



AmpliSNiP DQ2/DQ8 (qPCR)

Zestaw do wykrywania sekwencji haplotypów DQ2/DQ8
techniką **qPCR**

<i>Nr kat.</i>	<i>Wielkość zestawu</i>
SNP001-50	50 reakcji

Zestaw diagnostyczny jest przeznaczony do profesjonalnego stosowania w laboratoriach badawczych oraz diagnostycznych, w tym medycznych.

Przed użyciem należy zapoznać się z treścią niniejszej ulotki dołączonej do zestawu diagnostycznego.

TRANSPORT

Transport zestawu **AmpliSNiP DQ2/DQ8 (qPCR)** odbywa się w suchym lodzie. Po otrzymaniu przesyłki należy ją natychmiast rozpakować. Jeżeli stwierdzono uszkodzenie taśmy zabezpieczającej pudełko transportowe, uszkodzenie plomby opakowania handlowego lub brak suchego lodu w styropianowym pudełku transportowym należy o tym fakcie niezwłocznie powiadomić producenta zestawu.

SKŁADNIKI ZESTAWU

Nazwa	Opis	SNP001-50 50 reakcji	Kolor wieczka probówki
RM DQA1*03	Mieszanina reakcyjna	1 × 550 µL	zielony
RM DQA1*05	Mieszanina reakcyjna	1 × 550 µL	zielony
RM DQB1*02	Mieszanina reakcyjna	1 × 550 µL	zielony
RM DQB1*0302	Mieszanina reakcyjna	1 × 550 µL	zielony
PC	Kontrola pozytywna	1 × 300 µL	czerwony
WATER	Woda	1 × 1500 µL	biały

WARUNKI PRZECHOWYWANIA I UŻYTKOWANIA

- Składniki zestawu należy przechowywać w -20°C.
- UNIKAĆ EKSPOZYCJI SKŁADNIKA RM NA ŚWIATŁO.**
- Unikać wielokrotnego zamrażania i rozmrażania składników zestawu, w szczególności składnika **RM**. 10 cykli zamrożenia i rozmrożenia składnika **RM** nie wpływa znacząco na jakość zestawu.
- Termin ważności zestawu podany jest na opakowaniu.
- Nie używać składników zestawu po upływie terminu ważności.

OPIS ZESTAWU

Zastosowanie

Zestaw **AmpliSNiP DQ2/DQ8 (qPCR)** jest przeznaczony do wykrywania u człowieka haplotypów DQ2/DQ8 związanych z ryzykiem zachorowania na celiakię (chorobę trzewną). Zestaw diagnostyczny przeznaczony jest do diagnostyki *in vitro*. Zestaw ma charakter jakościowy: służy do oznaczenia wariantów allelicznych badanego genu człowieka.

Zasada działania

Zestaw **AmpliSNiP DQ2/DQ8 (qPCR)** zawiera cztery układy reakcji qPCR pozwalające wykryć haplotypy DQ2 oraz DQ8. Haplotypy te są zdefiniowane przez określone kombinacje alleli dwóch genów kodujących białka zgodności tkankowej: HLA DQA1 oraz HLA DQB1. Haplotyp DQ2 jest zdefiniowany poprzez kombinację alleli HLA – DQA1*05 – DQB1*02. Natomiast haplotyp DQ8 jest zdefiniowany poprzez kombinację alleli HLA – DQA1*03 – DQB1*0302. Detekcja powstającego produktu PCR następuje dzięki specyficznej sondzie typu TaqMan[®], która przyłączając się do powstającego amplikonu (powielanego fragmentu ludzkiego DNA) ulega hydrolizie. Podczas hydrolizy z sondy jest uwalniany barwnik fluorescencyjny FAM, który jest następnie wykrywany przez układ optyczny urządzenia do przeprowadzenia reakcji Real Time PCR. W skład zestawu wchodzi cztery składniki **RM** pozwalające wykryć dwa allele genu DQA1: DQA1*03 i DQA1*05 (odpowiednio **RM DQA1*03** i **RM DQA1*05**) oraz dwa allele genu DQB1: DQB1*02 i DQB1*0302 (odpowiednio **RM DQB1*02** i **RM DQB1*0302**).

W celu zwiększenia wiarygodności wyników składniki **RM** w zestawie **AmpliSNiP DQ2/DQ8 (qPCR)** zawierają system kontroli wewnętrznej w postaci układu sondy i starterów służących do namnożenia i detekcji sekwencji specyficznej dla ludzkiego DNA. Detekcja ludzkiego DNA odbywa się dzięki uwalnianiu przez sondę barwnika fluorescencyjnego HEX. Zastosowanie kontroli wewnętrznej pozwala

na monitorowanie prawidłowego przebiegu reakcji Real Time PCR oraz umożliwia kontrolę dodania ludzkiego genomowego DNA do reakcji.

