



**Használati utasítás a Biofortuna SSPGo™ HLA Wipe Test-hez BF-40-01  
(HLA kenőpróba)**

**2. verzió**

**2011. szeptember**

## 1. Rendeltetés

A Biofortuna SSPGo HLA Wipe Test (*HLA kenőpróba*) rendeltetése a laboratóriumi felületek és a laboratóriumi berendezések és eszközök Biofortuna SSPGo termékekből származó PCR-amplikonokkal való szennyezettségének ellenőrzése.

## 2. Bevezetés

A PCR olyan érzékeny technika, amely esetében könnyen bekövetkezhet korábbi PCR-vizsgálatokból származó DNS-amplikonokkal való szennyeződés. A szennyeződés fals pozitív amplifikációt eredményezhet a további PCR-vizsgálatok során, amely helytelen genotipizáláshoz vezethet. A PCR-amplikonokkal való szennyeződés érintheti a reagenseket és a mintákat csakúgy, mint a laboratóriumi eszközöket (például a pipettákat). Ezért a reagenseket és a berendezéseket/eszközöket rendszeresen ellenőrizni kell, hogy nem szennyeződtek-e.

## 3. A teszt leírása

Minden egyes SSPGo HLA Wipe Test magában foglal egy nyolc PCR-cellából álló csíkot. A cellák fagyasztva szárított PCR-puffert, polimerázt és a HLA-DRA génre specifikus primereket tartalmaznak, és 187 bp amplikont adnak a humán genomikus DNS-ből. Mivel minden Biofortuna készlet DRA-amplikonokat alkalmaz belső kontrollként, a Biofortuna SSPGo készletekből származó bármely szennyeződés a DRA gén amplifikációját eredményezi, amelyet a kenőteszt primerei kimutatnak.

Az egyes, nyolc cellát tartalmazó csíkok maximum három kenetzőna szennyeződési vizsgálatára alkalmasak. Mindegyik csíknak részét képezi egy pozitív és egy negatív kontrollt tartalmazó reakciócella, valamint inhibíciós kontroll-reakciócellák mindegyik kenetzőnához. Egy adott terület szennyeződésének ellenőrzéséhez az applikátorpálca vattás végét végig kell húzni a vizsgálandó felületen, majd vízbe kell áztatni. Ez a víz kerül felhasználásra templátként a kenőpróba során, valamint 50:50 arányban genomikus DNS-t tartalmazó keverékként a PCR inhibíciós vizsgálat céljára.

Javasoljuk, hogy rendszeresen végezzen szennyeződés-ellenőrzést. A jellemzően vizsgálandó területek az alábbiak: DNS-előkészítési munkaterület, PCR-beállítási munkaterület és posztamplifikációs munkaterület. A jellemzően vizsgálandó eszközök közé tartoznak a munkaasztalok, pipetták, centrifugák, hűtő- és fagyasztószekrények fogantyúi, ajtókilincsek és tartóállványok. A jellemzően vizsgálandó oldatok közé tartoznak a DNS-előkészítő pufferek és a DNS-hígítók. A több célra használatos reagensek, mint például a PCR-pufferek és a *Taq* polimeráz esetében fokozott a szennyeződés kockázata, ez a kockázat azonban nem áll fenn a Biofortuna készletek esetében, mivel a Biofortuna termékek tartalmaznak a teszt lefolytatásához szükséges minden alkotórészt, és a termékek használatához kizárólag a hozzáadott DNS szükséges.

## 4. A készlet tartalma

- 12 db, egyenként 8 PCR cellát tartalmazó csík, melyek mindegyike 10 µl előre kimért, fagyasztva szárított primert, polimerázt, dNTP-t\* és puffert tartalmaz. Minden egyes fóliába csomagolt csík három zóna szennyeződés-ellenőrzésére alkalmas. A nyolc reakciócellát tartalmazó csík kialakítása az alábbi.

| Reakciócella | Festék | Használat   |
|--------------|--------|---|
| 1.           | Vörös  | Pozitív kontroll: DNS   |
| 2.           | Lila   | Negatív kontroll: a vattapamacs benedvesítéséhez használt víz |
| 3.           | Kék    | 1. zóna – inhibíciós vizsgálat: 50% DNS, 50% kenetminta (víz) |
| 4.           | Lila   | 1. zóna – kenőpróba   |
| 5.           | Kék    | 2. zóna – inhibíciós vizsgálat: 50% DNS, 50% kenetminta (víz) |
| 6.           | Lila   | 2. zóna – kenőpróba   |
| 7.           | Kék    | 3. zóna – inhibíciós vizsgálat: 50% DNS, 50% kenetminta (víz) |
| 8.           | Lila   | 3. zóna – kenőpróba   |

- 36 db steril vattapálca
- 12x8 db PCR-kupak
- 1x használati utasítás
- 1x analitikai bizonylat
- Az anyagbiztonsági adatlapok (MSDS) a Biofortuna weboldaláról tölthetők le: [www.biofortuna.com](http://www.biofortuna.com). Amennyiben nem tudja letölteni a weboldalról a dokumentumokat, kérjük, lépjen érintkezésbe a helyi forgalmazóval.

