



**Használati utasítás a Biofortuna SSPGo™ HLA No Template Control
Kit-hez BF-40-02
(*Templát nélküli kontrollkészlet*)**

1. verzió

2011. július

1. Rendeltetés

A Biofortuna SSPGo No Template Control (NTC) Kit (*Templát nélküli kontroll- [NTC] készlet*) a PCR-amplikon-szennyeződés kimutatásához tartalmaz kiegészítő tesztet, amely az NTC-t nem tartalmazó Biofortuna SSPGo készletekkel való használatra szolgál.

2. Bevezetés

A PCR olyan érzékeny technika, amely esetében könnyen bekövetkezhet korábbi PCR-vizsgálatokból származó DNS-amplikonokkal való szennyeződés. A szennyeződés fals pozitív amplifikációt eredményezhet a további PCR-vizsgálatok során, amely helytelen genotipizáláshoz vezethet. A PCR-amplikonokkal való szennyeződés érintheti a reagenseket és a mintákat csakúgy, mint a laboratóriumi eszközöket (például a pipettákat). Ezért a reagenseket és a berendezéseket/eszközöket rendszeresen ellenőrizni kell, hogy nem szennyeződtek-e. Az NTC teszt a vizsgált mintához használt DNS-hígító potenciális PCR- vagy DNS-szennyeződésének kimutatására szolgál.

3. A teszt leírása

Minden egyes SSPGo No Template kontrollkészlet magában foglal 12 db, egyenként 8 PCR-reakciócellából álló csíkot. A cellák fagyasztva szárított PCR-puffert, polimerázt és a HLA-DRA génre specifikus primereket tartalmaznak, és 187 bp amplikont adnak a humán genomikus vagy amplifikált DNS-ből. Minden Biofortuna készlet DRA-amplikonokat alkalmaz belső kontrollként, ezért a Biofortuna SSPGo készletekből származó bármely szennyeződés a DRA gén ko-amplifikációját eredményezi, amelyet az NTC teszt primerei kimutatnak.

4. A készlet tartalma

- 12 db, egyenként 8 PCR-reakciócellát tartalmazó csík, melyek mindegyike 10 µl előre kimért, fagyasztva szárított primert, polimerázt, dNTP-t* és puffert tartalmaz. A nyolc reakciócellát tartalmazó csík kialakítása az alábbi.

Reakciócella	Festék	Használat
1.	Vörös	Templát nélküli kontroll: 1. minta
2.	Lila	Templát nélküli kontroll: 2. minta
3.	Lila	Templát nélküli kontroll: 3. minta
4.	Lila	Templát nélküli kontroll: 4. minta
5.	Lila	Templát nélküli kontroll: 5. minta
6.	Lila	Templát nélküli kontroll: 6. minta
7.	Lila	Templát nélküli kontroll: 7. minta
8.	Lila	Templát nélküli kontroll: 8. minta

- 12x8 db PCR-kupak
- 1x használati utasítás
- 1x analitikai bizonylat
- Az anyagbiztonsági adatlapok (MSDS) a Biofortuna weboldaláról tölthetők le: www.biofortuna.com. Amennyiben nem tudja letölteni a weboldalról a dokumentumokat, kérjük, lépjen érintkezésbe a helyi forgalmazóval.

* A CleanAmp™ dNTP-k licence a Biofortuna SSPGo termékekben való használatra a Trilink Biotechnologies Inc.-től származik.

5. Nem mellékelt reagensek, berendezések és eszközök

- Megfelelő pipettázók és steril hegyek, pl. P10 pipettázó 10 µl-es szűrőhegyekkel
- DNS-izolációs készlet/berendezés
- UV-spektrofotométer
- Steril, molekuláris tisztaságú víz
- 96 cellás, fűthető fedéllel rendelkező termocycler. A Biofortuna készletekhez használatos PCR-tálcákat és -csöveket érvényesítették a jelenleg forgalomban lévő legtöbb termocyclerrel való használatra, ideértve az MJ Research PTC-100, PTC-200, a Hybaid MBS és a Techne TC-512 termocyclereket. Az ezektől eltérő típusú termocyclereket a felhasználónak kell érvényesítenie.
- Gél-elektroforézis reagensek (agaróz; 0,5x TBE; 1000 bp DNS-molekulasúly-marker; 10 mg/ml etidium-bromid)
- Gél-elektroforézishez szükséges berendezések, eszközök (géltartályok, áramellátás, géldokumentációs rendszer UV-transzilluminátorral)

