



Biofortuna SSPGo™ HLA No Template Control Kit BF-40-02 Kullanım Talimatları

Sürüm 1

Temmuz 2011

1. Kullanım Amacı

Biofortuna SSPGo No Template Control (NTC) Kiti, tümleşik NTC içermeyen Biofortuna SSPGo kitiyle birlikte kullanılmak üzere tasarlanmış, PCR (Polimeraz Zincir Reaksiyonu) amplikon kontaminasyonuna yönelik tamamlayıcı testler içerir.

2. Giriş

PCR, önceki bir PCR'den gelen DNA amplikonu ile kontaminasyona duyarlı, hassas bir tekniktir. Kontaminasyon, sonraki PCR'lerde yanlış pozitif amplifikasyona yol açabilir, bu da hatalı genotiplemeye neden olabilir. PCR amplikonu reaktifler ve numunelerin yanı sıra pipetler gibi laboratuvar donanımlarını kontamine edebilir. Reaktifler ve donanım, kontaminasyon işaretleri açısından düzenli olarak izlenmelidir. NTC testi, bir test numunesi için kullanılan DNA dilüentinde bulunan potansiyel PCR veya DNA kontaminasyonunu tespit etmek için kullanılır.

3. Test Tanımı

Her SSPGo No Template Control kiti, dondurularak kurutulmuş PCR tamponu, polimeraz ve HLA-DRA genine özgü primerler içeren 8 PCR reaksiyonlu 12 şeritten oluşur ve insan genomik DNA'sından veya amplifiye edilmiş DNA'dan 187bp amplikon üretir. Tüm Biofortuna kitlerinde dahili kontrol olarak DRA amplikonundan yararlanıldığı için, Biofortuna SSPGo kitlerinin kullanımından kaynaklanan her türlü kontaminasyon DRA geni ko-amplifikasyonu içerecek ve NTC test primerleri tarafından tespit edilecektir.

4. Kit İçeriği

- Her biri önceden dağıtılmış ve dondurularak kurutulmuş 10µl primer, polimeraz, dNTP'ler* ve tampon içeren 8 PCR reaksiyonlu 12 şerit. Sekiz reaksiyon şeridi formatı aşağıda gösterilmiştir.

Reaksiyon	Boya	Kullanım
1	Kırmızı	Şablonsuz Kontrol: Numune 1
2	Mor	Şablonsuz Kontrol: Numune 2
3	Mor	Şablonsuz Kontrol: Numune 3
4	Mor	Şablonsuz Kontrol: Numune 4
5	Mor	Şablonsuz Kontrol: Numune 5
6	Mor	Şablonsuz Kontrol: Numune 6
7	Mor	Şablonsuz Kontrol: Numune 7
8	Mor	Şablonsuz Kontrol: Numune 8

- 12x8 PCR kapağı
- 1x kullanım talimatları
- 1x Analiz Sertifikası
- MSDS www.biofortuna.com adresindeki Biofortuna web sitesinden indirilebilir. Web sitesinden indiremiyorsanız lütfen yerel dağıtıcınızla iletişim kurun.

*CleanAmp™ dNTP'ler, Biofortuna SSPGo ürünlerinde kullanım için Trilink Biotechnologies Inc ruhsatına sahiptir.

5. Tedarik Edilmeyen Reaktifler ve Donanım

- Uygun pipetleyiciler ve steril uçlar, örn. 10µl'lik filtre uçlarına sahip P10 pipetleyici.
- DNA izolasyon kiti/donanımı.
- UV spektrofotometresi.
- Steril moleküler kalitede su.
- Isıtılmış kapaklı 96 kuyulu termal döngü. Biofortuna kitlerde kullanılan PCR plakaları ve tüpleri, MJ Research PTC-100, PTC-200, Hybaid MBS ve Techne TC-512 termal döngüleri dahil olmak üzere, piyasadaki termal döngülerin büyük bir kısmı ile kullanılmak üzere valide edilmiştir. Farklı modeller kullanıcı tarafından tekrar validasyon yapılmasını gerektirebilir.
- Jel elektroforez reaktifleri (agaroz, 0.5x TBE, 1000bp DNA moleküler ağırlık markörü, 10mg/ml Etidyum Bromür).
- Jel elektroforez donanımı (jel depoları, güç beslemesi, UV transillüminatörlü jel dokümantasyon sistemi).

