



**Οδηγίες χρήσης για την εξέταση Biofortuna SSPGo™ HLA
No Template Control Kit
BF-40-02**

Έκδοση 1

Ιούλιος 2011

1. Σκοπός χρήσης

Το διαγνωστικό σύνολο Biofortuna SSPGo No Template Control (NTC) Kit περιέχει συμπληρωματικές εξετάσεις για τη μόλυνση αμπλικονίου PCR που πρόκειται να χρησιμοποιηθεί σε συνδυασμό με τα διαγνωστικά σύνολα Biofortuna SSPGo που δεν διαθέτουν ακέραιο NTC.

2. Εισαγωγή

Η PCR είναι μια ευαίσθητη τεχνική που υπόκειται σε επιμόλυνση με αμπλικόνια DNA από προηγούμενη PCR. Η επιμόλυνση μπορεί να οδηγήσει σε ψευδώς θετική ενίσχυση των επόμενων PCR, η οποία ακολούθως μπορεί να οδηγήσει σε λανθασμένη τυποποίηση γονότυπου. Το αμπλικόνιο PCR μπορεί να μολύνει αντιδραστήρια και δείγματα, καθώς και εργαστηριακό εξοπλισμό όπως αναρροφητήρες. Τα αντιδραστήρια και ο εξοπλισμός πρέπει να υπόκεινται σε τακτικό έλεγχο για ενδείξεις μόλυνσης. Η εξέταση NTC χρησιμοποιείται για την ανίχνευση πιθανής μόλυνσης PCR ή DNA στο διάλυμα DNA που χρησιμοποιείται για ένα δείγμα εξέτασης.

3. Περιγραφή εξέτασης

Κάθε διαγνωστικό σύνολο SSPGo No Template Control kit αποτελείται από 12 ταινίες των 8 αντιδράσεων PCR που περιέχουν λυοφιλοποιημένο ρυθμιστικό διάλυμα PCR, πολυμεράση και εκκινητές ειδικούς για το γονίδιο HLA-DRA και θα δημιουργήσει ένα αμπλικόνιο 187bp από ανθρώπινο γενομικό DNA ή ενισχυμένο DNA. Όλα τα διαγνωστικά σύνολα Biofortuna χρησιμοποιούν ένα αμπλικόνιο DRA ως εσωτερικό πρότυπο ελέγχου, οπότε οποιαδήποτε μόλυνση από τη χρήση των διαγνωστικών συνόλων Biofortuna SSPGo θα έχει ταυτόχρονη ενίσχυση του γονιδίου DRA και θα ανιχνευτεί από τους εκκινητές εξέτασης NTC.

4. Περιεχόμενα συνόλου

- 12 ταινίες των 8 αντιδράσεων PCR, καθμία από τις οποίες περιέχει 10μl ήδη εισηγμένων λυοφιλοποιημένων εκκινητών, πολυμεράσης, dNTPs* και ρυθμιστικού διαλύματος. Παρακάτω εμφανίζονται τα στοιχεία της ταινίας οκτώ αντιδράσεων.

Αντίδραση	Χρωστική	Χρήση
1	Κόκκινο	No Template Control: Δείγμα 1
2	Μωβ	No Template Control: Δείγμα 2
3	Μωβ	No Template Control: Δείγμα 3
4	Μωβ	No Template Control: Δείγμα 4
5	Μωβ	No Template Control: Δείγμα 5
6	Μωβ	No Template Control: Δείγμα 6
7	Μωβ	No Template Control: Δείγμα 7
8	Μωβ	No Template Control: Δείγμα 8

- 12x8 καπάκια σωληναρίων PCR
- 1x Οδηγίες χρήσης.
- 1x Πιστοποιητικό ανάλυσης
- Τα δελτία δεδομένων ασφαλείας (MSDS) μπορούν να ληφθούν από το δικτυακό τόπο της Biofortuna www.biofortuna.com. Αν δεν μπορείτε να τα κατεβάσετε από τον ιστότοπο, επικοινωνήστε με τον τοπικό αντιπρόσωπο της χώρας σας.

*Η άδεια χρήσης των CleanAmp™ dNTPs εκχωρείται από την Trilink Biotechnologies Inc για χρήση με τα προϊόντα Biofortuna SSP Go.



