



**Vejledning i brug af Biofortuna SSPGo™ HLA No Template Control Kit
BF-40-02**

Version 1

Juli 2011

1. Anvendelse

Biofortuna SSPGo No Template Control (NTC) Kit indeholder ekstratest af PCR-amplikonkontaminering til anvendelse sammen med Biofortuna SSPGo-sæt, som ikke har en integreret NTC.

2. Introduktion

PCR er en følsom teknik, som er modtagelig over for kontaminering med DNA-amplikon fra en tidligere PCR. Kontaminering kan medføre falsk positiv amplifikation i efterfølgende PCR'er, hvilket kan medføre ukorrekt genotypebestemmelse. PCR-amplikon kan kontaminere reagenser og prøver samt laboratorieudstyr såsom pipetter. Reagenser og udstyr skal monitoreres regelmæssigt for tegn på kontaminering. NTC-testen anvendes til påvisning af potentiel PCR- eller DNA-kontaminering, der er til stede i den DNA-fortyndingsopløsning, som anvendes til en prøve.

3. Testbeskrivelse

Hvert SSPGo No Template Control-sæt består af 12 strips med 8 PCR-reaktioner, som indeholder frysetørret PCR-buffer, polymerase og primere, der er specifikke for HLA-DRA-genet, og producere en 187bp-amplikon fra humant genomisk DNA eller amplificeret DNA. Alle Biofortuna-sæt anvender en DRA-amplikon som intern kontrol, og derfor vil enhver kontaminering fra brugen af Biofortuna SSPGo-sæt have samtidig amplifikation af DRA-genet og blive påvist vha. NTC-testprimere.

4. Indhold i sættet

- 12 strips med 8 PCR-reaktioner, som hver indeholder 10 µl prædispenserede frysetørrede primere, polymerase, dNTP'er* og buffer. Formatet for de otte reaktionsstrips er vist nedenfor.

| Reaktion | Farve | Anvendelse |
|----------|-------|--------------------------------|
| 1 | Rød | Ingen skabelonkontrol: Prøve 1 |
| 2 | Lilla | Ingen skabelonkontrol: Prøve 2 |
| 3 | Lilla | Ingen skabelonkontrol: Prøve 3 |
| 4 | Lilla | Ingen skabelonkontrol: Prøve 4 |
| 5 | Lilla | Ingen skabelonkontrol: Prøve 5 |
| 6 | Lilla | Ingen skabelonkontrol: Prøve 6 |
| 7 | Lilla | Ingen skabelonkontrol: Prøve 7 |
| 8 | Lilla | Ingen skabelonkontrol: Prøve 8 |

- 12 x 8 PCR-hætter
- 1 x brugsvejledning
- 1 x analysecertifikat
- Sikkerhedsdatablade kan hentes fra Biofortunas websted www.biofortuna.com. Kontakt den lokale distributør, hvis det ikke er muligt at hente ovenstående fra webstedet.

*CleanAmp™-dNTP'er er givet i licens af Trilink Biotechnologies Inc til brug i Biofortuna SSPGo-produkter.

5. Nødvendige reagenser og nødvendigt udstyr

- Egnede pipetter og sterile pipettespidser, f.eks. P10-pipettor med 10- μ l-filterspidser.
- DNA-isolationssæt/-udstyr.
- UV-spektrofotometer.
- Sterilt vand af molekylær renhed.
- Termocykler med 96 brønde og opvarmet låg. De PCR-plader og -rør, der anvendes i Biofortuna-sættene, er valideret til brug sammen med de fleste termocyklere på markedet, herunder MJ Research PTC-100, PTC-200, Hybaid MBS og Techne TC-512. Andre modeller kræver muligvis yderligere brugervalidering.
- Gelelektroforesereagenser (agarose, 0,5 x TBE, 1000bp-DNA-molekylærvægtsmarkør, 10 mg/ml ethidiumbromid).
- Gelelektroforeseudstyr (geltanke, strømforsyning, geldokumentationssystem med UV-transilluminator).

