

# GeneProof®

## PCR Kit

Tento návod je určený pro práci se soupravami:

*Mycobacterium tuberculosis* PCR kit, *Borrelia burgdorferi* PCR kit, *Chlamydia trachomatis* PCR kit,  
*Chlamydia pneumoniae* PCR kit, *Neisseria gonorrhoeae* PCR kit, *Mycoplasma pneumoniae* PCR kit

CE

*in vitro* Diagnostics

Návod k použití na přístroji

SmartCycler®

## Obsah

<b>GENEPROOF PCR KIT</b> .....	<b>3</b>
<b>VERZE GENEPROOF PCR KITU ISIN A ISEX</b> .....	<b>4</b>
<b>NÁVOD K POUŽITÍ PRO SMARTCYCLER®</b> .....	<b>5</b>
Příprava reakce a programování přístroje.....	5
Vyhodnocení výsledků.....	10
Postup řešení nevalidního výsledku.....	12
<b>POZNÁMKY</b> .....	<b>14</b>

## GeneProof PCR kit

PCR kity společnosti GeneProof určené pro detekci a kvantifikaci DNA patogenů jsou založeny na principu amplifikace specifických cílových sekvencí mikroorganismů a měření nárůstu koncentrace amplifikačního produktu v průběhu polymerázové řetězové reakce pomocí fluorescenčně značených sond (sonda určená k detekci patogenu je značena fluoroforem FAM a sonda určená k detekci interního standardu je značena fluoroforem HEX).

### GeneProof PCR kity

- využívají technologii “hot start” minimalizující nesespecifické reakce a zajišťující maximální senzitivitu detekce.
- obsahují uracil-DNA-glykosylázu (UDG) kontrolující možnou kontaminaci PCR reakce amplifikačními produkty.
- všechny PCR kity určené pro detekci DNA patogenů je možno amplifikovat pomocí universálního amplifikačního programu.
- jsou uživatelsky jednoduché a obsahují vždy pouze zkumavku MasterMixu a zkumavku s pozitivní kontrolou (případně interním standardem), nebo sadu kalibračních kontrol.
- jsou určeny pro in vitro diagnostiku (certifikace CE IVD)

## Verze GeneProof PCR kitu ISIN a ISEX

Všechny PCR kity GeneProof obsahují interní standard, pomocí kterého je možné účinně sledovat možné inhibice v průběhu PCR amplifikace a případně také účinnost izolačního procesu. Interní standard je přesně definovaný a kvantifikovaný konstrukt plasmidu a insertu připravený cestami genového inženýrství. Společnost GeneProof vyvíjí a prodává dvě základní varianty PCR kitu, které se liší kompozicí interního standardu:

### PCR kit ISIN (Cat. No. PCR kit/ISIN/)

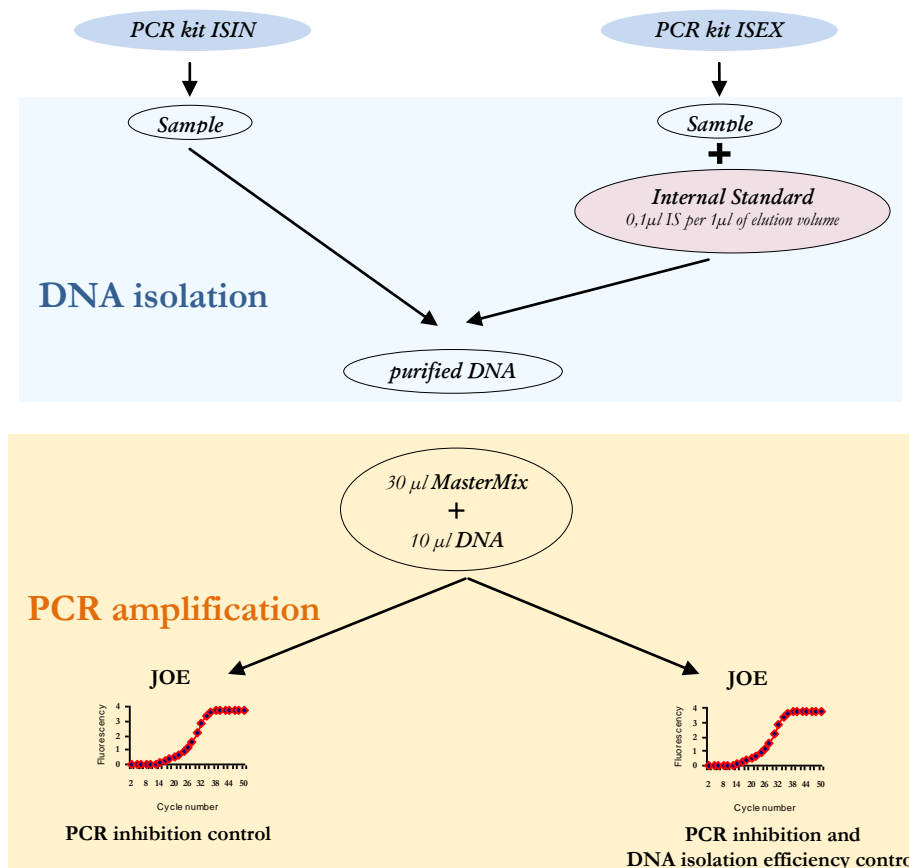
V této variantě PCR kitu je interní standard součástí zkušavky s MasterMixem. Pomocí této varianty kitu lze sledovat inhibici PCR reakce.

