



**Vejledning i brug af Biofortuna SSPGo™ HLA Wipe Test BF-40-01**

**Version 2**

**September 2011**

## 1. Anvendelse

Biofortuna SSPGo HLA Wipe Test skal anvendes til monitorering af laboratorieområder og -udstyr mht. PCR-amplikonkontaminering, der kan genereres af Biofortuna SSPGo-produkter.

## 2. Introduktion

PCR er en følsom teknik, som er modtagelig over for kontaminering med DNA-amplikon fra en tidligere PCR. Kontaminering kan medføre falsk positiv amplifikation i efterfølgende PCR'er, hvilket kan medføre ukorrekt genotypebestemmelse. PCR-amplikon kan kontaminere reagenser og prøver samt laboratorieudstyr såsom pipetter. Reagenser og udstyr skal monitoreres regelmæssigt for tegn på kontaminering.

## 3. Testbeskrivelse

Hver SSPGo HLA Wipe Test består af en strip med otte PCR-brønde, der indeholder frysetørret PCR-buffer, polymerase og primere, der er specifikke for HLA-DRA-genet, og producerer en 187bp-amplikon fra humant genomisk DNA. Eftersom alle Biofortuna-sæt anvender en DRA-amplikon som intern kontrol, vil enhver kontaminering fra brugen af Biofortuna SSPGo-sæt have amplifikation af DRA-genet og blive påvist vha. aftørringstestprimere.

Hver strip med otte brønde kan teste op til tre aftørringstestområder mht. kontaminering. Hver strip har integrerede positive og -negative kontrolreaktioner samt inhibitionskontrolreaktioner for hvert aftørringstestområde. For at teste et område for kontaminering aftørres det først med en podepind, som så gennemvædes med vand. Dette vand bruges som en skabelonkontrol i aftørringstesten og som en blanding i forholdet 50:50 med genomisk DNA som en PCR- inhibitionstest.

Det anbefales at teste for kontaminering regelmæssigt. Typiske områder, der skal testes, omfatter DNA-klargøringsområdet, PCR-opsætningsområdet og postamplifikationsområdet. Typiske artikler, der skal testes, er arbejdsbænke, pipetter, centrifuger, køleskabs- og fryserhåndtag, dørhåndtag og stativer. Typiske opløsninger, der skal testes, omfatter DNA-klargøringsbuffer og DNA-fortyndingsopløsninger. Delte reagenser til multibrug såsom PCR-buffere og *Taq*-polymerase er særligt modtagelige over for kontaminering, men disse har ikke indvirkning på Biofortuna-sæt, eftersom Biofortuna-produkter er komplette og kun kræver tilføjet DNA.

## 4. Indhold i sættet

- 12 strips med 8 PCR-brønde, som hver indeholder 10 µl prædispenserede frysetørrede primere, polymerase, dNTP'er\* og buffer. Hver foliepakket strip skal bruges til at teste tre områder for kontaminering. Formatet for de otte reaktionsstrips er vist nedenfor.

Reaktion	Farve	Anvendelse
1	Rød	Positiv kontrol: DNA
2	Lilla	Negativ kontrol: vand anvendt til at væde podepind
3	Blå	Område 1, inhibitionstest: 50 % DNA, 50 % vand til aftørringstest
4	Lilla	Område 1, aftørringstest
5	Blå	Område 2, inhibitionstest: 50 % DNA, 50 % vand til aftørringstest
6	Lilla	Område 2, aftørringstest
7	Blå	Område 3, inhibitionstest: 50 % DNA, 50 % vand til aftørringstest
8	Lilla	Område 3, aftørringstest

- 36 sterile podepinde
- 12 x 8 PCR-hætter
- 1 x brugsvejledning
- 1 x analysecertifikat
- Sikkerhedsdatablade kan hentes fra Biofortunas websted [www.biofortuna.com](http://www.biofortuna.com). Kontakt den lokale distributør, hvis det ikke er muligt at hente ovenstående fra webstedet.

\*CleanAmp™-dNTP'er er givet i licens af Trilink Biotechnologies Inc til brug i Biofortuna SSPGo-produkter.



