

PT

Instruções de utilização

CYCLER CHECK

Kit de teste para a validação da uniformidade da temperatura em termocicladores

pronto a usar, pré-aliquotado**REF 7104 (10 testes)****REF 71044 (4 testes)**

Índice

1. Descrição do produto.....	2
2. Material.....	2
2.1 Conteúdo do CYCLER CHECK.....	2
2.2 Material suplementar	2
2.3 Armazenamento e estabilidade.....	3
3. Procedimento de teste.....	3
3.1 Amplificação	3
3.2 Eletroforese em gel.....	4
3.3 Documentação e interpretação	4
4. Avisos e precauções.....	5
5. Resolução de problemas	5
6. Explicação dos símbolos usados nos rótulos.....	6

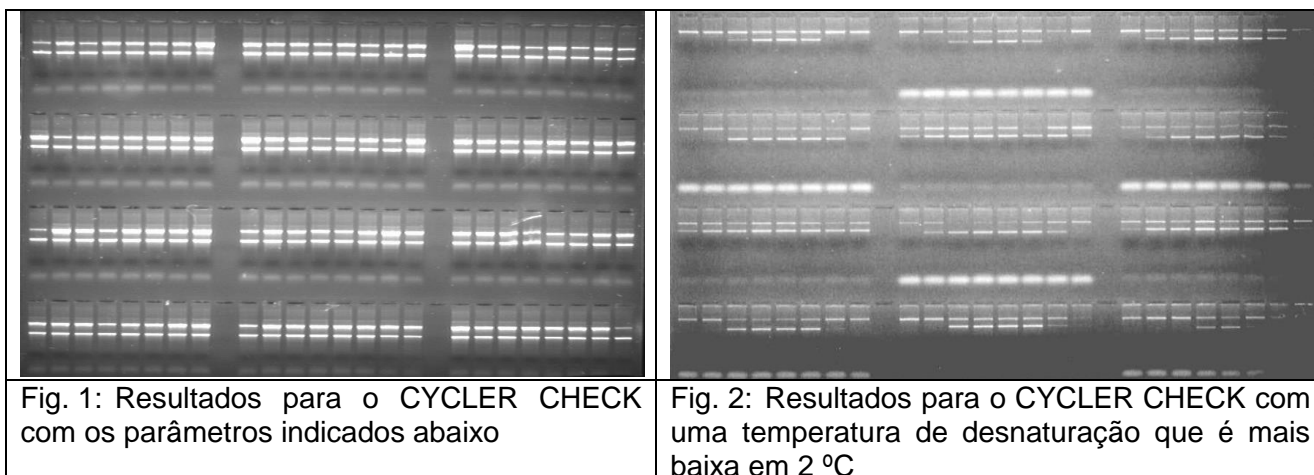
1. Descrição do produto

O CYCLER CHECK é um método rápido e fácil de validar a uniformidade da temperatura em termocicladores. É essencial assegurar a fiabilidade do termociclador utilizado, especialmente no diagnóstico de ácidos nucleicos. Consequentemente, este teste deve ser desempenhado regularmente.

O CYCLER CHECK consiste numa mistura de reação testada em todas as 96 posições de um bloco de termociclador. A mistura de reação contém um par de iniciadores (540 bp) e outro par de iniciadores para a validação da temperatura de hibridização (1040 bp). Com estes dois pares de iniciadores, é possível testar se a temperatura de desnaturação é inferior ou se a temperatura de hibridização é mais alta do que deveria ser.

Apenas no caso de a temperatura de desnaturação (96 °C) não puder ser atingida, podem ocorrer resultados falsos negativos, especialmente na presença de sequências ricas em GC, propensas a estruturas secundárias.

Se as temperaturas estiverem corretas e o perfil de temperatura for uniforme, devem existir duas bandas para as 96 posições do bloco (Fig. 1). As diferenças de temperatura resultam na perda de bandas em posições únicas ou em todas as posições (Fig. 2).



Como a mistura de teste na CYCLER CHECK encaixa nas condições dos BAG HISTO TYPE kits, é adequada para otimizar os parâmetros de PCR num termociclador individual. Isto pode ser necessário pois os termocicladores podem ser ajustados de formas bastante diferentes.

2. Material

2.1 Conteúdo do CYCLER CHECK kit

- ◆ 4 ou 10 placas de CYCLER CHECK suficientes para 4 ou 10 testes. As misturas de reação seca consistem em dois pares de iniciadores e nucleótidos.
- ◆ 1 ou 2 x tampões 10x de PCR de 1,1 ml
- ◆ 2 ou 5 x 210 µl de DNA de controlo (60 ng/µl)
- ◆ 4 ou 10 películas metalizadas para PCR suficientes para 4 ou 10 testes
- ◆ Instruções de utilização e protocolo de teste