5. Αντιδραστήρια και εξοπλισμός που δεν παρέχεται

- Κατάλληλοι αναρροφητήρες και αποστειρωμένα ρύγχη π.χ. αναρροφητήρες P10 με φίλτρο 10μl.
- Διαγνωστικό σύνολο/ εξοπλισμός απομόνωσης DNA.
- Φασματοφωτόμετρο UV.
- Αποστειρωμένο νερό εφαρμογών μοριακής βιολογίας.
- Θερμικός κυκλοποιητής 96 βοθρίων με θερμαινόμενο καπάκι. Οι πλάκες PCR και τα σωληνάρια που χρησιμοποιούνται στα διαγνωστικά σύνολα της Biofortuna έχουν εξεταστεί και εγκριθεί για χρήση με την πλειονότητα των διαθέσιμων θερμικών κυκλοποιητών που κυκλοφορούν στην αγορά, συμπεριλαμβανομένων των MJ Research PTC-100, PTC-200, Hybaid MBS και Techne TC-512. Διαφορετικά μοντέλα είναι πιθανό να απαιτούν περαιτέρω επικύρωση από το χειριστή.
- Τα αντιδραστήρια ηλεκτροφόρησης γέλης (αγαρόζης, 0,5x TBE, 1000bp DNA δείκτη μοριακού βάρους, 10mg/ml βρωμιούχου αιθιδίου).
- Εξοπλισμός ηλεκτροφόρησης γέλης [δεξαμενές γέλης, τροφοδοτικό ρεύματος, σύστημα τεκμηρίωσης γέλης με συσκευή υπεριώδους (UV transilluminator)].

6. Ασφάλεια και Προειδοποιήσεις

- Οι εξετάσεις πρέπει να εκτελούνται μόνο από κατάλληλα εκπαιδευμένο προσωπικό.
- Ο χειρισμός όλων των αντιδραστηρίων πρέπει να γίνεται σύμφωνα με τις αρχές της ορθής εργαστηριακής πρακτικής.
- Οι περιοχές πριν και μετά την PCR πρέπει να είναι σαφώς διαχωρισμένες. Μην μεταφέρετε υλικά μετά την PCR πίσω στην περιοχή πριν την PCR.
- **Προειδοποίηση βιολογικού κινδύνου:** Όλα τα προϊόντα αίματος πρέπει να θεωρούνται δυνητικώς μολυσματικά και πρέπει να τυγχάνουν της ανάλογης μεταχείρισης.
- **Προειδοποίηση βιολογικού κινδύνου:** Το βρωμιούχο αιθίδιο είναι δυνητικά καρκινογόνο. Σε περίπτωση χρήσης του, να φοράτε πάντοτε γάντια, ποδιά εργαστηρίου και προστατευτικά γυαλιά.
- **Προειδοποίηση βιολογικού κινδύνου:** Να προσέχετε όταν χρησιμοποιείτε πηγές UV - να φοράτε πάντοτε γάντια, ποδιά εργαστηρίου και προστατευτικά γυαλιά. Ποτέ μην κοιτάτε απευθείας την πηγή υπεριώδους φωτός UV.
- Δελτία δεδομένων ασφαλείας (MSDS) διατίθενται στην ιστοσελίδα www.biofortuna.com.

7. Αποθήκευση και σταθερότητα

Τα διαγνωστικά σύνολα Biofortuna SSP Go πρέπει να αποθηκεύονται σε θερμοκρασία 4-30°C. Μετά το άνοιγμα της αλουμινένιας συσκευασίας και την αφαίρεση των σωληναρίων PCR, τα αντιδραστήρια πρέπει να υδατώνονται με δείγμα εντός 3 ωρών. Ανατρέξτε στη συσκευασία για την ημερομηνία λήξης. Μην χρησιμοποιείτε τα προϊόντα μετά την εκτυπωμένη ημερομηνία.

Μη χρησιμοποιείτε τα διαγνωστικά σύνολα αν η συσκευασία αλουμινίου είναι σχισμένη ή τρυπημένη.

Βεβαιωθείτε ότι τα σωληνάρια PCR είναι καλά κλεισμένα μετά την προσθήκη του DNA, καθώς αυτό μπορεί να οδηγήσει σε εξάτμιση κατά την ενίσχυση PCR. Ιδιαίτερη προσοχή χρειάζεται σε άκρα και γωνίες.

8. Οδηγίες χρήσης

Σημείωση:

Μια συχνή πηγή μόλυνσης είναι οι αναρροφητήρες PCR. Συνιστάται να χρησιμοποιείται ένας ήδη ελεγμένος για μόλυνση αναρροφητήρας για τη μεταφορά του δείγματος στις αντιδράσεις PCR, συμπεριλαμβανομένης της εξέτασης NTC.

