



**Instrukcja używania zestawu kontroli ujemnej przy typowaniu
antygenów zgodności tkankowej HLA SSPGo™ firmy Biofortuna
(Biofortuna SSPGo™ HLA No Template Control Kit BF-40-02)**

wersja 1.

lipiec 2011

1. Przeznaczenie

Zestaw Biofortuna SSPGo No Template Control (NTC) Kit zawiera dodatkowe testy do wykrywania kontaminacji amplikonami PCR, przeznaczone do użytku wraz z testami SSPGo firmy Biofortuna, które nie zawierają tzw. „kontroli bez matrycy” (NTC), czyli kontroli ujemnej.

2. Wprowadzenie

PCR jest czułą techniką podatną na kontaminację amplikonami DNA pochodzącymi z wcześniejszych reakcji PCR. Zanieczyszczenie może być przyczyną uzyskiwania fałszywie dodatnich wyników amplifikacji w kolejnych reakcjach PCR, co z kolei może prowadzić do uzyskania nieprawidłowych wyników genotypowania. Amplikony powstałe w wyniku reakcji PCR mogą powodować kontaminację odczynników i badanych próbek, jak również sprzętu laboratoryjnego, np. pipet. Dlatego też odczynniki i sprzęt laboratoryjny należy regularnie monitorować pod względem kontaminacji. Test NTC jest stosowany do wykrywania potencjalnej kontaminacji produktem reakcji PCR lub próbką DNA w rozcieńczalniku DNA stosowanym do rozcieńczania badanej próbki.

3. Opis testu

Każdy test SSPGo No Template Control składa się z 12 pasków z 8 probówkami do reakcji PCR, zawierającymi bufor PCR poddany suszeniu sublimacyjnemu, polimerazę i primery swoiste dla genu HLA-DRA, gdzie powstaną amplikony o wielkości 187 pz z ludzkiego genomowego DNA lub zamplifikowanego DNA. Ze względu na fakt, iż wszystkie zestawy firmy Biofortuna wykorzystują amplikony DRA jako kontrolę wewnętrzną, wszelkie zanieczyszczenia wynikające ze stosowania zestawów Biofortuna SSPGo będą posiadały zamplifikowany gen DRA i zostaną wykryte przez primery testu NTC.

4. Zawartość zestawu

- 12 pasków po 8 probówek do reakcji PCR, z których każda zawiera po 10 µl uprzednio dodanych primerów poddanych suszeniu sublimacyjnemu, polimerazę, dNTP* oraz bufor. Poniżej pokazano schemat paska dla ośmiu probówek reakcyjnych.

Probówka reakcyjna	Barwnik	Zastosowanie
1	czzerwony	kontrola ujemna: próbka nr 1
2	purpurowy	kontrola ujemna: próbka nr 2
3	purpurowy	kontrola ujemna: próbka nr 3
4	purpurowy	kontrola ujemna: próbka nr 4
5	purpurowy	kontrola ujemna: próbka nr 5
6	purpurowy	kontrola ujemna: próbka nr 6
7	purpurowy	kontrola ujemna: próbka nr 7
8	purpurowy	kontrola ujemna: próbka nr 8

- 12x8 wieczek do pasków PCR
- 1 instrukcja użytkowania
- 1 certyfikat badania (*Certificate of Analysis*)
- Karty charakterystyki można pobrać ze strony internetowej firmy Biofortuna: www.biofortuna.com. Jeśli pobranie tych danych ze strony internetowej nie powiedzie się, prosimy o kontakt z lokalnym dystrybutorem.

*CleanAmp™ dNTP zostały wykorzystane w produktach SSPGo firmy Biofortuna na mocy licencji udzielonej przez firmę Trilink Biotechnologies Inc.

5. Niedostarczone odczynniki i sprzęt

- odpowiednie pipety i jałowe końcówki, np. pipeta P10 z końcówkami o obj. 10 µl z filtrami
- zestaw/sprzęt do izolacji DNA
- spektrofotometr UV
- jałowa woda o stopniu czystości Molecular Grade
- 96-dołkowy termocykler z pokrywą grzejącą. Płytki i probówki PCR stosowane w zestawach firmy Biofortuna posiadają walidację do stosowania w większości termocyklerów dostępnych na rynku, jak np. termocyklery MJ Research PTC-100, PTC-200, Hybaid MBS oraz Techne TC-512. Inne modele mogą wymagać dalszej walidacji przez użytkownika.
- odczynniki do elektroforezy żelowej (agarozą, bufor 0,5x TBE, marker masy cząsteczkowej do analizy fragmentów DNA o wielkości 1000 pz, bromek etydyny o stężeniu 10 mg/ml)
- sprzęt do elektroforezy żelowej (saneczki na żel, zasilacz, system do dokumentacji żeli z transiluminatorem UV)