Zestaw **AmpliSNiP DQ2/DQ8 (qPCR)** zawiera składnik **PC** (kontrola pozytywna), który zawiera mieszaninę fragmentów DNA kodujących wykrywane allele genów DQA1 i DQA2. Reakcja Real Time PCR ze składnikiem **PC** została skonstruowana tak, aby stanowić równocześnie kontrolę negatywną dla zanieczyszczenia ludzkim genomowym DNA. Prawidłowy przebieg reakcji ze składnikiem **PC** powinien dać wynik dodatni na kanale FAM (wykrycie określonego allelu) oraz wynik ujemny na kanale HEX oznaczający brak kontaminacji ludzkim genomowym DNA.

POTRZEBNY SPRZĘT I DODATKOWE MATERIAŁY

Zestaw umożliwia wykonanie kompletnej procedury diagnostycznej, polegającej na wykryciu haplotypów DQ2/DQ8 w pobranych próbkach w połączeniu **wyłącznie** z zestawem do ekstrakcji DNA z pobranej próbki oraz urządzeniem do przeprowadzenia reakcji Real Time PCR.

UWAGA 1. Zestaw **AmpliSNiP DQ2/DQ8 (qPCR)** jest kompatybilny z urządzeniami do przeprowadzenia reakcji Real Time PCR posiadającymi możliwość detekcji barwników fluorescencyjnych HEX i FAM; Pełną listę kompatybilnych urządzeń do przeprowadzenia reakcji Real Time PCR można znaleźć na stronach internetowych producenta zestawu.

UWAGA 2. Zestaw **AmpliSNiP DQ2/DQ8 (qPCR)** nie zawiera barwnika normalizacyjnego ROX. W przypadku urządzeń wymagających normalizacji, należy do składnika RM dodać barwnik ROX do odpowiedniego stężenia. Barwnik ROX nie jest dołączony do zestawu.

SPECYFIKACJA TECHNICZNA

Kontrola jakości	Zgodna z ISO 13485: Wyroby medyczne – System zarządzania jakością
Optymalna ilość DNA dodawana do reakcji	Do 100 ng

EKSTRAKCJA DNA

Do ekstrakcji DNA zaleca się stosowanie zestawów opartych o złoża krzemionkowe (tzw. zestawów kolumienkowych), gdyż zapewniają one uzyskanie preparatów DNA o odpowiedniej jakości. Preparaty DNA należy przechowywać w 2-8°C (krótki okres przechowywania), w -20°C lub niższej temperaturze (długi okres przechowywania). Ilość wymaganego materiału zależy od użytej metody ekstrakcji DNA.

UWAGA 3. Próbkę do badań należy pobierać do sterylnych probówek. Przed procesem ekstrakcji DNA, próbki muszą być przechowywane przez okres czasu i w warunkach gwarantujących stabilność materiału genetycznego człowieka.

UWAGA 4. W przypadku stosowania innych metod ekstrakcji niż zestawy kolumienkowe, preparat DNA może zawierać związki, które istotnie zmniejszają wydajność reakcji PCR. Prowadzi to do obniżenia czułości testu, a w skrajnych przypadkach do braku amplifikacji DNA.

REAKCJA REAL TIME PCR

1. Określić liczbę preparatów DNA poddawanych analizie (n).
2. Rozmrozić składniki zestawu. Po rozmrożeniu, dokładnie wymieszać zawartość probówek i krótko je zwirować. **Składniki po rozmrożeniu przechowywać w 2-8°C lub na lodzie.**

UNIKAĆ EKSPOZYCJI SKŁADNIKA RM NA ŚWIATŁO.

3. Określić ilość preparatu DNA dodawanego do reakcji (x μ L).

UWAGA 5. Optymalna ilość DNA dodawanego do reakcji nie powinna przekraczać 100 ng. Duża ilość genomowego DNA dodanego do reakcji PCR może prowadzić do pojawienia się reakcji niespecyficznych.

4. Przygotować cztery mieszaniny reakcyjne poprzez zmieszanie ze sobą składników **RM** i wody w proporcjach podanych poniżej:

Lp.	Składnik				Water
	RM DQA1*03	RM DQA1*05	RM DQB1*02	RM DQB1*0302	
1	$(n + 1) \times 11 \mu\text{L}$				$(n + 1) \times (9 - x) \mu\text{L}$
2		$(n + 1) \times 11 \mu\text{L}$			$(n + 1) \times (9 - x) \mu\text{L}$
3			$(n + 1) \times 11 \mu\text{L}$		$(n + 1) \times (9 - x) \mu\text{L}$
4				$(n + 1) \times 11 \mu\text{L}$	$(n + 1) \times (9 - x) \mu\text{L}$