2.2 Material complementar

- ◆ Taq polimerase (5 U/μl), (Happy Taq, REF 70976) ou outra Taq polimerase, validada com o kit do CYCLER CHECK pelo utilizador)
Não use uma Taq Polimerase de arranque a quente!
- ◆ Pipetas operadas por pistão (0,5-250 μl)
- ◆ Pontas esterilizadas com filtro integrado
- ◆ Ciclador de DNA (lista dos cicladores validados; consultar a página 4)

Dispositivos e material para eletroforese em gel

- ◆ DNA agarose
- ◆ 0,5 x Tampão TBE (45 mM de Tris, 45 mM de ácido bórico, 0,5 mM de EDTA)
- ◆ Brometo de etídio (EtBr) **ou peqGREEN**
- ◆ Unidade de eletroforese submarina
- ◆ Fonte de alimentação (200 - 300 V, 200 mA)

Dispositivos para interpretação e documentação

- ◆ Fonte UV (220-310 nm)
- ◆ Câmara (p. ex., sistema Polaroid) com rolos (Polaroid tipo 667) ou sistema de vídeo com papel térmico (p. ex., Typ KP65HM-CE)

2.3. Armazenamento e estabilidade

O kit é entregue sem arrefecimento. Armazene todos os reagentes a $\leq -20^{\circ}\text{C}$ no escuro num dispositivo com monitorização da temperatura. A vida útil encontra-se no rótulo do respetivo reagente e também é válida para reagentes abertos. A estabilidade, conforme indicada no rótulo exterior, refere-se ao reagente com a estabilidade menor contido no kit. Pouco tempo antes de o usar, descongele o tampão 10 x de PCR.

3. Procedimento de teste

A avaliação e controlo de qualidade foram efetuados com Happy Taq (REF 70976).

3.1 Amplificação

- Pipete a mistura principal, que consiste em tampão 10 x de PCR, solução de DNA, Taq Polimerase e água destilada e faça a depuração centrífuga em profundidade.

104 μl de DNA de controlo (60 ng/μl)

824 μl de água destilada

104 μl de tampão 10x de PCR

8,3 μl de Taq polimerase (5 U/μl)

- Adicione **10 μl** desta mistura às misturas de reação pré-pendente Feche bem os tubos com a película de alumínio respetiva. Certifique-se de que não toca na parte interna das tampas e nas extremidades superiores dos tubos com os dedos para evitar contaminação. Se forem usados cicladores com tampas que possam ser bem fechadas, também é possível utilizar soluções de PCR. Agite ligeiramente a placa para dissolver os grânulos no fundo da placa. Toda a solução de PCR deve fixar-se

no fundo. Se necessário, a placa deve ser brevemente girada para baixo. A sobreposição das misturas de reação com óleo mineral **não** é necessária se for usada uma tampa aquecida e ajustada!

- Coloque os tubos de reação no termociclador e aperte a tampa. Os tubos de reação devem ser bem fixados ao bloco. Inicie o programa de PCR. A posição da placa no bloco do ciclador (A1 no topo e no lado esquerdo) é importante para se conseguir reatribuir as reações às posições do ciclador.

Parâmetros de amplificação:

Programa-passo	Temp.	Tempo	N.º de ciclos
Primeira desnaturação	96 °C	5 min.	1 ciclo
Desnaturação	96 °C	20 seg.	5 ciclos
Hibridização + Extensão	68 °C	1 min.	
Desnaturação	96 °C	20 seg.	10 ciclos
Hibridização	64 °C	50 seg.	
Extensão	72 °C	45 seg.	
Desnaturação	96 °C	20 seg.	15 ciclos
Hibridização	61 °C	50 seg.	
Extensão	72 °C	45 seg.	
Extensão final	72 °C	5 min.	1 ciclo

Tipos de cicladores validados:

PTC 100/200/C1000
(MJ Research/ BioRad),
GeneAmp PCR-System
9600 / 9700 (usar taxa de aquecimento de 9600), Veriti (ABI),
Mastercycler epGradient S (usar função "simulate Mastercycler gradient") (Eppendorf),
Tprofessional (Biometra)

Não use um bloco de aquecimento de alumínio (p. ex., GeneAmp PCR-System 9600 / 9700).

Ao usar termocicladores com uma taxa de aquecimento e arrefecimento muito rápida, recomenda-se o uso de uma taxa de aquecimento e arrefecimento mais lenta (~2,5 °C/seg.).

Os testes de controlo de qualidade foram feitos em PTC-200 resp. C1000 (MJ Research / BioRad), 9700 (ABI), Mastercycler epGradient S (Eppendorf) e Tprofessional (Biometra).

