



**Návod na použitie Biofortuna SSPGo™ HLA No Template Control Kit
BF-40-02**

Verzia 1

Júl 2011

1. Použitie

Biofortuna SSPGo No Template Control (NTC - kontrola bez templátu) Kit obsahuje doplnkové testy na kontamináciu PCR amplikónmi, ktoré sa používajú spoločne s kitmi Biofortuna SSPGo, ktoré neobsahujú NTC.

2. Úvod

PCR je senzitívna technika, ktorá je náchylná na kontamináciu DNA amplikónom z predchádzajúcej PCR. Kontaminácia môže viesť k falošne pozitívnej amplifikácii v nasledujúcich PCR, čoho následkom môže byť nesprávna genotypizácia. PCR amplikón môže kontaminovať reagentie a vzorky, a tiež laboratórne vybavenie, ako napríklad pipety. Znamky kontaminácie reagentií a vybavenia je potrebné pravidelne monitorovať. Test NTC sa používa na detekciu potenciálnej kontaminácie PCR alebo DNA prítomnej v roztoku na riedenie DNA použitom pri testovaní vzoriek.

3. Popis testu

Každý SSPGo No Template Control kit sa skladá z 12 stripov s 8 PCR reakciami obsahujúcimi lyofilizovaný PCR pufer, polymerázu a priméry špecifické pre HLA-DRA gén, ktorého produktom je amplikón z ľudskej genomickej DNA alebo z amplifikovanej DNA s veľkosťou 187 bp. Keďže všetky súpravy Biofortuna využívajú ako internú kontrolu DRA amplikón, akákoľvek kontaminácia spôsobená použitím kitov Biofortuna SSPGo bude mať koamplifikáciu DRA génu a bude detegovaná priméromi NTC testu.

4. Obsah súpravy

- 12 stripov každý s 8 PCR reakciami a každá reakcia obsahuje 10 µl dopredu nadávkovaných lyofilizovaných primérov, polymerázu, dNTP* a pufer. Formát stripu s ôsmimi reakciami je uvedený nižšie.

Reakcia	Farbivo	Použitie
1	Červené	Kontrola bez templátu: Vzorka 1
2	Fialové	Kontrola bez templátu: Vzorka 2
3	Fialové	Kontrola bez templátu: Vzorka 3
4	Fialové	Kontrola bez templátu: Vzorka 4
5	Fialové	Kontrola bez templátu: Vzorka 5
6	Fialové	Kontrola bez templátu: Vzorka 6
7	Fialové	Kontrola bez templátu: Vzorka 7
8	Fialové	Kontrola bez templátu: Vzorka 8

- 12 x 8 PCR uzávery
- 1 x návod na použitie
- 1 x šaržový certifikát vydaný výrobcom (Certificate of Analysis)
- Karty bezpečnostných údajov (MSDS) možno získať z webovej stránky spoločnosti Biofortuna www.biofortuna.com. Ak nemáte možnosť získať ich z webovej stránky, kontaktujte prosím distribútora.

*CleanAmp™ dNTP podliehajú licencií spoločnosti Trilink Biotechnologies Inc so zvoľením na použitie v produktoch Biofortuna SSPGo.

5. Reagencie a vybavenie, ktoré nie sú súčasťou dodávky

- Vhodné pipety a sterilné špičky, napr. pipeta P10 s 10µl filtračnými špičkami.
- Súprava/vybavenie na izoláciu DNA.
- UV spektrofotometer.
- Sterilná voda pre molekulárno-biologické aplikácie.
- Termocyklér s 96 jamkami a vyhrievaným vekom. Platničky a skúmavky PCR použité v kitoch spoločnosti Biofortuna boli validované pre použitie s väčšinou termocyklérov na trhu, vrátane termocyklérov MJ Research PTC-100, PTC-200, Hybaid MBS a Techne TC-512. Iné modely môžu vyžadovať ďalšiu validáciu užívateľom.
- Reagencie pre gélovú elektroforézu (agaróza, 0,5x TBE pufer, 1 000bp DNA marker molekulovej hmotnosti, roztok etídiumbromidu 10 mg/ml).
- Vybavenie pre gélovú elektroforézu (gélová aparatúra, sieťový zdroj, dokumentačný systém pre gél s UV transiluminátorom).

