



**Návod k použití pro Biofortuna SSPGo™ HLA No Template Control Kit  
BF-40-02**

**Verze 1**

**Červenec 2011**

## 1. Použití

Biofortuna SSPGo No Template Control (NTC) Kit obsahuje doplňkové testy na kontaminaci PCR amplikonem, které jsou určeny k použití v kombinaci se soupravami Biofortuna SSPGo, jejichž součástí není NTC.

## 2. Úvod

PCR je citlivá technika, která je náchylná ke kontaminaci DNA amplikonem z předchozí PCR. Kontaminace může vést k falešně pozitivní amplifikaci v následujících PCR, a tudíž k nesprávné genotypizaci. PCR amplikon může kontaminovat reagentie a vzorky, ale i laboratorní vybavení, například pipety. Znamky kontaminace reagentií a vybavení je nutné pravidelně monitorovat. NTC test se používá k detekci potenciální kontaminace PCR nebo DNA přítomné v roztoku na ředění DNA používaném při testování vzorku.

## 3. Popis testu

Každá souprava SSPGo No Template Control se skládá z 12 proužků po osmi PCR reakcích obsahujících lyofilizovaný PCR pufr, polymerázu a primery specifické pro HLA-DRA gen a výsledkem reakce je amplikon o velikosti 187 pb z lidské genomové DNA nebo amplifikovaná DNA. Všechny soupravy Biofortuna používají jako interní kontrolu DRA amplikon, a proto při jakékoli kontaminaci způsobené použitím souprav Biofortuna SSPGo dojde k souběžné amplifikaci DRA genu, který bude detekován primery NTC testu.

## 4. Obsah soupravy

- 12 proužků po 8 PCR reakcích. Každá reakce obsahuje 10 µl předem nadávkovaných lyofilizovaných primerů, polymerázu, dNTP\* a pufr. Rozvržení proužku na 8 reakcí je uvedeno níže.

Reakce	Barvivo	Použití
1	Červené	Kontrola bez templátu: vzorek 1
2	Fialové	Kontrola bez templátu: vzorek 2
3	Fialové	Kontrola bez templátu: vzorek 3
4	Fialové	Kontrola bez templátu: vzorek 4
5	Fialové	Kontrola bez templátu: vzorek 5
6	Fialové	Kontrola bez templátu: vzorek 6
7	Fialové	Kontrola bez templátu: vzorek 7
8	Fialové	Kontrola bez templátu: vzorek 8

- 12 x 8 PCR uzávěrů
- 1x návod k použití
- 1x šaržový certifikát vydaný výrobcem (COA - Certificate of Analysis)
- Bezpečnostní list (MSDS) lze získat na webové stránce společnosti Biofortuna [www.biofortuna.com](http://www.biofortuna.com). Pokud nemáte možnost tento dokument stáhnout z webové stránky, kontaktujte prosím lokálního distributora.

\*CleanAmp™ dNTP podléhají licenci společnosti Trilink Biotechnologies Inc se svolením k použití v produktech Biofortuna SSPGo.

## 5. Reagencie a vybavení, které nejsou součástí dodávky

- Vhodné pipety a sterilní špičky, např. pipeta P10 s 10µl filtračními špičkami.
- Souprava / vybavení pro izolaci DNA.
- UV spektrofotometr.
- Sterilní voda pro molekulárně-biologické aplikace.
- 96jamkový termocykler s vyhřívaným víkem. Destičky a zkumavky PCR použité v soupravách společnosti Biofortuna byly validovány pro použití s většinou termocyklerů na trhu, včetně termocyklerů MJ Research PTC-100, PTC-200, Hybaid MBS a Techne TC-512. Jiné modely mohou vyžadovat další validaci uživatelem.
- Reagencie pro gelovou elektroforézu (agaróza, 0,5x TBE pufr, 1 000pb DNA marker molekulové hmotnosti, roztok ethidiumbromidu 10 mg/ml).
- Vybavení pro gelovou elektroforézu (gelová aparatura, síťový zdroj, gelový dokumentační systém s UV transluminátorem).