### PCR kit ISEX (Cat. No. PCR kit/ISEX/)

V této variantě PCR kitu je interní standard přiložen jako samostatná součást balení. Tuto variantu PCR kitu lze využít k amplifikaci a detekci patogenů s možností kontroly inhibice PCR se současnou možností kontroly účinnosti procesu izolace DNA.

Při použití PCR kitů obsahujících interní standard jako samostatnou součást balení je interní standard přidáván na počátku izolačního procesu tak, aby na **1  $\mu$ l elučního objemu připadlo vždy 0,1  $\mu$ l interního standardu** obsaženého v PCR kitu:

Eluční objem	25 $\mu$ l	50 $\mu$ l	100 $\mu$ l	200 $\mu$ l
Interní standard	2,5 $\mu$ l	5 $\mu$ l	10 $\mu$ l	20 $\mu$ l



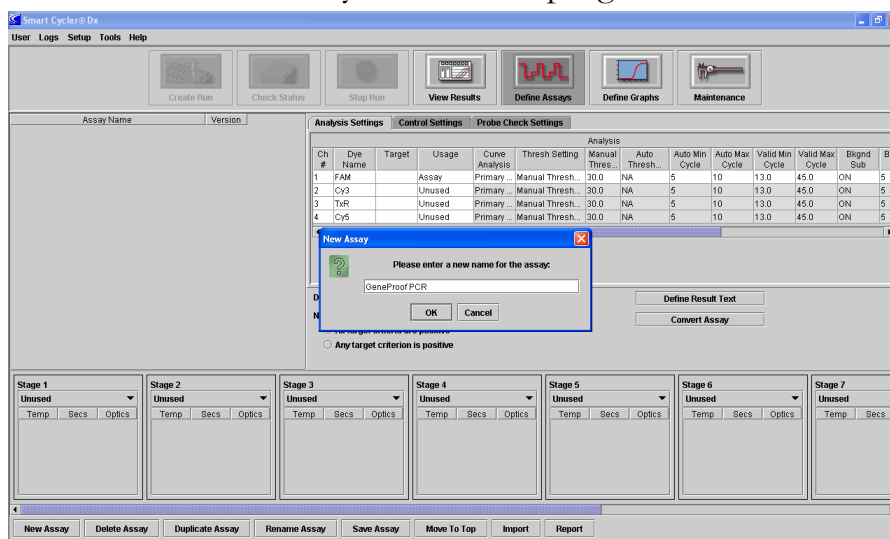
# Návod k použití pro SmartCycler®

## Příprava reakce a programování přístroje

Do zkumavky přidat **15 µl MasterMixu** a **10 µl izolátu DNA** nebo **10 µl Pozitivní kontroly**. Výsledný objem reakční směsi je 25 µl. Zkumavky uzavřít, krátce centrifugovat, vložit do přístroje a programovat dle schématu:

1. Spustit program SmartCycler® Dx, v hlavním menu zvolit záložku **Define Assays** a v dolním menu zvolit **New Assay**. Dojde k otevření okna **New Assay**. Zadat název **GeneProof PCR** a potvrdit tlačítkem **OK**. (Obr. 1).

