



**Istruzioni per l'uso del Biofortuna SSPGo™ HLA No Template Control
Kit BF-40-02**

Versione 1

Luglio 2011

1. Finalità d'uso

Il Biofortuna SSPGo No Template Control (NTC) Kit contiene test aggiuntivi per rilevare la contaminazione da ampliconi di PCR e va usato insieme ai kit Biofortuna SSPGo che non hanno un NTC incluso nelle piastre di reazione.

2. Introduzione

La PCR è una tecnica sensibile, che può subire la contaminazione da ampliconi di DNA provenienti da una PCR precedente. La contaminazione può indurre all'amplificazione di falsi positivi nelle successive reazioni di PCR, dando luogo ad una genotipizzazione non corretta. L'amplicone di PCR può contaminare reagenti e campioni, ma anche l'attrezzatura di laboratorio, ad esempio le pipette. I reagenti e l'attrezzatura di laboratorio vanno monitorati regolarmente, per rilevare eventuali segni di contaminazione. Il test NTC Test viene utilizzato per rilevare la contaminazione da prodotto di PCR o da DNA potenzialmente presente nel diluente del DNA usato per analizzare i campioni.

3. Descrizione del test

Ciascun SSPGo No Template Control Kit è costituito da 12 strisce di 8 reazioni di PCR, contenenti: tampone di PCR, Taq polimerasi e primer specifici per il gene HLA-DRA liofilizzati a freddo e produrrà un amplicone di 187bp dal DNA genomico umano o DNA amplificato. Poiché tutti i kit Biofortuna utilizzano l'amplicone DRA come controllo interno, qualsiasi contaminazione provocata dall'uso dei kit Biofortuna SSPGo presenterà una co-amplificazione del gene DRA e verrà rilevata dai primer del test NCT.

4. Contenuto dei kit

- 12 strisce con 8 reazioni di PCR, contenenti ciascuna 10 µl di primer Taq polimerasi, dNTP* e tampone liofilizzati a freddo e precedentemente dispensati. Il formato delle strisce a otto pozzetti è illustrato di seguito.

Reazione	Colorante	Uso
1	Rosso	Controllo privo di templatato: campione 1
2	Porpora	Controllo privo di templatato: campione 2
3	Porpora	Controllo privo di templatato: campione 3
4	Porpora	Controllo privo di templatato: campione 4
5	Porpora	Controllo privo di templatato: campione 5
6	Porpora	Controllo privo di templatato: campione 6
7	Porpora	Controllo privo di templatato: campione 7
8	Porpora	Controllo privo di templatato: campione 8

- 12x8 tappi PCR
- 1x istruzioni d'uso
- 1x certificato di analisi
- Le schede MSDS possono essere scaricate dal sito Biofortuna www.biofortuna.com. Nel caso non si riesca ad ottenere questi documenti dal sito, contattare il proprio distributore locale.

*CleanAmp™ dNTPs sono concessi in licenza da Trilink Biotechnologies Inc per l'uso con i prodotti Biofortuna SSPGo.



5. Reagenti e materiali non forniti

- Pipette e puntali per pipette appropriati, per es. pipetta P10 con puntali filtro da 10 µl.
- Kit/dispositivo di isolamento del DNA.
- Spettrofotometro UV.
- Acqua sterile di grado molecolare.
- Termociclatore a 96 pozzetti con coperchio riscaldato. Le piastre e le provette per la PCR nei kit Biofortuna sono state validate per l'uso con la maggior parte dei termociclatori disponibili in commercio, compresi i termociclatori MJ Research PTC-100, PTC-200, Hybaid MBS e Techne TC-512. Modelli differenti potrebbero richiedere una ulteriore validazione da parte dell'operatore.
- Reagenti per elettroforesi su gel (agarosio, 0,5x TBE, marcatore di peso molecolare di DNA 1000 bp, 10 mg/ml di bromuro di etidio).
- Attrezzatura per elettroforesi su gel (vasche per il gel, alimentazione elettrica, sistema di documentazione gel con transilluminatore UV).

