



AmpliSNiP *MYBPC3* – A31P (qPCR)

Zestaw do analizy polimorfizmu A31P
w obrębie genu *MYBPC3* metodą **genotypowania**

Nr kat.	Wielkość zestawu
SNP002-50	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 MYBPC3 – A31P (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	SNP002-50 50 reakcji	Kolor wieczka probówki
RM	Mieszanka reakcyjna	1 x 550 µL	zielony
PC-C	Kontrola pozytywna	1 x 300 µL	czerwony
PC-G	Kontrola pozytywna	1 x 300 µL	czerwony
NC	Kontrola negatywna	1 x 300 µL	niebieski
WATER	Woda	1 x 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

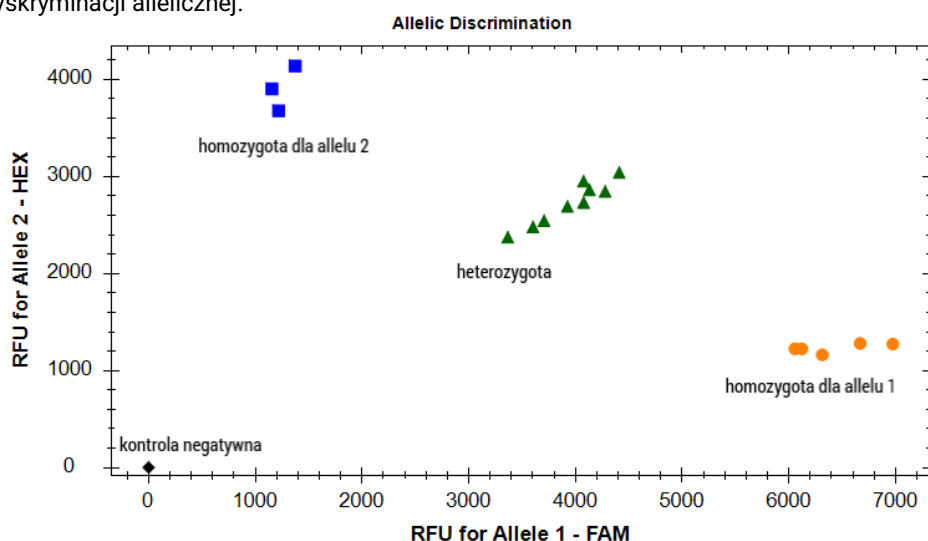
Zestaw **AmpliSNiP MYBPC3 – A31P (qPCR)** jest przeznaczony do analizy polimorfizmu A31Pw obrębie genu *MYBPC3*, związanego z rozwojem kardiomiopatii przerostowej u kotów. Wariant alleliczny, w którym nukleotyd C został zastąpiony nukleotydem G, koduje dysfunkcyjną wersję białka C wiążącego miozynę, które jest odpowiedzialne za rozwój choroby u kotów. Zestaw diagnostyczny przeznaczony jest do diagnostyki *in vitro*. Zestaw ma charakter jakościowy: służy do oznaczenia wariantów allelicznych badanego genu u kota.

Zasada działania

Zestaw **AmpliSNiP MYBPC3 – A31P (qPCR)** opiera się na metodzie genotypowania. Zestaw zawiera dwie sondy zaprojektowane tak, aby każda z nich wiązała się specyficznie do sekwencji zawierającej inny nukleotyd w miejscu polimorficznym. Sonda znakowana barwnikiem FAM jest komplementarna do sekwencji zawierającej nukleotyd C, natomiast sonda znakowana barwnikiem HEX - do sekwencji zawierającej nukleotyd G. Podczas reakcji sondy te konkurują ze sobą o związanie się do matrycy. Sonda, która jest w 100% homologiczna do nici DNA wiąże się z nią preferencyjnie w stosunku do sondy alternatywnej. W miarę postępu reakcji pojawia się silny sygnał dla sondy w pełni homologicznej i słaby sygnał dla sondy alternatywnej. Genotyp próbki określa się przez porównanie stosunku intensywności sygnałów między dwoma kanałami (FAM i HEX)*. Dla próbek homozygotycznych otrzymuje się silny sygnał na jednym kanale i słaby na drugim kanale. W przypadku próbek heterozygotycznych, które zawierają miejsca wiązania dla każdej z sond, otrzymuje się sygnał pośredni na obydwu kanałach. (Rys.1).