Obr. 1. Vytvoření PCR programu.

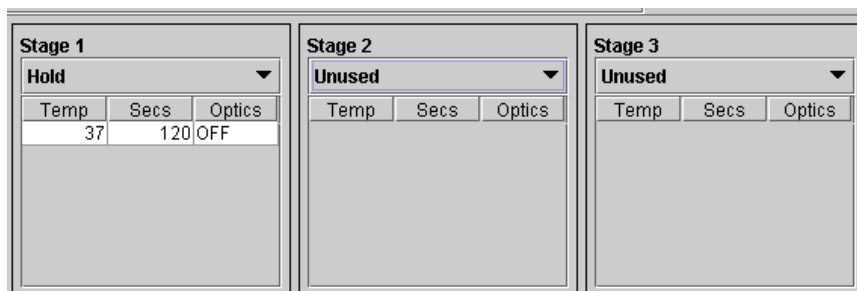


2. Naprogramovat teplotní profil podle následujícího návodu:

### Krok 1:

V okně **Stage 1** zvolit v menu **Hold**, do kolonky **Temp** zadat **37**, do kolonky **Secs** zadat **120** a ve sloupci **Optics** zvolit **OFF** (Obr. 2).

Obr. 2.



Krok 2:

V okně **Stage2** zvolit v menu **Hold**, do kolonky **Temp** zadat **95**, do kolonky **Secs** zadat **600** a ve sloupci **Optics** zvolit **OFF** (Obr. 3.).

Obr. 3.

Stage 1			Stage 2			Stage 3		
Hold			Hold			Unused		
Temp	Secs	Optics	Temp	Secs	Optics	Temp	Secs	Optics
37	120	OFF	95	600	OFF			

Krok 3:

V okně **Stage 3** zvolit v menu **3-Temperature Cycle**. Do kolonky **Repeat** zadat **45**. Zadat do prvního řádku **Temp 95**, **Secs 10** a **Optics OFF**, do druhého řádku zadat **Temp 64**, **Secs 60** a **Optics ON**, do třetího řádku zadat **Temp 72**, **Secs 40** a **Optics OFF** (Obr. 4.).

Obr. 4. Nastavení teplotního profilu.

Stage 1			Stage 2			Stage 3		
Hold			Hold			Repeat 45 times		
Temp	Secs	Optics	Temp	Secs	Optics	3-Temperature Cycle		
37	120	OFF	95	600	OFF	Temp	Secs	Optics
						95	10	OFF
						64	60	ON
						72	40	OFF

3. Nastavit kombinaci fluoroforů v řádku **Dye Set** jako **FTTC25**. U položky **NC fails if** označit **Any target criterion is positive** (Obr. 5.).
4. V záložce **Analysis Settings** u kanálu 1 (FAM) ve sloupci **Usage** zvolit **Assay**. Ve sloupci **Tresh Settings** vybrat **Manual Treshold**, ve sloupci **Manual Treshold** zadat hodnotu **30**. Ve sloupci **Bkgnd Sub** zadat **ON**, tento parametr se automaticky aplikuje na všechny používané kanály. Pro kanál 2 (TET) ve sloupci **Usage** zvolit **Internal Control**. Ve sloupci **Tresh Settings** vybrat **Manual Treshold**, ve sloupci **Manual Treshold** zadat hodnotu **30**. Pro kanály 3 a 4 (TxR a Cy5) zvolit ve sloupci **Usage** parametr **Unused**. Ostatní parametry ponechat beze změn (Obr. 5.).