## 6. Bezpečnost a varování

- Test může provádět pouze náležitě vyškolený pracovník.
- Se všemi reagensy zacházejte v souladu se zásadami Správné laboratorní praxe.
- Oblasti k provádění postupu před a po PCR musí být stále oddělené. Materiál používaný po PCR nevnášejte zpět do oblasti pro postup před PCR.
- **Varování týkající se biologického rizika:** Se všemi krevními deriváty zacházejte jako s potenciálně infekčními.
- **Varování týkající se biologického rizika:** Ethidiumbromid je potenciální karcinogen. Při jeho použití vždy používejte ochranné rukavice, laboratorní plášť a ochranné brýle.
- **Varování týkající se biologického rizika:** Při používání zdrojů UV záření postupujte opatrně - vždy používejte ochranné rukavice, laboratorní plášť a ochranné brýle. Nikdy se nedívejte přímo do zdroje UV záření.
- Bezpečnostní listy jsou k dispozici na webové stránce [www.biofortuna.com](http://www.biofortuna.com).

## 7. Skladování a stabilita

Soupravy Biofortuna SSPGo skladujte při teplotě 4–30 °C. Jakmile jsou PCR jamky vyjmuty z fólie, reagencie rehydratujte pomocí vzorku do 3 hodin. Datum expirace je uvedeno na obalu. Po uvedeném datu produkt nepoužívejte.

Soupravy, jejichž obal je poškozený, nepoužívejte.

Zajistěte, aby byly PCR jamky po nadávkování DNA důkladně utěsněny, neboť během PCR amplifikace by mohlo dojít k odpařování. Zvláštní pozornost věnujte okrajům a rohům.

## 8. Pokyny k použití

### Poznámka:

Častým zdrojem kontaminace jsou PCR pipety. K pipetování vzorků do PCR reakcí, včetně NTC testu, se doporučuje používat pipetu, u níž máte jistotu, že nebyla kontaminována.

1. Otevřete fóliový obal a PCR reakce náležitě označte; pomocí jednoho proužku lze otestovat 1 až 8 vzorků. Po otevření použijte PCR reakce do 3 hodin.
2. Pro každý vzorek DNA určený ke genotypizaci přidejte do jedné reakce NTC proužku 10  $\mu$ l vody nebo ředícího roztoku.
3. Je-li vyžadována pozitivní kontrola, použijte 10  $\mu$ l lidské genomové DNA o koncentraci 10 ng/ $\mu$ l. Výsledkem bude pozitivní test na 187pb amplikon.
4. Přikryjte reakce dodanými uzávěry a přejděte k obvyklým parametrům SSPGo PCR podle níže uvedených pokynů.

**POZNÁMKA TÝKAJÍCÍ SE RESUSPENZE:** Zajistěte, aby směsi pro PCR reakci byly resuspendovány pomocí vzorků do 3 hodin od vyjmutí panelu z fólie.

**POZNÁMKA TÝKAJÍCÍ SE VÝŠKY PROFILU DESTIČEK / PROUŽKŮ PCR:** Doporučuje se, aby výška profilu destiček a proužků byla shodná, pokud jsou vloženy ve stejném přístroji pro PCR reakci. Rozdíl výšky profilů může mít za následek nedostatečný kontakt s vyhřívaným víkem přístroje pro PCR reakci. Může tak dojít k nedostatečné amplifikaci PCR nebo k jejímu selhání.

### Parametry PCR

Používejte následující parametry PCR reakce. Ujistěte se, že rychlost náběhu je nejméně 1 °C za sekundu, a zapněte vyhřev víka. Kompletní návod k použití je uveden v uživatelské příručce od výrobce termocyklieru. Termocyklieru kalibrujte podle akreditačních pravidel vydaných organizací American Society of Histocompatibility and Immunogenetic (ASHI) nebo European Federation of Immunogenetics (EFI).

Denaturace	při teplotě 94 °C	po dobu 5 minut	
Denaturace	při teplotě 96 °C	po dobu 15 sekund	10 cyklů
Anelace	při teplotě 66 °C	po dobu 50 sekund	
Extenze	při teplotě 72 °C	po dobu 30 sekund	
Denaturace	při teplotě 96 °C	po dobu 15 sekund	20 cyklů
Anelace	při teplotě 64 °C	po dobu 50 sekund	
Extenze	při teplotě 72 °C	po dobu 30 sekund	

UDRŽUJTE PŘI TEPLITĚ 15 °C

### Gelová elektroforéza

Tyto pokyny jsou platné pro horizontální elektroforézu na agarózovém gelu: Připravte 2% agarózový gel v 0,5x TBE pufru. Jakmile je gel zchlazen přibližně na 60 °C, přidejte ethidiumbromid, aby jeho konečná koncentrace byla 0,5  $\mu$ g/ml. Nalijte gel a vložte hřebeny pro vytvoření mikrotitračních jamek (např. 12 x 8 jamek s 9mm mezerami). Po ztuhnutí vyjměte hřebeny a ponořte gel do roztoku 0,5x TBE pufru. Přeneste minimálně 5  $\mu$ l a maximálně 10  $\mu$ l z každé reakce na panelu nebo proužku do příslušné jamky v gelu a poznamenejte si pozici každé reakce. Pro určení velikosti může být užitečný 100pb ladder (velikostní marker). Gelovou elektroforézu provádějte po dobu 20 minut rychlostí 10 V/cm.

