



Bruksanvisning for Biofortuna SSPGo™ HLA Wipe Test BF-40-01

Versjon 2

September 2011

1. Bruksområde

Biofortuna SSPGo HLA Wipe Test brukes til å kontrollere om laboratorieområder og -utstyr er kontaminert med PCR-amplikon som kan genereres av Biofortuna SSPGo-produkter.

2. Innledning

PCR er en sensitiv teknikk som er utsatt for kontaminering med DNA-amplikon fra en tidligere PCR. Kontaminering kan føre til falsk positiv amplifikasjon i etterfølgende PCR-er, noe som kan gi uriktig genotyping. PCR-amplikon kan kontaminere reagenser og prøver samt laboratorieutstyr som pipetter. Reagenser og utstyr bør kontrolleres jevnlig med hensyn til tegn på kontaminering.

3. Analysebeskrivelse

Hver SSPGo HLA-avtørkingsanalyse består av en strips med åtte PCR-brønner som inneholder frysetørket PCR-buffer, polymerase og primere som er spesifikke for HLA-DRA-genet, og som vil produsere et 187 bp-amplikon fra humant genomisk DNA. Alle Biofortuna-kit benytter et DRA-amplikon som intern kontroll. Eventuell kontaminering fra bruk av Biofortuna SSPGo-kit vil derfor vise koamplifikasjon av DRA-genet og bli oppdaget av NTC-analyseprimerne.

Hver strips med åtte brønner analyserer opp til tre avtørkingsanalyseområder med hensyn til kontaminering. Hver strips har integrerte positive og negative kontrollreaksjoner samt hemmingskontrollreaksjoner for hvert avtørkingsanalyseområde. For å undersøke om et område er kontaminert, tørkes det først med en vattpinne som deretter bløtes i vann. Vannet benyttes som templat i avtørkingsanalysen, og som en blanding i forholdet 50:50 med genomisk DNA som PCR-hemmingsanalyse.

Det anbefales å foreta jevnlig kontamineringsanalyse. Vanlige områder som bør kontrolleres, er blant annet DNA-forberedelsesområdet, PCR-oppsettområdet og postamplifikasjonsområdet. Vanlige gjenstander som bør kontrolleres, er blant annet arbeidsbenker, pipetter, sentrifuger og håndtak, dørvidere og stativer på kjøleskap og fryser. Vanlige løsninger som bør kontrolleres, er blant annet DNA-forberedelsesbuffer og DNA-fortynningsmidler. Delte reagenser til flergangsbruk som PCR-buffere og *Taq*-polymerase er særlig utsatt for kontaminering, men de berører ikke Biofortuna-kit, siden Biofortuna-produkter er komplette og bare trenger DNA-tilsetning.

4. Innholdet i kitet

- 12 strips med 8 PCR-brønner. Hver brønn inneholder 10 µl forhåndsdispenserte frysetørkede primere, polymerase, dNTP-er* og buffer. Hver foliepakket strips er beregnet på kontroll av kontaminering i tre områder. Stripsformatet med åtte reaksjoner er angitt nedenfor.

Reaksjon	Farge	Bruk
1	Rød	Positiv kontroll: DNA
2	Lilla	Negativ kontroll: vann til fukting av vattpinne
3	Blå	Hemmingsanalyse for område 1: 50 % DNA, 50 % avtørkingsvann
4	Lilla	Avtørkingsanalyse for område 1
5	Blå	Hemmingsanalyse for område 2: 50 % DNA, 50 % avtørkingsvann
6	Lilla	Avtørkingsanalyse for område 2
7	Blå	Hemmingsanalyse for område 3: 50 % DNA, 50 % avtørkingsvann
8	Lilla	Avtørkingsanalyse for område 3

- 36 sterile vattpinner
- 12 x 8 PCR-lokk
- 1 bruksanvisning
- 1 analysesertifikat
- Sikkerhetsdatabladet kan lastes ned fra Biofortunas nettsted www.biofortuna.com. Hvis du ikke klarer å laste ned fra nettsiden, ber vi deg om å kontakte din lokale distributør.

*CleanAmp™ dNTP-er er lisensiert fra Trilink Biotechnologies Inc til bruk i Biofortuna SSPGo-produkter.