\*A CleanAmp™ dNTP-k licence a Biofortuna SSPGo termékekben való használatra a Trilink Biotechnologies Inc.-től származik.

## 5. Nem mellékelte reagensek, berendezések és eszközök

- Megfelelő pipettázók és steril hegyek, pl. P10 pipettázó 10 µl-es szűrőhegyekkel
- Humán genomikus DNS (5-10 ng/µl) a pozitív kontrollhoz
- DNS-izolációs készlet/berendezés
- UV-spektrofotométer
- 2 ml-es polipropilén csövek
- Steril, molekuláris tisztaságú víz
- 96 cellás, fűthető fedéllel rendelkező termocycler. A Biofortuna készletekhez használatos PCR-tálcákat és -csöveket érvényesítették a jelenleg forgalomban lévő legtöbb termocyclerrel való használatra, ideértve az MJ Research PTC-100, PTC-200, a Hybaid MBS és a Techne TC-512 termocyclereket. Az ezektől eltérő típusú termocyclereket a felhasználónak kell érvényesítenie.
- Gél-elektroforézis reagensek (agaróz; 0,5x TBE; 1000 bp DNS-molekulásúly-marker; 10 mg/ml etidium-bromid)
- Gél-elektroforézishez szükséges berendezések, eszközök (géltartályok, áramellátás, géldokumentációs rendszer UV-transzilluminátorral)

## 6. Biztonság és figyelmeztetések

- A vizsgálatokat kizárólag megfelelően képzett szakember végezheti.
- A reagenseket a jó laboratóriumi gyakorlatnak megfelelően kell kezelni.
- Különítse el a pre- és a poszt-PCR munkaterületeket! Ne vigye vissza a poszt-PCR anyagokat a pre-PCR munkaterületre!
- **Biológiai veszélyre vonatkozó figyelmeztetések:** kezeljen minden vérterméket fertőzésveszélyesként!
- **Biológiai veszélyre vonatkozó figyelmeztetések:** az etidium-bromid potenciális karcinogén anyag. Használata során mindig viseljen védőkesztyűt, laboratóriumi köpenyt és védőszemüveget!
- **Biológiai veszélyre vonatkozó figyelmeztetések:** gondossággal járjon el az UV-források kezelése során – mindig viseljen védőkesztyűt, laboratóriumi köpenyt és védőszemüveget! Soha ne nézzen közvetlenül UV-fényforrásba!
- Az anyagbiztonsági adatlapok a [www.biofortuna.com](http://www.biofortuna.com) weboldalról tölthetők le.

## 7. Tárolás és stabilitás

A Biofortuna SSPGo készletek 4-30 Celsius-fokos hőmérsékleten tárolandók. Miután a PCR-edényeket kivette a fóliátasakból, a reagenseket 3 órán belül a mintával rehidrálni kell. A lejáratási időpontot lásd a csomagoláson! Ne használja fel a termékeket a csomagoláson feltüntetett időpontot túl!

Ne használja fel a terméket, ha a fóliátasak szakadt vagy lyukas!

Ügyeljen arra, hogy a PCR-edények a DNS hozzáadása után szorosan le legyenek zárva, mivel a nem megfelelően lezárt edényekből a PCR-amplifikáció során párolgás léphet fel. Fordítson különös figyelmet az edény széleinek, sarkainak lezárására!