6. Güvenlik ve Uyarılar

- Testler yalnızca uygun eğitimi almış personel tarafından yapılmalıdır.
- Tüm reaktifleri İyi Laboratuvar Uygulaması uyarınca işleyin.
- PCR öncesi ve sonrası alanları birbirinden ayrı tutun. PCR sonrası malzemeleri PCR öncesi alana geri getirmeyin.
- **Biyolojik Tehlike Uyarısı:** Tüm kan ürünlerini potansiyel enfeksiyöz olarak işleyin.
- **Biyolojik Tehlike Uyarısı:** Etidyum Bromür potansiyel bir karsinojendir. Bu maddeyi kullanırsanız, daima eldiven, laboratuvar önlüğü ve koruyucu gözlük kullanın.
- **Biyolojik Tehlike Uyarısı:** UV kaynakları kullanırken dikkatli olun, daima eldiven, laboratuvar önlüğü ve koruyucu gözlük kullanın. Asla UV ışık kaynağına doğrudan bakmayın.
- Malzeme Güvenlik Bilgi Formlarına www.biofortuna.com adresinden ulaşabilirsiniz.

7. Saklama ve Stabilité

Biofortuna SSPGo kitleri 4-30 °C'de saklanabilir. PCR kapları folyo torbalardan çıkarıldıktan sonra, reaktifler 3 saat içinde numune ile rehidrasyona tabi tutulmalıdır. Son kullanma tarihi için ambalaja bakın. Ambalajda basılı tarih geçtikten sonra ürünleri kullanmayın.

Folyo torba yırtılmış ya da delinmişse kitleri kullanmayın.

PCR amplifikasyonu sırasında buharlaşmaya neden olabileceğinden, DNA ekledikten sonra PCR kaplarının sıkıca kapatıldığından emin olun. Kenarlara ve köşelere özellikle dikkat edin.

8. Kullanım Talimatları

Not:

PCR pipetleri sıklıkla kontaminasyona yol açabilen bir kaynak olup bu NTC testi de dahil olmak üzere, PCR reaksiyonlarına numune yüklemek için kontaminasyon içermediği bilinen bir pipet kullanılması tavsiye edilir.

1. Folyo torbayı açın ve uygun şekilde etiketleyin; bir şerit bir ila sekiz numuneyi test etmek için kullanılabilir. PCR reaksiyonları açıldıktan sonra 3 saat içinde kullanılmalıdır.
2. Genotiplenen her DNA numunesi için, NTC şeridinin reaksiyonlarından birine su veya kullanılan dilüentten 10µl ekleyin.
3. Pozitif bir kontrol gerekirse, 10µl miktarında 10ng/µl insan genomik DNA'sı kullanın. Bu, 187bp'lik bir pozitif test ampikonu verecektir.
4. Reaksiyonlara tedarik edilen kapakları takın ve aşağıda gösterilen standart SSPGo PCR parametreleriyle işleme devam edin.

YENİDEN SÜSPANSİYON NOTU: Tepsinin folyo poşetten çıkarılmasını izleyen 3 saat içinde PCR karışımlarının numunelerle yeniden süspansiyon haline getirilmesini sağlayın.

PCR PLAKASI/ŞERİDİ YÜKSEKLİK PROFİLİ NOTU: Plakaların ve şeritlerin yükseklik profilinin, aynı PCR makinesine yerleştirildiklerinde eşdeğer olması tavsiye edilir. Farklı yükseklik profilleri PCR makinelerinin ısıtılan kapağıyla yeterli temas sağlanmamasına neden olabilir. Bu da, yetersiz ya da başarısız PCR amplifikasyonuna yol açabilir.

PCR Parametreleri

Aşağıdaki PCR parametreleri kullanılmalıdır. Yükselme hızlarının saniyede en az 1 °C olmasını sağlayın ve ısıtılan kapağı etkinleştirin. Tüm kullanım talimatlarını görmek için, lütfen termal döngü üreticisinin kullanım kılavuzuna bakın. Termal döngüler, American Society of Histocompatibility and Immunogenetic (ASHI) veya European Federation of Immunogenetics (EFI) akreditasyon kuralları uyarınca kalibre edilmelidir.

