



**Инструкции по использованию тест-системы Biofortuna SSPGo™  
HLA No Template Control Kit BF-40-02**

**Версия 1**

**Июль 2011**

## 1. Назначение

Набор Biofortuna SSPGo No Template Control (NTC) Kit содержит дополнительные тест-системы для определения контаминации ПЦР- ампликона и предназначены для использования совместно с наборами Biofortuna SSPGo, не содержащими NTC (контроля без матрицы).

## 2. Введение

ПЦР является чувствительной технологией, допускающей контаминацию продуктами амплификации (ампликонами, специфическими фрагментами ДНК) предыдущих процессов ПЦР. Контаминация может быть причиной ложноположительных амплификаций соответствующих реакций ПЦР, что может вести к некорректному генотипированию. Ампликон ПЦР может контаминировать реагенты и образцы, а также лабораторное оборудование и пипетки. Реагенты и оборудование необходимо регулярно проверять на наличие следов контаминации. Тест NTC используется для выявления потенциальной контаминации ПЦР или ДНК, присутствующей в дилуенте ДНК, используемом для исследуемого образца.

## 3. Описание теста

Каждый набор SSPGo No Template Control состоит из 12 стрипов по 8 реакций ПЦР, содержащих лиофилизированный буфер ПЦР, полимеразу и праймеры, специфические для гена HLA-DRA и продуцирующие ампликон 187bp из геномного ДНК или амплифицированного ДНК человека. Во всех наборах Biofortuna используется ампликон DRA в качестве мишени для праймеров внутреннего контроля, поэтому при любой контаминации от наборов Biofortuna SSPGo будет присутствовать ко-амплификация гена DRA.

## 4. Содержимое набора

- 12 стрипов, в каждой 8 реакций ПЦР, содержат 10 мкл предварительно расфасованных замороженных сухих праймеров, полимеразу, дНТФ\* и буфер. Формат восьми реакций показан ниже.

Реакция	Краситель	Использование
1	Красный	Контроль без матрицы: Образец 1
2	Фиолетовый	Контроль без матрицы: Образец 2
3	Фиолетовый	Контроль без матрицы: Образец 3
4	Фиолетовый	Контроль без матрицы: Образец 4
5	Фиолетовый	Контроль без матрицы: Образец 5
6	Фиолетовый	Контроль без матрицы: Образец 6
7	Фиолетовый	Контроль без матрицы: Образец 7
8	Фиолетовый	Контроль без матрицы: Образец 8

- 12x8 крышек ПЦР
- 1x Руководство по эксплуатации
- 1x Сертификат анализа
- Инструкцию по безопасному обращению с материалом (MSDS) можно получить на веб-сайте Biofortuna [www.biofortuna.com](http://www.biofortuna.com). Если вы не можете скачать с сайта, обратитесь к местному дистрибьютору.

\* дНТФ CleanAmp™ лицензированы Trilink Biotechnologies Inc для использования в продуктах Biofortuna SSPGo.

## 5. Не поставляемые реагенты и оборудование

- Соответствующие дозаторы и стерильные наконечники с фильтрами, напр., P10 и 10-мкл наконечники.
- Набор/оборудование для изоляции ДНК.
- Спектрофотометр в УФ.
- Деионизированная вода (Molecular Grade).
- Термоциклер, 96 лунок, с нагревающей крышкой. ПЦР-плашки и пробирки, поставляемые в наборах Biofortuna, подходят для большинства типов термоциклеров, представленных на рынке, включая MJ Research PTC-100, PTC-200, Hybaid MBS и Techne TC-512. Возможно, пользователю потребуется подтвердить использование других моделей.
- Реагенты для гель-электрофореза (агароза, 0,5x TBE, ДНК-маркер молекулярного веса 1000bp, 10 мг/мл Ethidium Bromide).
- Оборудование для гель-электрофореза (ёмкость для геля, источник питания, система гель-документации с прибором для УФ-просвечивания).

## 6. Безопасность и предупреждения

- Тесты должны проводиться только квалифицированными специалистами.
- Обращайтесь со всеми реагентами в соответствии с правилами лабораторной практики.
- Рабочие зоны лаборатории для пред- и пост-ПЦР стадий должны быть разделены. Не вносите никакие материалы стадии пост-ПЦР в зоны пробоподготовки и пред-ПЦР.
- **Предупреждение о биологической опасности:** Обращайтесь со всеми продуктами крови как с потенциально инфекционными.
- **Предупреждение о биологической опасности:** Бромид этидия является потенциальным канцерогеном. При его использовании всегда надевайте перчатки, лабораторный халат и защитные очки.
- **Предупреждение о биологической опасности:** При использовании источников УФ-излучения соблюдайте меры предосторожности - всегда надевайте перчатки, лабораторный халат и защитные очки. Никогда не смотрите без защитных очков на источник ультрафиолетового излучения.
- Таблицы факторов риска доступны на [www.biofortuna.com](http://www.biofortuna.com).

## 7. Хранение и стабильность

Храните наборы Biofortuna SSP Go kit при 4-30°C. После того как вы достали ячейки ПЦР из фольгированных пакетов, добавьте в реагенты образец в течение 3 часов. См. на упаковке срок годности. Не используйте продукты после истечения срока годности.

Не используйте наборы, если фольгированные пакеты порваны или проколоты.

Убедитесь в том, что ячейки ПЦР плотно закрыты после добавления ДНК, так как это может вести к испарению во время ПЦР-амплификации. Особо обратите внимание на края и углы.

## 8. Инструкции по использованию

### Примечание:

Частым источником контаминации являются пипетки ПЦР, при загрузке образца в ПЦР-реакции, включая этот тест NTC, рекомендуется использовать заведомо неконтаминированную пипетку.