6. Biztonság és figyelmeztetések

- A vizsgálatokat kizárólag megfelelően képzett szakember végezheti.
- A reagenseket a jó laboratóriumi gyakorlatnak megfelelően kell kezelni.
- Különítse el a pre- és a poszt-PCR munkaterületeket! Ne vigye vissza a poszt-PCR anyagokat a pre-PCR munkaterületre!
- **Biológiai veszélyre vonatkozó figyelmeztetések:** kezeljen minden vérterméket fertőzésveszélyesként!
- **Biológiai veszélyre vonatkozó figyelmeztetések:** az etidium-bromid potenciális karcinogén anyag. Használata során mindig viseljen védőkesztyűt, laboratóriumi köpenyt és védőszemüveget!
- **Biológiai veszélyre vonatkozó figyelmeztetések:** gondossággal járjon el az UV-források kezelése során – mindig viseljen védőkesztyűt, laboratóriumi köpenyt és védőszemüveget! Soha ne nézzen közvetlenül UV-fényforrásba!
- Az anyagbiztonsági adatlapok a www.biofortuna.com weboldalról tölthetők le.

7. Tárolás és stabilitás

A Biofortuna SSPGo készletek 4-30 Celsius-fokos hőmérsékleten tárolandók. Miután a PCR-edényeket kivette a fóliatasakból, a reagenseket 3 órán belül a mintával rehidrálni kell. A lejáratási időpontot lásd a csomagoláson! Ne használja fel a termékeket a csomagoláson feltüntetett időponton túl!

Ne használja fel a terméket, ha a fóliatasak szakadt vagy lyukas!

Ügyeljen arra, hogy a PCR-edények a DNS hozzáadása után szorosan le legyenek zárva, mivel a nem megfelelően lezárt edényekből a PCR-amplifikáció során párolgás léphet fel. Fordítson különös figyelmet az edény széleinek, sarkainak lezárására!

8. Használati utasítások

Megjegyzés:

A szennyeződést gyakran a PCR-pipetták okozzák, ezért tanácsos ismerten szennyeződésmentes pipettát használni a minta PCR-reakciócellába való betöltéséhez, ideértve az NTC tesztet is.

1. Nyissa fel a fóliatasakat és megfelelően címkézze fel a csíkot; egy csík egy-nyolc minta vizsgálatához használható. Felnyitást követően a PCR-reakciócellákat 3 órán belül fel kell használni.
2. Minden egyes genotipizált DNS-minta esetében adjon 10 µl vizet vagy hígítót az NTC-csík egy reakciócellájába!
3. Amennyiben pozitív kontrollra van szükség, használjon 10 µl-t a 10 ng/µl humán genomikus DNS-ből! Ez 187 bp méretű pozitív tesztamplikont eredményez.
4. A mellékelt kupakkal zárja le a reakciócellákat, majd az alábbiaknak megfelelően állítsa be a szokásos SSPGo PCR-paramétereket!

ÚJRASZUSZPENDÁLÁSRA VONATKOZÓ MEGJEGYZÉS: ügyeljen arra, hogy a PCR-keverékeket a tálca fóliatasakból való kivétele után 3 órán belül újraszuszpendálja a mintákkal!

PCR-TÁLCA/-CSÍK MAGASSÁGÁRA VONATKOZÓ MEGJEGYZÉS: javasoljuk, hogy a tálcák és a csíkok magassága egyenlő legyen, amennyiben ugyanabba a PCR-készülékbe helyezi őket. Ha a magasság különböző, a tálca vagy a csík nem megfelelően érintkezik a PCR-készülék fűtött fedelével, ami gyenge vagy sikertelen PCR-amplifikációt okozhat.

PCR-paraméterek

Az alábbi PCR-paramétereket kell használni. Gondoskodjon arról, hogy a ramp- (*felfűtési/hűtési*) sebesség legalább 1 Celsius-fok legyen másodpercenként, és kapcsolja be a fedélfűtési funkciót! A teljes használati utasításért lásd a termocycler gyártójának felhasználói kézikönyvét! A termocyclereket az American Society of Histocompatibility and Immunogenetics ([*Amerikai Hisztokompatibilitási és Immunogenetikai Társaság*], ASHI) vagy a European Federation of Immunogenetics ([*Európai Immunogenetikuskok Társasága*], EFI) akkreditációs szabályainak megfelelően kell kalibrálni.