6. Sikkerhed og advarsler

- Test må kun udføres af kvalificeret personale.
- Alle reagenser skal håndteres i henhold til god laboratorieskik.
- Præ- og post-PCR-områder skal holdes adskilt. Overfør ikke nogen form for post-PCR-materialer tilbage til præ-PCR-området.
- **Advarsel om biologisk risiko:** Alle blodprodukter skal behandles som potentielt smittefarlige.
- **Advarsel om biologisk risiko:** Ethidiumbromid er et potentielt karcinogen. Anvend altid handsker, kittel og beskyttelsesbriller ved brug af ethidiumbromid.
- **Advarsel om biologisk risiko:** Vær forsigtig ved brug af UV-kilder. Anvend altid handsker, kittel og beskyttelsesbriller. Se aldrig direkte ind i UV-lyskilden.
- Sikkerhedsdatablade findes på www.biofortuna.com.

7. Opbevaring og holdbarhed

Biofortuna SSPGo-sættene kan opbevares ved 4-30 °C. Når PCR-beholderne fjernes fra foliepakken, skal reagenserne rehydreres med prøven inden for 3 timer. Se pakken for oplysninger om udløbsdato. Anvend ikke produkter efter den påtrykte dato.

Anvend ikke sættene, hvis foliepakken er beskadiget.

Sørg for, at PCR-beholderne forsegles tæt efter tilsætning af DNA, eftersom der ellers kan opstå fordampning under PCR-amplifikation. Vær særligt opmærksom på kanter og hjørner.

8. Brugsvejledning

Bemærk:

En hyppig kontamineringskilde er PCR-pipetter, og det tilrådes at anvende en kendt kontamineringsfri pipette til at afpipettere prøvemateriale i PCR-reaktionerne, herunder denne NTC-test.

1. Åbn foliepakken, og mærk den behørigt. Én strip kan anvendes til at teste mellem 1 og 8 prøver. Efter åbning skal PCR-reaktionerne anvendes inden for 3 timer.
2. For hver DNA-prøve, som skal genotypebestemmes, tilføjes 10 µl vand eller fortyndingsopløsning til en af reaktionerne på NTC-strippen.
3. Anvend 10 µl af 10 ng/µl humant genomisk DNA, hvis der er behov for en positiv kontrol. Dette vil resultere i en positiv 187bp-testamplikon.
4. Forsegl reaktionerne med de medleverede hætter, og fortsæt med standard-SSPGo-PCR-parametre som vist nedenfor.

BEMÆRKNING OM RESUSPENSION: Sørg for, at PCR-blandingerne resuspenderes med prøverne inden for 3 timer efter, at bakken er fjernet fra foliepakken.

BEMÆRKNING OM PCR-PLADE/-STRIP-HØJDEPROFIL: Det anbefales, at højdeprofilen på plader og strips er ens, hvis de skal anvendes i samme PCR-maskine. Forskellige højdeprofiler kan forårsage dårlig kontakt med PCR-maskinens opvarmede låg. Dette kan resultere i dårlig eller mislykket PCR-amplifikation.

PCR-parametre

Følgende PCR-parametre bør anvendes. Sørg for at anvende temperaturstigninger på mindst 1 °C i sekundet, og aktivér det opvarmede låg. Se brugermanualen fra fabrikanten af termocykleren for en fuldstændig vejledning. Termocyklere skal kalibreres i henhold til ASHIs (American Society of Histocompatibility and Immunogenetic) eller EFIs (European Federation of Immunogenetics) retningslinjer for akkreditering.

| | | | | |
|-----------|-------|-------------|---|-----------|
| Denaturer | 94 °C | 5 minutter | | |
| Denaturer | 96 °C | 15 sekunder | ← | 10 cykler |
| Bind | 66 °C | 50 sekunder | | |
| Udvid | 72 °C | 30 sekunder | | |
| Denaturer | 96 °C | 15 sekunder | ← | 20 cykler |
| Bind | 64 °C | 50 sekunder | | |
| Udvid | 72 °C | 30 sekunder | | |
| HOLD | 15 °C | | | |