6. Środki bezpieczeństwa i ostrzeżenia

- Testy powinny być wykonywane wyłącznie przez odpowiednio przeszkolony personel.
- Ze wszystkimi odczynnikami należy obchodzić się zgodnie z zasadami dobrej praktyki laboratoryjnej.
- Czynności poprzedzające reakcję PCR oraz następujące po niej należy wykonywać w osobnych pomieszczeniach. Nie należy przenosić materiałów używanych po zakończeniu reakcji PCR z powrotem do pomieszczenia, gdzie wykonywane były czynności poprzedzające reakcję PCR.
- **Ostrzeżenie o zagrożeniu biologicznym:** Wszystkie preparaty krwiopochodne należy traktować jako potencjalnie zakaźne.
- **Ostrzeżenie o zagrożeniu biologicznym:** Bromek etydyny jest substancją potencjalnie rakotwórczą. W przypadku jego stosowania należy zawsze nosić rękawiczki, fartuch laboratoryjny oraz okulary ochronne.
- **Ostrzeżenie o zagrożeniu biologicznym:** Należy zachować ostrożność podczas stosowania źródeł promieniowania UV - należy zawsze nosić rękawiczki, fartuch laboratoryjny oraz okulary ochronne. Nigdy nie należy patrzeć bezpośrednio w źródło światła UV.
- Karty charakterystyki są dostępne na stronie internetowej www.biofortuna.com.

7. Przechowywanie i stabilność

Zestawy Biofortuna SSPGo można przechowywać w temp. 4-30 °C. Odczynniki powinny być ponownie nawodnione poprzez dodanie próbek w ciągu 3 godzin po wyjęciu naczynek PCR z foliowych woreczków. Data ważności jest podana na opakowaniu. Nie stosować produktów po upływie daty ważności podanej na opakowaniu.

Nie stosować zestawów, jeśli woreczek foliowy jest rozdarty lub podziurawiony.

Należy upewnić się, czy po dodaniu DNA naczynka PCR są szczelnie zamknięte, w przeciwnym razie może dojść do parowania próbek podczas amplifikacji PCR. Należy zwracać szczególną uwagę na krawędzie i rogi naczynek.

8. Sposób użycia

Uwaga:

Częstym źródłem kontaminacji są pipety stosowane do nastawiania reakcji PCR, dlatego też, również w teście NTC, w celu nanoszenia próbek do probówek PCR zaleca się stosować pipety, o których wiadomo, że nie zostały zanieczyszczone.

1. Otworzyć foliowy woreczek i odpowiednio go oznaczyć. Jeden pasek można stosować do badania od jednej do ośmiu próbek. Probówki do PCR powinny być użyte w ciągu 3 godzin po otwarciu.
2. W przypadku każdej próbki DNA poddawanej genotypowaniu dodać 10 µl wody lub stosowanego rozcieńczalnika do jednej z reakcji na pasku kontroli NTC.
3. Jeśli wymagana jest kontrola dodatnia, dodać 10 µl ludzkiego genomowego DNA o stężeniu 10 ng/µl. W takim przypadku uzyska się wynik dodatni w postaci amplikonów o wielkości 187 pz.
4. Zamknąć probówki reakcyjne za pomocą dostarczonych wieczek i kontynuować badanie przy użyciu tradycyjnych parametrów reakcji PCR za pomocą zestawu SSPGo, jak pokazano poniżej.

KOMENTARZ DOTYCZĄCY TWORZENIA ZAWIESINY: Upewnić się, czy mieszaniny PCR utworzyły zawiesinę z badanymi próbkami w ciągu 3 godzin od wyjęcia płytki z foliowego woreczka.

KOMENTARZ DOTYCZĄCY WYSOKOŚCI PŁYTKI PCR/PROBÓWEK W PASKU: Zaleca się, aby wysokość płytek oraz probówek w paskach była taka sama, jeśli są wkładane do tego samego urządzenia do PCR. Różne wysokości mogą spowodować niewystarczający kontakt płytek lub probówek z pokrywą grzejną aparatu do PCR. Może to przyczynić się do zmniejszenia wydajności amplifikacji metodą PCR lub też jej braku.

Parametry reakcji PCR

Dla reakcji PCR należy stosować poniższe parametry. Upewnić się, czy parametr szybkości zmiany temperatury (ang. *ramp speed*) jest ustawiony na co najmniej 1 °C na sekundę, a następnie włączyć pokrywą grzejną. Pełne instrukcje dotyczące sposobu użycia, patrz instrukcja obsługi termocyklera. Termocyklery powinny być skalibrowane zgodnie z regułami akredytacyjnymi Amerykańskiego Towarzystwa Zgodności Tkankowej i Immunogenetyki (*American Society of Histocompatibility and Immunogenetic, ASHI*) lub Europejskiej Federacji Immunogenetyki (*European Federation of Immunogenetics, EFI*).