6. Avvertenze e precauzioni

- I test devono essere eseguiti solamente da personale specializzato.
- Trattare tutti i reagenti in base alle norme di buona pratica di laboratorio.
- Le aree di pre e post-PCR devono essere mantenute separate. I materiali di post-PCR non devono essere portati nuovamente nell'area di pre-PCR.
- **Avvertenza rischio biologico:** trattare tutti gli emoderivati come potenzialmente infettivi.
- **Avvertenza rischio biologico:** il bromuro di etidio è un potenziale cancerogeno. Se impiegato, indossare sempre guanti, camice da laboratorio e occhiali protettivi.
- **Avvertenza rischio biologico:** fare attenzione quando si usano fonti UV - indossare sempre guanti, camice da laboratorio e occhiali protettivi. Evitare di guardare direttamente la fonte di luce UV.
- Le schede di sicurezza dei componenti (Material Safety Data Sheets, MSDS) sono disponibili sul sito www.biofortuna.com.

7. Conservazione e stabilità

I kit Biofortuna SSPGo possono essere conservati a 4-30°C. Una volta rimosse le strisce o le piastre per la PCR dai sacchetti, i reagenti devono essere reidratati con il campione entro 3 ore. Per la data di scadenza fare riferimento a quanto riportato sulla confezione. Non utilizzare i prodotti successivamente alla data indicata.

I kit non devono essere usati nel caso il sacchetto sia strappato o perforato.

Assicurarsi dopo aver aggiunto il DNA che le strisce o le piastre per la PCR siano sigillate ermeticamente onde evitare l'evaporazione durante l'amplificazione PCR. Fare particolare attenzione ai lati e agli angoli.

8. Indicazioni d'uso

Nota:

Una fonte frequente di contaminazione sono le pipette utilizzate per la PCR, pertanto si consiglia di utilizzare una pipetta non contaminata per caricare i campioni nelle reazioni per la PCR, incluso il test NTC.

1. Aprire il sacchetto ed etichettare in maniera appropriata; una striscia può essere usata per analizzare da uno a otto campioni. Una volta aperte, le reazioni PCR vanno utilizzate entro 3 ore.
2. Per ciascun campione di DNA per cui si è eseguita la genotipizzazione, aggiungere 10 µl di acqua o diluente utilizzato ad una delle reazioni della striscia NTC.
3. Se è necessario un controllo positivo, utilizzare 10 µl di DNA genomico umano 10 ng/µl. Questo risulterà nell'amplificazione di un test positivo producendo un amplicone di 187bp.
4. Tappare le reazioni con i tappi forniti e procedere con i normali parametri SSPGo PCR illustrati di seguito.

NOTA SULLA RISOSPENSIONE: assicurarsi che le miscele PCR siano risospese con i campioni entro tre ore dalla rimozione del vassoio dal sacchetto.

NOTA SUL CORRETTO PROFILO D'ALTEZZA DELLA STRISCIA/PIASTRA DI PCR: se si posizionano le piastre e le strisce nello stesso dispositivo per la PCR si raccomanda di posizionarle in modo che il profilo dell'altezza sia equivalente. Profili di altezza differenti potrebbero causare un contatto impreciso con il coperchio riscaldato dei dispositivi per la PCR. L'amplificazione PCR potrebbe risultare scarsa o non avvenire.

Parametri PCR

Utilizzare i seguenti parametri per la reazione di PCR. Assicurarsi che le velocità della rampa siano di almeno 1°C al secondo e attivare il coperchio riscaldato. Per informazioni d'uso complete fare riferimento al manuale d'impiego del fabbricante del termociclatore. I termociclatori devono essere calibrati in accordo alle regole di accreditamento dell'American Society of Histocompatibility and Immunogenetic (ASHI) o dell'European Federation of Immunogenetics (EFI).

Denaturazione	94°C	5 minuti		
Denaturazione	96°C	15 secondi	←	10 cicli
Appaiamento	66°C	50 secondi		
Estensione	72°C	30 secondi		
Denaturazione	96°C	15 secondi	←	20 cicli
Appaiamento	64°C	50 secondi		
Estensione	72°C	30 secondi		
MANTENERE	15°C			

Elettroforesi su gel

Le seguenti istruzioni si riferiscono all'elettroforesi orizzontale su gel di agarosio. Preparare il gel di agarosio al 2% in tampone 0,5x TBE. Una volta raffreddatosi intorno ai 60°C dispensare bromuro di etidio raggiungendo una concentrazione finale di 0,5 µg/ml. Allestire il gel inserendo i pettini da microtitolazione (per es. 12x8 pozzetti con spazi di 9 mm). Una volta sistemato, rimuovere i pettini e immergere il gel in tampone 0,5x TBE. Trasferire da un minimo di 5 µl e un massimo di 10 µl da ciascuna piastra o striscia di reazione nel pozzetto corrispondente sul gel annotando la posizione di ciascuna reazione. Per determinare la dimensione dei prodotti di reazione, può essere di ausilio l'utilizzo di una scala da 100 bp. Far correre il gel per 20 minuti a 10 V/cm.

Per dettagli specifici relativi all'attrezzatura, fare riferimento alle istruzioni d'uso del fabbricante del sistema di elettroforesi. I gel dovrebbero essere archiviati utilizzando un sistema di acquisizione di immagini con transilluminatore ad UV.

9. Interpretazione

Annotare i risultati utilizzando la tabella riportata a pagina 6 delle presenti istruzioni d'uso. Se è presente una contaminazione da PCR SSPGo o del DNA, si osserverà un amplicone di 187bp. Eventuali strisce di amplificato (smears) o bande di ampiezza diversa possono anche indicare una contaminazione da PCR, ma i dimeri di primer e altri artefatti di estensione dei primer inferiori a 100 bp devono essere ignorati. Un risultato positivo per qualsiasi campione di diluente indica che la genotipizzazione del campione non è valida e deve essere ripetuta con un altro campione di DNA, utilizzando reagenti diversi.

10. Garanzia di qualità e controllo

Analisi del test: utilizzando un amplicone di PCR proveniente da un kit Biofortuna, è stato eseguito il test NTC Test con l'amplicone non diluito e quindi con diluizioni da 1×10^1 a 1×10^{15} . L'amplicone è stato rilevato nelle diluizioni fino a 1×10^{15} .

Il test NTC è stato eseguito con gDNA a $100 \text{ ng}/\mu\text{l}$ e quindi con diluizioni da 1×10^1 a 1×10^{15} . Il DNA è stato rilevato nelle diluizioni fino a 1×10^3 .

11. Bibliografia

- 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. Registro dei campioni Biofortuna NTC

Si raccomanda di fotocopiare il presente registro prima di utilizzarlo, in quanto è possibile eseguire il test NCT su 96 campioni (dodici strisce di otto test).

Descrizione campione 1 _____

Descrizione campione 2 _____

Descrizione campione 3 _____

Descrizione campione 4 _____

Descrizione campione 5 _____

Descrizione campione 6 _____

Descrizione campione 7 _____









Descrizione campione 8 _____

Registro campione NTC

Reazione	Colorante	ID del campione	Data del test:	Risultato
1	Rosso			
2	Porpora			
3	Porpora			
4	Porpora			
5	Porpora			
6	Porpora			
7	Porpora			
8	Porpora			



13. Legenda dei simboli utilizzati

	Numero di test
	Consultare le istruzioni per l'uso
	Sito di produzione
	Diagnostico in vitro
	Data di scadenza
	Temperatura di conservazione
	Numero di lotto
	Numero di catalogo

14. Indirizzo fabbricante

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. Traduzioni

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