Obr. 5. Nastavení parametrů detekce

Ch #	Dye Name	Target	Usage	Curve Analysis	Thresh Setting	Manual Thres...	Auto Thresh...	Auto Min Cycle	Auto Max Cycle	Valid Min Cycle	Valid Max Cycle	Bkgnd Sub	Bk
1	FAM		Assay	Primary ...	Manual Thresh...	30.0	NA	5	10	13.0	45.0	ON	5
2	TET		Internal Con...	Primary ...	Manual Thresh...	30.0	NA	5	10	13.0	45.0	ON	5
3	TxR		Unused	Primary ...	Manual Thresh...	30.0	NA	5	10	13.0	45.0	ON	5
4	Cy5		Unused	Primary ...	Manual Thresh...	30.0	NA	5	10	13.0	45.0	ON	5

Dye Set: FTTC25  Require Lot Number

NC fails if:  Use Patient IDs

All target criteria are positive  
 Any target criterion is positive

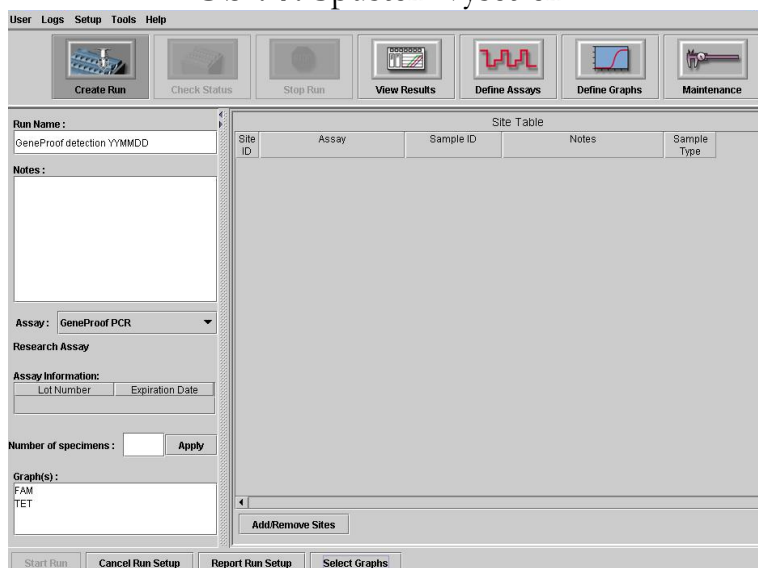
- Zobrazovaný text výsledků vyšetření lze nastavit otevřením tlačítka **Define Result Text**. Pozitivní výsledek detekce má ve sloupci **FAM** navolen parametr **POS** a ve sloupci **IC** parametr **NA**. Negativní výsledek detekce má ve sloupci **FAM** navolen parametr **NEG** a ve sloupci **IC** parametr **PASS**. V případě nevalidního výsledku detekce má vzorek navolen ve sloupci **FAM** parametr **NEG** a ve sloupci **IC** parametr **FAIL** (Obr. 6).

Obr. 6. Nastavení textu výsledků

FAM	IC	Assay Result Text	Assay Color
NEG	FAIL	Invalid	Light Gray
NEG	PASS	Negative	Red
POS	NA	Positive	Green

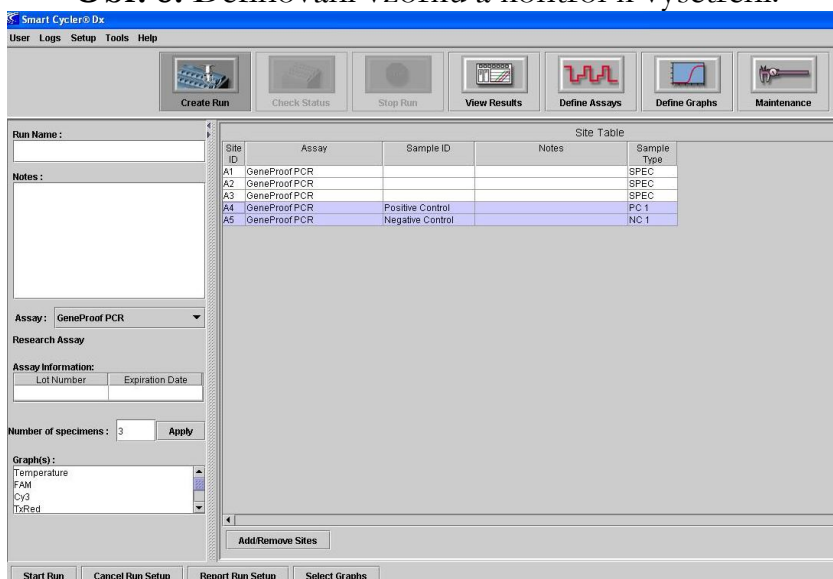
- Vytvořený program uložit pomocí tlačítka **Save Assay** v dolním menu.
- Pro spuštění vyšetření zvolit v horním menu záložku **Create Run**. Do pole **Run Name** zadat název použitého detekčního kitu. V záložce **Assay** vybrat PCR program GeneProof PCR připravený v první části tohoto návodu (Obr. 7.).