## 5. Nødvendige reagenser og nødvendigt udstyr

- Egnede pipetter og sterile pipettespidser, f.eks. P10-pipettor med 10- $\mu$ l-filterspidser.
- Humant genomisk DNA ved 5-10 ng/ $\mu$ l, der bruges som en positiv kontrol.
- DNA-isolationssæt/-udstyr.
- UV-spektrofotometer.
- 2-ml-polypropylenrør.
- Sterilt vand af molekylær renhed.
- Termocykler med 96 brønde og opvarmet låg. De PCR-plader og -rør, der anvendes i Biofortuna-sættene, er valideret til brug sammen med de fleste termocyklere på markedet, herunder MJ Research PTC-100, PTC-200, Hybaid MBS og Techne TC-512. Andre modeller kræver muligvis yderligere brugervalidering.
- Gelelektroforese reagenser (agarose, 0,5 x TBE, 1000bp-DNA-molekylærvægtsmarkør, 10 mg/ml ethidiumbromid).
- Gelelektroforese udstyr (geltanke, strømforsyning, geldokumentationssystem med UV-transilluminator).

## 6. Sikkerhed og advarsler

- Test må kun udføres af kvalificeret personale.
- Alle reagenser skal håndteres i henhold til god laboratorieskik.
- Præ- og post-PCR-områder skal holdes adskilt. Overfør ikke nogen form for post-PCR-materialer tilbage til præ-PCR-området.
- **Advarsel om biologisk risiko:** Alle blodprodukter skal behandles som potentielt smittefarlige.
- **Advarsel om biologisk risiko:** Ethidiumbromid er et potentielt karcinogen. Anvend altid handsker, kittel og beskyttelsesbriller ved brug af ethidiumbromid.
- **Advarsel om biologisk risiko:** Vær forsigtig ved brug af UV-kilder. Anvend altid handsker, kittel og beskyttelsesbriller. Se aldrig direkte ind i UV-lyskilden.
- Sikkerhedsdatablade findes på [www.biofortuna.com](http://www.biofortuna.com).

## 7. Opbevaring og holdbarhed

Biofortuna SSPGo-sættene kan opbevares ved 4-30 °C. Når PCR-beholderne fjernes fra foliepakken, skal reagenserne rehydreres med prøven inden for 3 timer. Se pakken for oplysninger om udløbsdato. Anvend ikke produkter efter den påtrykte dato.

Anvend ikke sættene, hvis foliepakken er beskadiget.

Sørg for, at PCR-beholderne forsegles tæt efter tilsætning af DNA, eftersom der ellers kan opstå fordampning under PCR-amplifikation. Vær særligt opmærksom på kanter og hjørner.

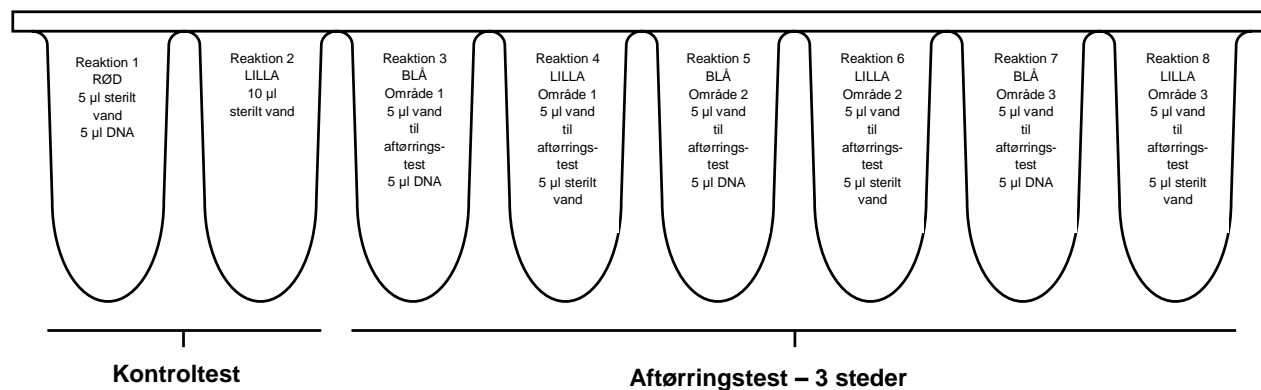
## 8. Brugsvejledning

### Bemærk:

En hyppig kontamineringskilde er PCR-pipetter, og det tilrådes at anvende en podedepind til spidsen af pipetten og om muligt inden i kanalen. Det anbefales også, at alle kontamineringstest udføres med en pipette, der er testet og har vist sig at være negativ. Hvis der påvises kontaminering, skal laboratorieretningslinjerne for fjernelse af kontaminering følges, og områderne skal testes igen.