Denaturacja	94 °C	5 minut		
Denaturacja	96 °C	15 sekund	←	10 cykli
Annealing	66 °C	50 sekund		
Polimeryzacja	72 °C	30 sekund		
Denaturacja	96 °C	15 sekund	←	20 cykli
Annealing	64 °C	50 sekund		
Polimeryzacja	72 °C	30 sekund		

HOLD (utrzymanie temperatury) 15 °C

Elektroforeza żelowa

Poniższe wskazówki dotyczą elektroforezy poziomej na żelu agarozowym: Przygotować 2% żel agarozowy w buforze 0,5x TBE. Po schłodzeniu żelu do temperatury ok. 60 °C dodać bromek etydyny do uzyskania końcowego stężenia wynoszącego 0,5 µg/ml. Wylać żel i umieścić w nim grzebienie standardu „microtitre” (np. 12 x 8 zagłębień w odstępach 9 mm). Po zastygnięciu żelu wyjąć grzebienie i zalać żel buforem 0,5x TBE. Przenieść co najmniej 5 µl, lecz nie więcej niż 10 µl każdej reakcji z płytki lub paska probówek do odpowiedniego zagłębienia na żelu, zapisując położenie każdej reakcji. Do określania wielkości cząsteczek można skorzystać ze wzorca masy 100 pz. Prowadzić rozdział przez 20 minut w polu elektrycznym o natężeniu wynoszącym 10 V/cm.

Szczegółowe informacje na temat poszczególnych urządzeń/wyposażenia, patrz instrukcje użytkowania wytwórcy aparatu do elektroforezy. Obrazowanie żeli powinno być przeprowadzone przy użyciu systemu do dokumentacji żeli z transiluminatorem UV.



9. Interpretacja

Zapisać wyniki przy użyciu tabeli z danymi o próbce podanej na stronie 6 niniejszej ulotki. W przypadku obecności kontaminacji produktem PCR lub próbką DNA widoczne będą amplikony o wielkości 187 pz. Obecność wszelkich rozmazanych obrazów lub prążków o różnych rozmiarach także może wskazywać na kontaminację produktem reakcji PCR, natomiast obecność primerów-dimerów oraz innych artefaktów polimeryzacji primerów o wielkości mniejszej niż 100 pz należy zignorować. Wynik dodatni dla dowolnej próbki rozcieńczalnika wskazuje, że genotypowanie tej próbki jest nieważne i badanie należy powtórzyć z użyciem innej próbki DNA i innych odczynników.

10. Procedury zapewnienia i kontroli jakości

Badanie testu: Przy użyciu amplikonu PCR z zestawu firmy Biofortuna przeprowadzono test NTC na nierozcieńczonym amplikonie, a następnie na amplikonie w rozcieńczeniach od 1×10^1 do 1×10^{15} . Amplikon został wykryty w rozcieńczeniach do 1×10^{15} włącznie.

Test NTC przeprowadzono na genomowym DNA o stężeniu $100 \text{ ng}/\mu\text{l}$, a następnie w rozcieńczeniach od 1×10^1 do 1×10^{15} . DNA wykryto w rozcieńczeniach do 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. Test Biofortuna NTC - arkusz z danymi o próbce

Zaleca się, aby przed rozpoczęciem wykonywania testu NTC sporządzić kopie niniejszego arkusza, bowiem zestaw NTC jest przeznaczony do badania 96 próbek (dwanaście pasków po osiem testów).

Opis próbki nr 1 _____

Opis próbki nr 2 _____

Opis próbki nr 3 _____

Opis próbki nr 4 _____

Opis próbki nr 5 _____

Opis próbki nr 6 _____

Opis próbki nr 7 _____









Opis próbki nr 8 _____

Test NTC, dane o próbce

Probówka reakcyjna	Barwnik	ID próbki	Data przeprowadzenia badania	Wynik
1	czerwony			
2	purpurowy			
3	purpurowy			
4	purpurowy			
5	purpurowy			
6	purpurowy			
7	purpurowy			
8	purpurowy			



13. Objasnienia użytych symboli

	Liczba testów
	Sprawdź w ulotce.
	Miejsce produkcji
	Do diagnostyki <i>in vitro</i>
	Data ważności
	Temperatura przechowywania
	Numer partii
	Numer katalogowy

14. Dane kontaktowe wytwórcy

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



15. Tłumaczenia

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