3.2 Eletroforese em gel

A separação dos produtos da amplificação é feita por eletroforese através de um gel de agarose (horizontal). Como tampão de eletroforese, recomenda-se um tampão 0,5x TBE (45 mM de tris, 45 mM de ácido bórico, 0,5 mM de EDTA). A concentração de gel deve ser de 2,0 - 2,5% de agarose. Deixe o gel polimerizar pelo menos 30 minutos antes de carregar as amostras. Depois de a amplificação ter sido concluída, retire as amostras do termociclador e coloque as misturas de reação completas cuidadosamente em cada

ranhura do gel. Adicionalmente, aplique 10 µl do DNA de comprimento padrão para a comparação de tamanhos. A separação da eletroforese é feita a 10 - 12 V/cm (com 20 cm de distância entre os elétrodos, aproximadamente 200-240 V), durante 20 - 40 minutos. Após o funcionamento ter sido concluído, todo o gel é tingido numa solução de brometo de etídio (EtBr) (aprox. 0,5 µg/ml de EtBr em H₂O ou tampão TBE durante 30 - 45 minutos). Como alternativa, pode também ser adicionado EtBr (0,5 µg/ml) ao tampão de eletroforese ou ao gel de agarose. Se necessário, o excesso de EtBr pode ser removido molhando o gel em H₂O ou tampão 0,5x TBE durante 20 - 30 minutos.

~~Em vez de brometo de etídio, pode usar peqGREEN para tingir o gel. Para este fim, junte peqGREEN à agarose derretida quando a solução de agarose tiver arrefecido até uma temperatura de 55 °C (1,6 µl de peqGREEN/100 ml de solução de agarose) e agite cuidadosamente para misturar.~~

3.3 Documentação e interpretação

Para documentação, visualize a amplificação de PCR usando um transiluminador UV (220 - 310 nm) e fotografe-a com uma máquina, rolo e filtros adequados (p. ex., Polaroid, rolo tipo 667 ou sistema de vídeo, papel térmico KP65HM-CE). Escolha o tempo de exposição e a abertura para que as bandas sejam esticadas ao máximo e se destaquem contra o fundo preto.

Resultados possíveis:

- Se as temperaturas no termociclador estiverem corretas em todo o bloco, devem existir duas bandas em todas as posições (540 bp + 1040 bp).
- Se a temperatura de desnaturação for demasiado baixa, a **banda de 540 bp** estará em falta em alguma ou em todas as posições.
- Se a temperatura de hibridização for demasiado alta, primeiro, a **banda 1040 bp** e também a **banda 540 bp** estarão em falta em alguma ou em todas as posições.
- Se a temperatura de hibridização for demasiado baixa, podem existir bandas não específicas.

Se o resultado da PCR não corresponder aos requisitos, as temperaturas devem ser verificadas com um dispositivo de medição eletrónica e, se necessário, deve ser contactada a assistência ao cliente para o instrumento.

4. Avisos e precauções





O brometo de etídio é um mutagénio poderoso. Use luvas quando manusear géis ou soluções que contenham EtBr! Respeite as instruções de utilização e os avisos e precauções do fabricante! O transiluminador irradia uma luz UV de onda muito curta que pode causar queimaduras na pele e na retina. Use uma máscara facial de proteção contra UV!

A eliminação de todas as amostras, reagentes não utilizados e desperdício deve ser feita de acordo com as regulamentações do país, federais, estatais e locais.

5. Resolução de problemas

Problema	Possível motivo	Solução
Sem amplificação, padrão de comprimento visível	A enzima está em falta ou a concentração é demasiado baixa	Repetir tipificação, alterar a concentração de enzimas
	Parâmetros de amplificação errados	Otimizar os parâmetros de amplificação, verificar ciclador
Nenhuma banda visível, ou apenas bandas muito fracas visíveis, comprimento padrão invisível	Tingimento muito fraco	Repetir tingimento
Fundo do gel com demasiado brilho	Tingimento demasiado longo, Concentração da solução de tingimento demasiado alta	Embeber gel em H ₂ O ou TBE, Concentração da solução de tingimento mais baixa
Banda turva	Tampão de eletroforese demasiado quente ou gasto, tampão de eletroforese errado, a polimerização do gel não foi bem feita	Baixar a tensão, usar tampão 0,5 x TBE

6. Explicação dos símbolos usados nos rótulos

	Temperatura de armazenamento
	Prazo de validade
	Consulte as instruções de utilização
	Suficiente para "n" ensaios
CONT	Conteúdo, contém
CONTROL DNA	DNA de controlo
CYCLER CHECKING	Utilização prevista: Validação da uniformidade da temperatura em termocicladores
IFU	Instruções de utilização
LOT	Código do lote
PCRBUF 10x	Tampão de PCR, concentração de 10x
PCRFOIL	Película de alumínio de PCR
PCRPLATE	Placas de PCR
REACTIONMIX	Misturas de reação
REF	Referência de catálogo
RTU	Pronto a usar

Para instruções de utilização noutros idiomas, consulte:

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

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

ou ligue para: +49 (0)6404-925-125



BAG Health Care GmbH

Amtsgerichtsstraße 1-5
35423 Lich/Alemanha

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

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

www.bag-healthcare.com

info@bag-healthcare.com

Encomenda:

Tel.: +49(0)6404/925-450

Fax: +49(0)6404/925-460

verkauf@bag-healthcare.com

Assistência ao cliente:

Tel.: +49(0)6404/925-125

Fax: +49(0)6404/925-421

service@bag-healthcare.com