6. Bezpečnosť a varovania

- Testy musí vykonávať iba náležite vyškolený personál.
- So všetkými vzorkami zaobchádzajte v súlade so zásadami Správnej laboratórnej praxe.
- Oblasti, kde sa vykonáva postup pred a po PCR musia byť oddelené. Žiadny materiál používaný po PCR nevnašajte späť do oblasti pred PCR.
- **Varovanie týkajúce sa biologického rizika:** So všetkými produktmi krvného pôvodu zaobchádzajte ako s potenciálne infekčnými.
- **Varovanie týkajúce sa biologického rizika:** Etídiumbromid je potenciálny karcinogén. Pri jeho použití vždy noste ochranné rukavice, laboratórny plášť a ochranné okuliare.
- **Varovanie týkajúce sa biologického rizika:** Buďte opatrní pri používaní zdrojov UV žiarenia - noste vždy ochranné rukavice, laboratórny plášť a ochranné okuliare. Nikdy sa nepozerajte priamo do zdroja UV svetla.
- Karty bezpečnostných údajov sú k dispozícii na webovej stránke www.biofortuna.com.

7. Skladovanie a stabilita

Kity Biofortuna SSPGo skladujte pri teplote 4 – 30 °C. Hneď po vybratí PCR jamiek z obalu je potrebné reagencie rehydratovať pomocou vzorky do 3 hodín. Dátum expirácie je uvedený na obale. Po dátume uvedenom na obale produkt nepoužívajte.

Nepoužívajte súpravy, ktorých fóliový obal je natrhnutý alebo prepichnutý.

Zaistite, aby boli PCR jamky po nadávkovaní DNA tesne uzavreté, pretože by mohlo dôjsť k vyparovaniu počas PCR amplifikácie. Zvláštnu pozornosť venujte okrajom a rohom.

8. Pokyny pre používanie

Poznámka:

PCR pipety sú častým zdrojom kontaminácie a preto je vhodné používať na pipetovanie vzorky do PCR reakcií (vrátane tohto NTC testu) pipetu, ktorá bola prehlásená za nekontaminovanú.

1. Otvorte fóliový obal a PCR reakcie vhodne označte; jeden strip možno použiť na otestovanie 1 – 8 vzoriek. PCR reakcie použite do 3 hodín od otvorenia obalu.
2. Pre každú vzorku DNA, ktorá má byť genotypizovaná, pridajte do jednej reakcie NTC stripu 10 µl vody alebo riediaceho roztoku.
3. Ak je požadovaná pozitívna kontrola, použite 10 µl ľudskej genomickej DNA s koncentráciou 10 ng/µl. Získate pozitívny test s amplikónom s veľkosťou 187 bp.
4. Zatvorte reakcie dodanými uzávermi a pokračujte podľa zvyčajných parametrov PCR SSPGo uvedených nižšie.

POZNÁMKA K RESUSPENZI: Zaistite, aby zmesi pre PCR reakciu boli resuspendované so vzorkami do 3 hodín od vybratia platničky z obalu.

POZNÁMKA TÝKAJÚCA SA VÝŠKY PROFILU PLATNIČIEK/STRIPOV: Odporúča sa, aby výška profilu platničiek a stripov bola zhodná, ak sú umiestnené v rovnakom prístroji pre PCR reakciu. Rozdielne výšky profilov môžu mať za následok nedostatočný kontakt s vyhrievaným vekom prístroja pre PCR reakciu. Výsledkom môže byť nedostatočná amplifikácia PCR alebo jej zlyhanie.

Parametre PCR

Pre PCR je potrebné použiť nasledujúce parametre. Uistite sa, že rýchlosť stúpania/klesania je najmenej 1 °C za sekundu a zapnite vyhrievanie veka. Kompletný návod na použitie je uvedený v užívateľskej príručke výrobcu termocykléru. Termocykléry musia byť kalibrované podľa akreditačných pravidiel vydaných organizáciou American Society of Histocompatibility and Immunogenetic (ASHI) alebo European Federation of Immunogenetics (EFI).

