




ELITechGroup S.p.A.
 C.so Svizzera, 185
 10149 Torino ITALY
 Büro: Tel. +39-011 976 19 Fax +39-011 936 76 11
 E. mail: emd.support@elitechgroup.com
 Internetseite: www.elitechgroup.com

BCL2 oligomix Alert kit
 Nachweis der BCL2-IgH MBR und BCL2-IgH mcr DNA

REF BANG08-02



INHALT

ANWENDUNGSGEBIET	Seite 1
TESTPRINZIP	Seite 2
KITBESCHREIBUNG	Seite 2
IM KIT ENTHALTENES MATERIAL	Seite 3
ZUSÄTZLICH BENÖTIGTES, NICHT MITGELIEFERTES MATERIAL	Seite 4
ANDEREN PRODUKTEN ERFORDERLICH	Seite 4
HINWEISE UND VORSICHTSMAßNAHMEN	Seite 4
PROBENMATERIAL UND KONTROLLEN	Seite 6
VERFAHREN	Seite 7
GRENZEN DES VERFAHRENS	Seite 13
MERKMALE DES PRODUKTES	Seite 14
LITERATUR	Seite 15
PROBLEMLÖSUNGEN	Seite 16
ERKLÄRUNG DER SYMBOLE	Seite 18

ANWENDUNGSGEBIET

Das Produkt «BCL2 oligomix Alert kit» ist ein qualitativer Nukleinsäure-Amplifikationstest zum Nachweis der DNA des Rearrangements BCL2-IgH, Translokation t(14;18), Varianten MBR und mcr in DNA-Extrakten aus Proben von peripherem EDTA-Blut, EDTA- oder Citrat-Knochenmarkblut, frischem und eingefrorenem Biopsiematerial.

Das Produkt ist in Kombination mit klinischen Daten und anderen Laboruntersuchungen in der Diagnostik und Überwachung der minimalen Resterkrankung bei Patienten mit follikulärem oder großzelligem Lymphom einsetzbar.

BCL2 oligomix Alert kit
 Nachweis der BCL2-IgH MBR und BCL2-IgH mcr DNA

REF BANG08-02

TESTPRINZIP

Das Verfahren sieht drei Arten von Amplifikationsreaktionen - MBR, mcr und ABL - mit einem programmierbaren Thermostat (thermal - cycler) vor.

Die Reaktion MBR sieht zwei aufeinander folgende Amplifikationsreaktionen (nested) vor, die für das Rearrangement BCL2-IgH, Variante MBR (MBR), spezifisch sind.

Die Reaktion mcr sieht zwei aufeinander folgende Amplifikationsreaktionen (nested), die für das Rearrangement BCL2-IgH, Variante mcr (mcr), spezifisch sind.

Die ABL-Reaktion besteht aus nur einer Amplifikationsreaktion (single round), die für das Gen ABL (ABL) spezifisch ist, und wird als Eignungskontrolle der Probe verwendet.

Bei den Reaktionen MBR und mcr wird eine erste Amplifikationsreaktion, die für einen Abschnitt des Rearrangements BCL2-IgH spezifisch ist, im ersten Reaktionsgefäß ausgeführt, ausgehend von der aus den Testproben extrahierten DNA. Dann wird im zweiten Reaktionsgefäß, ausgehend von dem Produkt der ersten Amplifikationsreaktion, eine zweite spezifische Amplifikationsreaktion für das Rearrangement durchgeführt.

Das Auftreten der spezifischen Produkte in der zweiten Amplifikationsreaktion zeigt an, dass DNA des Rearrangements BCL2-IgH im Ausgangsmaterial vorhanden war.

Bei der ABL-Reaktion wird im Reaktionsgefäß, ausgehend von dem Produkt der ersten Amplifikationsreaktion, eine spezifische Amplifikationsreaktion für einen Abschnitt des Gens ABL durchgeführt.

Das Auftreten des spezifischen Produkts der Kontrollamplifikation zeigt an, dass DNA des Gens ABL im Ausgangsmaterial vorhanden war.

KITBESCHREIBUNG

Der Kit enthält die folgenden Komponenten:

MBR OligoMIX und mcr OligoMIX für die erste Amplifikation

Optimierte Reaktionsmischungen für die Amplifikation der Nukleinsäuren in einer Stabilisationslösung, **voraliquotiert in gebrauchsfertigen «Monotest» Reaktionsgefäßen**. Jedes Reaktionsgefäß enthält 40 µL Lösung und 50 µL Vaselineöl.

MBR OligoMIX ist in **BLAUEN «Monotest» Reaktionsgefäßen** aliquotiert.

mcr OligoMIX ist in **FARBLOSEN «Monotest» Reaktionsgefäßen** aliquotiert.

Die Reaktionsmischungen liefern die Oligonukleotid-Primer für die erste Amplifikation, das Puffersystem, das Magnesiumchlorid und die Nukleotidtriphosphate.

Bei **MBR OligoMIX** sind die Oligonukleotid-Primer spezifisch für die Genomabschnitte **MBR** und **IgH**. Bei **mcr OligoMIX** sind die Oligonukleotid-Primer spezifisch für die Genomabschnitte **mcr** und **IgH**.

MBR OligoMIX und mcr OligoMIX für die zweite Amplifikation

Optimierte Reaktionsmischungen für die Amplifikation der Nukleinsäuren in einer Stabilisationslösung, **voraliquotiert in gebrauchsfertigen «Monotest» Reaktionsgefäßen**. Jedes Reaktionsgefäß enthält 44 µL Lösung und 50 µL Vaselineöl.

MBR OligoMIX ist in **ROTEN «Monotest» Reaktionsgefäßen** aliquotiert.

mcr OligoMIX ist in **GRÜNEN «Monotest» Reaktionsgefäßen** aliquotiert.

Die Reaktionsmischungen liefern die Oligonukleotid-Primer für die zweite Amplifikation, das Puffersystem, das Magnesiumchlorid und die Nukleotidtriphosphate.

Bei **MBR OligoMIX** sind die Oligonukleotid-Primer spezifisch für die Genomabschnitte **MBR** und **IgH**. Bei **mcr OligoMIX** sind die Oligonukleotid-Primer spezifisch für die Genomabschnitte **mcr** und **IgH**.

ABL OligoMIX für die Kontrollamplifikation

Optimierter Reaktionsmix für die Amplifikation der Nucleinsäuren in einer Stabilisationslösung, voraliquotiert in **gebrauchsfertigen GELBEN «Monotest» Reaktionsgefäßen**. Jedes Reaktionsgefäß enthält 40 µL Lösung und 50 µL Vaselinöl.

Der Reaktionsmix liefert die Oligonukleotid-Primer für die Kontrollamplifikation, das Puffersystem, das Magnesiumchlorid und die Nucleotidtriphosphate.

Die Oligonukleotid-Primer sind spezifisch für das **ABL-Gen**.

Mit dem Kit können **25 Reaktionen** inklusive Positiv- und Negativ-Kontrollen durchgeführt werden.