Gelelektroforese

Disse instruktioner gælder for horisontal agarosegelelektroforese: Forbered en 2 %-agarosegel i 0,5 x TBE-buffer. Når gelen er afkølet til ca. 60 °C, skal der tilsættes ethidiumbromid, så der opnås en endelig koncentration på 0,5 µg/ml. Støb gelen, og isæt mikrotiterformatkamme (f.eks. 12 x 8 brønde med 9 mm afstand). Når gelen er støbt, skal kammene fjernes. Dæk gelen med 0,5 x TBE-buffer. Overfør mindst 5 µl og højst 10 µl fra hver bakke- eller stripeaktion til den tilsvarende brønd på gelen. Notér positionen for hver reaktion. En 100-bp-stige kan være nyttig som hjælp til bestemmelse af størrelse. Kør gelen i 20 minutter ved 10V/cm.

Se brugermanualen fra fabrikanten af elektroforesesystemet for specifikke oplysninger om udstyret. Gelfotoet skal fremstilles med et UV-geldokumentationssystem med UV-transilluminator.

9. Fortolkning

Registrér resultaterne ved hjælp af fortolkningstabellen for prøver på side 6 i denne brugsvejledning. Der observeres en 187bp-amplikon, hvis der er SSPGo PCR-kontaminering eller DNA-kontaminering til stede. Smear eller bånd i forskellige størrelser kan også være et tegn på PCR-kontaminering, men primer-dimer og andre primer-forlængelsesartefakter på mindre end 100bp skal ignoreres. Et positivt resultat for enhver fortyndingsopløsningsprøve er et tegn på, at genotypebestemmelsen for den pågældende prøve er ugyldig og skal gentages sammen med en anden DNA-prøve med andre reagenser.

10. Kvalitetssikring og -kontrol

Analysetestning: Ved hjælp af en PCR-amplikon fra et Biofortuna-sæt blev NTC-testen udført på amplikonen i ufortyndet tilstand og herefter i fortyndinger fra 1×10^1 til 1×10^{15} . Amplikonen blev påvist i fortyndinger til og med 1×10^{15} .

NTC-testen blev udført på gDNA ved $100 \text{ ng}/\mu\text{l}$ og herefter i fortyndinger fra 1×10^1 til 1×10^{15} . DNA'et blev påvist i fortyndinger på op til 1×10^3 .

11. Referencer

- 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. Prøveoptegnelse for Biofortuna NTC-testen

Det anbefales, at denne prøveoptegnelse fotokopieres før brug, da NTC-sættet har test til 96 prøver (12 strips med otte test).

Beskrivelse af prøve 1.

Beskrivelse af prøve 2.

Beskrivelse af prøve 3.

Beskrivelse af prøve 4.

Beskrivelse af prøve 5.

Beskrivelse af prøve 6.

Beskrivelse af prøve 7.






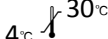


Beskrivelse af prøve 8.

NTC-prøveoptegnelse

| Reaktion | Farve | Prøve-id | Testdato | Resultat |
|----------|-------|----------|----------|----------|
| 1 | Rød | | | |
| 2 | Lilla | | | |
| 3 | Lilla | | | |
| 4 | Lilla | | | |
| 5 | Lilla | | | |
| 6 | Lilla | | | |
| 7 | Lilla | | | |
| 8 | Lilla | | | |



13. Symbolforklaring

| | |
|--|-----------------------------|
|  | Antal test |
|  | Se brugsvejledningen. |
|  | Fabrikationssted |
|  | <i>In vitro</i> -diagnostik |
|  | Udløbsdato |
|  | Opbevaringstemperatur |
|  | Lotnummer |
|  | Katalognummer |

14. Kontaktoplysninger hos fabrikant

Biofortuna Ltd
 1 Hawkshead Road
 Croft Business Park
 Bromborough, CH62 3RJ, UK
 Tlf.: +44 (0) 151 334 0182
 E-mail: info@biofortuna.com
 Web: www.biofortuna.com



15. Oversættelser

| | |
|-------------|-----------------------------|
| 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