1. Откройте пакет из фольги и соответственно пометьте его; с использованием одного стрипа можно исследовать от одного до восьми образцов. Используйте ПЦР-реакции в течение 3 часов после вскрытия.
2. Для каждого генотипируемого образца ДНК добавьте 10 мкл воды или дилуента в одну из реакций стрипа NTC.
3. Если требуется положительный контроль, используйте 10 мкл 10 нг/мкл геномного ДНК человека. В результате положительной амплификации будет генерироваться ампликон 187bp.
4. Закройте поставляемыми крышками реакции и продолжайте стандартный тест SSPGo PCR, как показано далее.

РЕСУСПЕНДИРОВАНИЕ, ПРИМЕЧАНИЕ: Смеси ПЦР должны быть ресуспендированы с образцами в течение 3 часов после извлечения плашки из пакета из фольги.

ПРОФИЛЬ ВЫСОТЫ ПЛАШЕК/СТРИПА ПЦР, ПРИМЕЧАНИЕ: Рекомендуется, чтобы высота плашек и стрипов при помещении их в одну и ту же машину ПЦР была одинаковой. Разные профили высоты могут вести к плохому контакту с нагретой крышкой машины ПЦР. Это может быть причиной слабой или ошибочной ПЦР амплификации.

### Параметры ПЦР

Следует использовать следующие параметры ПЦР. Скорость температурного нагрева должна составлять по крайней мере 1°C в секунду, подключите нагреваемую крышку. Подробные инструкции по использованию находятся в руководстве по эксплуатации производителя термоциклера. Термоциклер должен быть откалиброван в соответствии с правилами аккредитации Американского общества гистосовместимости и иммуногенетики (American Society of Histocompatibility and Immunogenetic) (ASHI) или Европейской федерации иммуногенетики (European Federation of Immunogenetics) (EFI).

Денатурировать	94°C	5 минут		
Денатурация	96°C	15 секунд	←	10 циклов
Отжиг	66°C	50 секунд		
Удлинение	72°C	30 секунд		
Денатурация	96°C	15 секунд	←	20 циклов
Отжиг	64°C	50 секунд		
Удлинение	72°C	30 секунд		
Остановка (HOLD)	15°C			

### Гель-электрофорез

Эти инструкции относятся к горизонтальному электрофорезу в агарозном геле:

Приготовьте 2% агарозный гель в 0,5x буфере TBE. Когда гель охладится до температуры 60°C, добавьте бромид этидия, конечная концентрация должна быть 0,5 мкг/мл. Залейте гель и установите пластиковые гребёнки (напр., 12x8 лунок с расстоянием 9 мм). Затем удалите гребёнки, поместите гель в 0,5x буфер TBE. Перенесите минимум 5 мкл и максимум 10 мкл из каждой платы или стрипа в соответствующую лунку на геле, отмечая позицию каждой реакции. Используйте масс-лэддер в 100 bp для установления размера полученных полос. Условия электрофореза - 20 минут при 10в/см.

См. подробную информацию о специальном оборудовании в инструкциях производителя системы для электрофореза. Изображение гелей должно быть сформировано с использованием системы гель-документации с прибором для УФ-просвечивания.



## 9. Интерпретация

Регистрируйте результаты в таблице регистрации образца (стр. 6 данной инструкции). При контаминации ПЦР или контаминации ДНК будет присутствовать ампликон 187bp. Любой «шмер» или полоски всех размеров могут также указывать на контаминацию ПЦР, но димеры праймеров и другие артефакты амплификации менее 100bp должны игнорироваться. Положительный результат исследования любого образца дилюента указывает, что генотипирование соответствующего образца невалидно и должно быть повторено с использованием другого образца ДНК и других реагентов.

## 10. Обеспечение и контроль качества

Проведение исследования: Тест NTC, использующий ПЦР- ампликон из набора Biofortuna, проводился на ампликоне в неразведённом виде и затем на разведениях от  $1 \times 10^1$  до  $1 \times 10^{15}$ . Ампликон был обнаружен в разведениях до и включая  $1 \times 10^{15}$ .

Тест NTC Test проводился с использованием геномной ДНК в концентрации 100 нг/мкл и затем в разведениях от  $1 \times 10^1$  до  $1 \times 10^{15}$ . ДНК была обнаружена в разведениях до  $1 \times 10^3$ .

## 11. Библиография

- 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. Таблица регистрации образца в тесте Biofortuna NTC Test**

Рекомендуется ксерокопировать эту таблицу до использования набора NTC, так как набор достаточен для исследования 96 образцов (двенадцать стрипов, восемь тестов каждый).

Образец 1, описание.

---

Образец 2, описание.

---

Образец 3, описание.

---

Образец 4, описание.

---

Образец 5, описание.

---

Образец 6, описание.

---

Образец 7, описание.

---






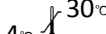


Образец 8, описание.

---

**Регистрация образца в тесте NTC**

Реакция	Краситель	№ образца	Дата теста:	Результат
1	Красный			
2	Фиолетовый			
3	Фиолетовый			
4	Фиолетовый			
5	Фиолетовый			
6	Фиолетовый			
7	Фиолетовый			
8	Фиолетовый			

### 13. Используемые символы

	Количество тестов
	См. инструкции по использованию
	Местоположение производителя
	Диагностика In Vitro
	Срок годности
	Температура хранения
	Номер серии
	Номер по каталогу

### 14. Контактная информация производителя

Biofortuna Ltd  
 1 Hawkshead Road  
 Croft Business Park  
 Bromborough, CH62 3RJ, UK  
 T: +44 (0) 151 334 0182  
 E: [info@biofortuna.com](mailto:info@biofortuna.com)  
 W: [www.biofortuna.com](http://www.biofortuna.com)



### 15. Переводы

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](http://www.biofortuna.com)