Obr. 7. Spuštění vyšetření.



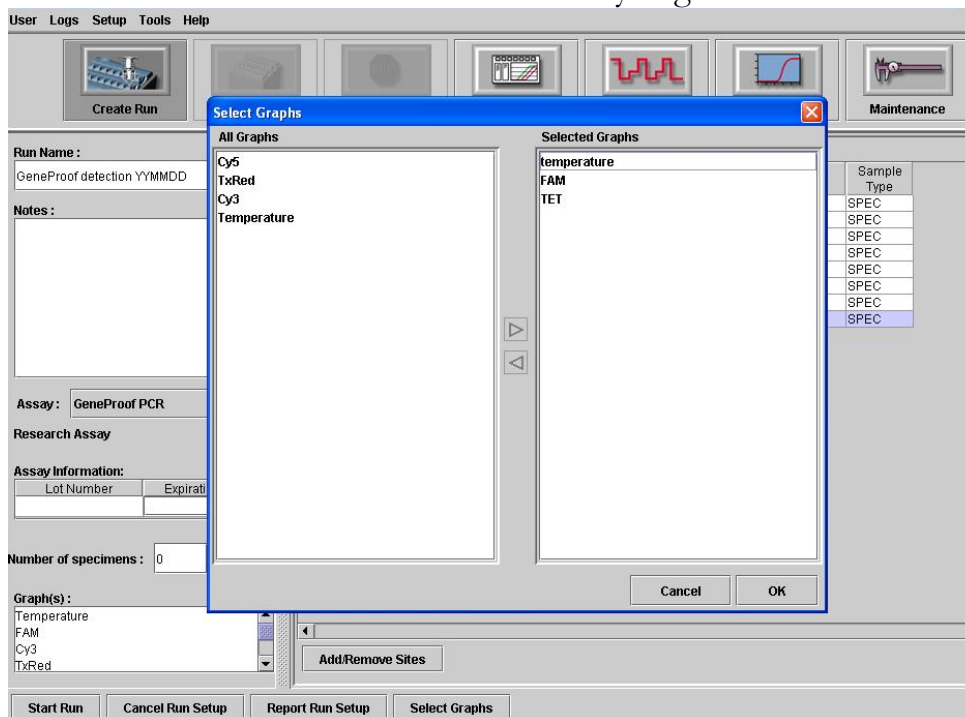
8. Navolit počet vzorků určených k vyšetření v kolonce **Number of specimens** a stisknout **Apply** (volit pouze vzorky bez externích kontrol jako jsou Pozitivní kontrola a Negativní kontrola. Tyto vzorky přiřadí přístroj automaticky za vzorky určené k vyšetření). V hlavním okně se zobrazí celkový počet a pořadí vzorků včetně externích kontrol určených k vyšetření. V případě potřeby provedení korekcí počtu nebo pozic vzorků stisknout tlačítko **Add/Remove Sites** a pomocí šipek přidat nebo odebrat zvolené pozice pro vzorky. V případě potřeby předefinování pozice pozitivní nebo negativní kontroly zvolit u vybraných vzorků v hlavním okně ve sloupci **Sample Type** z možností **PC1** (pro pozitivní kontrolu), **NC1** (pro negativní kontrolu), nebo **SPEC** (pro neznámý vzorek). Pro lepší orientaci je možno vzorky popsat ve sloupci Sample ID (Obr. 8).

Obr. 8. Definování vzorků a kontrol k vyšetření.



9. Volbou tlačítka **Select Graphs** v dolním menu lze nastavit zobrazování hodnot v reálném čase. Pomocí šipek vybrat hodnoty **FAM**, **TET** a **temperature** a potvrdit tlačítkem **OK**. Parametry grafu lze měnit i v průběhu PCR vyšetření po spuštění přístroje. (Obr. 9.).

Obr. 9. Volba zobrazovaných grafů.