94 °C'de	5 dakika denatüre edin	
96 °C'de	15 saniye denatüre edin	← 10 döngü
66 °C'de	50 saniye sertleştirin	
72 °C'de	30 saniye genişletin	
96 °C'de	15 saniye denatüre edin	← 20 döngü
64 °C'de	50 saniye sertleştirin	
72 °C'de	30 saniye genişletin	
15 °C'de BEKLETİN		

Jel Elektroforezi

Bu talimatlar yatay agaroz jel elektroforezi için geçerlidir: 0.5x TBE tamponu içinde %2'lik agaroz jel hazırlayın. Jel soğuyarak yaklaşık 60 °C'ye düştüğünde, 0.5 µg/ml'lik nihai konsantrasyona sahip olacak şekilde etidyum bromür ekleyin. Jeli eritin ve içine mikrotitre biçimlendirme tarakları sokun (örn. 9 mm boşluklu 12x8 kuyu). Katılaştıktan sonra tarakları çıkarın ve jeli 0.5x TBE tamponu ile kaplayın. Her bir tepsi ya da şerit reaksiyonundan en az 5 µl, en fazla 10 µl'lik bir miktarı, her reaksiyonun pozisyonuna dikkat ederek, jel üzerindeki ilgili kuyuya aktarın. 100 bp'lik bir merdiven, boyutun belirlenmesine yardımcı olabilir. Jeli 20 dakika boyunca 10 V/cm'de çalıştırın.

Özel donanım ayrıntıları için elektroforez sisteminizin üreticisinin kullanım talimatlarına bakın. Jeller, UV transillüminatörlü bir UV jel dokümantasyon sistemi kullanılarak görüntülenmelidir.

9. Yorum

Bu Kullanım Talimatlarının 6. sayfasında bulunan numune kayıt tablosunu kullanarak sonuçları kaydedin. SSPGo PCR kontaminasyonu veya DNA kontaminasyonu varsa 187bp'lik bir ampikon gözlemlenecektir. Farklı boyutlardaki herhangi bir smear veya bant da PCR kontaminasyonuna işaret edebilir, fakat 100bp'den küçük primer-dimer ve diğer primer genişleme artefaktları göz ardı edilmelidir. Herhangi bir dilüent numunesi için pozitif bir sonuç, numune genotiplemesinin geçersiz olduğunu ve farklı reaktifler kullanılarak başka bir DNA numunesiyle tekrarlanması gerektiğini gösterir.

10. Kalite Güvence ve Kalite Kontrol

Tetik test: Seyreltilmemiş ampikon ve ardından 1×10^1 ile 1×10^{15} arası dilüsyonlar üzerinde bir Biofortuna Kitinden alınan PCR ampikonu kullanılarak NTC Testi yapılmıştır. 1×10^{15} de dahil olmak üzere, bu değere kadar çıkan dilüsyonlarda ampikon tespit edilmiştir.

100ng/ μ l'deki gDNA üzerinde ve ardından 1×10^1 ile 1×10^{15} arası dilüsyonlar üzerinde NTC Testi yapılmıştır. 1×10^3 değerine kadar çıkan dilüsyonlarda DNA tespit edilmiştir.

11. Referanslar

- 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. Biofortuna NTC Testi Numune Kayıt Sayfası

NTC Kiti 96 numune için yeterli teste sahip olduğu için (sekiz teste ait on iki şerit), kullanımdan önce bu numune kayıt sayfasının fotokopisinin çekilmesi tavsiye edilir.

Numune 1 Tanımı.

Numune 2 Tanımı.

Numune 3 Tanımı.

Numune 4 Tanımı.

Numune 5 Tanımı.

Numune 6 Tanımı.

Numune 7 Tanımı.









Numune 8 Tanımı.

NTC Numune kaydı

Reaksiyon	Boya	Numune ID'si	Test tarihi	Sonuç
1	Kırmızı			
2	Mor			
3	Mor			
4	Mor			
5	Mor			
6	Mor			
7	Mor			
8	Mor			



13. Kullanılan Semboller Kılavuzu

	Test Sayısı
	Kullanım Talimatlarına Bakın
	Üretim Tesisi
	İn Vitro Tanı Amaçlı
	Son Kullanma Tarihi
	Saklama Sıcaklığı
	Lot Numarası
	Catalogue number

14. Üretici İletişim Bilgileri

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



15. Çeviriler

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