1. Ανοίξτε την αλουμινένια συσκευασία και τοποθετήστε την κατάλληλη ετικέτα. Μια ταινία μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την εξέταση ενός έως οκτώ δειγμάτων. Αφού ανοιχθούν οι αντιδράσεις PCR πρέπει να χρησιμοποιηθούν εντός 3 ωρών.
2. Για κάθε δείγμα DNA που έχει τυποποιηθεί ο γονότυπός του προσθέστε 10μl νερό ή αραιωτικό που χρησιμοποιείται σε μία από τις αντιδράσεις της ταινίας NTC.
3. Αν απαιτείται θετικό πρότυπο ελέγχου χρησιμοποιήστε 10μl από τα 10ng/μl ανθρώπινου γενομικού DNA. Αυτό θα έχει ως αποτέλεσμα ένα αμπλικόνιο 187bp θετικής εξέτασης.
4. Τοποθετήστε τα καπάκια των αντιδράσεων που περιλαμβάνονται στα διαγνωστικά σύνολα και συνεχίστε με τις συνήθεις παραμέτρους SSPGo PCR όπως φαίνεται παρακάτω.

ΣΗΜΕΙΩΣΗ ΓΙΑ ΕΠΑΝΑΛΗΨΗ ΕΝΑΙΩΡΗΣΗΣ: Βεβαιωθείτε ότι τα μίγματα PCR επαναιωρούνται με τα δείγματα εντός 3 ωρών από την απομάκρυνση του δίσκου από τη συσκευασία αλουμινίου.

ΣΗΜΕΙΩΣΗ ΠΡΟΦΙΛ ΎΨΟΥΣ ΠΛΑΚΑΣ/ΤΑΙΝΙΑΣ PCR : Συνιστάται το προφίλ ύψους των πλακών και ταινιών να είναι ισοδύναμα όταν τοποθετούνται στην ίδια συσκευή PCR. Τα διαφορετικά προφίλ ύψους μπορούν να προκαλέσουν ανεπαρκή επαφή με το θερμαινόμενο καπάκι των συσκευών PCR. Αυτό μπορεί να έχει ως αποτέλεσμα την ανεπαρκή ή ανεπιτυχή ενίσχυση PCR.

Παράμετροι PCR

Πρέπει να χρησιμοποιούνται οι παρακάτω παράμετροι PCR. Βεβαιωθείτε ότι η ράμπα επιταχύνει τουλάχιστον 1°C ανά δευτερόλεπτο και εξασφαλίζει το θερμαινόμενο καπάκι. Ανατρέξτε στο εγχειρίδιο του κατασκευαστή του θερμικού κυκλοποιητή για πλήρεις οδηγίες χρήσης. Οι θερμικοί κυκλοποιητές πρέπει να βαθμονομούνται σύμφωνα με τους κανόνες διαπίστευσης της Αμερικανικής Εταιρείας Ιστοσυμβατότητας και Ανοσογενετικής (American Society of Histocompatibility and Immunogenetic, ASHI) ή της Ευρωπαϊκής Ομοσπονδίας Ανοσογενετικής (European Federation of Immunogenetics, EFI).

Αποδιάταξη	94°C	5 λεπτά		
Αποδιάταξη	96°C	15 δευτερόλεπτα	}	10 κύκλοι
Αναδιάταξη	66°C	50 δευτερόλεπτα		
Επιμήκυνση	72°C	30 δευτερόλεπτα		
Αποδιάταξη	96°C	15 δευτερόλεπτα	}	20 κύκλοι
Αναδιάταξη	64°C	50 δευτερόλεπτα		
Επιμήκυνση	72°C	30 δευτερόλεπτα		
HOLD (Αναμονή)	15°C			

Ηλεκτροφόρηση γέλης

Οι οδηγίες αφορούν την οριζόντια ηλεκτροφόρηση σε γέλη αγαρόζης: Παρασκευάστε γέλη αγαρόζης 2% σε ρυθμιστικό διάλυμα TBE 0,5x. Όταν η γέλη φτάσει σε θερμοκρασία περίπου 60°C προσθέστε βρωμιούχο αιθίδιο σε τελική συγκέντρωση 0,5μg/ml. Τοποθετήστε τη γέλη και εισάγετε τα χτένια τύπου μικροτιτλοδότησης (π.χ. 12x8 βοθρία με διάκενο 9mm). Μόλις σταθεροποιηθεί, αφαιρέστε τα χτένια και καλύψτε τη γέλη με ρυθμιστικό διάλυμα TBE 0,5x. Μεταφέρετε τουλάχιστον 5μl και όχι παραπάνω από 10μl αντιδραστήριου από κάθε δίσκο ή ταινία στο αντίστοιχο βοθρίο στη γέλη, σημειώνοντας τη θέση κάθε αντιδραστήριου. Μια κλίμακα 100bp μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως βοηθητικό για τον καθορισμό του μεγέθους. Μετρήστε τη γέλη για 20 λεπτά στα 10V/cm.

