

Istruzioni d'uso

BAG Cyclor Check

REF 7104 (10 test)
REF 71044 (4 test)

Kit per la validazione dell'uniformità della temperatura nei termociclatori

pronto all'uso, prealiquotato

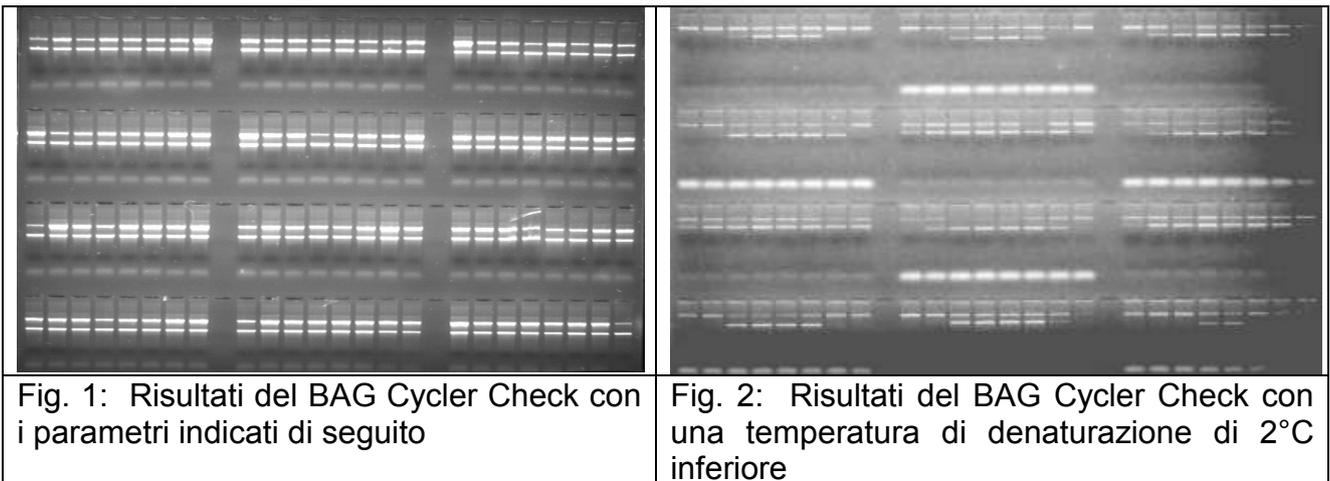
Indice

1. Descrizione del prodotto.....	2
2. Materiale.....	3
2.1 Contenuto del BAG Cyclor Check.....	3
2.2 Materiale supplementare	3
2.3 Conservazione e stabilità.....	4
3. Procedura del test.....	4
3.1 Amplificazione.....	4
3.2 Elettroforesi del gel.....	5
3.3 Documentazione ed interpretazione.....	6
4. Avvertenze e precauzioni.....	6
5. Soluzione dei problemi.....	7
6. Spiegazione dei simboli usati sulle etichette.....	7

1. Descrizione del prodotto

Il BAG Cycler Check è un metodo facile e veloce per la validazione dell'uniformità della temperatura nei termociclatori. In particolar modo nella diagnostica degli acidi nucleici, e' essenziale per assicurare l'affidabilità del termociclatore in uso. Perciò, il test dovrebbe essere eseguito regolarmente.

Il BAG Cycler Check consiste in una mix di reazione che testa tutte le 96 posizioni del blocco del termociclatore. La mix di reazione contiene una coppia di primers per la validazione della temperatura di denaturazione (540 bp) ed un'altra coppia di primers per la validazione della temperatura di annealing (1040 bp). Con queste due coppie di primers si può testare se la temperatura di denaturazione è inferiore o la temperatura di annealing è superiore a quelle impostate. Se le temperature sono esatte ed il profilo della temperatura è uniforme, dovrebbero esserci due bande per tutti le 96 posizioni del blocco (Fig 1). Temperature diverse danno origine alla perdita delle bande nella singola posizione o in tutte le posizioni (Fig. 2).



Poichè le condizioni del BAG Cycler Check corrispondono a quelle dei BAG HISTO TYPE kits, il test è ideale per ottimizzare i parametri di PCR su ciascun termociclatore. Inoltre il BAG Cycler Check può essere utilizzato per ottimizzare in generale i termociclatori per tutti i tipi di applicazioni.

2. Materiale

2.1 Contenuto del BAG Cycler Check

- ◆ 4 o 10 piastre BAG Cycler Check sufficienti per 4 o 10 tests. Le mix di reazione prealiquotate e preseminate includono due coppie di primers e i nucleotidi.

