

STANDARD OPERATING PROCEDURE STD FLOW CHIP KIT

Preparasi Sampel dan Multiplex PCR

1. ALAT & BAHAN

Alat		Bahan	
Biosafety cabinet	Centrifuge	STD Flow Chip Reagent	Urine collection tube
Thermalcycler PCR	Vortex mixer	Phosphate Buffer Saline 1X / NaCl 0.9%	Tips filter (1000µL, 100 µL, 10 µL)
Waterbath	Micropipette P1000, P100, P10	Swab rayon/dakron	Akuades
Cold plate (4°C)	Lemari pendingin (4°C, -20°C)	Gloves	Masker
HybriSpot12/24	Komputer + software	Microtube (0,2 & 1,5 mL)	

2. PREPARASI SAMPEL

Kit STD Direct Flow Chip sudah divalidasi untuk digunakan dalam PCR langsung dari berbagai jenis sampel klinis berikut tanpa mengekstraksi DNA. Protokol yang direkomendasikan untuk pemrosesan sampel dibawah ini adalah sebagai berikut :

2.1 Urin

- Homogenisasi sampel urin dengan menggunakan vortex. Ambil 400 µl dari cairan terhomogenisasi dan pindahkan ke microtube.
- Sentrifuse sampel selama 3 menit, 12.000 rpm. Buang supernatan. Direkomendasikan menggunakan pipet Pasteur atau mikropipet 1 ml.
- Cuci pellet/endapan sel menggunakan 400 µl **DNase/RNase-free double distilled water**.
- Sentrifuse sampel selama 3 menit, 12.000 rpm. Buang sebagian besar supernatan.
- Resuspensi pellet dalam 400 µl **DNase/RNase-free double distilled water**.
- Homogenisasi dengan vortex dan gunakan 30 µl suspensi untuk dicampurkan ke dalam tabung premix PCR. Jika analisis tidak dilakukan langsung, dapat disimpan pada suhu -20°C selama maksimal 2 bulan.

2.2 Sample Sperma

- Homogenkan spesimen klinis dengan menggunakan pipet. Ambil volume 400 µl dari yang sudah dihomogenkan dan pindahkan ke tabung microtube dengan volume yang sama.
- Centrifuge sampel selama 3 menit pada 12.000 rpm. Buang supernatan dengan hati-hati. Disarankan untuk menggunakan pipet Pasteur atau mikropipet 1 mL.
- Sampel klinis sperma membutuhkan perlakuan enzimatis untuk lisis seluler yang tepat. Oleh karena itu, dibutuhkan reagen DNA release dan Extraction buffer yang ada pada Paraffin Tissue Processing Kit (ref: MAD-003952M, property of Vitro, SA) dengan protocol sebagai berikut:
 - Tambahkan 100 µL larutan lisis ke setiap sampel sperma [pengenceran 1:50 dari DNA release dan Extraction buffer (2 µL DNA release ke dalam 98 µL Extraction buffer)]
- Tambahkan 100 µL larutan lisis ke dalam endapan/pellet dan dihomogenisasi.

- Inkubasi produk yang dihomogenisasi pada suhu 55°C selama 30 menit. Jika memungkinkan, inkubasi sampel dengan shaking pada 1.000 rpm.
- Inkubasi lisis sel pada suhu 95°C selama 10 menit. Setelah sentrifuse pada 2.000 rpm selama 1 menit untuk mengendapkan debris sel. Pindahkan supernatan kedalam tabung baru. Tambahkan 27 µl **DNase/RNase-free double distilled water** dan supernatan 3 µl sebagai templat DNA untuk PCR per tube. Jika analisis tidak akan dilakukan langsung, dapat disimpan pada suhu 20°C untuk jangka waktu maksimum 2 bulan.

2.3 Sampel Swab Serviks, Uretra, anal dan faring (usapan)

- Campurkan swab dalam 400 µl **DNase/RNase-free double distilled water** pada tabung 1,5-2 ml.
- Sampel di vortex dan gunakan 30 µl suspensi sel sebagai cetakan DNA untuk reaksi PCR.
- Jika pelet sudah mengandung medium transport (PBS atau sejenisnya), disarankan untuk mengikuti protokol di bawah ini:
 - Kocok dalam vortex untuk membubarkan sel ke dalam larutan dan mentransfer sampel yang dihomogenkan (suspensi sel) ke tabung microcentrifuge yang sesuai.
 - Centrifuge selama 3 menit pada 12.000 rpm.
 - Setelah sentrifugasi, buang sebagian besar supernatan dengan pipet atau mikropipet 1 mL.
 - Resuspensi dalam 400 µl **DNase/RNase-free double distilled water** untuk mendapatkan suspensi sel yang homogen.
 - Sampel di vortex dan gunakan 30 µl suspensi sel sebagai cetakan DNA untuk reaksi PCR.
- Catatan: Jika sampel tidak dianalisis secara langsung, sampel harus disimpan pada suhu 4°C untuk periode maksimum 1 minggu atau -20 ° C untuk periode maksimum 2 bulan.
- **Catatan: Untuk sampel klinis anal, pencucian tambahan dengan DNase/RNase-free double distilled water mungkin diperlukan, tergantung pada kekeruhan yang disebabkan oleh bahan organik, untuk meminimalisir penghambatan pada PCR dari agen tertentu yang terkandung dalam jenis sampel ini.**

3. REAKSI MULTIPLEX PCR

Reaksi PCR dilakukan dalam volume akhir 30 µl dalam tube yang mengandung mix PCR lyophilized.

Prosedur sebagai berikut :

- Ambil tube yang mengandung mix PCR lyophilized per sampel untuk di analisis.
- Tambahkan hingga 30 µl sampel di masing-masing tube
- Apabila melibatkan sampel sperma, tambahkan 27 µl **DNase/RNase-free double distilled water** dan **3 µl** sampel klinis yang diproses per tube sesuai dengan pedoman.
- Homogenkan dengan pipet dan centrifuge selama beberapa detik.
- Jika jumlah sampel yang dianalisis kurang atau lebih dari 8, tube yang diperlukan bisa dipisahkan dari strip tanpa perlu menggunakan strip lengkap. Sisa strip tube mix PCR lyophilized yang tidak akan digunakan pada saat itu, harus disimpan maksimum 1 minggu pada 4°C.
- Tempatkan tube PCR pada thermocycler dan amplifikasi DNA sesuai kondisi berikut:

PCR PROGRAM		
25°C	10 min	1 cycle
95°C	3 min	1 cycle
95°C	30 secs	40 cycles
55°C	45 secs	
72°C	30 secs	
72°C	5 min	1 cycle
8°C	∞	

Table 7: PCR program.

Biarkan tube pada suhu 8-10°C setelah reaksi selesai. Jika sampel tidak akan diproses pada saat itu, sampel dapat disimpan pada lemari es post-PCR pada suhu 8-10°C selama 1-2 hari. Untuk penyimpanan yang lebih lama, direkomendasikan untuk menyimpan sampel pada suhu -20°C.

Catatan penting: Jika sampel DNA yang telah dipurifikasi ingin langsung digunakan, maka 30 µl DNA ini dapat ditambahkan secara langsung ke tube PCR lyophilized dan homogenkan.