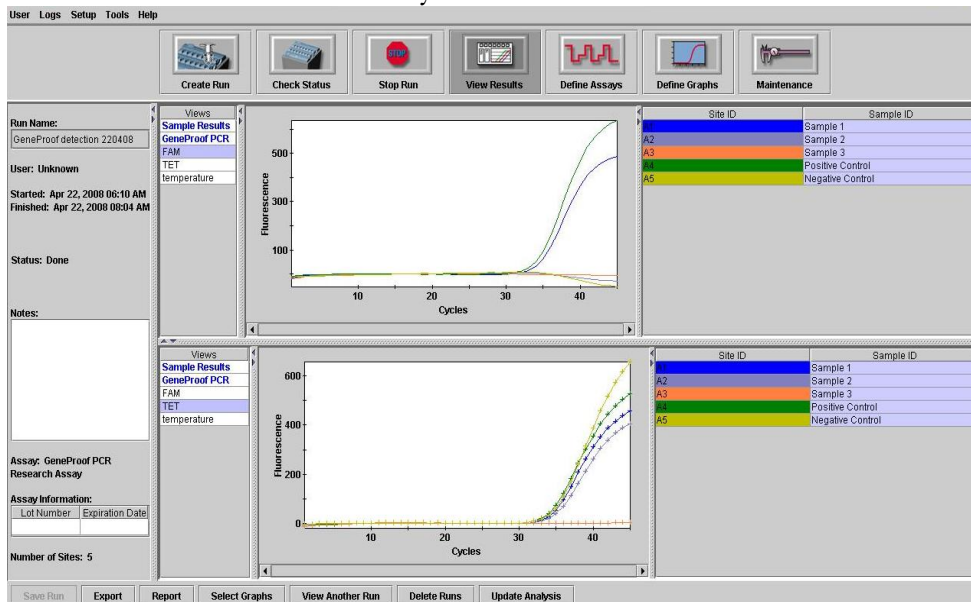


10. Stisknutím tlačítka **Start Run** spustit vyšetření.

## Vyhodnocení výsledků

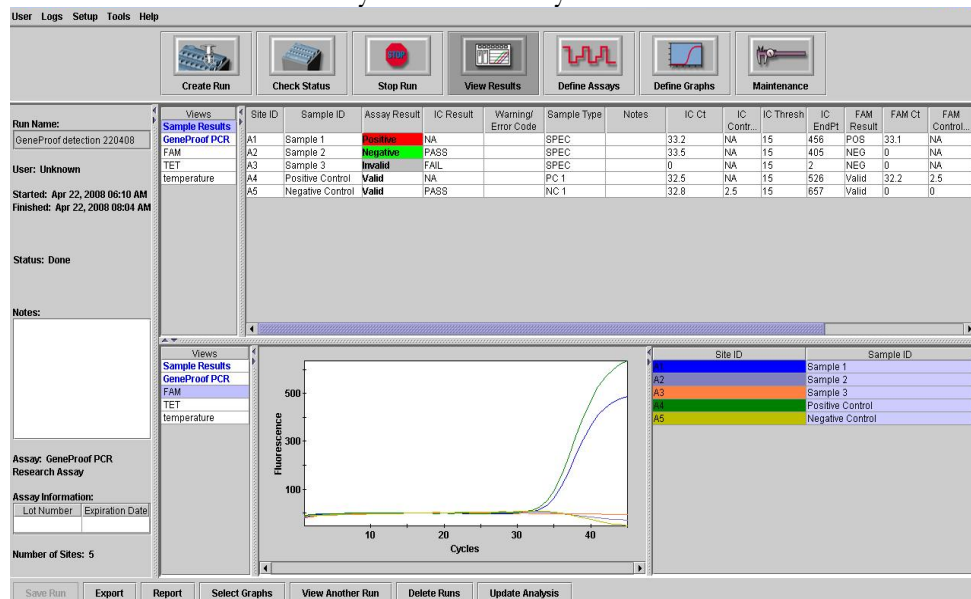
- Po ukončení programu vybrat v hlavním menu **View Results**. V okně **Views** zvolit kanály **FAM** pro kontrolu pozitivního signálu a **TET** pro kontrolu detekce interního standardu (Obr. 10.).