5. Każdą z czterech przygotowanych mieszanin reakcyjnych nanieść do $n + 1$ probówek reakcyjnych w ilości $(20 - x) \mu\text{L}$.
6. Do n probówek reakcyjnych dodać po $x \mu\text{L}$ przygotowanych preparatów DNA. Każdy preparat DNA należy dodawać do każdej z czterech probówek zawierających różne mieszaniny reakcyjne (**RM DQA1*03**, **RM DQA1*05**, **RM DQB1*02** oraz **RM DQB1*0302**).
7. Do ostatnich czterech probówek (każda zawierająca inną mieszaninę reakcyjną) dodać po $x \mu\text{L}$ składnika **PC**.
8. Zamknąć probówki reakcyjne, a następnie krótko je zwirować.
9. Probówki reakcyjne umieścić w urządzeniu do przeprowadzenia reakcji Real Time PCR i wykonać reakcję zgodnie z temperaturowym profilem reakcji.

Etap	Temperatura	Czas	Odczyt fluorescencji	Ilość cykli
Denaturacja wstępna	95°C	5 min		1
Denaturacja	95°C	10 s	FAM i HEX	} 45
Amplifikacja	58°C	25 s		

UWAGA 6. Zaleca się, aby czynności związane z nastawieniem reakcji Real Time PCR wykonywać w komorze laminarnej, celem ograniczenia ryzyka zanieczyszczenia probówek reakcyjnych.

INTERPRETACJA WYNIKÓW

Etap I: Analiza reakcji ze składnikiem PC (kontrolą pozytywną)

Przeanalizować każdą z czterech reakcji ze składnikiem **PC** (kontrolą pozytywną) pod względem prawidłowości przebiegu reakcji Real Time PCR.

Lp.	FAM	HEX	Wynik
1	+	-	Prawidłowy
2	+	+	Nieprawidłowy – kontaminacja ludzkim DNA
3	-	-	Nieprawidłowy – brak reakcji Real Time PCR

+ oznacza amplifikację produktu PCR rejestrowaną jako wzrost fluorescencji

- oznacza brak amplifikacji produktu PCR i brak wzrostu fluorescencji

W przypadku stwierdzenia wyników prawidłowych dla wszystkich czterech reakcji kontrolnych przejść do etapu II analizy.

Etap II: Kontrola dodania preparatu DNA do reakcji (analiza amplifikacji kontroli wewnętrznej)

Na kanale HEX przeanalizować reakcje pod względem dodania ludzkiego genomowego DNA do reakcji Real Time PCR.

Lp.	HEX	Wynik
1	+	Prawidłowy – dodano DNA do reakcji
2	-	Nieprawidłowy – nie dodano DNA do reakcji lub preparat zawiera inhibitory reakcji Real Time PCR

+ oznacza amplifikację produktu PCR rejestrowaną jako wzrost fluorescencji

- oznacza brak amplifikacji produktu PCR i brak wzrostu fluorescencji

W przypadku stwierdzenia wyników prawidłowych dla danego preparatu DNA można przejść do III etapu analizy.

Etap III: Określenie haplotypów DQ2/DQ8

Odczytane wyniki dodatnie i ujemne dla poszczególnych mieszanin reakcyjnych połączyć ze sobą określając obecność/ brak obecności haplotypów DQ2/DQ8.

Mieszanina				Haplotyp
RM DQA1*05	RM DQA1*03	RM DQB1*02	RM DQB1*0302	
+		+		DQ2
-		+		-
+		-		-
-		-		-
	+		+	DQ8
	-		+	-
	+		-	-
	-		-	-

+ oznacza amplifikację produktu PCR rejestrowaną jako wzrost fluorescencji

- oznacza brak amplifikacji produktu PCR i brak wzrostu fluorescencji

UWAGI DODATKOWE

- Zastosowane sondy TaqMan® posiadają tzw. ciemne wygaszacze (dark quenchers), które nie generują dodatkowych sygnałów fluorescencyjnych. W urządzeniach do przeprowadzenia reakcji Real Time PCR, które tego wymagają (np. RotorGene 6000), jako typ wygaszacza należy wybrać opcję „none”.
- Urządzenie do przeprowadzania reakcji Real Time PCR powinno posiadać kalibrację (tzw. Kompensację kolorów) dla barwników fluorescencyjnych wykorzystywanych w zestawie.
- Zestaw **AmpliSNIp DQ2/DQ8 (qPCR)** został zoptymalizowany do przeprowadzenia reakcji w objętości 20 µL. Zmiana objętości reakcji może istotnie wpłynąć na niektóre parametry testu, w tym na osiągnięty limit detekcji.