1. På et DNA-frit område mærkes et sterilt DNase-frit 2-ml-polypropylenrør for hvert af aftørringstestområderne, der skal testes. Mærk et ekstra rør "Negativ kontrol".
2. Ved hjælp af en kendt kontamineringsfri pipette tilføjes 500 µl sterilt destilleret vand af molekylær renhed til hvert 2-ml-rør.
3. Væd en medleveret steril plastikpodepind i hvert rør til aftørringstest.
4. Aftør det område, der skal testes, med den fugtede podedepind.
5. Knæk eller skær plastikskaftet af podedepinden, og anbring den i det oprindelige 2-ml-rør med vand.
6. Vortex kortvarigt.
7. Fjern, og kassér podedepinden med en steril pincet.
8. Centrifuger i 1 minut ved 10.000-13.000 rpm i en mikrocentrifuge for at fjerne udfældninger.
9. Åbn test-foliepakken. Alle test skal rehydreres med i alt 10 µl væske som vist i diagram 1.
10. **Negativ kontrol:** Tilsæt **10 µl** sterilt vand af molekylær renhed til den negative kontrolreaktion **2** (lilla).
11. Tilsæt **5 µl** sterilt vand til reaktion **1, 4, 6, 8**.
12. **Positiv kontrol:** Tilsæt **5 µl** af 10 ng/µl humant genomisk DNA til reaktion **1** (rød reaktion) og reaktion **3, 5 & 7** (blå).
13. **Aftørringstestreaktioner:** Tilsæt **5 µl** centrifugeret væske (vand til aftørringstest) fra aftørringsområde 1 til reaktion **3 & 4**, fra aftørringsområde 2 til reaktion **5 & 6** og fra aftørringsområde 3 til reaktion **7 & 8**.
14. Alle reaktioner har nu 10 µl rehydreret volumen som vist i diagram 1. Forsegl reaktionerne med de medleverede hætter, og fortsæt med de sædvanlige SSPGo-PCR-parametre som vist nedenfor.

Diagram 1.



**BEMÆRKNING OM RESUSPENSION:** Sørg for, at PCR-blandingerne resuspenderes med prøverne inden for 3 timer efter, at bakken er fjernet fra foliepakken.

**BEMÆRKNING OM PCR-PLADE/-STRIP-HØJDEPROFIL:** Det anbefales, at højdeprofilen på plader og strips er ens, hvis de skal anvendes i samme PCR-maskine. Forskellige højdeprofiler kan forårsage dårlig kontakt med PCR-maskinens opvarmede låg. Dette kan resultere i dårlig eller mislykket PCR-amplifikation.

**PCR-parametre**

Følgende PCR-parametre bør anvendes. Sørg for at anvende temperaturstigninger på mindst 1 °C i sekundet, og aktivér det opvarmede låg. Se brugermanualen fra fabrikanten af termocycleren for en fuldstændig vejledning. Termocyklere skal kalibreres i henhold til ASHIs (American Society of Histocompatibility and Immunogenetic) eller EFIs (European Federation of Immunogenetics) retningslinjer for akkreditering.

Denaturer	94 °C	5 minutter		
Denaturer	96 °C	15 sekunder	←	10 cykler
Bind	66 °C	50 sekunder		
Udvid	72 °C	30 sekunder		
Denaturer	96 °C	15 sekunder	←	20 cykler
Bind	64 °C	50 sekunder		
Udvid	72 °C	30 sekunder		
HOLD 15 °C				

**Gelelektroforese**

Disse instruktioner gælder for horisontal agarosegelelektroforese: Forbered en 2 %-agarosegel i 0,5 x TBE-buffer. Når gelen er afkølet til ca. 60 °C, skal der tilsættes ethidiumbromid, så der opnås en endelig koncentration på 0,5 µg/ml. Støb gelen, og isæt mikrotiterformatkammer (f.eks. 12 x 8 brønde med 9 mm afstand). Når gelen er støbt, skal kammene fjernes. Dæk gelen med 0,5 x TBE-buffer. Overfør mindst 5 µl og højst 10 µl fra hver bakke- eller stripreaktion til den tilsvarende brønd på gelen. Notér positionen for hver reaktion. En 100-bp-stige kan være nyttig som hjælp til bestemmelse af størrelse. Kør gelen i 20 minutter ved 10V/cm.

Se brugermanualen fra fabrikanten af elektroforesesystemet for specifikke oplysninger om udstyret. Gelfotoet skal fremstilles med et UV-geldokumentationssystem med UV-transilluminator.

## 9. Fortolkning

Resultaterne for de aftørrede områder er kun gyldige, hvis den positive kontrol er positiv, og den negative kontrol er negativ.

Test af aftørrede områder er kun gyldige, hvis den tilsvarende inhibitionskontroltest er positiv.

Der bør observeres en 187bp-amplikon, hvis der er PCR-kontaminering eller DNA-kontaminering til stede. Smear eller bånd i forskellige størrelser kan også være et tegn på PCR-kontaminering, men primer-dimer og andre primer-førlængelsesartefakter på mindre end 100bp skal ignoreres.

