

CZ

Návod k použití

CYCLER CHECK

Elektronické návody ke stažení na www.bag-diagnostics.com

Test pro validaci teplotní uniformity cyklérů

Připraveno k použití, prealiquotováno

REF 7104 (10 testů)

REF 71044 (4 testy)

Obsah

1. Popis výrobku	2
2. Materiál	3
2.1 Obsah soupravy CYCLER CHECK	3
2.2 Doplnkový materiál	3
2.3 Skladování a stabilita.....	3
3. Provedení testu.....	4
3.1 Amplifikace.....	4
3.2 Gelová elektroforéza.....	5
3.3 Dokumentace a interpretace	5
4. Varování a bezpečnostní opatření.....	6
5. Řešení problémů.....	6
6. Vysvětlení symbol použitých na etiketách	7

Verze: 10/2019 / publikováno: 2019-06

Změny proti verzi 9/2016 jsou vyznačeny žlutě!

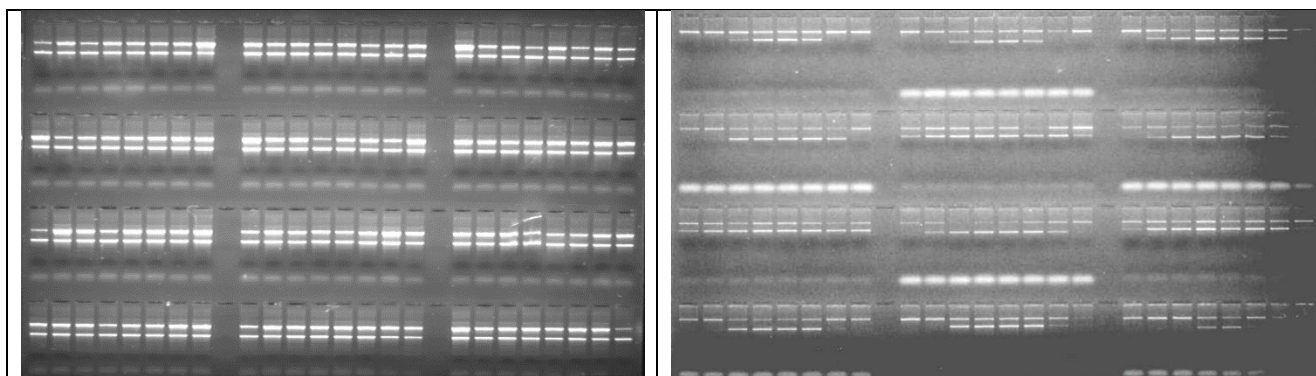
1. Popis výrobku

CYCLER CHECK je rychlá a bezpečná metoda k validaci teplotní uniformity cyklérů. Obzvláště při diagnostice nukleových kyselin je nebytné mít ověřenu spolehlivost a přesnost požívaných cyklérů. Z toho plyne nutnost provádět takovýto typ testu pravidelně.

Souprava CYCLER CHECK se skládá z jedné reakční směsi, která je testována ve všech 96 pozicích termobloku cykléru. Reakční směs obsahuje jeden pár primerů pro validaci teploty denaturace (540 bp) a druhou dvojici primerů pro kontrolu teploty annealingu (1040 bp). S těmito dvěma dvojicemi primerů lze otestovat, zda je teplota denaturace a annealingu odpovídají nastavení nebo zda je reálná teplota denaturace nižší nebo teplota annealingu vyšší než jaká by měla být.

V případě, že nelze dosáhnout teploty denaturace (96°C), se mohou objevit falešně negativní výsledky, obzvláště u sekvencí bohatých na CG, což se projevuje v sekundární struktuře.

Pokud je teplota správná a teplotní profil je uniformní, pak by měly být patrné dva proužky ve všech 96 pozicích termobloku (obr. 1). Odlišné teploty pak vedou k vymizení proužků buď v jednotlivých nebo všech pozicích (obr. 2)



Obr. 1: Výsledky testu CYCLER CHECK s parametry odpovídajícími parametrům z 3.1

Obr. 2: Výsledky testu CYCLER CHECK s teplotou denaturace nižší o 2°C

Jelikož testovaná směs ze soupravy CYCLER CHECK odpovídá podmínkám souprav BAG HISTO TYPE, je CYCLER CHECK velmi vhodný pro optimalizaci parametrů PCR v uživatelských cyklérech. To je mnohdy nutné, neboť jednotlivé cykléry jsou nezdědka nastaveny rozdílně.

