

Gebrauchsinformation
BAG Cyclor Check

Testkit zur Überprüfung der Temperaturuniformität in Thermocyclern
gebrauchsfertig vorgetropft

REF 7104 (10 Tests)
REF 71044 (4 Tests)

Inhalt

1. Produktbeschreibung	2
2. Material	3
2.1 Inhalt des BAG Cyclor Check	3
2.2 Zusätzlich erforderliches Material	3
2.3 Lagerung und Haltbarkeit	4
3. Testdurchführung	4
3.1 Amplifikation	4
3.2 Gelelektrophorese	5
3.3 Dokumentation und Auswertung	6
4. Warn- und Entsorgungshinweise	6
5. Mögliche Fehlerquellen	7
6. Erklärung der Symbole auf den Etiketten	7

1. Produktbeschreibung

Der BAG Cyclus Check ist eine schnelle und einfache Methode zur Überprüfung der Temperaturuniformität im Thermocycler. Da insbesondere in der Nukleinsäurediagnostik die Sicherstellung der Funktionalität des Thermocyclers von entscheidender Bedeutung ist, sollte ein solcher Test regelmäßig durchgeführt werden.

Der BAG Cyclus Check besteht aus einem Reaktionsmix, der in allen Positionen eines 96er Thermoblocks getestet wird. Dieser Mix enthält ein Primerpaar zur Überprüfung der Denaturierungstemperatur (540 bp Bande) und ein Primerpaar zur Überprüfung der Annealingtemperatur (1040 bp Bande). Mit diesen beiden Primerpaaren kann getestet werden, ob die Denaturierungstemperatur nach unten oder die Annealingtemperatur nach oben abweicht.

Bei korrekten Temperaturen und einem einheitlichen Temperaturprofil sollten in allen 96 Positionen zwei Banden erscheinen (Abb. 1). Wenn die Temperaturen vom Soll abweichen, so fallen Banden in einzelnen Positionen oder in allen Positionen aus (Abb. 2).

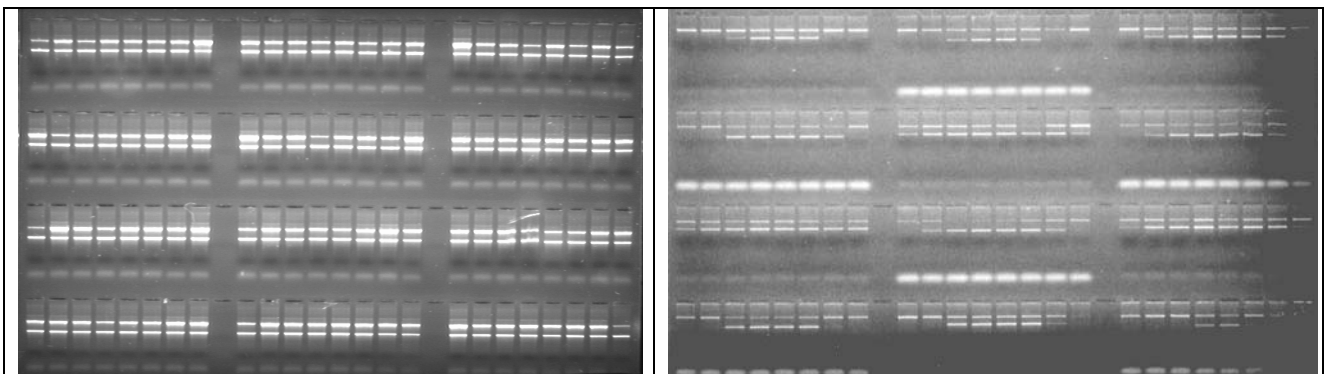


Abb.1: Ergebnisse mit dem BAG Cyclus Check unter den nachfolgend angegebenen Bedingungen

Abb.2: Ergebnisse mit dem BAG Cyclus Check mit einer um 2°C nach unten abweichenden Denaturierungstemperatur

Da der Testmix im BAG Cyclus Check speziell auf die Reaktionsbedingungen für die BAG HISTO TYPE Kits abgestimmt ist, eignet er sich auch sehr gut, um die optimalen Reaktionsbedingungen auf einem speziellen Thermocycler zu ermitteln. Dies kann notwendig sein, da Thermocycler sehr unterschiedlich eingestellt sein können

2. Material

2.1 Inhalt des BAG Cycler Check

- ◆ 4 bzw. 10 BAG Cycler Check Testplatten ausreichend für 4 bzw. 10 Tests. Die vorpipettierten und getrockneten Reaktionsansätze enthalten zwei Primerpaare und Nukleotide.
- ◆ 1 bzw. 2 x 1,1 ml 10 x PCR-Puffer
- ◆ 2 bzw. 5 x 210 µl Kontroll-DNA (60 ng/µl)
- ◆ 4 bzw. 10 x PCR Folie für jeweils 4 bzw. 10 Tests
- ◆ Gebrauchsinformation und Testprotokoll