Obr. 10. Zobrazení výsledků v kanálech FAM a TET



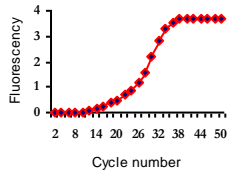
- Pro vyhodnocení výsledků zvolit v okně **Views** položku **Sample Results**. Ve sloupci **Assay Result** se zobrazí automatické vyhodnocení podle nastavených parametrů (Obr. 11.).

Obr. 11. Vyhodnocení výsledků detekce.

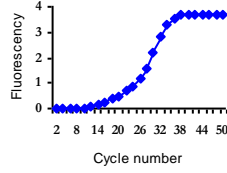


## Vyhodnocení analýzy:

FAM/Sybr

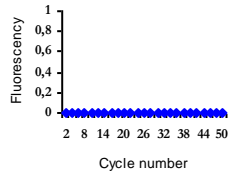
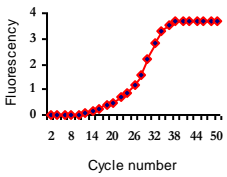


TET

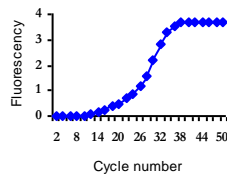
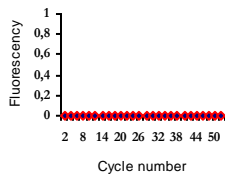


Výsledek

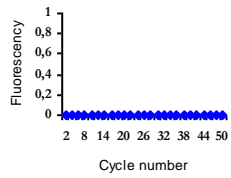
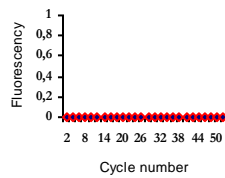
Pozitivní



Pozitivní



Negativní

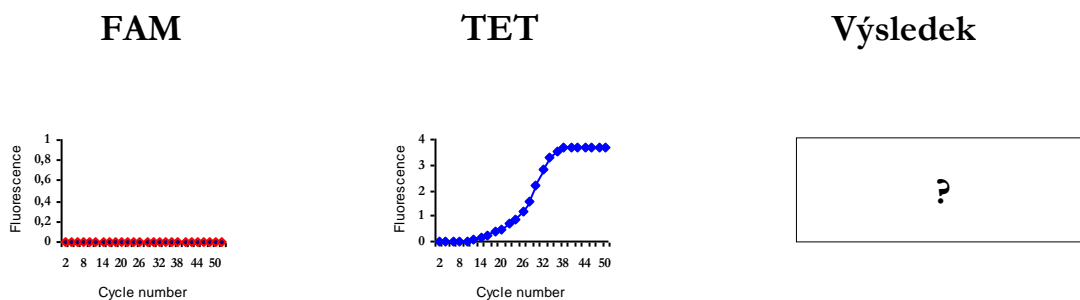


Nevalidní  
výsledek\*

\* viz Postup řešení nevalidního výsledku detekce str. 12

## Postup řešení nevalidního výsledku

### Nevalidní výsledek analýzy Pozitivní kontroly



❖ Problém: *Nesprávné programování PCR amplifikace*

Postup řešení:

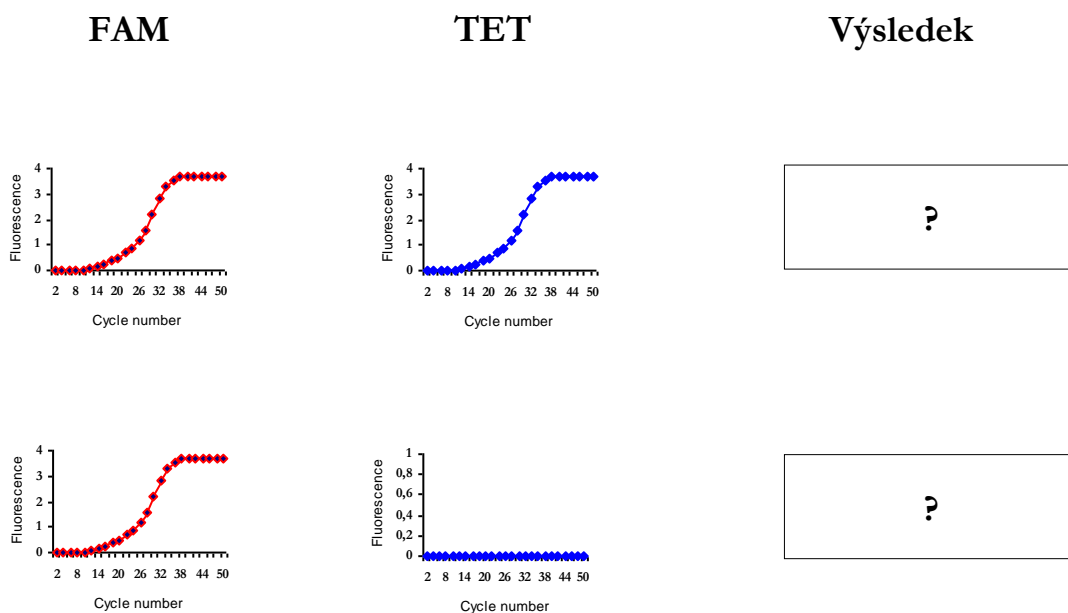
1. Zkontrolovat naprogramování přístroje podle návodu
2. Ověřit nastavení správných teplot v jednotlivých blocích programu

❖ Problém: *Pozitivní kontrola skladována nesprávně* (viz Podmínky skladování a přepravy)

Postup řešení:

1. Zkontrolovat správnost uložení komponent soupravy podle doporučení výrobce
2. Alikvotovat Pozitivní kontrolu a opakovaně nerozmrazovat

### Nevalidní výsledek analýzy Negativní kontroly

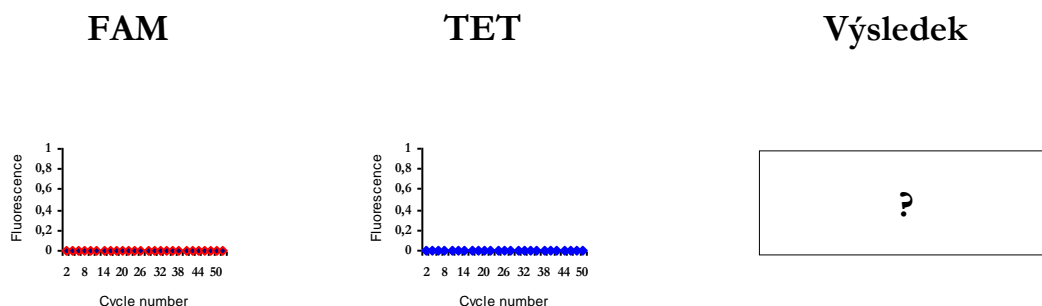


❖ Problém: *Kontaminace PCR reakce*

Postup řešení:

1. Zkontrolovat proces přípravy a pipetování PCR směsi do zkumavek
2. Zkontrolovat používání sterilních plastů a špiček s filtrem
3. Vyčistit PCR box
4. Přidat do reakce uracil-DNA-glykosylázu (UDG)

**Nevalidní výsledek analýzy Neznámého vzorku**



❖ Problém: *Inhibice PCR reakce* (PCR kit ISIN a ISEX)

Postup řešení:

1. Opakovat izolaci DNA
2. Zkontrolovat proces přípravy a pipetování PCR směsi do zkumavek

❖ Problém: *Nevalidní proces izolace DNA* (PCR kit ISEX)

Postup řešení:

1. Opakovat izolaci DNA
2. Zkontrolovat proces přípravy a pipetování interního standardu na počátku izolačního procesu

❖ Problém: *Nesprávné skladování MasterMixu* (viz Podmínky skladování a přepravy)

Postup řešení:

1. Zkontrolovat správnost uložení MasterMixu podle doporučení výrobce
2. Alikvotovat MasterMix a opakovaně nerozmrazovat

V případě jakéhokoliv dotazu kontaktujte prosím oddělení odborné podpory produktů na internetové adrese: **support@geneproof.com**

## Poznámky:

---

Výrobce: GeneProof a.s., Viniční 235, 615 00 Brno, Česká Republika  
Tel./Fax.: +420 543 211 679, e-mail: [sales@geneproof.com](mailto:sales@geneproof.com), [www.geneproof.com](http://www.geneproof.com)

Datum vydání:

Datum poslední revize: