



## **AmpliTest *Human gDNA* (Real Time PCR)**

Zestaw do wykrywania sekwencji DNA specyficznych  
dla **ludzkiego genomowego DNA** techniką **Real Time PCR**

<i>Nr kat.</i>	<i>Wielkość zestawu</i>
<b>OTH01-100</b>	<b>100 reakcji</b>

Zestaw diagnostyczny jest przeznaczony do profesjonalnego stosowania w laboratoriach badawczych.  
Przed użyciem należy zapoznać się z treścią niniejszej ulotki dołączonej do zestawu diagnostycznego.

## TRANSPORT

Transport zestawu **AmpliTest Human gDNA (Real Time PCR)** 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	OTH01-100 100 reakcji	Kolor wieczka probówki
RM	Mieszanka reakcyjna	2 × 275 µL	zielony
PC	Kontrola pozytywna	1 × 300 µL	czerwony
NC	Kontrola negatywna	1 × 300 µL	niebieski
IC	Kontrola wewnętrzna	2 × 750 µL	przezroczysty
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 wynosi 12 miesięcy.
- Okres trwałości składników zestawu po ich pierwszym otwarciu jest tożsamy z terminem ważności.
- Nie używać składników zestawu po upływie terminu ważności.

## OPIS ZESTAWU

### Zastosowanie

Zestaw **AmpliTest Human gDNA (Real Time PCR)** jest przeznaczony do wykrywania sekwencji DNA specyficznych dla ludzkiego genomowego DNA. Obecność sekwencji specyficznych dla człowieka diagnozuje się w preparatach DNA ekstrahowanych z wymazów, śladów biologicznych, tkanek niewiadomego pochodzenia. Zestaw diagnostyczny przeznaczony jest do diagnostyki *in vitro*. Zestaw ma charakter jakościowy: służy do potwierdzenia lub wykluczenia obecności ludzkiego genomowego DNA w analizowanym preparacie.

### Zasada działania

Zestaw **AmpliTest Human gDNA (Real Time PCR)** zawiera startery umożliwiające namnożenie fragmentu ludzkiego genomu. Detekcja obecności ludzkiego DNA następuje dzięki specyficznej sondzie typu TaqMan®, która przyłączając się do powstającego amplikonu (powielanego fragmentu DNA) ulega hydrolizie. Podczas hydrolizy z sondy uwalniany jest barwnik fluorescencyjny FAM, który następnie wykrywany jest przez układ optyczny urządzenia do przeprowadzenia reakcji Real Time PCR. Odpowiednio dobrane sekwencje sondy i starterów zapewniają wysoką specyficzność reakcji.

W celu zwiększenia wiarygodności wyników, zestaw **AmpliTest Human gDNA (Real Time PCR)** zawiera system kontroli wewnętrznej, który można wykorzystać do monitorowania prawidłowego przebiegu

procesu ekstrakcji kwasów nukleinowych oraz reakcji Real Time PCR. Składnik **RM**, poza układem sondy i starterów służących do wykrywania sekwencji specyficznych dla człowieka, zawiera układ sondy i starterów służący do namnożenia i detekcji kontroli wewnętrznej. Detekcja kontroli wewnętrznej odbywa się dzięki uwalnianiu przez sondę barwnika fluorescencyjnego HEX. Dodatni wynik dla kontroli wewnętrznej stanowi potwierdzenie prawidłowego przebiegu procesu ekstrakcji kwasów nukleinowych i reakcji Real Time PCR.

## POTRZEBNY SPRZĘT I DODATKOWE MATERIAŁY

Zestaw **AmpliTest Human gDNA (Real Time PCR)** nie jest urządzeniem do diagnostyki *in vitro* w rozumieniu zapisów Rozporządzenia Parlamentu Europejskiego i Rady (UE) 2017/746 z dn. 5.04.2017 w sprawie wyrobów medycznych do diagnostyki *in vitro*. Zestaw umożliwia wykonanie kompletnej procedury diagnostycznej, polegającej na wykryciu obecności ludzkiego genomowego DNA w pobranych próbkach **jedynie** w połączeniu z zestawem do ekstrakcji DNA z pobranej próbki oraz urządzeniem do przeprowadzenia reakcji Real Time PCR.

**UWAGA 1.** Zestaw **AmpliTest Human gDNA (Real Time PCR)** jest kompatybilny z urządzeniami do przeprowadzenia reakcji 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 2,2°C/s;
- Czas odczytu poziomu fluorescencji < 10s.

Pełną listę kompatybilnych urządzeń do przeprowadzenia reakcji Real Time PCR można znaleźć na stronach internetowych producenta zestawu.

**UWAGA 2.** Zestaw **AmpliTest Human gDNA (Real Time PCR)** 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

Limit detekcji	3,3 cząsteczki DNA/reakcję
Maksymalna ilość DNA dodawana do reakcji	400 ng

## EKSTRAKCCJA DNA

Materiałem wyjściowym do ekstrakcji DNA mogą być wymazy, ślady biologiczne oraz tkanki niewiadomego pochodzenia. Ilość wymaganego materiału zależy od użytej metody ekstrakcji DNA. Do ekstrakcji DNA zaleca się stosowanie zestawów opartych o złoża krzemionkowe (tzw. zestawów kolumienkowych), gdyż zapewniają one uzyskanie preparatów DNA o odpowiedniej jakości. Uzyskane preparaty DNA pozbawione są inhibitorów reakcji PCR. Preparaty DNA należy przechowywać w 2-8°C (krótki okres przechowywania), w -20°C lub niższej temperaturze (długi okres przechowywania).

Do kontroli prawidłowego przebiegu procesu ekstrakcji DNA można wykorzystać system kontroli wewnętrznej zawarty w zestawie **AmpliTest Human gDNA (Real Time PCR)**. W tym celu na początkowym etapie procesu ekstrakcji DNA do próbki należy dodać składnik **IC**. Objętość dodanego składnika **IC** zależy od zastosowanej objętości buforu elucyjnego zestawu do ekstrakcji DNA. Należy dodać 5 µL składnika **IC** na każde 50 µL użytego buforu elucyjnego.

**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.

**UWAGA 4.** W przypadku stosowania innych metod ekstrakcji niż zestawy kolumnkowe, 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** µL).

**UWAGA 5.** Ilość DNA dodawanego do reakcji nie powinna przekraczać 400 ng. Duże ilości DNA dodawanego do reakcji PCR hamują aktywność polimerazy DNA i obniżają czułość testu.

### WARIANT I: Kontrola wewnętrzna została dodana do próbki podczas procesu ekstrakcji DNA.

**UWAGA 6.** Należy postąpić według wariantu I, jeżeli system kontroli wewnętrznej jest wykorzystywany do kontrolowania poprawności procesu ekstrakcji kwasów nukleinowych oraz prawidłowego przebiegu reakcji Real Time PCR.

- 4.1. Dokładnie wymieszać ze sobą  $(n + 3) \times 11$  µL składnika **RM** oraz  $(n + 3) \times (9 - x)$  µL wody.
- 4.2. Do **n + 2** probówek reakcyjnych nanieść po  $(20 - x)$  µL przygotowanej mieszaniny.
- 4.3. Do **n** probówek reakcyjnych dodać po **x** µL przygotowanych preparatów DNA. Do jednej z pozostałych dwóch probówek reakcyjnych dodać **x** µL składnika **NC** (kontrola negatywna), a do drugiej **x** µL składnika **PC** (kontrola pozytywna). Następnie przejść do punktu 5.

### WARIANT II: Kontrola wewnętrzna nie została dodana do próbki podczas procesu ekstrakcji DNA.

**UWAGA 7.** Należy postąpić według wariantu II, jeżeli system kontroli wewnętrznej jest wykorzystywany wyłącznie do kontrolowania prawidłowego przebiegu reakcji Real Time PCR.

- 4.1. Dokładnie wymieszać ze sobą  $(n + 3) \times 11$  µL składnika **RM** oraz  $(n + 3) \times (8,5 - x)$  µL wody.
- 4.2. Do **n + 2** probówek reakcyjnych nanieść po  $(19,5 - x)$  µL przygotowanej mieszaniny.
- 4.3. Do **n** probówek reakcyjnych nanieść **x** µL przygotowanych preparatów DNA oraz **0,5** µL składnika **IC** (kontrola wewnętrzna).
- 4.4. Do jednej z pozostałych dwóch probówek dodać  $(x + 0,5)$  µL składnika **NC** (kontrola negatywna), a do drugiej  $(x + 0,5)$  µL składnika **PC** (kontrola pozytywna). Następnie przejść do punktu 5.
5. Zamknąć probówki reakcyjne, a następnie krótko je zwirować.
6. 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 2,2°C.

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		
Schłodzenie urządzenia	30-40°C	30 s		1

**UWAGA 8.** Zaleca się, aby czynności związane z nastawieniem reakcji Real Time PCR wykonywać w komorze laminarnej, celem ograniczenia ryzyka zanieczyszczenia probówek reakcyjnych.