- ◆ 1 o 2 x 1.1 ml PCR-buffer 10x
- ◆ 2 o 5 x 210 µl DNA di controllo (60 ng/µl)
- ◆ 4 o 10 fogli PCR sufficienti per 4 o 10 test
- ◆ Istruzioni d'uso e protocollo del test

2.2 Materiale supplementare

- ◆ Taq Polimerasi (5 U/µl) (es. HISTO TAQ, REF 70975). **Non utilizzare una Taq polimerasi hot-start!**
- ◆ Pipette (0,5-250 µl)
- ◆ Puntali sterili con filtro integrato
- ◆ Termociclatore (per es. PTC 200 con coperchio termostato MJ Research/BioRad; la lista dei termociclatori validati è a pagina 5).

Strumenti e materiale per l'elettroforesi del gel

- ◆ Agarosio
- ◆ TBE buffer 0.5x (45mM di Tris, 45 mM di acido borico, 0,5 mM di EDTA)
- ◆ Etidio bromuro (EtBr)
- ◆ Cella elettroforetica
- ◆ Alimentatore (200-300 V, 200 mA)

Strumenti per l'interpretazione e la documentazione

- ◆ Transluminatore UV (220-310 nm)
- ◆ Macchina fotografica (per es. sistema Polaroid) con pellicole (Polaroid tipo 667) o sistema video con carta termica (per es. tipo KP65HM-CE)

2.3. Conservazione e stabilità

Il kit è fornito senza ghiaccio secco. Conservare tutti i reagenti a -20°C al buio e in un frigorifero a temperatura controllata. La data di scadenza indicata sull'etichetta si riferisce a tutti i reagenti contenuti nel kit. La stabilità indicata sull'etichetta esterna si riferisce al reagente con la stabilità inferiore contenuto nel kit. Scongellare il PCR-buffer 10x prima dell'uso.

3. Procedura del test

La valutazione e il controllo di qualità sono stati eseguiti con with HISTO TAQ (REF 70975) o con TaqPolimerasi da Qiagen.

3.1 Amplificazione

- Preparare la Master-Mix composta da PCR-buffer 10x, soluzione di DNA, Taq-Polimerasi e acqua distillata e miscelare bene

104 µl DNA di controllo (60 ng/µl)

824 µl acqua distillata

104 µl PCR buffer 10x

8,3 µl Taq polimerasi (5 U/µl)

- Pipettare **10 µl** di questa miscela in ciascuna mix di reazione prealiquotata e preseminata nella piastra. Chiudere bene le provette con i rispettivi tappi. Se si usano termociclatori con coperchio a chiusura ermetica è anche possibile usare PCR mat riciclabili. Scuotere leggermente la piastra verso il basso per dissolvere il pellet blu sul fondo della piastra. Tutte le miscele di PCR dovrebbero depositarsi sul fondo. Se si usa un coperchio termostato **non** è necessario aggiungere olio minerale all'interno delle provette!
- Mettere le provette di reazione nel termociclatore e chiudere bene il coperchio. Le provette di reazione dovrebbero essere inserite correttamente nel blocco. Avviare il programma di PCR. **La posizione della piastra nel blocco del termociclatore (A1 in alto a sinistra) è importante per poter assegnare le reazioni ai pozzetti del termociclatore.**

Programma di amplificazione

Programma	Tempo	Temp.	Numero di cicli
Prima Denaturazione	5 Min	96°C	1 ciclo
Denaturazione	20 Sec	96°C	5 cicli
Annealing+Estensione	60 Sec	68°C	
Denaturazione	20 Sec	96°C	10 cicli
Annealing	50 Sec	64°C	
Estensione	45 Sec	72°C	
Denaturazione	20 Sec	96°C	15 cicli
Annealing	50 Sec	61°C	
Estensione	45 Sec	72°C	
Estensione finale	5 Min	72°C	1 ciclo

Tipi di termociclatore:

PTC 100 / 200/C1000 (MJ Research/ Biozym) e GeneAmp PCR-System 9600 / 9700 (utilizzare la velocità di riscaldamento a 9600)(ABI), Mastercycler epGradient S (utilizzare la funzione "simulate Mastercycler gradient") (Eppendorf) e Tprofessional (Biometra).

L'utilizzo di termociclatori con una velocità elevata di riscaldamento/raffreddamento è consigliato utilizzare le impostazioni di ramp rate ridotte (~ 2.5°C/sec).

I controlli di qualità sono stati condotti su PTC-200 e C1000 (MJ Research/BioRad), 9700 (ABI), Mastercycler epGradient S (Eppendorf) e Tprofessional (Biometra).