Denaturálás	94°C	5 perc		
Denaturálás	96°C	15 másodperc	←	10 ciklus
Kapcsolódás (<i>annealing</i>)	66°C	50 másodperc		
Meghosszabbítás	72°C	30 másodperc		
Denaturálás	96°C	15 másodperc	←	20 ciklus
Kapcsolódás (<i>annealing</i>)	64°C	50 másodperc		
Meghosszabbítás	72°C	30 másodperc		
TARTÁS („HOLD”)	15°C			

Gél-elektroforézis

A következő utasítások a horizontális agaróz gél-elektroforézisre vonatkoznak: készítse el 2% agaróz gélt 0,5x TBE pufferben! Amikor a gél lehűlt kb. 60 Celsius-fokra, adjon hozzá etídium-bromidot a 0,5 µg/ml-es végső koncentráció elérése céljából! Töltse ki a gélt, és helyezze be a mikrotiter fésűket (pl. 12x8 cella 9 mm-es sortávolsággal)! A gél megszilárdulása után vegye ki a fésűket, és öntsön a gélre 0,5x TBE puffert, úgy, hogy az befedje a gélt! A tálcákon vagy a csíkokon lévő reakciócellákból tegyen át minimum 5, maximum 10 µl-t a gélen lévő megfelelő cellába; jegyezze fel az egyes cellák pozícióját! 100 bp létra hasznos lehet a méretmeghatározáshoz. Futtassa a gélt 20 percig 10 V/cm feszültség mellett!

A készülékre vonatkozó részletekért lásd az elektroforézis készülék gyártójának használati utasításait! A gélek megjelenítéséhez képpalkotó berendezésként UV-transzilluminátoros UV-géldokumentációs rendszert kell használni.

9. Értelmezés

Az e használati utasítás 6. oldalán található Mintaadat táblázat segítségével jegyezze fel az eredményeket! Amennyiben SSPGo termékekből származó PCR- vagy DNS-szennyeződés áll fenn, 187 bp méretű amplicon figyelhető meg. Ettől eltérő méretű foltok vagy sávok megjelenése szintén PCR-szennyeződésre utalhat, a 100 bp-nál kisebb kiterjedésű primer-dimer és egyéb primer extenziós képződményeket azonban figyelmen kívül kell hagyni. A hígítóminta esetében kapott pozitív eredmény azt jelzi, hogy a minta esetében végzett genotipizálás érvénytelen, és más reagensek felhasználásával másik DNS-mintával meg kell ismételni.

10. Minőségbiztosítás és -ellenőrzés

Tesztellenőrzés: egy Biofortuna készletből származó PCR-amplicont először hígítatlan, majd 1×10^1 - 1×10^{15} arányú hígításokban vizsgáltunk az NTC teszttel. Az amplicon kimutatható volt maximum 1×10^{15} arányú hígításokban.

A gDNS-t először 100 ng/ μ l-es hígításban, majd 1×10^1 - 1×10^{15} arányú hígításokban vizsgáltuk az NTC teszttel. A DNS kimutatható volt maximum 1×10^3 arányú hígításokban.

11. Irodalomjegyzék

- 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 teszt: Mintaadatlap

Ajánljuk, hogy ezt a mintaadatlapot felhasználás előtt fénymásolja le, mivel a NTC készlet 96 minta (tizenkét csík / nyolc vizsgálat) vizsgálatára elegendő.

1. minta leírása: _____

2. minta leírása: _____

3. minta leírása: _____

4. minta leírása: _____

5. minta leírása: _____

6. minta leírása: _____






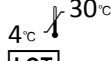


7. minta leírása: _____

8. minta leírása: _____

NTC mintaadat

Reakciócella	Festék	Mintaazonosító	Vizsgálat ideje	Eredmény
1	Vörös			
2	Lila			
3	Lila			
4	Lila			
5	Lila			
6	Lila			
7	Lila			
8	Lila			

13. Jelmagyarázat

	Vizsgálatok száma
	Olvassa el a használati utasításokat!
	Gyártás helye
	<i>In vitro</i> diagnosztikum
	Lejárat napja
	Tárolási hőmérséklet
	Tételszám
	Katalógusszám

14. A gyártó kapcsolattartási információi

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. Fordítások

Française:	Traductions disponibles
Deutsch:	Übersetzungen verfügbar
Español:	Traducciones disponibles
Italiano:	Traduzioni disponibili
České:	Překlady k dispozici
Danske:	Tilgængelige oversættelser
Ἑλληνες:	διαθέσιμες μεταφράσεις
Magyar:	Fordítás rendelkezésre áll
Norske:	Oversettelser tilgjengelig
Polska:	Dostępne tłumaczenia
Português:	Traduções disponíveis
Россия:	Переводы доступны
Slovenskému:	Preklady k dispozícii
Türk:	Çeviriler mevcut
Svenska:	Översättningar tillgängliga

www.biofortuna.com