PCR etkinliği.
- Elüsyon tamponundaki yüksek EDTA konsantrasyonu PCR inhibisyonuna yol açabilir. Yalnızca önerilen miktarda DNA kullanın.

10. Örneklerin hazırlanması

Formalin-fikse, parafine gömülü (FFPE) doku örnekleri, servikal svaplar / fırça örnekleri ve de ThinPrep örnekleri HPV genotiplendirmesi için başlangıç materyali olarak kullanılabilir.

Önerilen DNA ekstraksiyon kitleri:

- FFPE örnekler: VisionArray FFPE DNA Extraction Kit (VI-0001).
- ThinPrep örnekleri: VisionArray Cytology DNA Extraction Kit (VI-0002)

Ekstraksiyondan sonra DNA'nın kalitesini ve miktarını kontrol etmek için DNA konsantrasyonunun ölçülmesi gerekir. Her örnek yüksek saflıkta (260/280: ~1.8) en az 15 ng/ μ l DNA konsantrasyonuna sahip olmalıdır.

Ekstraksiyon sürecinde DNA kontaminasyonu olmasından sakının. Mikrotom kullanıldığında doku kesitleri alınır alınmaz hemen bir reaksiyon tüpüne konmalıdır. Farklı doku örneklerine geçerken mikrotom bıçağı değiştirilmelidir. Aynı şey lamaların üzerine sabitlenmiş doku örnekleri için de geçerlidir. Farklı örneklerle geçerken doku kazıma aracı değiştirilmelidir.

11. Ürünün kullanıma hazırlanması

İlk adım olarak gereken PCR sayısını (n) belirleyin; bu sayı DNA örneği sayısı artı bir negatif kontroldür (DNA şablonu olmayan reaksiyon miksi).

Pipetleme planı:

No.	Reaktifler	1x (final kons.)	nx
1	VisionArray HPV PreCise Master Mix	15 μ l (1x)	
2	DNA örneği	2.5-5 μ l	
3	H ₂ O	25 μ l'ye tamamla	
	Toplam Hacim	25 μl	

- VisionArray HPV PreCise Master Mix'i DNA/Dnase içermeyen PCR tüplerine paylaşın.
- DNA örneğini Master Mix içine pipetleyin (Yukarıdaki pipetleme planında 2. adım). Negatif kontrol olarak 10 μ l DNA/Dnase içermeyen su ekleyin.
- 25 μ l son reaksiyon hacmine ulaşmak için gerekirse su ekleyin (Yukarıdaki pipetleme planında 3. adım).
- Örnekleri önceden ısıtılmış ve kalibre edilmiş PCR cihazına koyun.

12. Çalışma prosedürü

Bu kullanma kılavuzunda verilen amplifikasyon protokolü bir Biometra TProfessional Thermocycler System cihazında önerilen enzimler kullanılarak 0,2 ml PCR tüplerinde oluşturulmuştur. Başka PCR cihazları kullanıldığında gerekirse üreticisinin koşullarına göre modifikasyonlar yapılabilir. Bu yüzden, bu protokol kullanılmadan önce uyumluluğu kontrol edilmelidir. Kullanılan PCR cihazı üreticisinin talimatlarına göre kalibre edilmelidir.

Termal profil:

Süre	Sıcaklık	Tekrar	Adım
10 dk	25°C	x1	Uracil-DNA Glycosylase İnkübasyonu
10 dk	95°C	x1	HotStart Taq Polymerase aktivasyonu, Uracil-DNA Glycosylase deaktivasyonu
20 s	95°C	x10	Denatürasyon
30 s	55°C		Kaynama
80 s	60°C		Uzama
20 s	95°C	x35	Denatürasyon
30 s	38°C		Kaynama
80 s	60°C		Uzama
1 dk	95°C	x1	Denatürasyon
∞	8°C	x1	

Isınma hızı: Δ 5°C/s

Termal profil, bu kullanma kılavuzunda önerilen reaktifler için optimize edilmiştir. Kimyasal bileşimindeki veya setindeki değişiklikler kullanımdan önce kullanıcı tarafından doğrulanmalıdır. PCR işlemi tamamlandıktan sonra tüp -16°C...-22°C arasında saklanmalıdır.

13. Sonuçların yorumlanması

VisionArray HPV PreCise Master Mix; bir VisionArray HPV Chip ve VisionArray HPV Detection Kit ile birlikte kullanılır. Sonuçların yorumlanması ilgili VisionArray Analysis Package yardımıyla yapılmalıdır.

14. Önerilen kalite kontrol prosedürleri

İşlenen örneklerin ve test reaktiflerinin doğru performans gösterdiklerini izlemek için her deneye doğrulanmış dış pozitif ve negatif kontrol örnekleri dahil edilmelidir. İç ve/veya dış kontroller uygun boyanma göstermezse hasta örnekleri ile alınan sonuçlar geçersiz kabul edilmelidir.

PCR'in ve amplifikasyon ürünlerinin kontrolü daha sonra agaroz jel elektroforezi ile yapılabilir. HPV tiplerinin fragman uzunlukları 140 bp civarındadır ve yalnızca HPV pozitif olan bir örnekte bulunur. Pozitif kontrol 227 bp uzunluğunda bir bant gösterir.

Tek iplikçikli ürünlerin lehine olan düşük kaynama sıcaklığı ve PCR koşulları sebebiyle her testte sınırları net olan bantlar bulunmaz. Yine de başarılı bir çip hibridizasyonu yapılabilir. Yalnızca jelde bir bantın tamamen eksik olması PCR'in başarısız olduğunu gösterir. Daha fazla ayrıntı için sorun giderme kısmına bakın.

15. Performans özellikleri

İlgili VisionArray HPV Chip'in performans özelliklerine bakın.

16. Atık bertarafı

Atıkların bertarafı yerel düzenlemelere uygun olarak yapılmalıdır.

17. Sorun giderme

Çalışma talimatlarına uyulmaması hatalı sonuçların alınmasına veya sonuç alınamamasına sebep olabilir.

Sorun	Olası sebep	Önem
Amplifikasyon ürünü yok veya çok az	PCR reaktiflerinin kullanma tarihi dolmuş veya bozulmuşlar; PCR cihazı programı yanlış.	PCR reaktiflerini ve PCR cihazını kontrol edin.
	DNA şablonu degrade olmuş; düşük DNA verimi.	DNA'yı -16...-20°C arasında saklayın; tekrarlı çözme ve dondurma yapmaktan sakının; alternatif bir ekstraksiyon protokolü kullanın.
	Reaksiyon miksinde PCR inhibitörleri var.	Alternatif bir ekstraksiyon protokolü kullanın.
Negatif kontrolde PCR amplifikasyon ürünleri var	Örneklerin hazırlanması ve PCR kurulumu sırasında reaktifler kontamine olmuş.	Taze reaktifler kullanın; örneklerin kontamine olmasından sakının.

18. Literatür

- 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.

Uzmanlarımız sorularınızı yanıtlamaya hazırdır.
Lütfen helptech@zytovision.com adresine yazınız.



42 life sciences GmbH & Co. KG
Fischkai 1
27572 Bremerhaven/Germany
Telefon: +49 471 4832-500
Faks: +49 471 4832-308
www.42ls.com
E-posta: info@42ls.com

Dağıtıcı:

ZytoVision GmbH
Fischkai 1
27572 Bremerhaven/ Germany
Telefon: +49 471 4832-300
Faks: +49 471 4832-509
www.zytovision.com
E-posta: info@zytovision.com

Ticari markalar:

VisionArray®, 42 life sciences GmbH & Co. KG'nin ticari markasıdır.