



**Bruksanvisning for Biofortuna SSPGo™ HLA No Template Control Kit
BF-40-02**

Versjon 1

Juli 2011

1. Bruksområde

Biofortuna SSPGo No Template Control (NTC) Kit inneholder tilleggsanalyser for PCR-amplikonkontaminering til bruk sammen med Biofortuna SSPGo-kit som ikke har integrert NTC.

2. Innledning

PCR er en sensitiv teknikk som er utsatt for kontaminering med DNA-amplikon fra en tidligere PCR. Kontaminering kan føre til falsk positiv amplifikasjon i etterfølgende PCR-er, noe som kan gi uriktig genotyping. PCR-amplikon kan kontaminere reagenser og prøver samt laboratorieutstyr som pipetter. Reagenser og utstyr bør kontrolleres jevnlig med hensyn til tegn på kontaminering. NTC-analysen brukes til å oppdage potensiell PCR- eller DNA-kontaminering i DNA-fortynningsmiddelet som benyttes til en analyseprøve.

3. Analysebeskrivelse

Hvert SSPGo No Template Control-kit består av 12 strips med 8 PCR-reaksjoner som inneholder frysetørket PCR-buffer, polymerase og primere som er spesifikke for HLA-DRA-genet, og vil produsere et 187 bp amplikon av humant genomisk DNA eller amplifisert DNA. Alle Biofortuna-kit benytter et DRA-amplikon som intern kontroll. Eventuell kontaminering fra bruk av Biofortuna SSPGo-kit vil derfor vise koamplifikasjon av DRA-genet og bli oppdaget av NTC-analyseprimerne.

4. Innholdet i kitet

- 12 strips med 8 PCR-reaksjoner. Hver reaksjon inneholder 10 µl forhåndsdispenserte frysetørkede primere, polymerase, dNTP-er* og buffer. Stripsformatet med åtte reaksjoner er angitt nedenfor.

Reaksjon	Farge	Bruk
1	Rød	Ikke-templatkontroll: prøve 1
2	Lilla	Ikke-templatkontroll: prøve 2
3	Lilla	Ikke-templatkontroll: prøve 3
4	Lilla	Ikke-templatkontroll: prøve 4
5	Lilla	Ikke-templatkontroll: prøve 5
6	Lilla	Ikke-templatkontroll: prøve 6
7	Lilla	Ikke-templatkontroll: prøve 7
8	Lilla	Ikke-templatkontroll: prøve 8

- 12 x 8 PCR-lokk
- 1 bruksanvisning
- 1 analysesertifikat
- Sikkerhetsdatabladet kan lastes ned fra Biofortunas nettsted www.biofortuna.com. Hvis du ikke klarer å laste ned fra nettsiden, ber vi deg om å kontakte din lokale distributør.

*CleanAmp™ dNTP-er er lisensiert fra Trilink Biotechnologies Inc til bruk i Biofortuna SSPGo-produkter.

5. Reagenser og utstyr som ikke følger med

- Egnede pipetter og sterile spisser, f.eks. P10-pipette med 10 µl-filterspisser.
- DNA-isolasjonskit/-utstyr.
- UV-spektrofotometer.
- Sterilt vann av molekylærbiologisk kvalitet.
- 96-brønners termosyklusere med oppvarmet lokk. PCR-plater og rør til Biofortuna-kit er godkjent til bruk med de fleste termosyklusere på markedet, bl.a. MJ Research PTC-100, PTC-200, Hybaid MBS og Techne TC-512. Ulike modeller kan kreve ytterligere validering fra brukeren.
- Gelelektroforese-reagenser (agarose, 0,5 x TBE, 1000 bp DNA molekylærvektmarkør, 10 mg/ml etidiumbromid).
- Gelelektroforese-utstyr (gelkar, strømforsyning, geldokumentasjonssystem med UV-transilluminator).

6. Sikkerhet og advarsler

- Analysene skal bare utføres av personell med riktig opplæring.
- Håndter alle reagenser i samsvar med god laboratoriepraksis.
- Hold pre- og post-PCR-områder adskilt. Ikke ta med post-PCR-materiale tilbake til pre-PCR-området.
- **Biologisk fare:** Behandle alle blodprodukter som potensielt smittefarlige.
- **Biologisk fare:** Etidiumbromid er et potensielt karsinogen. Hvis det brukes, må brukeren ha på hansker, laboratoriefrakk og vernebriller.
- **Biologisk fare:** Vær forsiktig ved bruk av UV-kilder – ha alltid på hansker, laboratoriefrakk og vernebriller. Se aldri direkte på UV-lyskilden.
- Sikkerhetsdatablader kan fås fra www.biofortuna.com.

7. Oppbevaring og stabilitet

Biofortuna SSPGo-kit skal oppbevares ved 4–30 °C. Når PCR-kyvettene er tatt ut av folieposene, skal reagensene rehydreres med prøve innen 3 timer. Utløpsdatoen er angitt på emballasjen. Ikke bruk produkter som er gått ut på dato.

Ikke bruk kitet hvis folieposen er revet opp eller det er hull i den.

Sørg for at PCR-kyvettene blir tett forseglet når DNA-et har blitt tilsatt, siden det ellers kan oppstå fordampning under PCR-amplifikasjonen. Vær spesielt nøye med kanter og hjørner.

8. Instruksjoner for bruk

Merk:

En vanlig kontamineringskilde er PCR-pipetter, og det anbefales å overføre prøvemateriale til PCR-reaksjonene, inkludert denne NTC-analysen, med en kjent, kontamineringsfri pipette.

1. Åpne folieposen, og merk den på en hensiktsmessig måte. Én strips kan brukes til å analysere mellom én og åtte prøver. Når PCR-reaksjonene er åpnet, må de brukes innen 3 timer.
2. For hver DNA-prøve som er genotypet, tilsettes 10 µl vann eller fortynningsmiddel som brukes til én av NTC-stripsens reaksjoner.
3. Hvis en positiv kontroll er nødvendig, skal det brukes 10 µl av 10 ng/µl humant genomisk DNA. Dette vil gi et positivt 187 bp-amplikon.
4. Sett de medfølgende lokkene på reaksjonene, og fortsett med SSPGo PCR-standardparametrene som angitt nedenfor.

MERKNAD OM RESUSPENDERING: Se til at PCR-blandingene blir resuspendert med prøvene innen 3 timer fra brettet blir tatt ut av folieposen.

MERKNAD OM PCR-PLATENS/-STRIPSENS HØYDEPROFIL: Det anbefales at platenes og stripsenes høydeprofil er den samme når de plasseres i den samme PCR-maskinen. Ulike høydeprofiler kan forårsake dårlig kontakt med PCR-maskinens oppvarmede lokk. Det kan resultere i dårlig eller mislykket PCR-amplifikasjon.

PCR-parametre

Følgende PCR-parametre skal brukes: Se til at stigetiden (ramp speed) er minst 1 °C per sekund, og aktiver det oppvarmede lokket. Fullstendig bruksanvisning finnes i termosyklusproduzentens bruksanvisning. Termosyklere skal kalibreres i samsvar med akkrediteringsreglene fra American Society of Histocompatibility and Immunogenetic (ASHI) eller European Federation of Immunogenetics (EFI).

Denaturering	94 °C	5 minutter		
Denaturering	96 °C	15 sekunder	←	10 sykluser
Annealing	66 °C	50 sekunder		
Elongering	72 °C	30 sekunder		
Denaturering	96 °C	15 sekunder	←	20 sykluser
Annealing	64 °C	50 sekunder		
Elongering	72 °C	30 sekunder		
HOLD	15 °C			

Gelelektroforese

Disse instruksjonene gjelder bare horisontal agarosegelelektroforese: Forbered en 2 % agarosegel i 0,5 x TBE-buffer. Når gelen er avkjølt til ca. 60 °C, tilsettes etidiumbromid til en endelig konsentrasjon på 0,5 µg/ml. Støp gelen og sett inn mikroplatekammer (f.eks. 12 x 8 brønner med 9 mm mellomrom). Når gelen er stivnet, fjernes kammene, og gelen dekket med 0,5 x TBE-buffer. Overfør minimum 5 µl og maksimum 10 µl fra hver brett- eller stripsreaksjon til den tilsvarende brønnen på gelen, og noter hvor hver reaksjon befinner seg. En 100 bp-ladder kan være til hjelp når størrelsen skal bestemmes. Kjør gelen ved 10 V/cm i 20 minutter.

Se bruksanvisningen fra produsenten av elektroforesesystemet for spesifikke opplysninger om utstyret. Gelene fotograferes med et UV-geldokumentasjonssystem med UV-transilluminator.

9. Tolkning

Noter resultatene i prøvetabellen på side 6 i denne bruksanvisningen. Et 187 bp-amplikon observeres hvis det foreligger SSPGo PCR-kontaminering eller DNA-kontaminering. Smears eller bånd av forskjellige størrelser kan også tyde på PCR-kontaminering, men primer-dimer og andre primerutvidelsesartefakter på mindre enn 100 bp bør ignoreres. Et positivt resultat for en fortynningsprøve viser at genotypingen av den aktuelle prøven er ugyldig og bør gjentas med en annen DNA-prøve ved hjelp av andre reagenser.

10. Kvalitetssikring og -kontroll

Analysetesting: Med PCR-amplikon fra et Biofortuna-kit ble NTC-analysen utført på amplikonet ufortynnet og deretter i fortynninger fra 1×10^1 til 1×10^{15} . Amplikonet ble påvist i fortynninger opp til og med 1×10^{15} .

NTC-analysen ble utført på gDNA ved 100 ng/ μ l og deretter i fortynninger fra 1×10^1 til 1×10^{15} . DNA-et ble påvist i fortynninger opp til 1×10^3 .

11. Referanser

- 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-prøveark

Det anbefales at dette prøvearket fotokopieres før bruk, siden NTC-kitet har nok analyser til 96 prøver (tolv strips med åtte analyser).

Beskrivelse av prøve 1.

Beskrivelse av prøve 2.

Beskrivelse av prøve 3.

Beskrivelse av prøve 4.

Beskrivelse av prøve 5.

Beskrivelse av prøve 6.









Beskrivelse av prøve 7.

Beskrivelse av prøve 8.

NTC-prøvetabell

Reaksjon	Farge	Prøve-ID	Analysedato	Resultat
1	Rød			
2	Lilla			
3	Lilla			
4	Lilla			
5	Lilla			
6	Lilla			
7	Lilla			
8	Lilla			

14. Symbolforklaring

	Antall analyser
	Se bruksanvisning
	Produksjonssted
	<i>In vitro</i> -diagnostikk
	Utløpsdato
 4°C → 30°C	Oppbevaringstemperatur
	Lotnummer
	Katalognummer

15. Produsentens kontaktopplysninger

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



16. Oversettelser

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

