

DE

Gebrauchsinformation

CYCLER 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 CYCLER CHECK.....	3
2.2 Zusätzlich erforderliches Material.....	3
2.3 Lagerung und Haltbarkeit.....	3
3. Testdurchführung.....	4
3.1 Amplifikation.....	4
3.2 Gelelektrophorese.....	5
3.3 Dokumentation und Auswertung	5
4. Warn- und Entsorgungshinweise	6
5. Mögliche Fehlerquellen	6
6. Erklärung der Symbole auf den Etiketten.....	7

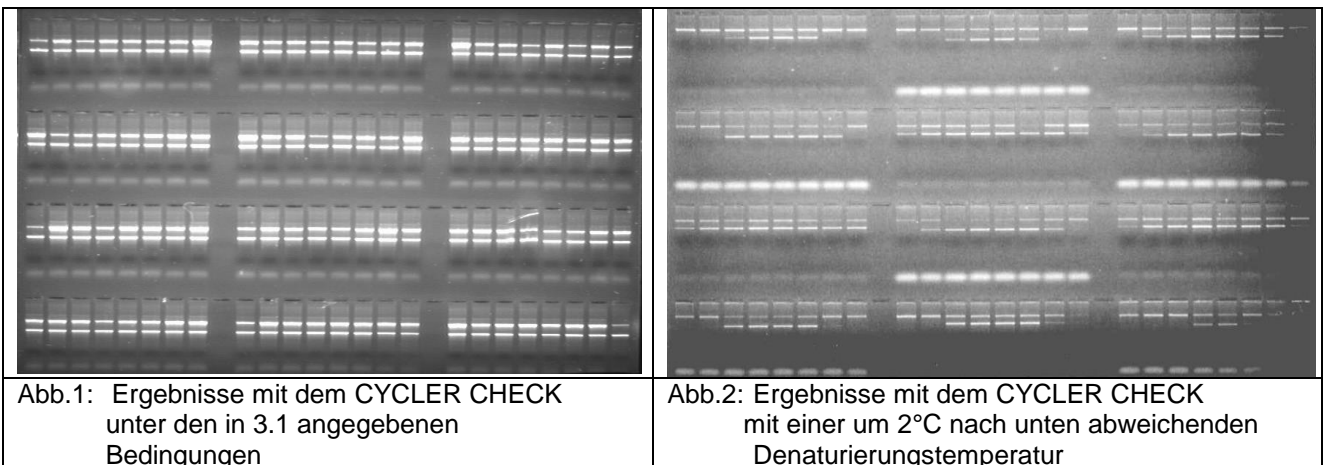
1. Produktbeschreibung

Der CYCLER 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 CYCLER 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.

Gerade bei GC reichen Sequenzen, die zu Sekundärstrukturen neigen, kann das Nichterreichen der Denaturierungstemperatur (96°C) zu falsch negativen Ergebnissen führen.

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).



Da der Testmix im CYCLER 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 CYCLER CHECK

- ◆ 4 bzw. 10 CYCLER CHECK Testplatten ausreichend für 4 bzw. 10 Tests. Die vor-pipettierten 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), (Happy Taq REF 70976 oder eine andere vom Anwender mit dem CYCLER CHECK validierte Taq Polymerase)

Bitte keine Hot-start Taq Polymerase verwenden!

- ◆ Kolbenhubpipetten (0,5 - 250 µl)
- ◆ sterile Spitzen, ggf. mit Filter
- ◆ DNA-Cycler (Liste der validierten Cycler siehe Seite 4)

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) oder **peqGREEN**
- ◆ 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 oder Video-System mit Thermopapier Typ KP65HM-CE)

2.3 Lagerung und Haltbarkeit

Der Kit wird ungekühlt versandt. Nach Erhalt alle Kit-Reagenzien bei $\leq -20^{\circ}\text{C}$ lichtgeschützt in temperaturüberwachten Geräten lagern. Die Haltbarkeitsdauer ist den Etiketten auf den jeweiligen Reagenzien zu entnehmen und gilt auch nach dem ersten Öffnen. Die auf dem Außenetikett angegebene Haltbarkeit entspricht dem Kitbestandteil mit der kürzesten Haltbarkeit.

Den 10 x PCR-Puffer kurz vor Gebrauch auftauen.

3. Testdurchführung

Die Evaluierung und die Qualitätskontrolle des CYCLER CHECK-Kits wurde mit der Happy Taq (REF 70976) durchgeführt.

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 (5 U/µl)

- Jeweils 10 µl Master-Mix in jede Position der PCR-Platte tropfen.

Die Gefäße mit der dafür vorgesehenen Folie **dicht** verschließen. Es ist darauf zu achten, dass die Deckelinnenseiten und die oberen Ränder nicht mit den Fingern berührt werden, um Verunreinigungen zu vermeiden. Bei Cyclern mit festdrehbarem Deckel können auch wieder verwendbare PCR-Matten zum Verschließen verwendet werden.

Durch leichtes Schütteln der Platte sollte das Pellet am Gefäßboden etwas angelöst werden, und es sollte darauf geachtet werden, dass sich die gesamte Reaktionslösung im Gefäßboden befindet. Gegebenenfalls sollte die Platte kurz anzentrifugiert werden.

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

Validierte Cycler-Typen:

PTC 100 / 200 / C1000 (MJ Research/BioRad),

GeneAmp PCR-System 9600 / 9700 (bitte Heizrate vom 9600 verwenden), Veriti (ABI),

Mastercycler epGradient S (bitte Funktion „simulate Mastercycler gradient“ verwenden) (Eppendorf),

Tprofessional (Biometra)

Keine Aluminiumheizblöcke verwenden (z.B. GeneAmp PCR-System 9600 / 9700)!

Bei Cyclern mit sehr schnellen Heiz- und Kühlraten wird empfohlen, eine etwas langsamere Heiz- und Kühlrate (~ 2,5°C/sec) zu wählen.

Die Qualitätskontrollen wurden mit Cyclern des Typs PTC 200 bzw. C1000 (MJ Research/BioRad), 9700 (ABI), Mastercycler epGradient S (Eppendorf) und Tprofessional (Bio-metra) durchgeführt.

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 Proben-auftrag sollte das Gel mindestens 30 Minuten 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 Minuten. Nach abgeschlossenem Lauf wird das komplette Gel für 30 - 45 Minuten 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 Minuten in H₂O entfärbt werden.

~~Statt mit Ethidiumbromid kann das Gel auch mit peqGREEN angefärbt werden. Dazu das Agarose-Gel nach dem Aufkochen etwas abkühlen lassen (bis ca. 55°C) und dann 1,6 µl peqGREEN pro 100 ml Gel zufügen und durch Schwenken gut mischen.~~

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 oder Video-System, Typ KP65HM-CE) fotografiert. Belichtungszeit und Blende sind so zu wählen, dass die Banden scharf gezeichnet sind und sich gegen den dunklen Hintergrund abheben.

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 **540 bp Bande** aus.
- Wenn die Annealingtemperatur nach oben abweicht, fällt in einigen oder allen Positionen zunächst die **1040 bp Bande** und dann auch die **540 bp 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!

Die Entsorgung ungebrauchter Reagenzien und Abfälle sollte entsprechend der Gesetzgebung des jeweiligen Landes und der lokalen Behörden erfolgen.

5. Mögliche Fehlerquellen

Fehler	mögliche Ursache	Beseitigung
Keine Amplifikation, Längenstandard sichtbar	Enzym fehlt oder Konzentration zu niedrig, falsche Amplifikationsparameter	Typisierung wiederholen, Enzym-Konzentration ändern, Optimierung der Parameter, Thermocycler überprüfen
Keine oder sehr schwache Banden sichtbar, Längenstandard kaum sichtbar	Färbung zu schwach	Färbung wiederholen
Gel-Hintergrund leuchtet zu stark	Färbung zu lange, Farbstoff-Konzentration zu hoch	Mit H ₂ O entfärben, Farbstoff niedriger konzentrieren
Verschmierte Banden im Gel	Laufpuffer zu heiß oder verbraucht, falscher Laufpuffer, Gel nicht auspolymerisiert	Geringere Voltzahl wählen, 0,5 x TBE Puffer verwenden

6. Erklärung der Symbole auf den Etiketten

	Lagertemperatur
	Verwendbar bis
	Gebrauchsinformation beachten
	Ausreichend für n Tests
CONT	Inhalt, enthält
CONTROL DNA	Kontroll-DNA
CYCLER CHECKING	Zweckbestimmung: Überprüfung der Temperaturuniformität in Thermocyclern
IFU	Gebrauchsinformation
LOT	Lot-Nr.
PCRBUF 10x	PCR-Puffer, 10x konzentriert
PCRFOIL	PCR-Folie
PCRPLATE	PCR-Platten
REACTIONMIX	Reaktionsmische
REF	Bestell-Nr.
RTU	Gebrauchsfertig

Gebrauchsinformationen in anderen Sprachen sind zu finden unter:

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

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

oder 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