Reaktion	Farve	Anvendelse	Resultat	Konklusion	Handling
1	Rød	Positiv kontrol	187bp + ve	Test gyldig. DNA egnet. PCR effektiv	
			Ingen amplifikation	Test ugyldig	Gentag hele analysen med en anden DNA-kontrol
2	Lilla	Negativ kontrol	187bp + ve	Test ugyldig. Vand og/eller pipette kontamineret	Test med andet vand og anden pipette
			Ingen amplifikation	Test gyldig. Vand ikke kontamineret	
3, 5, 7	Blå	Inhibitionstest	187bp + ve	Aftørringstest gyldig. Ingen hæmmere til stede	
			Ingen amplifikation	Aftørringstest ugyldig. Mulige hæmmere til stede	Rengør område med sterilt vand, gentag
4, 6, 8	Lilla	Aftørringstest	187bp + ve	Kontaminering er til stede	Isolér, og rengør brugt pipette. Rengør kontamineret område med opløsning fremstillet til at fjerne DNA. Gentag test
			Ingen amplifikation	Aftørringstest negativ. Ingen kontaminering	

## 10. Kvalitetssikring og -kontrol

Analysetestning: En PCR-amplikon fra et Biofortuna-sæt fik lov til at tørre på en fast overflade. Aftørringstesten blev udført uforyndet på amplikonen og herefter i fortyndinger fra  $1 \times 10^1$  til  $1 \times 10^{15}$ . Amplikonen blev påvist i fortyndinger til og med  $1 \times 10^{15}$ .

Genomisk DNA fik lov til at tørre på en fast overflade. Aftørringstesten blev udført på gDNA ved  $100 \text{ ng}/\mu\text{l}$  og herefter i fortyndinger fra  $1 \times 10^1$  til  $1 \times 10^{15}$ . DNA'et blev påvist i fortyndinger på op til  $1 \times 10^3$ .

## 11. Referencer

- 1) Bunce M et al Tissue Antigens. 1995 Nov;46(5):355-67.
- 2) Saiki RK et al. Nature. 1986 Nov 13-19;324(6093):163-6.

## 12. Biofortuna HLA Wipe Test (v2): Prøveoptegnelse

**Prøveoptegnelse** Det anbefales, at denne prøveoptegnelse fotokopieres før brug, da aftørringstestsættet har test til 36 områder (3 aftørringsområder for hver 8 strip med brønde, 12 strips pr. sæt).

Testdato:

---

Test udført af:

---

Godkendt af:

---

Andre oplysninger:






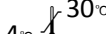


---

Sætlotnummer:

---

Reaktion	Farve	Anvendelse (se vejledning)	Testresultat	Handling	Oplysninger om prøve
1	Rød	Positiv kontrol: DNA			
2	Lilla	Negativ kontrol: Vand			
3	Blå	Område 1, inhibitionstest			
4	Lilla	Område 1, aftørringstest			
5	Blå	Område 2, inhibitionstest			
6	Lilla	Område 2, aftørringstest			
7	Blå	Område 3, inhibitionstest			
8	Lilla	Område 3, aftørringstest			

### 13. Symbolforklaring

	Antal test
	Se brugsvejledningen.
	Fabrikationssted
	<i>In vitro</i> -diagnostik
	Udløbsdato
	Opbevaringstemperatur
	Lotnummer
	Katalognummer

### 14. Kontaktoplysninger hos fabrikant

Biofortuna Ltd  
 1 Hawkshead Road  
 Croft Business Park  
 Bromborough, CH62 3RJ, UK  
 Tlf.: +44 (0) 151 334 0182  
 E-mail: [info@biofortuna.com](mailto:info@biofortuna.com)  
 Web: [www.biofortuna.com](http://www.biofortuna.com)



### 15. Oversættelser

Française :	Traductions disponibles
Deutsch:	Übersetzungen verfügbar
Español:	Traducciones disponibles
Italiano:	Traduzioni disponibili
Česky:	Překlady k dispozici
Dansk:	Tilgængelige oversættelser
Ελληνικά:	Διαθέσιμες μεταφράσεις
Magyar:	Fordítás rendelkezésre áll
Norsk:	Tilgjengelige oversettelser
Polski:	Tłumaczenia dostępne
Português:	Traduções disponíveis
Русский:	Переводы доступны
Slovensky:	Preklady k dispozícii
Türkçe:	Çeviriler mevcut
Svenska:	Översättningar tillgängliga

[www.biofortuna.com](http://www.biofortuna.com)

#### Revisionshistorik

Dette dokument er version 2.  
 Anvisninger i afsnit 8 og nummerering af afsnit er ændret.