Ανατρέξτε στις οδηγίες του κατασκευαστή του συστήματος ηλεκτροφόρησης για λεπτομέρειες σχετικά με συγκεκριμένο εξοπλισμό. Οι γέλες πρέπει να απεικονίζονται οπτικά με ένα σύστημα τεκμηρίωσης γέλης UV χωρίς συσκευή υπεριώδους (UV transilluminator).



9. Ερμηνεία

Καταγράψτε τα αποτελέσματα χρησιμοποιώντας τον πίνακα καταγραφής του δείγματος στη σελίδα 6 αυτού του συνοδευτικού φυλλαδίου. Ένα αμπλικόνιο 187bp θα παρατηρηθεί εφόσον υπάρχει ήδη επιμόλυνση SSPGo PCR ή DNA. Πιθανές διαχύσεις ή ζώνες διαφορετικού μεγέθους μπορεί επίσης να υποδεικνύουν επιμόλυνση PCR, αλλά τα primer-dimer και άλλα τεχνητά προϊόντα επιμήκυνσης κάτω των 100bp πρέπει να μη λαμβάνονται υπόψη. Ένα θετικό αποτέλεσμα για κάθε δείγμα αραιωτικού δείχνει ότι οι γονότυποι αυτού του δείγματος δεν είναι έγκυροι και πρέπει να επαναλαμβάνονται με άλλο δείγμα DNA χρησιμοποιώντας διαφορετικά αντιδραστήρια.

10. Διασφάλιση και Έλεγχος ποιότητας

Διενέργεια εξέτασης: χρησιμοποιώντας αμπλικόνιο PCR από ένα διαγνωστικό σύνολο Biofortuna, η εξέταση NTC πραγματοποιήθηκε σε μη αραιωμένο αμπλικόνιο και στη συνέχεια σε αραιώσεις από 1×10^1 έως 1×10^{15} . Το αμπλικόνιο ανιχνεύτηκε σε αραιώσεις μέχρι και (συμπεριλαμβανομένου) 1×10^{15} .

Η εξέταση NTC πραγματοποιήθηκε σε gDNA στα 100ng/μl και στη συνέχεια σε αραιώσεις από 1×10^1 έως 1×10^{15} . Ανιχνεύτηκε DNA σε αραιώσεις μέχρι 1×10^3 .

11. Παραπομπές

- 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. Φύλλο καταγραφής δείγματος εξέτασης Biofortuna NTC

Συνιστάται αυτό το φύλλο καταγραφής δείγματος να φωτοτυπηθεί πριν τη χρήση του καθώς το διαγνωστικό σύνολο NTC διαθέτει επαρκείς εξετάσεις για 96 δείγματα (12 ταινίες των οκτώ εξετάσεων).

Περιγραφή δείγματος 1.

Περιγραφή δείγματος 2.

Περιγραφή δείγματος 3.

Περιγραφή δείγματος 4.

Περιγραφή δείγματος 5.

Περιγραφή δείγματος 6.

Περιγραφή δείγματος 7.






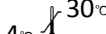


Περιγραφή δείγματος 8.

Αρχείο καταγραφής δείγματος NTC

Αντίδραση	Χρωστική	Sample ID (Κωδικός δείγματος)	Ημερομηνία εξέτασης	Αποτέλεσμα
1	Κόκκινο			
2	Μωβ			
3	Μωβ			
4	Μωβ			
5	Μωβ			
6	Μωβ			
7	Μωβ			
8	Μωβ			



13. Επεξήγηση πίνακα συμβόλων

	Αριθμός εξετάσεων
	Συμβουλευτείτε τις οδηγίες χρήσης
	Τόπος παρασκευής
	In vitro διαγνωστική εξέταση
	Ημερομηνία λήξης
	Θερμοκρασία αποθήκευσης
	Αριθμός παρτίδας
	Αριθμός καταλόγου

14. Στοιχεία επικοινωνίας με τον κατασκευαστή

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. Μεταφράσεις**

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