3.2 Elettroforesi del gel

La separazione dei prodotti ottenuti di amplificazione si effettua tramite gel di agarosio in elettroforesi orizzontale. Si consiglia come tampone per l'elettroforesi TBE 0,5x (45 mM di tris, 45 mM di acido borico, 0.5 mM di EDTA). La concentrazione del gel dovrebbe essere 2.0 - 2.5% di agarosio. Lasciare polimerizzare il gel per almeno 30 minuti prima di caricare il campione. Al termine dell'amplificazione, prelevare i campioni dal termociclatore e caricare con attenzione ciascuna miscela di reazione (10 µl) in ogni pozzetto del gel. Inoltre caricare 10 µl di DNA length standard per la valutazione del peso molecolare. La corsa elettroforetica è eseguita a 10-12 V/cm (con elettrodi distanti 20 cm, 200-240 V circa) per 20-40 min. Al termine della corsa il gel viene colorato immergendolo in una soluzione di etidiobromuro (EtBr) (circa 0.5 µg/ml di EtBr in H₂O o in buffer TBE per 30-45 min). In alternativa l'EtBr (0.5 µg/ml) può essere aggiunto al buffer per elettroforesi o al gel di agarosio. Se necessario rimuovere l'EtBr in eccesso immergendo il gel in H₂O o in buffer TBE 0,5x per 20-30 minuti.

3.3 Documentazione ed interpretazione

Per la documentazione, visualizzare il prodotto di PCR usando un transluminatore UV (220-310 nm) e fotografare con una macchina fotografica, pellicola e filtri adatti (per es. polaroid, pellicola tipo 667 o sistema video con carta termica KP65HM-CE). Scegliere i tempi di esposizione e di apertura in modo che le bande siano ben visibili e risaltino sullo sfondo scuro (apertura approssimativa 11, tempo di esposizione 1 secondo).

Risultati possibili:

- Se le temperature del termociclatore sono corrette in tutto il blocco dovrebbero esserci due bande in tutte le posizioni (540 bp + 1040 bp).
- Se la temperatura di denaturazione è troppo bassa la banda più piccola sarà assente in alcune o in tutte le posizioni.
- Se la temperatura di annealing è troppo alta, prima la banda più grande e poi quella più piccola saranno assenti in alcune o in tutte le posizioni.
- Se la temperatura di annealing è troppo bassa potrebbero esserci bande non

specifiche.

Se il risultato della PCR non corrisponde ai requisiti, si dovrebbero controllare le temperature con uno strumento elettronico e se necessario dovrebbe essere contattato il servizio clienti del termociclatore.

4. Avvertenze e precauzioni

L'etidobromuro è un potente mutageno. Indossare i guanti quando si maneggiano il gel o le soluzioni contenenti EtBr!. Fare riferimento alle istruzioni, alle precauzioni e alle avvertenze d'uso del produttore! Il transluminatore UV emette onde molto corte che possono provocare bruciature alla pelle o alla retina. Usare una maschera per la protezione facciale UV!

5. Soluzione dei problemi

Problema	Possibile causa	Soluzione
Nessuna amplificazione, length standard visibile	• enzima mancante o concentrazione troppo bassa	• ripetere la tipizzazione, modificare la concentrazione dell'enzima
	• parametri di amplificazione errati	• ottimizzare i parametri di amplificazione, controllare il termociclatore
Nessuna banda visibile o molto debole, length standard invisibile	colorazione EtBr troppo debole	ripetere la colorazione
Lo sfondo del gel è troppo chiaro	colorazione troppo forte, concentrazione di EtBr troppo alta	immergere il gel in H ₂ O o TBE per diminuire la concentrazione di EtBr
Bande confuse	buffer per elettroforesi troppo caldo o riutilizzato troppe volte, composizione errata del tampone, mancata o cattiva polimerizzazione del gel	Diminuire il voltaggio Usare TBE buffer 0,5x

6. Spiegazione dei simboli usati sulle etichette

	Temperatura di conservazione
	Utilizzare fino a
	Consultare le istruzioni d'uso
	Sufficiente per n tests
CONT	Contenuto, contiene
CONTROL DNA	DNA di controllo
CYCLER CHECKING	Destinazione d'uso: validazione dell'uniformità di temperature in termociclatori
IFU	Istruzioni d'uso
LOT	Codice batch
PCRBUF 10x	Buffer PCR, 10x concentrato
PCRFOIL	fogli adesivi PCR
PCRPLATE	Piastre PCR
REACTIONMIX	Mix di reazione
REF	Numero di catalogo
RTU	Pronto all'uso

Per istruzioni d'uso in altre lingue si veda:

<http://www.bag-healthcare.com>

<http://service.bag-healthcare.com>

tel: +49 (0)6404-925-125



BAG Health Care GmbH
 Amtsgerichtsstraße 1-5
 35423 Lich/Germany

Tel.: +49 (0) 6404 / 925-0
 Fax: +49 (0) 6404 / 925-250

www.bag-healthcare.com
 info@bag-healthcare.com

Auftragsannahme/Ordering:
 Tel.: +49 (0) 6404 / 925-450
 Fax: +49 (0) 6404 / 925-460
 verkauf@bag-healthcare.com

Customer Service:
 Tel.: +49 (0) 6404 / 925-125
 Fax: +49 (0) 6404 / 925-421
 service@bag-healthcare.com