OSTRZEŻENIA I ŚRODKI OSTROŻNOŚCI

- Należy zachować szczególną ostrożność podczas ekstrakcji DNA. Uzyskany materiał biologiczny traktować jako **potencjalnie skażony**.
- Ekstrakcję DNA oraz analizę wykrywanych haplotypów DQ2/DQ8 powinien wykonać odpowiednio przeszkolony personel w laboratorium spełniającym odpowiednie wymogi i dopuszczonym do pracy ze skażonym materiałem biologicznym. Należy zwrócić szczególną uwagę, aby podczas ekstrakcji DNA nie doszło do krzyżowego zanieczyszczenia preparatów DNA ekstrahowanych równolegle lub zanieczyszczenia preparatów DNA materiałem genetycznym osoby wykonującej izolację.
- W celu maksymalnego wyeliminowania fałszywych wyników należy przestrzegać następujących zasad:
 - w miarę możliwości wyznaczyć osobne stanowiska do ekstrakcji DNA, przygotowania reakcji Real Time PCR oraz jej wykonania/analizy;
 - zmieniać odzież ochronną (fartuch laboratoryjny, rękawice jednorazowe) pomiędzy etapami ekstrakcji DNA oraz przygotowania reakcji Real Time PCR;
 - powierzchnie stanowisk roboczych należy przemywać środkami usuwającymi/niszczącymi DNA;
 - należy stosować jedynie sterylne końcówki z filtrem dedykowane do pipet automatycznych;
 - podczas przygotowywania reakcji Real Time PCR, składniki **PC** należy dodać jako **ostatnie**. Przed jego dodaniem, w miarę możliwości, należy zamknąć probówki z dodanymi preparatami DNA.
- Podczas pracy z zestawem nie wolno jeść, pić, ani palić papierosów.
- Należy umyć ręce bezpośrednio po zakończeniu pracy z zestawem.
- W przypadku bezpośredniego kontaktu składników zestawu ze skórą lub oczami, należy przemyć te miejsca obficie wodą.
- Zaleca się, aby zestawy z przekroczonym terminem ważności lub niewykorzystane składniki zestawu były utylizowane jak laboratoryjne odpady jednorazowego użytku.

ROZWIĄZYWANIE PROBLEMÓW

Przebieg reakcji Real Time PCR

Zaistniały problem	Prawdopodobna przyczyna		Rozwiązanie problemu
	FAM	HEX	
Nieprawidłowy odczyt fluorescencji dla kontroli pozytywnej	+	+	Kontaminacja ludzkim genomowym DNA. Powtórzyć reakcję dla kontroli pozytywnej. W przypadku otrzymania ponownie wyniku nieprawidłowego należy założyć kontaminację składnika RM ludzkim genomowym DNA.
	-	-	Nie dodano składnika PC lub składnik RM jest złej jakości. Powtórzyć reakcję dla kontroli pozytywnej. W przypadku otrzymania ponownie wyniku nieprawidłowego należy założyć złą jakość składnika RM (niewłaściwe przechowywanie, niewłaściwe warunki transportu, przekroczenie terminu ważności).
Nieprawidłowy odczyt fluorescencji dla badanej próbki	-	-	Nie dodano preparatu DNA do reakcji. Niska wydajność ekstrakcji DNA i/lub obecne inhibitory reakcji Real Time PCR. Zbyt duże stężenie preparatu DNA Zła jakość odczynnika RM . Zmierzyć stężenie preparatu DNA i w razie konieczności powtórzyć reakcję z mniejszą ilością DNA dodanego do reakcji. Przy dalszym braku amplifikacji na kanale HEX dla badanych preparatów DNA oraz na kanale FAM dla reakcji pozytywnej założyć złą jakość składnika RM . Przy amplifikacji na kanale FAM dla kontroli pozytywnej oraz braku amplifikacji na kanale HEX dla badanych preparatów DNA, założyć zanieczyszczenie preparatu DNA inhibitorami reakcji PCR lub niską wydajność ekstrakcji kwasów nukleinowych.
	+	-	Kontaminacja składnika RM . Należy wykonać reakcję składającą się z 11 µL składnika RM i 9 µL składnika Water . Brak amplifikacji na kanałach FAM i HEX wskazuje na brak kontaminacji. Amplifikacja na jednym lub obydwu kanałach wskazuje na kontaminację kontrolą pozytywną, ludzkim genomowym DNA i/lub produktem PCR powstałym we wcześniej wykonywanych reakcjach.

OBSŁUGA KLIENTA

- Wszelkie problemy i nieprawidłowości, które pojawiły się podczas użytkowania zestawu diagnostycznego można zgłaszać telefonicznie lub drogą mailową.
- Zamówienia na zestawy **AmpliSNIp (qPCR)** można składać drogą mailową.

KONTAKT

Obsługa klienta

+48 739 223 268
contact@amplicon.pl