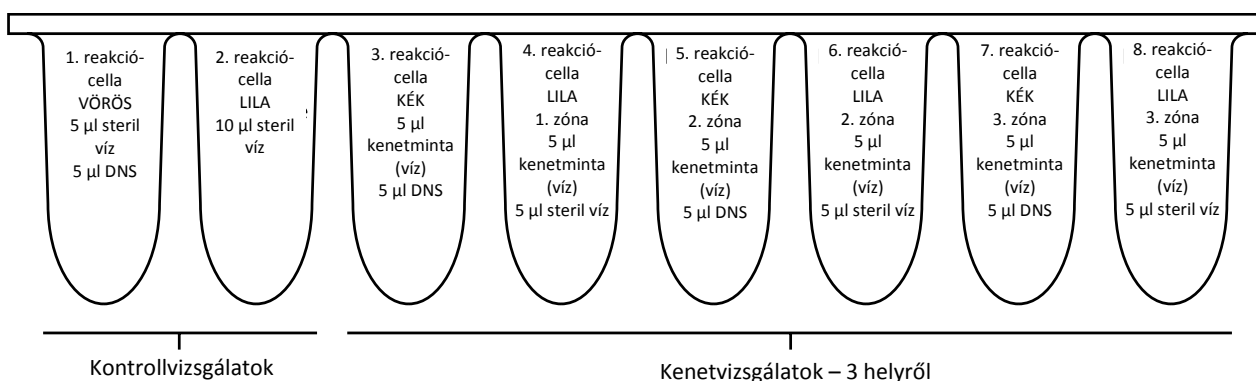
## 8. Használati utasítások

### Megjegyzés:

A szennyeződést gyakran a PCR-pipetták okozzák, ezért tanácsos a pipettahegyről és a pipettatest belsejéből is kenetmintát venni. Ajánljuk továbbá, hogy minden szennyeződés-vizsgálatot olyan pipettával végezzen, amely az előzőleg elvégzett szennyeződés-vizsgálat során negatív eredményt adott. Amennyiben szennyeződést tapasztal, laboratóriuma eljárási rendjét követve szüntesse meg a szennyeződést, és ismét ellenőrizze az érintett területeket!

- Olyan területen, ahol nem használ DNS-t, címkézzen fel egy steril Dnáz-mentes 2 ml-es polipropilén csövet minden egyes vizsgálandó zónához! Egy további csövet címkézzen fel „Negatív kontroll” felirattal!
- Ellenőrzött, szennyeződésmentes pipettával adjon 500 µl steril, molekuláris tisztaságú desztillált vizet mindegyik 2 ml-es csőbe!
- Nedvesítse meg a mellékelt steril műanyag applikátorpálcán lévő vattapamacsot az egyes tesztcsövekbe mártva azt!
- Húzza végig a vizsgálandó felületen a megnedvesített applikátorpálcát!
- Törje vagy vágja le az applikátorpálca vattás végét, és tegye bele a vizet tartalmazó 2 ml-es tesztcsőbe!
- Rövid ideig vortexelje a tesztcsöveket!
- Steril csipesszel vegye ki a csövekből a vattapamacsot, és ártalmatlanítsa azt!
- Mikrocentrifugában centrifugálja a csöveket 1 percig 10000 - 13000 rpm-mel a szemcsés anyagok eltávolítása céljából!
- Nyissa ki a teszt fóliatasakját! Minden vizsgálati anyagot összesen 10 µl folyadékkal rehidrálni kell az 1. ábra szerint!
- Negatív kontroll:** adjon **10 µl** steril molekuláris tisztaságú vizet a negatív kontroll **2.** (lila) reakciócellájába!
- Adjon **5 µl** steril vizet az **1., 4., 6., 8.** reakciócellába!
- Pozitív kontroll:** adjon **5 µl**-t a 10 ng/µl humán genomikus DNS-ből az **1.** (piros) a **3.,** az **5. és a 7.** (kék) reakciócellába!
- Kenőpróba reakciócellák:** adjon **5 µl** centrifugált folyadékot (kenetminta [víz]) az 1. kenetzónából a **3. és a 4.** reakciócellába, a 2. kenetzónából az **5. és a 6.** reakciócellába, és a 3. kenetzónából a **7. és a 8.** reakciócellába!
- Ekkor minden reakciócellában 10 µl rehidrált anyagmennyiségnek kell lennie az 1. ábrának megfelelően. Zárja le a reakciócellákat a mellékelt kupakkal, és állítsa be a szokásos SSPGo PCR-paramétereket az alábbiak szerint!

### 1. ábra



**ÚJRASZUSPENDÁLÁSRA VONATKOZÓ MEGJEGYZÉS:** ügyeljen arra, hogy a PCR-keverékeket a tálca fóliatasakból való kivétele után 3 órán belül újraszuszpendálja a mintákkal!

**PCR-TÁLCA/-CSÍK MAGASSÁGÁRA VONATKOZÓ MEGJEGYZÉS:** javasoljuk, hogy a tálcák és a csíkok magassága egyenlő legyen, amennyiben ugyanabba a PCR-készülékbe helyezi őket. Ha a magasság különböző, a tálca vagy a csík nem megfelelően érintkezik a PCR-készülék fűtött fedelével, ami gyenge vagy sikertelen PCR-amplifikációt okozhat.