*Oznaczenie poszczególnych wariantów (alleli) następuje na podstawie końcowego pomiaru natężenia fluorescencji barwników. Silne sygnały fluorescencyjne dla każdego allelu zapewniają łatwe rozróżnienie między dwoma genotypami homozygotycznymi i jednym heterozygotycznym, dzięki tworzeniu się wyraźnych trzech klastrów na wykresie dyskryminacji allelicznej (Rys.1). Oprogramowanie dołączone do większości urządzeń do przeprowadzenia reakcji Real Time PCR wykonuje takie analizy automatycznie.

Rys. 1 Wykres dyskryminacji allelicznej.



Zestaw **AmpliSNIp MYBPC3 – A31P (qPCR)** zawiera jeden składnik **RM** pozwalający określić genotyp (CC/GG/CG) badanego zwierzęcia. Zestaw zawiera również dwa różne składniki **PC** (kontrolę pozytywną), w których znajdują się cząsteczki DNA kodujące wykrywane genotypy genu *MYBPC3*. W celu zapewnienia wyraźnego rozdziału klastrów, ilość cząsteczek dodawanej kontroli pozytywnej powinna być zbliżona do liczby cząsteczek dodawanego genomowego DNA.

POTRZEBNY SPRZĘT I DODATKOWE MATERIAŁY

Zestaw **AmpliSNIp MYBPC3 – A31P (qPCR)** umożliwia wykonanie kompletnej procedury diagnostycznej, polegającej na analizie polimorfizmu A31P w obrębie genu *MYBPC3* w pobranych próbkach **wyłącznie** w połączeniu z zestawem do ekstrakcji DNA z pobranej próbki oraz urządzeniem do przeprowadzenia reakcji Real Time PCR.

UWAGA 1. Zestaw **AmpliSNIp MYBPC3 – A31P (qPCR)** jest kompatybilny z urządzeniami do przeprowadzenia reakcji do Real Time PCR posiadającymi następujące parametry:

- Możliwość detekcji barwników fluorescencyjnych HEX i FAM;
 - Możliwość ustawienia szybkości zmian temperatury probówek reakcyjnych (tzw. parametr RAMP RATE) na wartość 2,0°C/s;
- Pełną listę kompatybilnych urządzeń można znaleźć na stronach internetowych producenta zestawu.

UWAGA 2. Zestaw **AmpliSNIp MYBPC3 – A31P (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

EKSTRAKCYJA DNA

Do ekstrakcji DNA zaleca się stosowanie zestawów opartych o złoża krzemionkowe (tzw. zestawów kolumnowych), 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 kocięgo materiału genetycznego.

UWAGA 4. W przypadku stosowania innych metod ekstrakcji niż zestawy kolumnowe, 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.

REAKCYJA 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. Dokładnie wymieszać ze sobą (**n + 4**) x 11 μ l mieszaniny reakcyjnej **RM** oraz (**n + 4**) x (9 - **x**) μ l wody.
5. Do **n + 3** probówek reakcyjnych nanieść po (20 - **x**) μ l przygotowanej mieszaniny.
6. Do **n** probówek reakcyjnych dodać po **x** μ L przygotowanych preparatów DNA. Do jednej z trzech probówek dodać **x** μ L kontroli negatywnej **NC**, a do pozostałych dwóch po **x** μ L kontroli pozytywnych (**PC-C**, **PC-G**).
7. Zamknąć probówki reakcyjne, a następnie krótko je zwirować.
8. Probówki reakcyjne umieścić w urządzeniu do przeprowadzenia reakcji Real Time PCR i wykonać reakcję zgodnie z temperaturowym profilem reakcji. Ponadto, w oprogramowaniu urządzenia do przeprowadzenia reakcji Real Time PCR należy ustawić szybkość grzania i chłodzenia bloku grzejnego (tzw. parametr RAMP RATE) na wartość 2,0°C.

Etap	Temperatura	Czas	Odczyt fluorescencji	Ilość cykli
Denaturacja wstępna	95°C	5 min		1
Denaturacja	95°C	10 s		} 45
Amplifikacja	62°C	25 s	FAM i HEX	

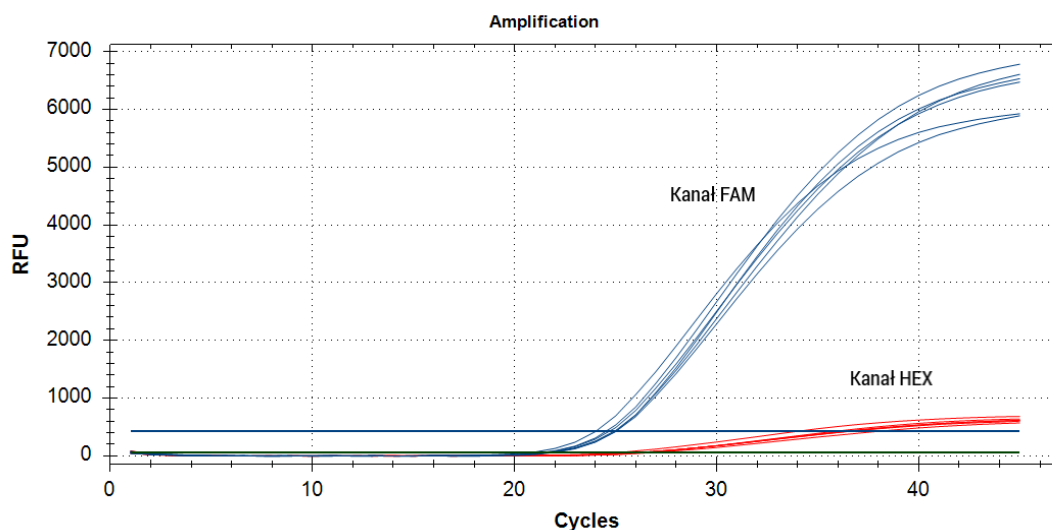
UWAGA 6. Zaleca się, aby czynności związane z nastawieniem reakcji Real Time PCR wykonywać w komorze laminarnej, celem ograniczenia ryzyka zanieczyszczenia probówek reakcyjnych.

SPOSOBY INTERPRETACJI WYNIKÓW

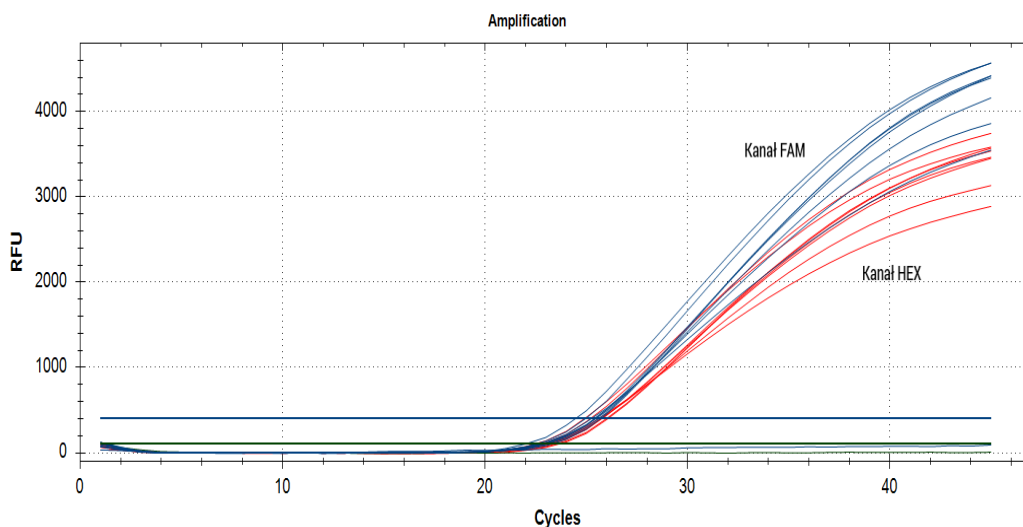
Otrzymane dane można w najlepszy sposób zobrazować za pomocą wykresu punktowego dyskryminacji allelicznej, korzystając z oprogramowania dołączonego do urządzenia do przeprowadzenia reakcji Real - Time PCR. Oprogramowanie, bazując na wartościach RFU, automatycznie przypisuje genotyp nieznanej próbie. Na jednej z osi będą widoczne dane z końcowego pomiaru natężenia fluorescencji dla kanału FAM, a na drugiej dla kanału HEX. Każdy punkt na wykresie reprezentuje dane dla pojedynczej próbki reakcyjnej (Rys.1).