2.2 Zusätzlich erforderliches Material

- ◆ Taq-Polymerase (5 U/µl)
- ◆ Kolbenhubpipetten (0,5-250 µl)
- ◆ sterile Spitzen, ggf. mit Filter
- ◆ DNA-Thermocycler (z. B. PTC 200 von MJ Research/Fa. Biozym mit beheiztem, justierbarem Deckel)

Geräte und Material für die Gelelektrophorese

- ◆ DNA-Agarose
- ◆ 0,5 x TBE-Puffer (45 mM Tris, 45 mM Borsäure, 0,5 mM EDTA)
- ◆ Ethidiumbromid (EtBr)
- ◆ Flachgelkammer mit Kämmen (mind. 25 Taschen)
- ◆ Spannungsgeber (200 - 300 V, 200 mA)

Geräte zur Auswertung und Dokumentation

- ◆ UV-Leuchtplatte (220-310 nm)
- ◆ Photoeinrichtung (z.B. Polaroid-System mit Filmen Polaroid Typ 667)

2.3 Lagerung und Haltbarkeit

Der Kit wird ungekühlt versandt. Nach Erhalt werden alle Kit-Reagenzien bei -20 bis -80°C lichtgeschützt gelagert. Die Haltbarkeitsdauer ist den Etiketten auf den jeweiligen Reagenzien zu entnehmen. Die auf dem Außenetikett angegebene Haltbarkeit entspricht dem Kitbestandteil mit der kürzesten Haltbarkeit. Den 10 x Reaktionspuffer kurz vor Gebrauch auftauen.

3. Testdurchführung

3.1 Amplifikation

- Den Master-Mix bestehend aus 10 x PCR-Puffer, DNA-Lösung, Taq-Polymerase und Aqua dest. zusammenpipettieren und gründlich vortexen.

104 µl Kontroll-DNA (60 ng/µl)

824 µl Aqua dest.

104 µl 10 x PCR Puffer

8,3 µl Taq-Polymerase (5U/µl)

- Jeweils 10 µl des Mastermix in jede Position der PCR-Platte tropfen.

Die Gefäße werden mit der dafür vorgesehenen Folie **dicht** verschlossen. Bei Cyclern mit festdrehbarem Deckel können auch wieder verwendbare PCR-Matten zum Verschließen verwendet werden. Durch leichtes nach unten Schütteln der Platte sollte das blaue Pellet am Gefäßboden etwas angelöst werden, und es sollte darauf geachtet werden, daß sich die gesamte Reaktionslösung im Gefäßboden befindet. Ein Überschichten der Ansätze mit Mineralöl ist bei Verwendung eines beheizten und justierbaren Deckels **nicht** nötig!

- Die Reaktionsgefäße in den Cycler stellen (auf festen Sitz achten!) und das PCR-Programm starten. Die Positionierung der Testplatte im Cycler muss dabei beachtet werden (A1 oben links), um später die Reaktionen den einzelnen Positionen im Thermocycler zuordnen zu können.

Amplifikationsprotokoll

Programm-Schritt	Temp.	Zeit	Anzahl Zyklen
Erste Denaturierung	96°C	5 Min	1 Zyklus
Denaturierung	96°C	20 Sek	5 Zyklen
Annealing+Extension	68°C	1 Min	
Denaturierung	96°C	20 Sek	10 Zyklen
Annealing	64°C	50 Sek	
Extension	72°C	45 Sek	
Denaturierung	96°C	20 Sek	15 Zyklen
Annealing	61°C	50 Sek	
Extension	72°C	45 Sek	
Letzte Extension	72°C	5 Min	1 Zyklus

Cycler-Typen:

PTC 200 (MJ Research/Fa. Biozym) und GeneAmp PCR-System 9600 / 9700 (Fa. Perkin Elmer)