Podrobnosti týkající se specifického vybavení jsou uvedeny v návodu k použití od výrobce elektroforetického systému. Gel zobrazte pomocí UV dokumentačního systému pro gel s UV transluminátorem.

## 9. Interpretace

Zznamenejte výsledky za použití záznamového listu pro vzorky na straně 6 tohoto návodu k použití. Došlo-li ke kontaminaci SSPGo PCR nebo kontaminaci DNA, bude zjištěn amplikon o velikosti 187 pb. Známkou kontaminace PCR mohou být také šmouhy nebo pruhy různých velikostí, ale dimery primerů a další násobky primerů menší než 100 pb jsou artefakty a měli byste je ignorovat. Pozitivní výsledek u vzorku ředícího roztoku indikuje, že genotypizace příslušného vzorku je neplatná a měla by se zopakovat za použití jiného vzorku DNA s jinými reagensy.

## 10. Zajištění a kontrola kvality

Testování metodou: NTC test PCR amplikonu ze soupravy Biofortuna byl proveden za použití neředěného amplikonu a poté amplikonu zředěného v rozmezí  $1 \times 10^1$  až  $1 \times 10^{15}$ . Amplikon byl detekován v ředěních až do  $1 \times 10^{15}$ , včetně.

NTC test byl proveden za použití genomové DNA o koncentraci 100 ng/ $\mu$ l a poté za použití ředění v rozmezí  $1 \times 10^1$  až  $1 \times 10^{15}$ . DNA byla detekována v ředěních až do  $1 \times 10^3$ .

## 11. Literatura

- 1) Bunce M et al Tissue Antigens. 1995 Nov;46(5):355-67.
- 2) Saiki RK et al. Nature. 1986 Nov 13-19;324(6093):163-6.

**12. Biofortuna NTC Test: Záznamový list pro vzorky**

Před použitím se doporučuje tento záznamový list pro vzorky okopírovat, neboť NTC souprava obsahuje testy pro 96 vzorků (12 proužků po 8 testech).

Popis vzorku 1: \_\_\_\_\_

Popis vzorku 2: \_\_\_\_\_

Popis vzorku 3: \_\_\_\_\_

Popis vzorku 4: \_\_\_\_\_

Popis vzorku 5: \_\_\_\_\_

Popis vzorku 6: \_\_\_\_\_









Popis vzorku 7: \_\_\_\_\_

Popis vzorku 8: \_\_\_\_\_

**Záznamový list pro NTC vzorky**

Reakce	Barvivo	ID vzorku	Datum testu	Výsledek
1	Červené			
2	Fialové			
3	Fialové			
4	Fialové			
5	Fialové			
6	Fialové			
7	Fialové			
8	Fialové			

### 13. Vysvětlivky k používaným symbolům

	Počet testů
	Viz návod k použití
	Místo výroby
	Diagnostické prostředky <i>in vitro</i>
	Datum expirace
	Teplota skladování
	Číslo šarže
	Katalogové číslo

### 14. Kontaktní údaje výrobce

Biofortuna Ltd  
 1 Hawkshead Road  
 Croft Business Park  
 Bromborough, CH62 3RJ, UK  
 T: +44 (0) 151 334 0182  
 E: [info@biofortuna.com](mailto:info@biofortuna.com)  
 W: [www.biofortuna.com](http://www.biofortuna.com)



### 15. Překlady

Française :	Traductions disponibles
Deutsch:	Übersetzungen verfügbar
Español:	Traducciones disponibles
Italiano:	Traduzioni disponibili
Česky:	Překlady k dispozici
Dansk:	Tilgængelige oversættelser
Ελληνικά:	Διαθέσιμες μεταφράσεις
Magyar:	Fordítás rendelkezésre áll
Norsk:	Tilgjengelige oversettelser
Polski:	Tłumaczenia dostępne
Português:	Traduções disponíveis
Русский:	Переводы доступны
Slovensky:	Preklady k dispozícii
Türkçe:	Çeviriler mevcut
Svenska:	Översättningar tillgängliga

[www.biofortuna.com](http://www.biofortuna.com)