Analizę można także wykonać porównując intensywność fluorescencji. W tym celu wykorzystuje się otrzymane krzywe amplifikacji. W przypadku homozygoty obserwuje się silny wzrost sygnału dla jednego fluoroforu w stosunku do wzrostu sygnału dla drugiego (Rys. 2). W przypadku heterozygot otrzymuje się pośredni wzrost sygnału dla obydwu fluoroforów (Rys. 3).

Rys. 2 Krzywa amplifikacji dla wersji homozygotycznych badanego genu



Rys. 3 Krzywa amplifikacji dla wersji heterozygotycznych badanego genu



INTERPRETACJA WYNIKÓW

Etap I: Analiza reakcji ze składnikami kontrolnymi (PC i NC)

Przeanalizować każdą z dwóch reakcji ze składnikiem **PC** (kontrolą pozytywną) oraz reakcję z kontrolą negatywną (składnikiem **NC**) biorąc pod uwagę intensywności fluorescencji lub odczytując wyniki z wykresu punktowego.

Kontrola	FAM (allel 1)	HEX (allel 2)	Wynik
PC-C	+	-	Prawidłowy
PC-G	-	+	Prawidłowy

- oznacza brak widocznego wzrostu poziomu fluorescencji lub niewielki wzrost w porównaniu z alternatywną kontrolą pozytywną

+ oznacza wyraźny wzrost poziomu fluorescencji w porównaniu z alternatywną kontrolą pozytywną

Kontrola	FAM (allel 1)	HEX (allel 2)	Wynik
NC	-	-	Prawidłowy

- oznacza brak amplifikacji produktu PCR i brak wzrostu fluorescencji

W przypadku stwierdzenia wyników prawidłowych dla obu reakcji kontrolnych należy przejść do etapu II analizy.

Etap II: Określenie genotypów badanych preparatów DNA

Dla każdej próbki porównać sygnały fluorescencji zarejestrowane na kanałach FAM i HEX wykorzystując otrzymane krzywe amplifikacji lub korzystając z wykresu punktowego dyskryminacji allelicznej. Następnie określić genotyp badanych preparatów DNA zgodnie z poniższą tabelą:

Lp.	FAM (allel 1)	HEX (allel 2)	Wynik
1	+	-	Prawidłowy - homozygota dla allelu CC
2	-	+	Prawidłowy - homozygota dla allelu GG
3	+	+	Prawidłowy - heterozygota CG

- oznacza nieznaczny wzrost fluorescencji lub brak widocznego wzrostu fluorescencji

+ oznacza wyraźny wzrost 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 MYBPC3 – A31P (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 polimorfizmu G118A w obrębie genu *SOD1* 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 do 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 ich 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	Zaistniały problem		Prawdopodobna przyczyna	Rozwiązanie problemu
	FAM	HEX		
Nieprawidłowy odczyt fluorescencji dla kontroli pozytywnej (składnik PC-C)	-	+	Dodano składnik PC-G zamiast PC-C .	Powtórzyć reakcję dla kontroli pozytywnej.
	-	-	Nie dodano składnika PC , dodano składnik NC zamiast 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 kontroli pozytywnej (składnik PC-G)	+	-	Dodano składnik PC-C zamiast PC-G .	Powtórzyć reakcję dla kontroli pozytywnej.
	-	-	Nie dodano składnika PC , dodano składnik NC zamiast 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 kontroli negatywnej	-	+	Dodano składnik PC zamiast NC . Kontaminacja składnika RM .	Powtórzyć reakcję dla kontroli negatywnej. W przypadku otrzymania ponownie wyniku nieprawidłowego należy założyć kontaminację składnika RM
	+	-		
	+	+		
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 .	Powtórzyć reakcję dla badanego preparatu DNA. 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 dla reakcji pozytywnej i negatywnej założyć złą jakość składnika RM . Przy amplifikacji na kanale HEX dla kontroli negatywnej oraz braku amplifikacji na kanale HEX dla badanych preparatów DNA, założyć zanieczyszczenie preparatu DNA inhibitorami reakcji PCR lub niską wydajność ekstrakcji kwasów nukleinowych.

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