



**Instruções de utilização de Biofortuna SSPGo™ HLA No Template
Control Kit BF-40-02**

Versão 1

Julho 2011

1. Finalidade de uso

O Biofortuna SSPGo No Template Control (NTC) Kit contém testes suplementares para a detecção de contaminação no produto amplificado de PCR a ser utilizado em conjunto com os kits Biofortuna SSPGo que não possuem um NTC.

2. Introdução

A PCR é uma técnica sensível, susceptível à contaminação com produto amplificado de ADN de uma PCR anterior. A contaminação pode conduzir a uma amplificação falsa positiva nas PCRs subsequentes, podendo gerar uma genotipagem incorrecta. O produto amplificado de PCR pode contaminar reagentes e amostras, bem como equipamento laboratorial, como por exemplo, as pipetas. Deve-se verificar regularmente se os reagentes e o equipamento apresentam sinais de contaminação. O teste do NTC é utilizado para detectar potencial contaminação por PCR ou ADN no diluente de ADN utilizado para uma amostra de teste.

3. Descrição do teste

Cada kit SSPGo No Template Control é constituído por 12 tiras de 8 reacções PCR contendo tampão PCR liofilizado, polimerase e *primers* específicos para o gene HLA-DRA e irá produzir produto amplificado de 187 pb a partir de ADN de genoma humano ou ADN amplificado. Dado que todos os kits Biofortuna utilizam um produto amplificado de DRA como controlo interno, qualquer contaminação provocada pela utilização dos kits Biofortuna SSPGo terá uma co-amplificação do gene DRA e será detectada pelos *primers* dos testes de NTC.

4. Conteúdo do kit

- 12 Tiras de 8 reacções PCR, cada uma contendo 10 µl de *primers* liofilizados pré-dispensados, polimerase, dNTPs* e tampão. O formato da tira de oito poços de reacção é apresentado abaixo.

Reacção	Corante	Utilização
1	Vermelho	"No Template Control": Amostra 1
2	Roxo	"No Template Control": Amostra 2
3	Roxo	"No Template Control": Amostra 3
4	Roxo	"No Template Control": Amostra 4
5	Roxo	"No Template Control": Amostra 5
6	Roxo	"No Template Control": Amostra 6
7	Roxo	"No Template Control": Amostra 7
8	Roxo	"No Template Control": Amostra 8

- 12x8 tampas PCR
- 1x Instruções de utilização.
- 1x Certificado de análise
- As fichas de segurança dos materiais (MSDS) podem ser transferidas da página da Internet da Biofortuna: www.biofortuna.com. Se tiver problemas em aceder a estes documentos, por favor contactar o seu distribuidor local.

*Trilink Biotechnologies Inc licenciou a utilização de CleanAmp™ dNTPs com os produtos Biofortuna SSP Go.

5. Reagentes e equipamentos não fornecidos

- Pipetas e pontas de pipetas esterilizadas apropriadas, p. ex. Pipeta P10 com pontas com filtro de 10 µl.
- Kit/equipamento de isolamento de ADN.
- Espectrofotómetro de UV.
- Água ultrapura para utilização em biologia molecular.
- Termociclador de 96 poços com tampa aquecida. As placas e tubos para PCR utilizados nos kits Biofortuna foram validados para utilização com a maioria dos termocicladores disponíveis no mercado, incluindo os seguintes: MJ Research PTC-100, PTC-200, Hybaid MBS e Techne TC-512. Modelos diferentes poderão ter de ser validados pelo utilizador.
- Reagentes de electroforese em gel (agarose, TBE 0,5x, marcador de peso molecular de ADN de 1000 pb, 10 mg/ml de brometo de etídio).
- Equipamento de electroforese em gel (tinhas de gel, fonte de alimentação, sistema de documentação do gel com transiluminador de UV).

6. Avisos e segurança

- Os testes só devem ser realizados por pessoal devidamente treinado para o efeito.
- Todos os reagentes devem ser manuseados de acordo com as boas práticas de laboratório.
- Manter as zonas de pré- e pós-PCR separadas. Os materiais da zona pós-PCR não podem ser levados para a zona de pré-PCR.
- **Aviso de perigo biológico:** manusear todos os produtos sanguíneos como potencialmente infecciosos.
- **Aviso de perigo biológico:** o brometo de etídio é um potencial carcinogénico. Se for utilizado, devem utilizar-se sempre luvas, bata de laboratório e protecção ocular.
- **Aviso de perigo biológico:** tomar as devidas precauções ao utilizar fontes de luz UV - utilizar sempre luvas, bata de laboratório e protecção ocular. Nunca olhar directamente para a fonte de luz UV.
- As fichas de segurança dos materiais estão disponíveis em www.biofortuna.com.

7. Conservação e estabilidade

Os kits Biofortuna SSPGo devem ser conservados entre 4 a 30°C. Depois das cuvetes PCR serem retiradas das bolsas de alumínio os reagentes devem ser rehidratados no prazo de 3 horas. Consultar o prazo de validade na embalagem. Não utilizar os produtos após a data impressa.

Se a bolsa de alumínio estiver rasgada ou perfurada não utilizar os kits.

Assegurar que as cuvetes para PCR estão bem seladas após a adição do ADN para evitar a evaporação durante a amplificação PCR. Tomar especial atenção às extremidades e aos cantos.

8. Instruções de utilização

Nota:

As pipetas de PCR são uma fonte frequente de contaminação. Por essa razão, recomenda-se para a transferência da amostra para as reacções PCR, incluindo este teste NTC, a utilização de uma pipeta isenta de contaminação.