IM KIT ENHALTENES MATERIAL

Komponente	Beschreibung	Menge	Zusammensetzung	Etikettierung
MBR OligoMIX für die erste Amplifikation	Amplifikationsmix in BLAUEN 0,2 mL-Reaktionsgefäßen	25 x 90 µL	Externe Oligonukleotide, Kaliumchlorid, TRIS Base, TRIS HCl, Triton X-100, Magnesiumchlorid, Desoxynucleotidtriphosphat-mix, Vaselinöl	-
mcr OligoMIX für die erste Amplifikation	Amplifikationsmix in FARBLOSEN 0,2 mL-Reaktionsgefäßen	25 x 90 µL	Externe Oligonukleotide, Kaliumchlorid, TRIS Base, TRIS HCl, Triton X-100, Magnesiumchlorid, Desoxynucleotidtriphosphat-mix, Vaselinöl	-
ABL OligoMIX Kontrollamplifikation	Amplifikationsmix in GELBEN 0,2 mL-Reaktionsgefäßen	25 x 90 µL	Oligonukleotide, Kaliumchlorid, TRIS Base, TRIS HCl, Triton X-100, Magnesiumchlorid, Desoxynucleotidtriphosphat-mix, Vaselinöl	-
MBR OligoMIX für die zweite Amplifikation	Amplifikationsmix in ROTEN 0,2 mL-Reaktionsgefäßen	25 x 94 µL	Interne Oligonukleotide, Kaliumchlorid, TRIS Base, TRIS HCl, Triton X-100, Magnesiumchlorid, Desoxynucleotidtriphosphat-mix, Vaselinöl	-
mcr OligoMIX für die zweite Amplifikation	Amplifikationsmix in GRÜNEN 0,2 mL-Reaktionsgefäßen	25 x 94 µL	Interne Oligonukleotide, Kaliumchlorid, TRIS Base, TRIS HCl, Triton X-100, Magnesiumchlorid, Desoxynucleotidtriphosphat-mix, Vaselinöl	-

ZUSÄTZLICH BENÖTIGTES, NICHT MITGELIEFERTES MATERIAL

- Laminarfluss-Werkbank (Laminarbox).
- Ungepuderte Einweghandschuhe aus Latex o.ä.
- Tisch-Mikrozentrifuge (12.000 - 14.000 U/min).
- Mikropipetten und sterile Pipettenspitzen mit Aerosolfilter oder Direktverdrängungs-Dispensierpipetten (0,5-10 µL, 2-20 µL, 5-50 µL, 50-200 µL).
- Steriles bidestilliertes Wasser.
- Programmierbarer Thermostat (PCR-Thermocycler).

ANDEREN PRODUKTEN ERFORDERLICH

NICHT in diesem Kit enthalten sind die Reagenzien für die DNA-Extraktion aus den zu testenden Proben, für die positive Amplifikationskontrolle und für den Nachweis der amplifizierten DNA. Für diese Analysenschritte werden die folgenden Ergänzungskits von ELITechGroup S.p.A.:

«**EXTRAcell**» (Katalognr. EXT D02), Kit für die DNA-Extraktion aus zellulären Proben. Mit dem Kit können 50 Extraktionen durchgeführt werden.

«**EXTRAffin**» (Katalognr. EXT F01), Kit für die Nucleinsäure-Extraktion aus Biopsiematerial. Mit dem Kit können 50 Extraktionen durchgeführt werden.

«**BCL2 - Positive Control**» (Katalognr. CTR G08), positive Amplifikationskontrolle der Plasmid-DNA. Mit dem Kit kann die Kontrolle von 25 Läufen durchgeführt werden.

«**DNA polymerase 2U / µL**» (Katalognr. ER40 und ER140), thermostabile DNA-Polymerase für die Amplifikation von Nucleinsäuren. Mit dem Kit können 125 Reaktionen durchgeführt werden.

«**ELECTROPHORESIS 3**» (Katalognr. EPH03), Nachweis der amplifizierten DNA mittels Agarosegel-Elektrophorese. Mit dem Kit können 120 Nachweise durchgeführt werden.

HINWEISE UND VORSICHTSMAßNAHMEN

Dieser Kit ist ausschließlich für die *In-vitro-Diagnose* bestimmt.

Allgemeine Hinweise und Vorsichtsmaßnahmen

Alle biologischen Proben müssen so gehandhabt und entsorgt werden, als ob sie Infektionserreger übertragen könnten. Der direkte Kontakt mit den biologischen Proben ist zu vermeiden. Es dürfen keine Spritzer oder Aerosol erzeugt werden. Material, das mit den biologischen Proben in Kontakt gekommen ist, muss vor der Entsorgung mindestens 30 Minuten lang mit 3%-igem Natriumhypochlorit behandelt oder eine Stunde lang bei 121°C autoklaviert werden.

Alle Reagenzien und im Test verwendeten Materialien müssen so gehandhabt und entsorgt werden, als ob sie Infektionserreger übertragen könnten. Der direkte Kontakt mit den Reagenzien ist zu vermeiden. Es dürfen keine Spritzer oder Aerosol erzeugt werden. Abfälle müssen gemäß den geltenden Sicherheitsvorschriften behandelt und entsorgt werden. Brennbares Einwegmaterial muss verbrannt werden. Flüssige Abfälle, die Säuren oder Basen enthalten, müssen vor der Beseitigung neutralisiert werden.

BCL2 oligomix Alert kit

Nachweis der BCL2-IgH MBR und BCL2-IgH mcr DNA

REF

BANG08-02

- Geeignete Schutzkleidung und -handschuhe tragen. Augen und Gesicht sind zu schützen.
- Lösungen niemals mit dem Mund pipettieren.
- Im Arbeitsbereich nicht essen, trinken, rauchen und keine Kosmetika auftragen.
- Nach der Arbeit mit Proben und Reagenzien gründlich die Hände waschen.
- Überschüssige Reagenzien und Abfälle nach den geltenden Vorschriften entsorgen.
- Vor dem Test alle Gebrauchsanweisungen zum Kit lesen.
- Bei der Testdurchführung sind die im Kit enthaltenen Anweisungen zu befolgen.
- Das Verfallsdatum des Kits ist einzuhalten.
- Nur die im Kit enthaltenen oder vom Hersteller empfohlenen Reagenzien verwenden.
- Nie Reagenzien verschiedener Chargen gegeneinander austauschen.
- Keine Reagenzien aus Testbestecken anderer Hersteller verwenden.

Hinweise und Vorsichtsmaßnahmen für die Molekularbiologie

Die Verfahren der Molekularbiologie wie Extraktion, reverse Transkription, Amplifikation und Nachweis von Nukleinsäuren erfordern geschultes Personal, um falsche Ergebnisse – bedingt durch den Abbau von Nukleinsäuren in den Proben oder Kontamination der Proben durch Amplifikationsprodukte – zu vermeiden.

Die DNA-Extraktion aus den Proben und die Vorbereitung der Amplifikationsreaktionen müssen räumlich separat von der Amplifikation und dem Nachweis der Amplifikationsprodukte durchgeführt werden. Ein Amplifikationsprodukt darf nie in den Arbeitsbereich 'Extraktion/Vorbereitung der Amplifikationsreaktionen' gelangen.

Für die Extraktion/Vorbereitung der Amplifikationsreaktionen einerseits und für die Amplifikation/Nachweis der Amplifikationsprodukte andererseits müssen jeweils gesondert Kittel, Handschuhe und Instrumente zur Verfügung stehen. Die Kittel, Handschuhe und Instrumente aus dem Bereich 'Amplifikation/Nachweis der Amplifikationsprodukte' dürfen nie in den Bereich 'Extraktion/Vorbereitung der Amplifikationsreaktionen' gelangen.

Die Proben dürfen ausschließlich für diese Art von Analyse verwendet werden. Die Proben müssen an einer Laminarfluss-Werkbank gehandhabt werden. Reaktionsgefäße mit verschiedenen Proben dürfen nie gleichzeitig geöffnet werden. Die Pipetten zum Pipettieren der Proben dürfen ausschließlich dafür verwendet werden. Die Pipetten müssen Direktverdrängungs-Dispensierpipetten sein, andernfalls müssen Pipettenspitzen mit Aerosolfilter verwendet werden. Die verwendeten Spitzen müssen steril, DNase/RNase-frei sowie DNA/RNA-frei sein.

Die Reagenzien müssen an einer Laminarfluss-Werkbank gehandhabt werden. Die für die Amplifikation erforderlichen Reagenzien müssen so vorbereitet werden, dass sie in einer Sitzung aufgebraucht werden. Die Pipetten zum Pipettieren der Reagenzien dürfen ausschließlich dafür verwendet werden. Die Pipetten müssen Direktverdrängungs-Dispensierpipetten sein, andernfalls müssen Pipettenspitzen mit Aerosolfilter verwendet werden. Die verwendeten Spitzen müssen steril, DNase/RNase-frei sowie DNA/RNA-frei sein.

Die Amplifikationsprodukte müssen so gehandhabt werden, dass ihre Verbreitung in die Umgebung weitestgehend begrenzt wird, um Kontaminationen zu vermeiden. Die Pipetten zum Pipettieren der Amplifikationsprodukte dürfen ausschließlich dafür verwendet werden.

Spezielle Hinweise und Vorsichtsmaßnahmen für die Komponenten

Die Reaktionsgefäße mit **OligoMIX** für die **erste Amplifikation**, für die **zweite Amplifikation** und die **Kontrollamplifikation** sind Einweggefäße und dürfen daher nur einmal für Amplifikationsreaktionen verwendet werden.

Für **OligoMIX** für die **erste Amplifikation**, für die **zweite Amplifikation** und die **Kontrollamplifikation** gelten folgende Sicherheitsempfehlungen (S-Sätze):

S 23-25. Gas/Rauch/Dampf/Aerosol nicht einatmen. Berührung mit den Augen vermeiden.

BCL2 oligomix Alert kit

Nachweis der BCL2-IgH MBR und BCL2-IgH mcr DNA

REF

BANG08-02

PROBENMATERIAL UND KONTROLLEN

Proben

Verwenden Sie mit diesem Produkt nur aus den folgenden biologischen Proben extrahierte **DNA**: in EDTA gesammeltes peripheres Blut, in EDTA gesammeltes Knochenmark- oder Citratblut, frisches und eingefrorenes Biopsiematerial.

Peripheres EDTA-Blut, EDTA- oder Citrat-Knochenmarkblut

Peripheres EDTA-Blut, EDTA- oder Citrat-Knochenmarkblut für die DNA-Extraktion müssen nach den Laboranweisungen gesammelt und bei +2° bis +8°C transportiert werden. Bei +2° bis +8°C können sie maximal drei Tage aufbewahrt werden.

Peripheres oder Knochenmarkblut nicht einfrieren, um den Verlust der DNA zu vermeiden.

Die Arbeitsvorschriften für die Extraktion der DNA sind im Handbuch für «**EXTRAcell**» enthalten.

Frisches und eingefrorenes Biopsiematerial

Frische Biopsieproben für die DNA-Extraktion müssen nach den Laboranweisungen gesammelt und bei +2° bis +8°C transportiert werden. Sie können bei +2° bis +8°C maximal vier Stunden, bei -20°C maximal dreißig Tage und bei -70°C auch längere Zeit verwendbar gelagert werden.

Proben, die eingefroren aufbewahrt werden, sollten in Fragmenten zu je ca. 1 mm³ eingefroren werden, um wiederholtes Frieren/Tauen zu vermeiden.

Die Arbeitsvorschriften für die Extraktion der DNA sind im Handbuch für «**EXTRAffin**» enthalten.

Interferierende Substanzen

Die aus den Ausgangsproben extrahierte DNA darf kein Heparin oder Hämoglobin enthalten, um Inhibitionsphänomene und ungültige Testergebnisse zu vermeiden.

Es liegen keine Daten zu eventuellen Inhibitionsphänomenen durch Antibiotika, Virustatika, Chemotherapeutika oder Immunsuppressiva vor.

Amplifikationskontrollen

Es ist absolut notwendig, jeden Lauf zu validieren, indem eine negative und eine positive Kontrolle mitgeführt wird.

Für die Negativkontrolle verwendet man steriles bidestilliertes Wasser (nicht im Kit enthalten), das der Reaktion anstelle der aus der Probe extrahierten DNA hinzugefügt wird.

Für die Positivkontrolle wird DNA aus einer bereits getesteten positiven Probe oder die «**BCL2 - Positive Control**» verwendet.

Qualitätskontrollen

Es wird empfohlen, den gesamten Analyseprozess, Extraktion und Amplifikation in einem Lauf zu validieren, indem man eine negative und eine positive Probe, die bereits getestet sind, oder kalibriertes Referenzmaterial verwendet.

VERFAHREN

Programmierung des Thermocyclers

(Im Arbeitsbereich 'Amplifikation/Nachweis der Amplifikationsprodukte' auszuführen)

Vor dem Beginn des Laufs sind folgende Vorbereitungen zu treffen:

- Überprüfen, ob der Temperaturblock des programmierbaren Thermostats (Thermocycler) kompatibel mit dem Format der im Kit enthaltenen «**Monotest**» Reaktionsgefäße ist (0,2 mL-Reaktionsgefäße).
- Im Handbuch des Cyclers prüfen, wie die Temperaturkontrolle erfolgt.
- Möglichst die **direkte Temperaturkontrolle am Heizblock** auswählen (z.B. beim Thermocycler Hybrid™ oder Eppendorf™).
- Wenn dies nicht möglich ist (z.B. beim Thermocycler GeneAmp PCR System von Applied Biosystems™) die Kontrolle der Temperaturvoreinstellung wählen.
- Wenn abgefragt, am Thermocycler das Reaktionsvolumen **100 µL** einstellen.
- Am Thermocycler die Parameter des Reaktionszyklus entsprechend den folgenden Tabellen einstellen:

Programm der ersten Amplifikation		
Anzahl der Zyklen	Temperatur	Zeitdauer
1 Zyklus	95° C	4 Min.
35 Zyklen	95° C	1 Min.
	60° C	1 Min.
	72° C	1 Min.
1 Zyklus	72° C	5 Min.

Programm der zweiten Amplifikation		
Anzahl der Zyklen	Temperatur	Zeitdauer
1 Zyklus	95° C	2 Min.
30 Zyklen	95° C	1 Min.
	60° C	1 Min.
	72° C	1 Min.
1 Zyklus	72° C	5 Min.

Vorbereitung der ersten Amplifikation

(im Arbeitsbereich 'Extraktion/Vorbereitung der Amplifikationsreaktion' auszuführen)

Jede Probe erfordert ein eigenes Reaktionsgefäß. Ein Kit ermöglicht die Durchführung von 25 Reaktionen MBR, 25 Reaktionen mcr, 25 Reaktionen ABL, inklusive Positiv- und Negativ-Kontrollen. Pro Lauf müssen mindestens neun Reaktionen durchgeführt werden: drei Reaktionen MBR (Positivkontrolle, Negativkontrolle und zu analysierende Probe), drei Reaktionen mcr (idem), drei Reaktionen ABL (idem).

Vor dem Beginn des Laufs sind folgende Vorbereitungen zu treffen:

- Die Proben für die Analyse, die «**BCL2 - Positive Control**» auftauen, 5 Sekunden zentrifugieren, um den gesamten Inhalt am Gefäßboden zu konzentrieren, und in Eis stellen.
- Jeweils ein **BLAUES (MBR) «Monotest» Reaktionsgefäß** für jede Analyseprobe, für die Negativkontrolle und für die Positivkontrolle auftauen, 5 Sekunden zentrifugieren*, um den gesamten Inhalt am Gefäßboden zu konzentrieren, gut lesbar mit einem wasserfesten Stift beschriften und in Eis stellen.
- Jeweils ein **FARBLOSES (mcr) «Monotest» Reaktionsgefäß** für jede Analyseprobe, für die Negativkontrolle und für die Positivkontrolle auftauen, 5 Sekunden zentrifugieren*, um den gesamten Inhalt am Gefäßboden zu konzentrieren, gut lesbar mit einem wasserfesten Stift beschriften und in Eis stellen.
- Jeweils ein **GELBES (ABL) «Monotest» Reaktionsgefäß** für jede Analyseprobe und für die Negativkontrolle auftauen, 5 Sekunden zentrifugieren*, um den gesamten Inhalt am Gefäßboden zu konzentrieren, gut lesbar mit einem wasserfesten Stift beschriften und in Eis stellen.

*Hinweis: Die «**Monotest**» Reaktionsgefäße sind "dünnwandig" und müssen vorsichtig gehandhabt werden, damit sie nicht kaputt gehen. Das Zentrifugieren muss gegebenenfalls mit geeigneten Adaptoren und gemäß den Angaben in diesem Gebrauchshandbuch ausgeführt werden.

- «**DNA pol. 2U / µL**» entnehmen, 5 Sekunden zentrifugieren, um den gesamten Inhalt am Gefäßboden zu konzentrieren, und in Eis stellen.
- Das Enzym «**DNA pol. 2U / µL**» nach den Angaben in der folgenden Tabelle mit sterilem bidestilliertem Wasser verdünnen. Man stellt ein verdünntes Enzymvolumen her, das für alle Reaktionen **MBR, mcr** und **ABL** (einschließlich Kontrollen) plus eine ausreichend, um eine Sicherheitsspanne zu haben. Das verdünnte Enzym kann **nicht** aufbewahrt werden.

Anzahl der Reaktionen	DNA pol. 2U / µL	Wasser	Gesamtvolumen
4	2,0 µL	18,0 µL	20 µL
5	2,5 µL	22,5 µL	25 µL
6	3,0 µL	27,0 µL	30 µL
7	3,5 µL	31,5 µL	35 µL
8	4,0 µL	36,0 µL	40 µL
9	4,5 µL	40,5 µL	45 µL
10	5,0 µL	45,0 µL	50 µL
11	5,5 µL	49,5 µL	55 µL
12	6,0 µL	54,0 µL	60 µL
13	6,5 µL	58,5 µL	65 µL
14	7,0 µL	63,0 µL	70 µL
15	7,5 µL	67,5 µL	75 µL
16	8,0 µL	72,0 µL	80 µL
17	8,5 µL	76,5 µL	85 µL
18	9,0 µL	81,0 µL	90 µL
19	9,5 µL	85,5 µL	95 µL
20	10,0 µL	90,0 µL	100 µL
21	10,5 µL	94,5 µL	105 µL

1. In jedes **BLAUE (MBR), FARBLOSE (mcr)** und **GELBE (ABL) «Monotest» Reaktionsgefäß 5 µL** der verdünnten thermostabilen DNA-Polymerase (1U) pipettieren.
2. In jedes **BLAUE, FARBLOSE** und **GELBE «Monotest» Reaktionsgefäß 5 µL** der gewonnenen DNA pipettieren. In gleicher Weise für die Negativ- und die Positivkontrolle vorgehen.
3. Die **BLAUEN, FARBLOSEN** und **GELBEN «Monotest» Reaktionsgefäße** in den Thermocycler im Arbeitsbereich 'Amplifikation/Nachweis der Amplifikationsprodukte' stellen und das Programm für die erste Amplifikation starten.

Vorbereitung der zweiten Amplifikation

(im Arbeitsbereich 'Extraktion/Vorbereitung der Amplifikationsreaktion' auszuführen)

Vor dem Beginn des Laufs sind folgende Vorbereitungen zu treffen:

- «**DNA pol. 2U / µL**» entnehmen, 5 Sekunden zentrifugieren, um den gesamten Inhalt am Gefäßboden zu konzentrieren, und in Eis stellen.
- Ebenso viele **ROTE (MBR) «Monotest» Reaktionsgefäße** auftauen, wie blaue verwendet wurden, 5 Sekunden zentrifugieren*, um den gesamten Inhalt am Gefäßboden zu konzentrieren, gut lesbar mit einem wasserfesten Stift beschriften und auf Eis halten.
- Ebenso viele **GRÜNE (mcr) «Monotest» Reaktionsgefäße** auftauen, wie farblose verwendet wurden, 5 Sekunden zentrifugieren*, um den gesamten Inhalt am Gefäßboden zu konzentrieren, gut lesbar mit einem wasserfesten Stift beschriften und auf Eis halten.

*Hinweis: Die «**Monotest**» Reaktionsgefäße sind "dünnwandig" und müssen vorsichtig gehandhabt werden, damit sie nicht kaputt gehen. Das Zentrifugieren muss gegebenenfalls mit geeigneten Adaptoren und gemäß den Angaben in diesem Gebrauchshandbuch ausgeführt werden.

- Das Enzym «DNA pol. 2U / µL» nach den Angaben in der obigen Tabelle mit sterilem bidestilliertem Wasser verdünnen. Man stellt ein verdünntes Enzymvolumen her, das für alle vorgesehenen Reaktionen **MBR** und **mcr** (einschließlich Kontrollen) plus eine ausreicht, um eine Sicherheitsspanne zu haben. Das verdünnte Enzym kann **nicht** aufbewahrt werden.

- In jedes **ROTE (MBR)** und **GRÜNE (mcr)** «*Monotest*» Reaktionsgefäß **5 µL** der verdünnten thermostabilen DNA-Polymerase (1 U) pipettieren.
- In jedes **ROTE (MBR)** «*Monotest*» Reaktionsgefäß **1 µL** des Produkts aus der ersten Amplifikation aus dem entsprechenden **BLAUEN (MBR)** «*Monotest*» Reaktionsgefäß dazu pipettieren.
- In jedes **GRÜNE (mcr)** «*Monotest*» Reaktionsgefäß **1 µL** des Produkts aus der ersten Amplifikation aus dem entsprechenden **FARBLOSEN (mcr)** «*Monotest*» Reaktionsgefäß dazu pipettieren.

Hinweis: Das Produkt der ersten Amplifikation kann die folgenden Tests kontaminieren. Halten Sie die überschüssigen Produkte aus der ersten Amplifikation separat und wechseln Sie die Handschuhe am Ende dieses Schrittes.

- Die **ROTEN** und **GRÜNEN** «*Monotest*» Reaktionsgefäße in den Thermocycler im Arbeitsbereich 'Amplifikation/Nachweis der Amplifikationsprodukte' stellen und das Programm für die zweite Amplifikation starten.

Hinweis: Das Reaktionsprodukt kann bei -20°C für maximal einen Monat aufbewahrt werden.

Nachweis des spezifischen Amplifikationsprodukts

(Im Arbeitsbereich 'Amplifikation/Nachweis der Amplifikationsprodukte' auszuführen)

Das spezifische Produkt der zweiten Amplifikation kann durch elektrophoretische Trennung nachgewiesen und identifiziert werden. Dazu verwendet man ein 4%iges Agarosegel mit 1 µg/mL Ethidiumbromid in 1x TAE-Puffer, (20 mM TRIS Base, 20 mM TRIS Acetat, 1 mM Dinatrium-EDTA), analog zum Produkt «**ELECTROPHORESIS 3**».

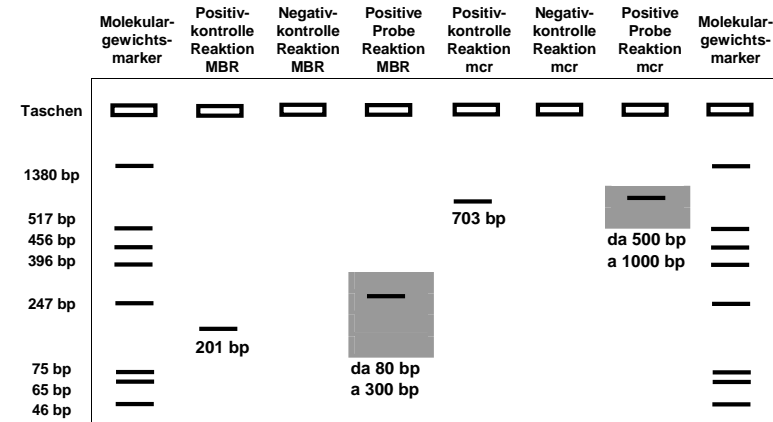
Die spezifischen Produkte der zweiten Amplifikation **MBR** haben eine Größe von **80 bis 300 bp**

Die spezifischen Produkte der zweiten Amplifikation **mcr** haben eine Größe von **500 bis 1000 bp**

Das spezifische Produkt der Amplifikation **ABL** hat eine Größe von **715 bp**

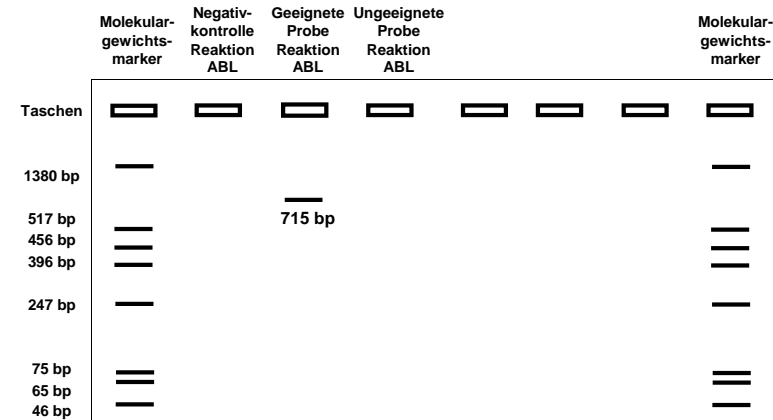
Hinweis: Das Produkt der zweiten Amplifikation kann spätere Analysen kontaminieren. Überschüssige Produkte aus der zweiten Amplifikation und der beim Nachweis erzeugte Abfall müssen separiert werden.

Das Beispiel zeigt schematisch das Ergebnis der elektrophoretischen Auftrennung der Produkte aus der zweiten MBR und mcr Amplifikation.



Hinweis: Durch eine Homologie, die gelegentlich im Abschnitt J des Gens IgH vorhanden ist, kann man in Verbindung mit dem spezifischen Produkt der zweiten Amplifikation MBR oder mcr ein weiteres Amplifikationsprodukt mit einer Größe von über 500 bp feststellen.

Das Beispiel zeigt schematisch das Ergebnis der elektrophoretischen Auftrennung der ABL Amplifikationsprodukte.



Es ist unbedingt notwendig, die Identität des zweiten Amplifikationsprodukts einer Probe zu validieren. Dazu vergleicht man seine Wanderungsstrecke im Gel mit der eines Markers mit bekanntem Molekulargewicht und mit der Wanderung des zweiten Amplifikationsprodukts der Positivkontrolle.

Das eventuelle Vorhandensein von unspezifischen Produkten in anderen Größen als die der spezifischen Produkte der zweiten Amplifikation einer Probe hat für den Nachweis der DNA der Rearrangements MBR und mcr und der DNA des ABL-Gens keinerlei Bedeutung.

Bewertung der Ergebnisse

Die Ergebnisse der negativen und der positiven Kontrollreaktionen werden verwendet, um die Sitzung entsprechend der folgenden Tabelle zu validieren:

Amplifikation der Negativkontrollen	Amplifikation
Spezifisches Produkt MBR, mcr und ABL	
NICHT VORHANDEN	KORREKT
Amplifikation der Positivkontrollen	Amplifikation
Spezifisches Produkt MBR und mcr	
VORHANDEN	KORREKT

Wenn das spezifische Amplifikationsprodukt in einer der negativen Kontrollreaktionen vorhanden ist, sind Probleme in der Amplifikationsphase (Kontamination) aufgetreten, die zu falschen Positivergebnissen führen können. Die Sitzung ist ungültig und muss ab der Amplifikation wiederholt werden. Wenn das spezifische Amplifikationsprodukt in einer der positiven Kontrollreaktionen nicht vorhanden ist, sind Probleme in der Amplifikationsphase aufgetreten (unwirksame oder keine Amplifikation), die zu falschen Negativergebnissen führen können. Die Sitzung ist ungültig und muss ab der Amplifikation wiederholt werden.

Mit diesem Kit kann eine Mindestmenge von 10 DNA-Kopien der Rearrangements MBR oder mcr pro Amplifikationsreaktion nachgewiesen werden (Nachweisgrenze des Produkts, siehe Abschnitt Merkmale des Produktes auf Seite 14).

Die Reaktionsergebnisse der Analysenproben werden, wie in der folgenden Tabelle beschrieben, verwendet, um die Präsenz von MBR und mcr-DNA nachzuweisen.

Amplifikation der Probe		Eignung der Probe	Testergebnis	MBR oder mcr DNA
Spezifisches Produkt MBR oder mcr	Spezifisches Produkt ABL			
NICHT VORHANDEN	NICHT VORHANDEN	nicht geeignet	ungültig	-
	VORHANDEN	geeignet	gültig, negativ	NICHT ERFASST
VORHANDEN	NICHT VORHANDEN	geeignet*	gültig, positiv	VORHANDEN
	VORHANDEN	geeignet	gültig, positiv	VORHANDEN

Wenn bei der Reaktion einer Probe weder das spezifische Produkt der Amplifikation MBR und mcr noch das des ABL-Gens der Kontrollamplifikation nachgewiesen werden, sind Probleme in der Amplifikationsphase (unwirksame oder keine Amplifikation) oder in der Extraktionsphase (keine DNA oder Präsenz von Inhibitoren oder Ausgangsprobe mit ungenügender Zellenzahl) aufgetreten, die zu falsch negativen Ergebnissen führen können. Die Probe ist unbrauchbar, der Test ist ungültig und muss ab Extraktion einer neuen Probe wiederholt werden.

Wenn in der Reaktion einer Analysenprobe das spezifische Produkt der Amplifikation MBR und mcr fehlt und das des ABL-Gens der Kontrollamplifikation vorhanden ist, wurde die DNA der Rearrangements MBR und mcr in der aus der Probe extrahierten DNA nicht erfasst. Man kann aber nicht ausschließen, dass die DNA der Rearrangements MBR und mcr mit einem Titer vorhanden ist, der unter der Nachweisgrenze des Produkts liegt (Nachweisgrenze des Produkts, siehe Abschnitt 'Merkmale des Produktes' auf Seite 14). In diesem Fall würde es sich um ein falsch negatives Ergebnis handeln.

Bei der Bewertung der mit diesem Produkt erhaltenen Ergebnisse müssen alle klinischen Daten und die anderen Laborwerte des Patienten berücksichtigt werden.

***Hinweis:** Wenn in einer Amplifikationsreaktion das spezifische Amplifikationsprodukt der Rearrangements MBR oder mcr vorhanden ist und das des ABL-Gens der Kontrollamplifikation fehlt, ist die Probe dennoch geeignet und das positive Testergebnis gültig. Die Amplifikationsreaktion des ABL-Gens hat nämlich eine geringere Wirksamkeit (single round) als die Amplifikation von MBR und mcr (nested).

Berechnung der Nachweisgrenzen

Die Nachweisgrenze des Tests berechnet sich ausgehend von der Nachweisgrenze der PCR gemäß folgender Formel, unter der Voraussetzung dass eine bestimmte Extraktionsmethode benutzt und Bezug auf eine bestimmte Referenz-Maßeinheit genommen wird.

$$\text{Nachweisgrenze} = Fe \times Ee \times Fa \times 10 \text{ DNA Kopien/Reaktion}$$

Fe ist der Quotient aus der Referenz-Maßeinheit und der in der Extraktion tatsächlich verwendeten Probenmenge, z.B.:

Extraktion	Referenz-Maßeinheit	extrahierte Probenmenge	Fe
«EXTRAcell»	DNA Kopien / 1.000.000 Zellen	500.000 Zellen	$Fe = 10^6 \text{ Z.} / 5 \times 10^5 \text{ Z.} = 2$

Ee ist die reziproke Extraktionseffizienz, z.B.:

Extraktion	Extraktionseffizienz	Ee
«EXTRAcell»	Effizienz ca. 100%, d.h. 1,0	$Ee = 1 / 1,0 = 1$

Fa ist der Quotient aus dem Volumen des DNA-Extrakts und dem in der Amplifikationsreaktion verwendeten Volumen, z.B.:

Extraktion	Volumen des Extrakts	Volumen in Reaktion	Fa
«EXTRAcell»	100 µL	5 µL	$Fa = 100 \mu\text{L} / 5 \mu\text{L} = 20$

Wenn man die Extraktionskits von ELITechGroup S.p.A. verwendet, ergibt obige Formel:

Extraktion	Nachweisgrenzen
«EXTRAcell»	Nachweisgrenze = 400 DNA Kopien / 1.000.000 Zellen

GRENZEN DES VERFAHRENS

Verwenden Sie mit diesem Produkt nur aus den folgenden biologischen Proben extrahierte DNA: in EDTA gesammeltes peripheres Blut, in EDTA gesammeltes oder Citrat-Knochenmarkblut, frisches und eingefrorenes Biopsiematerial.

Verwenden Sie mit diesem Produkt keine DNA aus heparinisierten Proben: Heparin hemmt die Amplifikationsreaktion der Nucleinsäuren und führt zu ungültigen Ergebnissen.

Verwenden Sie mit diesem Produkt keine mit Hämoglobin kontaminierte extrahierte DNA: Diese Substanzen können die Amplifikationsreaktion der Nucleinsäuren hemmen und zu ungültigen Ergebnissen führen.

Es liegen keine Daten zu eventuellen Inhibitionsphänomenen durch Antibiotika, Virustatika, Chemotherapeutika oder Immunsuppressiva vor.

Die mit diesem Produkt erzielten Resultate hängen von der korrekten Entnahme, Transport, Lagerung und Vorbereitung der Proben ab. Um Fehlergebnisse zu vermeiden, ist besondere Sorgfalt während dieser Arbeitsschritte sowie die strikte Einhaltung der mit dem Produkt mitgelieferten Arbeitsanleitung für die Extraktion der Nucleinsäuren angezeigt.

Die nested Amplifikation für Nucleinsäuren, die in diesem Produkt angewendet wird, unterliegt wegen ihrer hohen analytischen Sensitivität leicht der Kontamination durch MBR und mcr-positive klinische Proben, die Positivkontrollen und die Produkte der Amplifikationsreaktion selbst. Kontaminationen führen zu falsch positiven Ergebnissen. Das Produkt wurde so ausgeführt, dass die Kontaminationswahrscheinlichkeit begrenzt ist; dennoch können nur die technisch einwandfreie Durchführung der Experimente und die sorgfältige Einhaltung der Anweisungen in diesem Handbuch Kontaminationen vermeiden.

Das Personal, das mit diesem Produkt arbeitet, muss praktische Erfahrung mit der Handhabung von potenziell infektiösen biologischen Proben und als gefährlich eingestuftem chemischen Präparaten haben, um Unfälle mit eventuell schweren Folgen für den Anwender oder andere Personen zu vermeiden.

Dieses Produkt erfordert geeignete Arbeitskleidung und Arbeitsbereiche für die Handhabung von potenziell infektiösen biologischen Proben und als gefährlich eingestuftem chemischen Präparaten, um Unfälle mit eventuell schweren Folgen für den Anwender oder andere Personen zu vermeiden.

Das Personal, das mit diesem Produkt arbeitet, muss praktische Erfahrung mit molekularbiologischen Methoden wie Extraktion, Amplifikation und Nachweis von Nucleinsäuren haben, um Fehlergebnisse zu vermeiden.

Dieses Produkt erfordert separate Arbeitsbereiche für die Extraktion/Vorbereitung der Amplifikationsreaktionen und die Amplifikation/Nachweis der Amplifikationsprodukte, um falsch positive Ergebnisse zu vermeiden.

Dieses Produkt erfordert separate Arbeitskleidung und -instrumente für die Extraktion/Vorbereitung der Amplifikation und die Amplifikation/Nachweis der Amplifikationsprodukte, um falsch positive Ergebnisse zu vermeiden.

Ein negatives Ergebnis, das mit diesem Produkt erreicht wurde, zeigt an, dass die DNA der Rearrangements MBR und mcr in der aus der Probe extrahierten DNA nicht nachweisbar war. Man kann jedoch nicht ausschließen, dass die DNA der Rearrangements MBR und mcr mit einem Titer vorhanden ist, der unter der Nachweisgrenze des Produktes liegt (Nachweisgrenze des Produktes, siehe Abschnitt 'Merkmale des Produktes' auf Seite 14); in diesem Fall handelt es sich um ein falsch negatives Ergebnis.

Wie bei allen diagnostischen Verfahren müssen bei der Bewertung der Ergebnisse dieses Produktes alle klinischen Daten und die anderen Laborwerte des Patienten berücksichtigt werden.

Wie bei allen diagnostischen Verfahren besteht ein Restrisiko, mit diesem Produkt ungültige, falsch-positive oder falsch-negative Ergebnisse zu erhalten. Dieses Restrisiko kann nicht eliminiert oder weiter reduziert werden. Dieses Restrisiko kann in besonderen Situationen zu Fehlentscheidungen beitragen, die für den Patienten potenziell schwere Folgen haben können.

MERKMALE DES PRODUKTES

Analytische Sensitivität: Nachweisgrenze von MBR OligoMIX und mcr OligoMIX

Die analytische Sensitivität dieser OligoMIX ermöglicht den Nachweis von ca. 10 Molekülen der Ziel-DNA in 5 µL DNA-Extrakt, die in der Amplifikationsreaktion eingesetzt werden.

Die analytische Sensitivität des Tests, d.h. seine Nachweisgrenze, wurde mit zwei Plasmid-DNA als Referenzmaterial bestimmt. Die Plasmid-DNA enthielt das Amplifikationsprodukt, dessen Anfangskonzentration spektrophotometrisch gemessen wurde (pMBR und pmcr).

Die Plasmid-DNA pMBR wurde auf einen Titer von 10 Kopien/5 µL verdünnt. Die Verdünnung wurde als Doppelwert in sechs unabhängigen Sitzungen der nested Amplifikation mit MBR OligoMIX, einem Produkt von ELITechGroup S.p.A., eingesetzt.

Die Endergebnisse sind in der folgenden Tabelle zusammengefasst.

Proben	Anzahl Sitzungen	Anzahl Replikate	MBR positiv	MBR negativ
10 Kopien pMBR	6	2	12	0

Die pmcr Plasmid-DNA wurde auf einen Titer von 10 Kopien/5 µL verdünnt. Die Verdünnung wurde als Doppelwert in sechs unabhängigen Sitzungen der nested Amplifikation mit mcr OligoMIX, produziert von ELITechGroup S.p.A., eingesetzt.

Die Endergebnisse sind in der folgenden Tabelle zusammengefasst.

Proben	Anzahl Sitzungen	Anzahl Replikate	mcr positiv	mcr negativ
10 Kopien pmcr	6	2	12	0

Analytische Sensitivität: Nachweisgrenze von ABL OligoMIX

Die analytische Sensitivität dieses Tests ermöglicht den Nachweis von ca. 100 Molekülen der Ziel-DNA in 5 µL DNA-Extrakt, die in der Amplifikationsreaktion eingesetzt werden.

Die analytische Sensitivität der Eignungskontrolle der Probe, d.h. seine Nachweisgrenze, wurde mit humaner genomischer DNA als Referenzmaterial bestimmt, deren Anfangskonzentration spektrophotometrisch gemessen wurde.

Die humane genomische DNA wurde auf einen Titer von 5 ng /5 µL verdünnt. Die Verdünnung wurde als Doppelwert in sechs unabhängigen Sitzungen der single round Amplifikation mit ABL OligoMIX, produziert von ELITechGroup S.p.A., eingesetzt.

Die Endergebnisse sind in der folgenden Tabelle zusammengefasst.

Proben	Anzahl Sitzungen	Anzahl Replikate	ABL positiv	ABL negativ
5 ng humane genomische DNA	6	2	12	0

Diagnostische Sensitivität: Nachweeffizienz an eventuellen Polymorphismen

Die diagnostische Sensitivität des Tests, d.h. die Effizienz des Nachweises an eventuellen Polymorphismen, wurde durch den Vergleich von Sequenzen mit Nucleotid-Datenbanken bewertet.

Das Allinment der Abschnitte, die für die Hybridisierung der Oligonukleotid-Primer für das Rearrangement MBR der **MBR OligoMIX** gewählt wurden, mit den in der Datenbank vorhandenen Sequenzen der Genomabschnitte des Rearrangements BCL2-IgH zeigt ihre Konserviertheit und die Abwesenheit von Mutationen.

Das Allinment der Abschnitte, die für die Hybridisierung der Oligonukleotid-Primer für das Rearrangement mcr der **mcr OligoMIX** gewählt wurden, mit den in der Datenbank vorhandenen Sequenzen der Genomabschnitte des Rearrangements BCL2-IgH zeigt ihre Konserviertheit und die Abwesenheit von Mutationen.

Das Allinment der Abschnitte, die für die Hybridisierung der Oligonukleotid-Primer für das Gen ABL der **ABL OligoMIX** gewählt wurden, mit den in der Datenbank vorhandenen Sequenzen des Abschnitts des ABL-Gens zeigt ihre Konserviertheit und die Abwesenheit von Mutationen.

Diagnostische Spezifität: negative Proben

Die diagnostische Spezifität des Tests – als Bestätigung für negative Proben – wurde mit Analysen von Proben der humanen genomischen DNA nachgewiesen.

Die diagnostische Spezifität wurde mit menschlicher genomischer DNA als Referenzmaterial bewertet, die für das Rearrangement MBR und mcr negativ war und deren Anfangskonzentration spektrophotometrisch gemessen wurde.

Die humane genomische DNA wurde auf eine Konzentration von 500 ng/5 µL verdünnt. Die Verdünnung wurde als Doppelwert in sechs unabhängigen Sitzungen der nested Amplifikation mit MBR OligoMIX, produziert von ELITechGroup S.p.A., eingesetzt.

Die Endergebnisse sind in der folgenden Tabelle zusammengefasst.

Proben	Anzahl Sitzungen	Anzahl Replikate	MBR positiv	MBR negativ
500 ng Genom-DNA	6	2	0	12

Die humane genomische DNA wurde auf eine Konzentration von 500 ng/5 µL verdünnt. Die Verdünnung wurde als Doppelwert in sechs unabhängigen Sitzungen der nested Amplifikation mit mcr OligoMIX, produziert von ELITechGroup S.p.A., eingesetzt.

Die Endergebnisse sind in der folgenden Tabelle zusammengefasst.

Proben	Anzahl Sitzungen	Anzahl Replikate	mcr positiv	mcr negativ
500 ng Genom-DNA	6	2	0	12

Analytische Spezifität: Potenziell interferierende Marker

Die analytische Spezifität des Tests als Kreuzreaktivität mit anderen potenziell interferierenden Markern wurde durch den Vergleich von Sequenzen mit Nukleotid-Datenbanken bewertet.

Das Allinement der gewählten Abschnitte für die Hybridisierung der Oligonukleotid-Primer für das Rearrangement MBR der **MBR OligoMIX** mit den in der Datenbank verfügbaren Sequenzen von anderen humanen genomischen Abschnitten als MBR und IgH, darunter jenen des vollständigen humanen Genoms, wurde geprüft und hat die Spezifität des Amplifikationssystems erwiesen.

Das Allinement der gewählten Abschnitte für die Hybridisierung der Oligonukleotid-Primer für das Rearrangement mcr der **mcr OligoMIX** mit den in der Datenbank verfügbaren Sequenzen von anderen humanen genomischen Abschnitten als mcr und IgH, darunter jenen des vollständigen humanen Genoms, wurde geprüft und hat die Spezifität des Amplifikationssystems erwiesen.

Das Allinement der gewählten Abschnitte für die Hybridisierung der Oligonukleotid-Primer für das ABL-Gen der **ABL OligoMIX** mit den in der Datenbank verfügbaren Sequenzen von anderen humanen genomischen Abschnitten als dem humanen ABL-Gen, darunter jenen des vollständigen humanen Genoms, wurde geprüft und hat die Spezifität des Amplifikationssystems erwiesen.

Hinweis: Die vollständigen Daten und Ergebnisse der Tests, die für die Merkmale des Produktes durchgeführt wurden, sind in Abschnitt 7 der Technischen Produktmappe "BCL2 oligomix Alert kit", FTP BANG08 registriert.

LITERATUR

J. G. Gribben et al. (1994) *Blood* **12**: 3800 - 3807

PROBLEMLÖSUNGEN

Das spezifische Amplifikationsprodukt ist in der negativen Kontrollreaktion vorhanden

Mögliche Ursachen	Lösungen
Fehler bei der Dispensierung der extrahierten DNA.	Öffnen Sie nur ein Reaktionsgefäß zur gleichen Zeit, vermeiden Sie, den Inhalt austreten zu lassen, wechseln Sie immer die Pipettenspitze.
Fehler bei der Dispensierung des Produkts aus der ersten Amplifikation.	Öffnen Sie nur ein Reaktionsgefäß zur gleichen Zeit, vermeiden Sie, den Inhalt austreten zu lassen, wechseln Sie immer die Pipettenspitze.
Kontamination der für die Sitzung vorbereiteten Reagenzien.	Beobachten Sie sorgfältig die Verdünnung und Dispensierung des Enzyms, wechseln Sie immer die Pipettenspitze.
Kontamination des sterilen Wassers für die Enzymverdünnung.	Verwenden Sie ein neues Aliquot von sterilem Wasser.
Kontamination des Enzymvorrats.	Verwenden Sie ein neues Enzymaliquot.
Kontamination des Bereichs für die Extraktion / Vorbereitung der Amplifikationsreaktionen.	Reinigen Sie Oberflächen und Instrumente mit wasserlöslichen Detergenzien, waschen Sie die Kittel, ersetzen Sie die verwendeten Reaktionsgefäße und Pipettenspitzen.

Das spezifische Amplifikationsprodukt ist in der Positive Control Reaktion nicht vorhanden.

Mögliche Ursachen	Lösungen
Enzym zu stark verdünnt oder Fehler bei der Dispensierung des Enzyms.	Überprüfen Sie die Verdünnungsberechnungen, befolgen Sie aufmerksam die Dispensierung des Enzyms und mischen Sie gut.
Fehler bei der Dispensierung der Positivkontrolle.	Beobachten Sie aufmerksam die Dispensierung der Positivkontrolle.
Abbau der Positivkontrolle.	Verwenden Sie ein neues Aliquot der Positivkontrolle.
Fehler bei der Programmierung des Temperaturzyklus.	Kontrollieren Sie den-Temperatur-Zyklus, der am Thermocycler eingestellt ist.
Fehler bei der Dispensierung des Produkts aus der ersten Amplifikation.	Entnehmen und dispensieren Sie das Produkt der ersten Amplifikation sorgfältig für die zweite Amplifikation.
Fehler bei der Dispensierung des Produkts der zweiten Amplifikation ins Gel.	Laden Sie das Produkt der zweiten Amplifikation sorgfältig ins Gel.










Unspezifische Amplifikationsprodukte in den Reaktionen der Proben vorhanden.

Mögliche Ursachen	Lösungen
Enzym zu stark konzentriert.	Überprüfen Sie die Berechnungen der Enzymverdünnung.
Die Vorbereitung der ersten Amplifikationsreaktion dauert zu lange.	Halten Sie die Reaktionsgefäße, denen bereits der DNA-Extrakt zugesetzt wurde, auf Eis, bis sie in den Thermocycler gestellt werden
Fehler bei der Programmierung des Temperaturzyklus.	Kontrollieren Sie den-Temperatur-Zyklus, der am Thermocycler eingestellt ist.
Zu viel extrahierte DNA in der Reaktion.	Beurteilen Sie die Konzentration der extrahierten DNA, fügen Sie nicht mehr als 1 µg DNA pro Reaktion hinzu.

Das spezifische Amplifikationsprodukt ist in der ABL-Kontrollreaktion der Proben nicht vorhanden

Mögliche Ursachen	Lösungen
Heparin in der Vollblutprobe.	Die Blutprobe muss EDTA oder Natriumcitrat als Antikoagulans enthalten.
Fehler bei der Konservierung der Blutprobe.	Das Blut für die DNA-Extraktion muss innerhalb von wenigen Stunden ab der Abnahme behandelt und darf nie eingefroren werden.
Fehler in der Extraktionsphase.	Extraktionsarbeitsschritte kontrollieren. Extraktion mit gewissenhafter Beachtung der Anweisungen vorbereiten und ausführen.
Abbau der extrahierten Probe.	Die DNA-Extraktion muss mit DNase-freien Materialien und Reagenzien ausgeführt werden. Die extrahierte DNA muss bei -20°C oder -70°C aufbewahrt werden.
Fehler in der Amplifikationsphase.	Siehe Hinweise im Abschnitt: "Das spezifische Amplifikationsprodukt ist in der positiven Kontrollreaktion nicht vorhanden".

ERKLÄRUNG DER SYMBOLE

-  Katalognummer.
-  Oberer Temperaturgrenzwert.
-  Chargencode
-  Zu verwenden bis (letzter Tag des Monats).
-  *In-vitro*-Diagnostikum.
-  Entspricht den Anforderungen der Europäischen Richtlinie 98\79\EG über *In-vitro*-Diagnostika.
-  Inhalt ausreichend für "N" Tests.
-  Achtung, lesen Sie die Gebrauchsanleitung.
-  Hersteller.

Der Kauf des Produktes berechtigt den Käufer zur Amplifikation von Nukleinsäure-Sequenzen im Rahmen der *In-vitro*-Humandiagnostik. Dieses Recht wird nur dann gewährt, wenn dieses Erzeugnis zusammen mit den lizenzierten Produkten für "Positive Control" und Nachweis von ELITechGroup S.p.A. verwendet wird. Mit dem Kauf wird kein allgemeines Patent oder eine andere Lizenz als dieses spezifische Nutzungsrecht übertragen.