## INTERPRETACJA WYNIKÓW

Prawidłowy wynik reakcji Real Time PCR przedstawiono w tabeli poniżej:

Rodzaj próbki	FAM	HEX	Wynik
Kontrola pozytywna	+	-	Prawidłowy
Kontrola negatywna	-	+	Prawidłowy
Oznaczenie 1	+	+	Dodatni
Oznaczenie 2	+	-	Dodatni
Oznaczenie 3	-	+	Ujemny

+ oznacza amplifikację produktu PCR rejestrowaną jako wzrost fluorescencji

- oznacza brak amplifikacji produktu PCR i brak wzrostu fluorescencji

Wynik określany jako **dodatni** potwierdza obecność sekwencji specyficznych dla ludzkiego genomowego DNA w badanej próbce. Wynik **ujemny** oznacza brak obecności lub obecność poniżej granicy wykrywalności, sekwencji specyficznych dla ludzkiego genomowego DNA w badanej próbce.

## 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”.
- Zestaw **AmpliTest Human gDNA (Real Time PCR)** 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 zakażony**.
- Ekstrakcję DNA oraz detekcję obecności sekwencji specyficznych dla ludzkiego genomowego DNA powinien wykonać odpowiednio przeszkolony personel w laboratorium spełniającym odpowiednie wymogi i dopuszczonym do pracy z zakażonym materiałem biologicznym. Należy zwrócić szczególną uwagę, aby podczas ekstrakcji DNA nie doszło do krzyżowego zanieczyszczenia preparatów DNA ekstrahowanych równolegle.
- 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, składnik **PC** należy dodać jako **ostatni**. Przed jego dodaniem, w miarę możliwości, należy zamknąć probówki z dodanymi preparatami DNA i składnikiem **NC**;
- 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	-	+	Dodano do próbówki reakcyjnej składnik <b>NC</b> zamiast <b>PC</b> .	Powtórzyć reakcję dla kontroli pozytywnej.
	-	-	Nie dodano składnika <b>PC</b> lub składnik <b>RM</b> jest złej jakości.	Powtórzyć reakcję dla kontroli pozytywnej. W przypadku otrzymania ponownie wyniku nieprawidłowego należy założyć złą jakość składnika <b>RM</b> (niewłaściwe przechowywanie, niewłaściwe warunki transportu, przekroczenie terminu ważności).
Nieprawidłowy odczyt fluorescencji dla kontroli negatywnej	+	+	Kontaminacja składnika <b>RM</b> .	Powtórzyć reakcję dla kontroli negatywnej. W przypadku otrzymania ponownie wyniku nieprawidłowego należy przyjąć, że doszło do kontaminacji składnika <b>RM</b> .
	+	-	Dodano do próbówki reakcyjnej składnik <b>PC</b> zamiast <b>NC</b> .	Powtórzyć reakcję dla kontroli negatywnej.
	-	-	Nie dodano składnika <b>NC</b> lub składnik <b>RM</b> jest złej jakości.	Powtórzyć reakcję dla kontroli negatywnej. W przypadku otrzymania ponownie wyniku nieprawidłowego należy przyjąć, że składnik <b>RM</b> jest złej jakości.
Nieprawidłowy odczyt fluorescencji dla badanej próbki	-	-	Nie dodano kontroli wewnętrznej <b>IC</b> na jednym z etapów przeprowadzania testu.	Ustalić, czy dodano kontroli wewnętrznej <b>IC</b> na założonym etapie wykonywania testu. Powtórzyć reakcję Real Time PCR z dodaną kontrolą wewnętrzną.
			Niska wydajność ekstrakcji DNA i/lub obecne inhibitory reakcji Real Time PCR Zbyt duże stężenie preparatu DNA Zła jakość składnika <b>RM</b> .	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 kontroli negatywnej założyć złą jakość składnika <b>RM</b> . 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.

### Proces ekstrakcji kwasów nukleinowych

Zaistniały problem	Prawdopodobna przyczyna	Rozwiązanie problemu
Istotnie wyższe wartości $C_q$ uzyskiwane na kanale HEX dla badanych próbek w porównaniu z wartością $C_q$ uzyskaną dla kontroli negatywnej ( $\Delta C_q > 2$ )	Niska wydajność ekstrakcji DNA z badanej próbki.	W celu ustalenia przyczyn niskiej wydajności ekstrakcji DNA należy skontaktować się z producentem zastosowanego zestawu do ekstrakcji kwasów nukleinowych.

## OBSŁUGA KLIENTA

- Wszelkie problemy i nieprawidłowości, które pojawiły się podczas użytkowania zestawu diagnostycznego można zgłaszać telefonicznie lub drogą mailową.
- Zamówienia na zestaw **AmpliTest *Human gDNA* (Real Time PCR)** można składać drogą mailową.

## KONTAKT

### Obsługa klienta, zgłaszanie problemów

+48 739 223 268  
contact@amplicon.pl

### Zamówienia

+48 739 223 268  
contact@amplicon.pl