



**Gebrauchsanweisung für Biofortuna SSPGo™ HLA
No Template Control Kit BF-40-02**

Version 1

Juli 2011

1. Verwendungszweck

Der Biofortuna SSPGo No Template Control (NTC) Kit enthält zusätzliche Tests auf PCR-Amplifikatkontamination zur Verwendung mit Biofortuna SSPGo Kits ohne integrierte Negativkontrolle (NTC - No Template Control).

2. Einführung

PCR ist ein sensibles Verfahren, das anfällig für Kontaminationen mit DNA-Amplifikaten aus einer vorherigen PCR ist. Eine Kontamination kann in nachfolgenden PCRs zu einer falsch-positiven Amplifikation führen, was wiederum eine fehlerhafte Genotypisierung zur Folge haben kann. Sowohl Reagenzien und Proben als auch Laborausrüstung wie Pipetten können mit PCR-Amplifikaten kontaminiert werden. Reagenzien und Laborausrüstung sollten regelmäßig auf Anzeichen für eine Kontamination überprüft werden. Der NTC-Test dient zum Nachweis einer potentiellen PCR- oder DNA-Kontamination im DNA-Verdünnungsmittel, das für eine getestete Probe verwendet wird.

3. Erläuterung des Tests

Jeder SSPGo No Template Control Kit enthält 12 Streifen mit 8 PCR-Reaktionen mit gefriergetrocknetem PCR-Puffer, Polymerase und Primern, spezifisch für das HLA-DRA-Gen, und bildet ein 187-bp-Amplifikat aus genomischer Human-DNA oder amplifizierter DNA. Alle Biofortuna Kits verwenden ein DRA-Amplifikat als interne Kontrolle. Daher weist jede Kontamination durch Verwendung von Biofortuna SSPGo Kits gleichzeitig eine Amplifikation des DRA-Gens auf und wird von den NTC-Test-Primern nachgewiesen.

4. Inhalt des Kits

- 12 Streifen mit 8 PCR-Reaktionen, jeweils mit 10 µl vorpipettierten gefriergetrockneten Primern, Polymerase, dNTPs* und Puffer. Das Schema eines Streifens mit 8 Reaktionen ist nachfolgend dargestellt.

Reaktion	Farbstoff	Verwendung
1	Rot	Negativkontrolle: Probe 1
2	Violett	Negativkontrolle: Probe 2
3	Violett	Negativkontrolle: Probe 3
4	Violett	Negativkontrolle: Probe 4
5	Violett	Negativkontrolle: Probe 5
6	Violett	Negativkontrolle: Probe 6
7	Violett	Negativkontrolle: Probe 7
8	Violett	Negativkontrolle: Probe 8

- 12 x 8 PCR-Verschlüsse
- 1 Gebrauchsanweisung
- 1 Analysenzertifikat
- Sicherheitsdatenblätter (Material Safety Data Sheets, MSDS) können von der Biofortuna Internetseite www.biofortuna.com heruntergeladen werden. Sollte das Herunterladen nicht möglich sein, wenden Sie sich bitte an Ihren zuständigen Kundendienst.

*CleanAmp™ dNTPs stehen unter der Lizenz von Trilink Biotechnologies Inc zur Verwendung in Biofortuna SSPGo Produkten.

5. Nicht mitgelieferte Reagenzien und Laborausstattung

- Geeignete Pipetten und sterile Pipettenspitzen, z. B. P10-Pipette mit 10- μ l-Filterspitzen
- DNA-Isolierungskit/-materialien
- UV-Spektralphotometer
- Steriles Wasser (Molecular Grade)
- 96-Well-Thermocycler mit beheiztem Deckel. Die in Biofortuna Kits verwendeten PCR-Platten und Röhrchen wurden für die Verwendung mit den meisten im Handel erhältlichen Thermocyclern validiert, einschließlich MJ Research PTC-100, PTC-200, Hybaid MBS und Techne TC-512 Thermocyclern. Für andere Modelle ist unter Umständen eine weitere Validierung durch den Benutzer erforderlich.
- Gelelektrophorese-Reagenzien (Agarose, 0,5x TBE, DNA-Molekulargewichtsmarker (1.000 bp), 10 mg/ml Ethidiumbromid)
- Gelelektrophorese-Ausrüstung (Geltanks, Netzanschluss, Geldokumentations-System mit UV-Transilluminator)