2. Materiál

2.1 Obsah soupravy CYCLER CHECK kit

- ◆ 4 nebo 10 destiček CYCLER CHECK, což odpovídá 4 nebo 10 testům. Vysušené reakční směsi na dně mikrozkrumavek obsahující dvě dvojice primerů a směs nukleotidů.
- ◆ 1 nebo 2 x 1,1 ml 10 x PCR-pufr
- ◆ 2 nebo 5 x 210 µl kontrolní DNA (60 ng/µl)
- ◆ 4 nebo 10 x PCR fólie pro provedení 4 nebo 10 testů
- ◆ Návod k použití a protokol testu

2.2 Doplnkový materiál

- ◆ Taq Polymeráza (5 U/µl), (Happy Taq REF 70976 nebo jiná Taq Polymeráza validovaná pro použití se soupravou CYCLER CHECK kit uživatelem)
Nepoužívejte Hot-Start polymerázu!
- ◆ Pipety (0,5 – 250 µl)
- ◆ Sterilní špičky s integrovaným filtrem
- ◆ DNA cyklér (seznam validovaných cyklérů na straně 4)

Přístroje a materiál pro gelovou elektroforézu

- ◆ Agaróza pro separaci DNA
- ◆ 0,5 x TBE pufr (45 mM Tris, 45 mM kyselina boritá, 0,5 mM EDTA)
- ◆ Ethidium bromid (EtBr)
- ◆ Jednotka na gelovou elektroforézu DNA
- ◆ Zdroj napětí (200-300V, 200mA)

Přístroje pro interpretaci a dokumentaci

- ◆ Zdroj UV záření (220-310 nm)
- ◆ fotoaparát (např. systém Polaroid) s filmem (Polaroid typ 667) nebo video-systém s termopapírem (např. Typ KP65HM-CE)

2.3. Skladování a stabilita

Soupravy jsou dodávány nezmrazené při pokojové teplotě. Po obdržení skladujte veškeré reagenty v temnu při $\leq -20^{\circ}\text{C}$ v zařízeních s monitorovanou teplotou. Datum expirace je uvedeno na štítku každé reagenty a je platné i pro reagenty po prvním otevření. Datum expirace uvedené na obalu soupravy odpovídá reagentům s nejkratší dobou trvanlivosti. Krátce před použitím nechte roztát 10 x PCR-pufr.

3. Provedení testu

Vyhodnocení a kontrola kvality byly prováděny s polymerázou Happy Taq (REF 70976).

3.1 Amplifikace

- Napipetujte Master-Mix obsahující 10 x PCR-pufř, roztok DNA, Taq-Polymerázu a destilovanou vodu a pečlivě vortexujte.

104 µl kontrolní DNA (60 ng/µl)

824 µl destilovaná voda

104 µl 10x PCR pufř

8,3 µl Taq polymeráza (5 U/µl)

- Přidejte **10 µl** Master Mixu k předkapaným a vysušeným reakčním směsím do mikrozumavek na PCR destičce. Pevně uzavřete mikrozumavky folií. Buďte pozorní, abyste se nedotkli vnitřní strany víček (fólie) a horní hrany mikrozumavek a nedošlo tak ke kontaminaci. Pokud je použit cyklér s těsně přiléhajícím víkem, lze k uzavření použít i PCR podložky pod víko k opakovanému použití. Lehce poklepte s destičkou, aby se rozpustil pelet na dně mikrozumavek. Celá PCR směs musí být na dně mikrozumavky. V případě potřeby PCR destičku krátce stočte. Překrytí reakční směsi minerálním olejem **není** u cyklérů s vyhříváním víkem s nastavitelnou polohou nutné!
- Vložte reakční mikrozumavky do cykléru a upevněte těsně víko. Spustěte PCR program. Orientace destičky v cykléru (A1 vlevo nahoře) je důležitá, abychom byli schopni posléze určit, kde která pozice v cykléru byla.

Parametry amplifikace:

Krok programu	Teplota	Čas	Počet cyklů
První denaturace	96°C	5 Min	1 cyklus
Denaturace	96°C	20 Sec	5 cyklů
Annealing a extenze	68°C	1 Min	
Denaturace	96°C	20 Sec	10 cyklů
Annealing	64°C	50 Sec	
Extenze	72°C	45 Sec	
Denaturace	96°C	20 Sec	15 cyklů
Annealing	61°C	50 Sec	
Extenze	72°C	45 Sec	
Závěrečná extenze	72°C	5 Min	1 cyklus

Validované cykléry

PTC 100 / 200 / C1000
(MJ Research/ BioRad),
GeneAmp PCR-System 9600 /
9700 (prosíme, použijte
faktor ohřevu 9600), Veriti
(ABI),
Mastercycler epGradient S
(prosíme, použijte funkci
"simulate Mastercycler
gradient") (Eppendorf)

Tprofessional (Biometra)

Prosíme, nepoužívejte hliníkové bloky (jako např. GeneAmp PCR system 9600/9700)!

Při použití cyklérů umožňujících velmi rychlé ohřívání a chlazení doporučujeme nastavit pomalejší ohřívání a chlazení (ramp rate) (cca 2,5 °C/s).

Testy kontroly kvality byly prováděny na cyklérech PTC-200, resp. C1000 (MJ Research/BioRad), 9700 (ABI) a Mastercycler epGradient S (Eppendorf) a Tprofessional (Biometra).