1. Abra correctamente a bolsa de alumínio e o rótulo. Uma tira pode ser utilizada para testar uma a oito amostras. Depois de abertas as reacções PCR devem ser utilizadas no prazo de 3 horas.
2. Para cada amostra de ADN genotipada adicione 10 µl da água ou diluente utilizado a uma das reacções da tira de NTC.
3. Se for necessário um controlo positivo, use 10 µl de ADN de genoma humano a 10 ng/µl. Isto irá gerar um produto amplificado de teste positivo de 187 pb.
4. Tape as reacções com as tampas fornecidas e prossiga com os parâmetros PCR SSPGo habituais, conforme indicado abaixo.

NOTA SOBRE RESSUSPENSÃO: assegurar que as misturas de PCR são ressuspensas com as amostras no prazo de 3 horas após a placa ser retirada da bolsa de alumínio.

NOTA SOBRE PERFIL DE ALTURA DA PLACA/TIRA PCR: recomenda-se que o perfil de altura das placas e tiras seja equivalente quando estas são colocadas no mesmo aparelho PCR. Perfis de altura diferentes podem originar mau contacto com a tampa aquecida dos aparelhos PCR. Isto pode dar origem a uma amplificação PCR falhada ou fraca.

Parâmetros PCR

Devem ser utilizados os seguintes parâmetros PCR. Assegurar velocidades de rampa de 1°C por segundo, no mínimo, e activar a tampa aquecida. Para obter instruções de utilização completas, consultar o manual de utilização do fabricante do termociclador. Os termocicladores devem ser calibrados de acordo com as regras de acreditação da *American Society of Histocompatibility and Immunogenetic (ASHI)* ou da *European Federation of Immunogenetics (EFI)*.

Desnaturar	94°C	5 minutos		
Desnaturar	96°C	15 segundos	←	10 ciclos
Hibridar	66°C	50 segundos		
Extensão	72°C	30 segundos		
Desnaturar	96°C	15 segundos	←	20 ciclos
Hibridar	64°C	50 segundos		
Extensão	72°C	30 segundos		
HOLD	15°C			

Electroforese em gel

Estas instruções aplicam-se à electroforese horizontal em gel de agarose: preparar um gel de agarose a 2% em tampão TBE 0,5x. Quando o gel tiver arrefecido e tiver atingido uma temperatura de aproximadamente 60°C adicionar brometo de etídio para obter uma concentração final de 0,5 µg/ml. Moldar o gel e inserir pentes de formato de microtitulação (p. ex. 12x8 poços com espaçamento de 9 mm). Quando o gel estiver consistente, retirar os pentes e cobrir o gel em tampão TBE 0,5x. Transferir um mínimo de 5 µl e um máximo de 10 µl de cada reacção da placa ou tira para o poço correspondente no gel, anotando a posição de cada reacção. Uma escala de 100 pb pode ser utilizada para ajudar a determinar o tamanho. Submeter o gel a 10 V/cm durante 20 minutos.

Para obter informações detalhadas sobre o equipamento, consultar as instruções de utilização do fabricante do sistema de electroforese. Os géis devem ser visualizados utilizando um sistema de documentação de gel UV com um transiluminador de UV.



9. Interpretação

Registe os resultados utilizando a tabela de registo de amostras da página 6 destas instruções de utilização. Irá observar-se produto amplificado de 187 pb se existir contaminação PCR ou contaminação com ADN. Manchas ou bandas de tamanho diferente também podem indicar contaminação PCR, mas o *primer-dimer* e outros artefactos de extensão do *primer* inferiores a 100 pb devem ser ignorados. Um resultado positivo numa amostra de diluente indica que a genotipagem dessa amostra é inválida e deve ser repetida com outra amostra de ADN utilizando reagentes diferentes.

10. Garantia e controlo de qualidade

Testes do ensaio: Utilizando produto amplificado PCR de um kit Biofortuna, efectuou-se um teste NTC no produto amplificado não diluído e em seguida em diluições de 1×10^1 a 1×10^{15} . O produto amplificado foi detectado em diluições $\leq 1 \times 10^{15}$.

O teste de NTC foi efectuado em gADN a $100 \text{ ng}/\mu\text{l}$ e, em seguida, em diluições de 1×10^1 a 1×10^{15} . O ADN foi detectado em diluições até 1×10^3 .

11. Referências

- 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. Ficha de registo de amostras de teste NTC Biofortuna

Recomenda-se que esta ficha de registo de amostras seja fotocopiada antes da utilização, uma vez que o kit NTC possui testes suficientes para 96 amostras (doze tiras de oito testes).

Descrição da amostra 1.

Descrição da amostra 2.

Descrição da amostra 3.

Descrição da amostra 4.

Descrição da amostra 5.

Descrição da amostra 6.






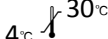


Descrição da amostra 7.

Descrição da amostra 8.

Registo de amostras NTC

Reacção	Corante	ID da amostra	Data do teste	Resultado
1	Vermelho			
2	Roxo			
3	Roxo			
4	Roxo			
5	Roxo			
6	Roxo			
7	Roxo			
8	Roxo			

13. Legenda dos símbolos utilizados

	Número de testes
	Consultar as instruções de utilização
	Local de fabrico
	Diagnóstico <i>in vitro</i>
	Prazo de validade
	Temperatura de conservação
	Número de lote
	Número de catálogo

14. Informação de contacto do fabricante

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. Traduções

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