## PCR-paraméterek

Az alábbi PCR-paramétereket kell használni. Gondoskodjon arról, hogy a ramp- (*felfűtési/hűtési*) sebesség legalább 1 Celsius-fok legyen másodpercenként, és kapcsolja be a fedélfűtési funkciót! A teljes használati utasításért lásd a termocycler gyártójának felhasználói kézikönyvét! A termocyclereket az American Society of Histocompatibility and Immunogenetics ([*Amerikai Hisztokompatibilitási és Immunogenetikai Társaság*], ASHI) vagy a European Federation of Immunogenetics ([*Európai Immunogenetikuskok Társasága*], EFI) akkreditációs szabályainak megfelelően kell kalibrálni.

|                                  |      |              |   |           |
|----------------------------------|------|--------------|---|-----------|
| Denaturálás                      | 94°C | 5 perc       |   |           |
| Denaturálás                      | 96°C | 15 másodperc | ← | 10 ciklus |
| Kapcsolódás ( <i>annealing</i> ) | 66°C | 50 másodperc |   |           |
| Meghosszabbítás                  | 72°C | 30 másodperc |   |           |
| Denaturálás                      | 96°C | 15 másodperc | ← | 20 ciklus |
| Kapcsolódás ( <i>annealing</i> ) | 64°C | 50 másodperc |   |           |
| Meghosszabbítás                  | 72°C | 30 másodperc |   |           |
| TARTÁS („HOLD”)                  | 15°C |              |   |           |

## Gél-elektroforézis

A következő utasítások a horizontális agaróz gél-elektroforézisre vonatkoznak: készítsen el 2% agaróz gélt 0,5x TBE pufferben! Amikor a gél lehűlt kb. 60 Celsius-fokra, adjon hozzá etídium-bromidot a 0,5 µg/ml-es végső koncentráció elérése céljából! Töltse ki a gélt, és helyezze be a mikrotiter fésűket (pl. 12x8 cella 9 mm-es sortávolsággal)! A gél megszilárdulása után vegye ki a fésűket, és öntsön a géltre 0,5x TBE puffert, úgy, hogy az befedje a gélt! A tálcákon vagy a csíkokon lévő reakciócellákból tegyen át minimum 5, maximum 10 µl-t a gélen lévő megfelelő cellába; jegyezze fel az egyes cellák pozícióját! 100 bp létra hasznos lehet a méretmeghatározáshoz. Futtassa a gélt 20 percig 10 V/cm feszültség mellett!

A készülékre vonatkozó részletekért lásd az elektroforézis készülék gyártójának használati utasításait! A gélek megjelenítéséhez képpalkotó berendezésként UV-transzilluminátoros UV-géldokumentációs rendszert kell használni.

## 9. Értelmezés

Az ellenőrzött felületek teszteredményei kizárólag akkor érvényesek, ha a pozitív kontroll pozitív, a negatív kontroll pedig negatív eredményt ad.

Az ellenőrzött felületek teszteredményei kizárólag akkor érvényesek, ha a megfelelő inhibíciós kontroll pozitív eredményt ad.

Amennyiben PCR- vagy DNS-szennyeződés áll fenn, 187 bp méretű amplikon figyelhető meg. Ettől eltérő méretű foltok vagy sávok megjelenése szintén PCR-szennyeződésre utalhat, a 100 bp-nál kisebb kiterjedésű primer-dimer és egyéb primer extenziós képződményeket azonban figyelmen kívül kell hagyni.

| Reakció-cella | Festék | Használat            | Eredmény           | Következtetés   | Teendő  |
|---------------|--------|----------------------|--------------------|---|---|
| 1.            | Vörös  | Pozitív kontroll     | 187 bp pozitív     | A vizsgálat érvényes. A DNS megfelelő. A PCR hatékony.        |   |
|               |        |                      | Nincs amplifikáció | A vizsgálat érvénytelen.                                      | Ismételje meg a teljes vizsgálatot eltérő DNS-kontrollal!   |
| 2.            | Lila   | Negatív kontroll     | 187 bp pozitív     | A vizsgálat érvénytelen. A víz és/vagy a pipetta szennyezett. | Ismételje meg a vizsgálatot másik vízzel és pipettával!   |
|               |        |                      | Nincs amplifikáció | A vizsgálat érvényes. A víz nem szennyezett.                  |   |
| 3., 5., 7.    | Kék    | Inhibíciós vizsgálat | 187 bp pozitív     | A kenőpróba érvényes. Nincsenek jelen inhibitorok.            |   |
|               |        |                      | Nincs amplifikáció | A kenőpróba érvénytelen. Esetleg inhibitorok vannak jelen.    | Tisztítsa le a felületet steril vízzel, ismételje meg a vizsgálatot!  |
| 4., 6., 8.    | Lila   | Kenőpróba            | 187 bp pozitív     | Szennyeződés áll fenn.  | A használt pipettát vegye ki a többi közül, és tisztítsa meg! Tisztítsa le a szennyezett felületet DNS eltávolítására szolgáló oldattal! Ismételje meg a vizsgálatot! |
|               |        |                      | Nincs amplifikáció | A kenőpróba negatív. Nem áll fenn szennyeződés.               |   |