6. Sicherheits- und Gefahrenhinweise

- Die Tests sollten nur von qualifiziertem Fachpersonal durchgeführt werden.
- Alle Reagenzien gemäß den Richtlinien der guten Laborpraxis handhaben.
- Den Prä-PCR-Bereich vom Post-PCR-Bereich trennen. Keine Materialien vom Post-PCR-Bereich zurück in den Prä-PCR-Bereich bringen.
- **Biogefährdung:** Alle Blutprodukte als potentiell infektiös behandeln.
- **Biogefährdung:** Ethidiumbromid ist potentiell karzinogen. Bei der Verwendung stets Handschuhe, Laborkittel und Schutzbrille tragen.
- **Biogefährdung:** Vorsicht beim Umgang mit UV-Quellen - stets Handschuhe, Laborkittel und Schutzbrille tragen. Nie direkt in das UV-Licht schauen.
- Sicherheitsdatenblätter (Material Safety Data Sheets) finden Sie unter www.biofortuna.com.

7. Lagerung und Haltbarkeit

Biofortuna SSPGo Kits können bei 4 - 30 °C gelagert werden. Sobald PCR-Gefäße aus den Folienbeuteln entnommen wurden, sollten die Reagenzien innerhalb von 3 Stunden mit Probe rehydratisiert werden. Das Verfallsdatum entnehmen Sie bitte der Verpackung. Die Produkte nicht über das aufgedruckte Datum hinaus verwenden.

Die Kits nicht verwenden, wenn der Folienbeutel gerissen ist oder Löcher aufweist.

Sicherstellen, dass die PCR-Gefäße nach Zugabe von DNA dicht verschlossen sind, da andernfalls während der PCR-Amplifikation Verdunstung auftreten kann. Dabei insbesondere auf die Ränder und Ecken achten.

8. Anweisungen zur Verwendung

Hinweis:

Häufige Ursache für eine Kontamination sind PCR-Pipetten, weshalb die Verwendung von nachweislich kontaminationsfreien Pipetten zum Transferieren von Proben in die PCR-Reaktionen, auch für diesen NTC-Test, zu empfehlen ist.

1. Den Folienbeutel öffnen und entsprechend kennzeichnen; mit einem Streifen können zwischen einer und 8 Proben getestet werden. Nach dem Öffnen sollten die PCR-Reaktionen innerhalb von 3 Stunden verwendet werden.
2. Für jede genotypisierte DNA-Probe 10 µl des verwendeten Wassers oder Verdünnungsmittels in eine der Reaktionen des NTC-Streifens geben.
3. Ist eine positive Kontrolle erforderlich, 10 µl von 10 ng/µl genomischer Human-DNA verwenden. Auf diese Weise entsteht ein positives Test-Amplifikat von 187 bp.
4. Die Reaktionen mit den mitgelieferten Verschlüssen verschließen und mit den SSPGo PCR-Standard-Parametern wie nachfolgend dargestellt fortfahren.

HINWEIS ZUR RESUSPENSION: Sicherstellen, dass die PCR-Mischungen innerhalb von 3 Stunden nach der Entnahme der Platte aus dem Folienbeutel mit den Proben resuspendiert werden.

HINWEIS ZUR HÖHE DER PCR-PLATTE/STREIFEN: Es wird empfohlen, dass die Platten und Streifen dieselbe Höhe aufweisen, wenn sie im selben PCR-Gerät verwendet werden. Bei unterschiedlicher Höhe kann es zu unzureichendem Kontakt mit dem beheizten Deckel des PCR-Gerätes kommen. Dies kann zu einer schwachen oder fehlerhaften PCR-Amplifikation führen.

PCR-Parameter

Die folgenden PCR-Parameter sollten verwendet werden. Sicherstellen, dass die Temperaturerhöhungsgeschwindigkeit (ramp speed) mindestens 1 °C pro Sekunde beträgt, und den beheizten Deckel aktivieren. Eine vollständige Gebrauchsanweisung zum Thermocycler entnehmen Sie bitte dem Benutzerhandbuch des Herstellers. Thermocycler sollten gemäß den Akkreditierungsrichtlinien der "American Society of Histocompatibility and Immunogenetic (ASHI)" oder "European Federation of Immunogenetics (EFI)" kalibriert werden.