3.2 Gelová elektroforéza

Separace amplifikačních produktů se provádí pomocí gelové elektroforézy na horizontálním agarózovém gelu. Doporučeným pufrům pro elektroforézu je 0,5 x TBE (45 mM tris, 45 mM kyselina boritá, 0,5 mM EDTA). Koncentrace gelu by měla být 2,0 - 2,5% agarózy. Před napipetováním vzorků nechte gel polymerizovat alespoň 30 minut. Po ukončení amplifikace vyjměte vzorky z cykléru a napipetujte celý reakční objem vzorku opatrně do odpovídající jamky v gelu. Dále přidejte 10 µl DNA délkového standardu tak, aby bylo možno odečíst délku produktů amplifikace. Elektroforetická separace se provádí při 10-12 V/cm (např. při 20cm vzdálenosti elektrod přibližně 200-240 V) po dobu 20 - 40 minut. Po ukončení běhu proveďte barvení celého gelu v roztoku ethidiumbromidu (EtBr) (0,5 µg/ml EtBr ve vodě nebo TBE pufru) po dobu 30 - 40 minut. Alternativní možností je přidání EtBr (0,5 µg/ml) do elektroforetického pufru nebo přímo do gelu. Pokud je to nutné, lze odstranit přebytečný EtBr z gelu máčením ve vodě nebo 0,5 x TBE po dobu 20-30 minut.

3.3 Dokumentace a interpretace výsledků

K zobrazení výsledků prosvíte gel UV transiluminátorem ($\lambda = 220-310$ nm) a vyfotografujte pomocí vhodného přístroje, filmu a filtrů (např. Polaroid, film typ 667 nebo video systém s termálním papírem KP65HM-CE). Nastavte čas a expozici tak, aby proužky byly jasně viditelné oproti tmavšímu pozadí.

Možné výsledky:

- Pokud je teplota v cykléru správná na všech pozicích termobloku, měly by být vidět na všech pozicích gelu dva proužky (540 bp + 1040 bp).
- Pokud byla teplota denaturace příliš nízká, bude v některých nebo všech pozicích chybět proužek o délce **540 bp**.
- Pokud byla teplota annealingu příliš vysoká, pak zmizí z některých nebo ze všech pozic nejprve proužek o délce **1040 bp**, a pak i **540 bp**.
- Pokud bude teplota annealingu příliš nízká, mohou se vyskytnout i dodatečné nespecifické proužky.

Pokud výsledky PCR neodpovídají požadavkům, je vhodné přeměřit termoblok elektronickým měřícím zařízením a kontaktovat servisní pracoviště.

4. Varování a bezpečnostní opatření






Ethidumbromid je silný mutagen. Při práci s gely nebo roztoky obsahujícími EtBr používejte rukavice. Postupujte podle návodu a bezpečnostních instrukcí výrobce! Transiluminátor vyzařuje velmi krátkovlnné UV záření, které může spálit kůži a sítnici. Používejte ochranný UV obličejový štít! Likvidace vzorků, nepoužitých reagentů a odpadu musí být provedena ve shodě s národní legislativou a bezpečnostními požadavky příslušného pracoviště.

Bezpečnostní listy (Material Safety Data Sheets (MSDS)) jsou dostupné ke stažení na www.bag-diagnostics.com.

5. Řešení problémů

Problém	Možný důvod	Řešení
žádná amplifikace, délkový standard viditelný	chybí enzym nebo je jeho koncentrace příliš nízká	opakujte PCR, změňte koncentraci enzymu
	špatné amplifikační parametry	optimalizujte amplifikační parametry, zkontrolujte cyklér
žádné nebo pouze slabé proužky, délkový standard není vidět	příliš slabé barvení	opakujte barvení
pozadí gelu svítí příliš silně	příliš dlouhá doba barvení, příliš vysoká koncentrace barvicího roztoku	máčejte gel ve vodě nebo v TBE, snižte koncentraci barvicího roztoku
rozmazané proužky	elektroforetický pufr je příliš horký, špatný elektroforetický pufr, gel není dobře polymerizovaný	snižte napětí použijte 0,5 x TBE pufr používejte jen zcela polymerizovaný gel

6. Vysvětlivky symbolů na etiketách

	Teplota skladování, limity teploty
	Použijte do
	Výrobce
	Viz návod k použití
	Dostatečné pro n testů
CONT	Obsahuje
CONTROL DNA	Kontrolní DNA
CYCLER CHECKING	Zamýšlené použití: Validace teplotní uniformity cyklérů
IFU	Návod k použití
LOT	Číslo šarže
PCRBUF 10x	PCR pufr, 10x koncentrovaný
PCRFOIL	PCR folie
PCRPLATE	PCR destičky
REACTIONMIX	Reakční směsi
REF	Katalogové číslo
RTU	Připraveno k použití

Návod k použití v jiných jazycích naleznete na:

<http://www.bag-diagnostics.com>,

info@bag-diagnostics.com

nebo telefonu: +49 (0)6404-925-125

Návody v čj vyžádejte na BAG Diagnostics GmbH, Na Hlínách 555/17,182 00 Praha 8

Tel.: +420 286 840 508, Fax: +420 286 840 510, E-mail: info@bag-diagnostics.cz, www.bag-diagnostics.cz