3.2 Gelelektrophorese

Die Auftrennung und Auswertung der Amplifikationsprodukte erfolgt durch Elektrophorese über ein (Horizontal-) Agarose-Gel. Als Laufpuffer wird 0,5 x TBE (45 mM Tris, 45 mM Borsäure, 0,5 mM EDTA) - Puffer empfohlen. Die Gelstärke sollte 2,0 - 2,5% Agarose betragen. Vor dem Probenauftrag sollte das Gel mindestens 30 Min. polymerisieren. Nach Beendigung der Amplifikation werden die Proben dem Cycler entnommen und die kompletten Ansätze vorsichtig in jeweils eine Tasche des Gels pipettiert. Die Zugabe von Probenpuffer ist nicht mehr nötig. Zusätzlich sollte eine Tasche mit einem DNA-Längenstandard für den Größenvergleich beladen werden. Die elektrophoretische Auftrennung erfolgt bei 10-12 V/cm (bei 20 cm Elektrodenabstand ca. 200-240 V) für 20-40 Min. Nach abgeschlossenem Lauf wird das komplette Gel für 30-45 Min. in einer Ethidiumbromid(EtBr)-Lösung (ca. 0,5 µg/ml EtBr in H₂O oder TBE-Puffer) gefärbt. Alternativ kann auch EtBr (0,5 µg/ml) dem Elektrophorese-Puffer oder dem Agarose-Gel zugesetzt werden. Im Bedarfsfall kann das Gel für ca. 20-30 Min. in H₂O entfärbt werden.

3.3 Dokumentation und Auswertung

Zur Dokumentation wird das Gel auf einen UV-Transilluminator (220-310 nm) gelegt und mit einer geeigneten Kamera (z.B. Polaroid, Film Typ 667) fotografiert. Belichtungszeit und Blende sind so zu wählen, dass die Banden scharf gezeichnet sind und sich gegen den dunklen Hintergrund abheben (Näherungswerte: Blende 11, Belichtungszeit 1 Sekunde).

Mögliche Ergebnisse:

- Wenn der Thermocycler die Temperaturen korrekt und gleichmäßig erreicht, sollten in allen Positionen zwei Banden erscheinen (540 bp + 1040 bp).
- Bei Abweichung der Denaturierungstemperatur nach unten fällt in einigen oder allen Positionen die **untere Bande** aus.
- Wenn die Annealingtemperatur nach oben abweicht, fällt in einigen oder allen Positionen zunächst die **obere** und dann auch die **untere Bande** aus.
- Bei einer zu niedrigen Annealingtemperatur ist mit unspezifischen Reaktionen zu rechnen.

Wenn das PCR-Ergebnis nicht den Anforderungen entspricht, sollte die Temperaturgenauigkeit mit einem elektronischen Messgerät überprüft werden und gegebenenfalls der Geräteservice angefordert werden.

4. Warn- und Entsorgungshinweise





Ethidiumbromid ist ein stark mutagenes Reagenz. Hautkontakt und Kontaminationen vermeiden! Die Gebrauchsinformation sowie die Warn- und Entsorgungshinweise des entsprechenden Herstellers sind zu beachten!

Der Transilluminator sendet sehr kurzwelliges UV-Licht aus, das Verbrennungen der Haut und der Netzhaut hervorrufen kann. UV-Gesichtsschutz tragen!

5. Mögliche Fehlerquellen

Fehler	mögliche Ursache	Beseitigung
Keine Amplifikation, Längenstandard sichtbar	<ul style="list-style-type: none"> Enzym fehlt oder Konzentration zu niedrig falsche Amplifikationsparameter 	<ul style="list-style-type: none"> Typisierung wiederholen, Enzym-Konzentration ändern Optimierung der Parameter, Thermocycler überprüfen
Keine oder sehr schwache Banden sichtbar, Längenstandard kaum sichtbar	EtBr-Färbung zu schwach	Färbung wiederholen
Gel-Hintergrund leuchtet zu stark	Färbung zu lange, EtBr-Konzentration zu hoch	mit H ₂ O entfärben, EtBr niedriger konzentrieren
Verschmierte Banden im Gel	Laufpuffer zu heiß Falscher Laufpuffer	Geringere Voltzahl wählen 0,5x TBE Puffer verwenden

6. Erklärung der Symbole auf den Etiketten

	Lagertemperatur
	Lot-Nr.
	Verwendbar bis
REF	Bestell-Nr.
	Gebrauchsinformation beachten

© Wichtige Information: Lizenzausschluss

Dieses Produkt ist optimiert für die Anwendung in der Polymerase-Ketten-Reaktion („PCR“). Die Durchführung der PCR ist durch Patente der Roche Molecular Systems, Inc. und der F. Hoffmann-La Roche AG („Roche“) geschützt. Durch den Kauf dieses Produktes werden weder direkt noch indirekt Lizenzrechte zur Nutzung des PCR-Verfahrens erworben. Weitere Informationen über die Lizenzvergabe zur Durchführung der PCR erhalten Sie in Europa über den PCR-Lizenzmanager der F. Hoffmann-La Roche AG, Grenzacherstr. 124, CH-4070 Basel.



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