Denaturierung	94 °C	5 Minuten	
Denaturierung	96 °C	15 Sekunden	10 Zyklen
Anlagerung	66 °C	50 Sekunden	
Extension	72 °C	30 Sekunden	
Denaturierung	96 °C	15 Sekunden	20 Zyklen
Anlagerung	64 °C	50 Sekunden	
Extension	72 °C	30 Sekunden	
HALTEN	15 °C		

Gelelektrophorese

Diese Anweisungen gelten für die horizontale Agarose-Gelelektrophorese: Ein 2%iges Agarosegel in 0,5x TBE-Puffer herstellen. Wenn das Gel bis auf ca. 60 °C abgekühlt ist, Ethidiumbromid in einer End-Konzentration von 0,5 µg/ml zugeben. Das Gel gießen und Kämme im Mikrotiter-Format einsetzen (z. B. 12 x 8 Vertiefungen mit 9 mm Abstand). Sobald das Gel erstarrt ist, die Kämme entnehmen und das Gel in 0,5x TBE-Puffer legen. Das Gel muss vollständig bedeckt sein. Mindestens 5 µl und höchstens 10 µl aus jeder Platten- bzw. Streifenreaktion in die entsprechende Vertiefung im Gel transferieren und die Position jeder Reaktion notieren. Eine 100-bp-Leiter kann zur Größenbestimmung hilfreich sein. Das Gel 20 Minuten bei 10 V/cm laufen lassen.

Genauere Angaben zur Ausrüstung entnehmen Sie bitte der Gebrauchsanweisung des Herstellers Ihres Elektrophorese-Gerätes. Die Betrachtung des Gels sollte mit einem UV-Dokumentations-System mit UV-Transilluminator erfolgen.



9. Interpretation

Die Ergebnisse unter Verwendung der Probendokumentationstabelle auf Seite 6 dieser Gebrauchsanweisung dokumentieren. Ein 187-bp-Amplifikat wird festgestellt, wenn eine SSPGo PCR-Kontamination oder DNA-Kontamination vorliegt. Streifen oder Banden unterschiedlicher Größe können ebenfalls auf eine PCR-Kontamination hindeuten, wohingegen Primer-Dimer und andere Primer-Extensions-Artefakte mit weniger als 100 bp ignoriert werden sollten. Ein positives Ergebnis einer verdünnten Probe deutet darauf hin, dass die Genotypisierung dieser Probe ungültig ist und mit einer anderen DNA-Probe unter Verwendung anderer Reagenzien wiederholt werden sollte.

10. Qualitätssicherung und -kontrolle

Test-Überprüfung: Unter Verwendung eines PCR-Amplifikats aus einem Biofortuna Kit wurde der NTC-Test mit dem Amplifikat zunächst unverdünnt und anschließend in Verdünnungen von 1×10^1 bis 1×10^{15} durchgeführt. Das Amplifikat wurde in Verdünnungen bis einschließlich 1×10^{15} nachgewiesen.

Der NTC-Test wurde mit gDNA bei $100 \text{ ng}/\mu\text{l}$ und anschließend in Verdünnungen von 1×10^1 bis 1×10^{15} durchgeführt. Die DNA wurde in Verdünnungen bis 1×10^3 nachgewiesen.

11. Literatur

- 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.

13. Biofortuna NTC Test - Probendokumentationsblatt

Es wird empfohlen, vor der Verwendung Kopien dieses Probendokumentationsblattes zu machen, da der NTC-Kit über ausreichend Tests für 96 Proben (12 Streifen mit 8 Tests) verfügt.

Probe 1 Beschreibung. _____

Probe 2 Beschreibung. _____

Probe 3 Beschreibung. _____

Probe 4 Beschreibung. _____

Probe 5 Beschreibung. _____

Probe 6 Beschreibung. _____









Probe 7 Beschreibung. _____

Probe 8 Beschreibung. _____

NTC Probendokumentation

Reaktion	Farbstoff	Proben-ID	Datum des Tests	Ergebnis
1	Rot			
2	Violett			
3	Violett			
4	Violett			
5	Violett			
6	Violett			
7	Violett			
8	Violett			

14. Erläuterung der verwendeten Symbole

	Anzahl der Tests
	Gebrauchsanweisung beachten
	Herstellungsort
	In-vitro-Diagnostikum
	Verfallsdatum
	Lagertemperatur
	Chargenbezeichnung
	Bestellnummer

15. Kontaktinformationen des Herstellers

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



15. Übersetzungen

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