## 10. Minőségbiztosítás és minőség-ellenőrzés

Tesztellenőrzés: egy Biofortuna készletből származó PCR-amplikont szilárd felületen száradni hagyunk. Az amplikont először hígítatlan, majd  $1 \times 10^1$  -  $1 \times 10^{15}$  arányú hígításokban vizsgáltuk a kenőpróbával. Az amplikon kimutatható volt maximum  $1 \times 10^{15}$  arányú hígításokban.

Genomikus DNS-t szilárd felületen száradni hagyunk. A gDNS-t először 100 ng/μl-es hígításban, majd  $1 \times 10^1$  -  $1 \times 10^{15}$  arányú hígításokban vizsgáltuk a kenőpróbával. A DNS kimutatható volt maximum  $1 \times 10^3$  arányú hígításokban.

## 11. Irodalomjegyzék

- 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): Mintaadatlap

**Mintaadatlap** Ajánljuk, hogy ezt a mintaadatlapot felhasználás előtt fénymásolja le, mivel a kenőpróbakészlet 36 zóna (3 kenetzóna / egyenként 8 cellát tartalmazó csíkok, készletenként 12 csík) ellenőrzésére alkalmas.

Vizsgálat időpontja:

---

A vizsgálatot végző személy:

---

Jóváhagyta:

---

Egyéb információk:









---

Készlet tételszáma:

---

| Reakciócella | Festék | Használat (lásd az utasításokat) | Teszteredmény | Teendők | Mintára vonatkozó információk |
|--------------|--------|----------------------------------|---------------|---------|-------------------------------|
| 1.           | Vörös  | Pozitív kontroll: DNS            |               |         |                               |
| 2.           | Lila   | Negatív kontroll: víz            |               |         |                               |
| 3.           | Kék    | 1. zóna: inhibíciós vizsgálat    |               |         |                               |
| 4.           | Lila   | 1. zóna: kenőpróba               |               |         |                               |
| 5.           | Kék    | 2. zóna: inhibíciós vizsgálat    |               |         |                               |
| 6.           | Lila   | 2. zóna: kenőpróba               |               |         |                               |
| 7.           | Kék    | 3. zóna: inhibíciós vizsgálat    |               |         |                               |
| 8.           | Lila   | 3. zóna: kenőpróba               |               |         |                               |

## 13. Jelmagyarázat

|  |                                       |
|--|---------------------------------------|
|  | Vizsgálatok száma                     |
|  | Olvassa el a használati utasításokat! |
|  | Gyártás helye                         |
|  | <i>In vitro</i> diagnosztikum         |
|  | Lejárat napja                         |
|  | Tárolási hőmérséklet                  |
|  | Tételszám                             |
|  | Katalógusszám                         |

## 14. A gyártó kapcsolattartási információi

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



## 15. Fordítások

|              |                             |
|--------------|-----------------------------|
| Française:   | Traductions disponibles     |
| Deutsch:     | Übersetzungen verfügbar     |
| Español:     | Traducciones disponibles    |
| Italiano:    | Traduzioni disponibili      |
| České:       | Překlady k dispozici        |
| Danske:      | Tilgængelige oversættelser  |
| Έλληνες:     | διαθέσιμες μεταφράσεις      |
| Magyar:      | Fordítás rendelkezésre áll  |
| Norske:      | Oversettelser tilgjengelig  |
| Polska:      | Dostępne tłumaczenia        |
| Português:   | Traduções disponíveis       |
| Россию:      | Переводы доступны           |
| Slovenskému: | Preklady k dispozícii       |
| Türk:        | Çeviriler mevcut            |
| Svenska:     | Översättningar tillgängliga |

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

### Átdolgozástörténet

A dokumentum verziószáma: 2.  
 Módosított részek: 8. pont – utasítások, valamint a pontok számozása.