Denaturácia	94 °C	po dobu 5 minút	
Denaturácia	96 °C	po dobu 15 sekúnd	← 10 cyklov
Anelácia	66 °C	po dobu 50 sekúnd	
Elongácia	72 °C	po dobu 30 sekúnd	
Denaturácia	96 °C	po dobu 15 sekúnd	← 20 cyklov
Anelácia	64 °C	po dobu 50 sekúnd	
Elongácia	72 °C	po dobu 30 sekúnd	

UDRŽIAVAJTE PRI TEPLOTE 15 °C

Gélová elektroforéza

Tieto pokyny aplikujte pri horizontálnej elektroforéze na agarózovom géle: Pripravte 2% agarózový gél v 0,5x TBE pufri. Keď je gél ochladený na približne 60 °C, pridajte etídiumbromid tak, aby konečná koncentrácia bola 0,5 µg/ml. Nalejte gél a vložte hrebene na vytvorenie mikrotitračných jamiek (napr. jamiek 12 x 8 s 9mm medzerami). Po stuhnutí vyberte hrebene a ponorte gél do roztoku 0,5x TBE pufri. Preneste 5 – 10 µl z každej reakcie platničky alebo stripu do príslušnej jamky v géle a poznamenajte si pozíciu každej reakcie. Na určenie veľkosti môže byť vhodný 100bp ladder (veľkostný marker). Elektroforetickú separáciu nechajte prebiehať 20 minút pri 10 V/cm.

Podrobnosti týkajúce sa špecifického vybavenia sú uvedené v návode na použitie od výrobcu vášho elektroforetického systému. Gél je potrebné zobraziť pomocou UV dokumentačného systému pre gél s UV transiluminátorom.

9. Interpretácia

Zaznamenajte výsledky do záznamovej tabuľky uvedenej na strane 6 tohto návodu na použitie. Ak je v SSPGo prítomná kontaminácia PCR alebo kontaminácia DNA, bude pozorovaný amplikón s veľkosťou 187 bp. Akékoľvek šmuhy alebo pružky rôznych veľkostí môžu tiež indikovať kontamináciu PCR, ale diméry primérov a ďalšie násobky primérov menšie ako 100 bp sú artefakty a mali by ste ich ignorovať. Pozitívny výsledok získaný pre niektorý riediaci roztok znamená, že genotypizácia danej vzorky je neplatná a test je potrebné zopakovať s použitím inej vzorky DNA a iných reagensí.

10. Zaistenie a kontrola kvality

Testovanie metódy: S využitím PCR amplikónu zo súpravy Biofortuna sa NTC test uskutočnil s použitím neriedeného amplikónu a potom s použitím riedení v rozmedzí 1×10^1 až 1×10^{15} . Amplikón bol detegovaný v riedeniach do 1×10^{15} (vrátane).

NTC test sa uskutočnil s použitím genomickej DNA s koncentráciou 100 ng/ μ l a potom s použitím riedení v rozmedzí 1×10^1 až 1×10^{15} . DNA bola detegovaná v riedeniach do 1×10^3 .

11. Literatúra

- 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. Záznamový hárok Biofortuna NTC testu

Pred použitím sa odporúča skopírovať tento záznamový hárok, keďže NTC Kit obsahuje testy pre 96 vzoriek (12 stripov x 8 testov).

Popis vzorky 1. _____

Popis vzorky 2. _____

Popis vzorky 3. _____

Popis vzorky 4. _____

Popis vzorky 5. _____

Popis vzorky 6. _____









Popis vzorky 7. _____

Popis vzorky 8. _____

Záznam vzoriek NTC

Reakcia	Farbivo	ID vzorky	Dátum testu	Výsledok
1	Červené			
2	Fialové			
3	Fialové			
4	Fialové			
5	Fialové			
6	Fialové			
7	Fialové			
8	Fialové			

13. Vysvetlivky k používaným symbolom

	Počet testov
	Pozri návod na použitie
	Miesto výroby
	Diagnostické pomôcky <i>in vitro</i>
	Dátum expirácie
	Teplota skladovania
	Číslo šarže
	Katalógové číslo

14. Kontaktné údaje výrobcu

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. Preklady

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