5. Reagenser og utstyr som ikke følger med

- Egnede pipetter og sterile spisser, f.eks. P10-pipette med 10 µl-filterspisser.
- Humant genomisk DNA med 5–10 ng/µl til bruk som positiv kontroll.
- DNA-isolasjonskit/-utstyr.
- UV-spektrofotometer.
- 2 ml polypropylenrør.
- Sterilt vann av molekylærbiologisk kvalitet.
- 96-brønners termosykler med oppvarmet lokk. PCR-plater og rør til Biofortuna-kit er godkjent til bruk med de fleste termosyklusene på markedet, bl.a. MJ Research PTC-100, PTC-200, Hybaid MBS og Techne TC-512. Ulike modeller kan kreve ytterligere validering fra brukeren.
- Gelelektroforese-reagenser (agarose, 0,5 x TBE, 1000 bp DNA molekylærvæktmarkør, 10 mg/ml etidiumbromid).
- Gelelektroforese-utstyr (gelkar, strømforsyning, geldokumentasjonssystem med UV-transilluminator).

6. Sikkerhet og advarsler

- Analysene skal bare utføres av personell med riktig opplæring.
- Håndter alle reagenser i samsvar med god laboratoriepraksis.
- Hold pre- og post-PCR-områder adskilt. Ikke ta med post-PCR-materiale tilbake til pre-PCR-området.
- **Biologisk fare:** Behandle alle blodprodukter som potensielt smittefarlige.
- **Biologisk fare:** Etidiumbromid er et potensielt karsinogen. Hvis det brukes, må brukeren ha på hansker, laboratoriefrakk og vernebriller.
- **Biologisk fare:** Vær forsiktig ved bruk av UV-kilder – ha alltid på hansker, laboratoriefrakk og vernebriller. Se aldri direkte på UV-lyskilden.
- Sikkerhetsdatablader kan fås fra www.biofortuna.com.

7. Oppbevaring og stabilitet

Biofortuna SSPGo-kit skal oppbevares ved 4–30 °C. Når PCR-kyvettene er tatt ut av folieposene, skal reagensene rehydreres med prøve innen 3 timer. Utløpsdatoen er angitt på emballasjen. Ikke bruk produkter som er gått ut på dato.

Ikke bruk kitet hvis folieposen er revet opp eller det er hull i den.

Sørg for at PCR-kyvettene blir tett forseglet når DNA-et har blitt tilsatt, siden det ellers kan oppstå fordampning under PCR-amplifikasjonen. Vær spesielt nøye med kanter og hjørner.

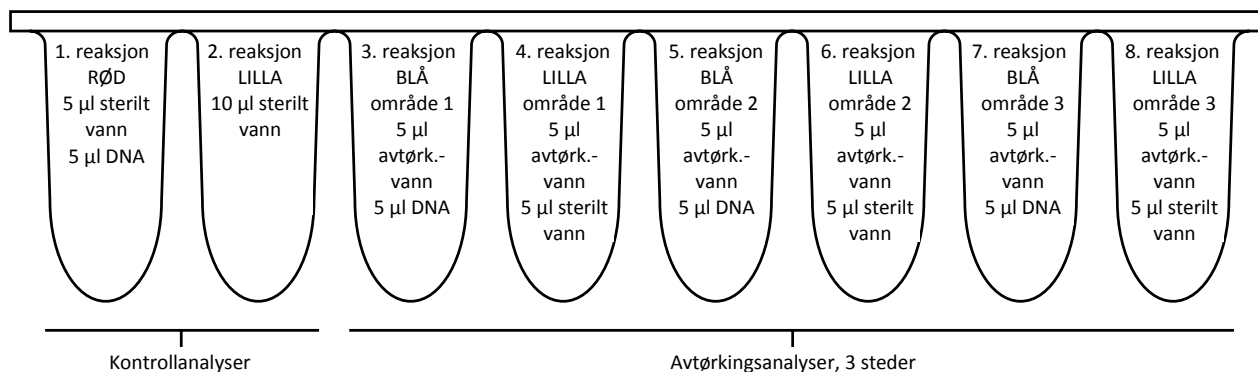
8. Instruksjoner for bruk

Merk:

En vanlig kontamineringskilde er PCR-pipetter, og det anbefales å tørke av pipettespissen og om mulig innsiden av sylindren. Det anbefales også at alle kontamineringsanalyser utføres med en pipette som er kontrollert og funnet negativ. Hvis det oppdages kontaminering, skal du følge laboratoriets retningslinjer for å fjerne kontamineringen og kontrollere områdene på nytt.

1. I et DNA-fritt område skal du merke et sterilt DNase-fritt 2 ml-polypropylenrør for hvert avtørkingsanalyseområde som skal kontrolleres. Merk et ekstra rør "Negativ kontroll".
2. Tilsett 500 µl sterilt, destillert vann av molekylærbiologisk kvalitet til hvert av 2 ml-rørene med en kjent kontamineringsfri pipette.
3. Fukt en medfølgende steril applikatorpinne av plast i hvert avtørkingsanalyseområde.
4. Tørk av området som skal kontrolleres, med den fuktete applikatoren.
5. Bryt eller klipp av applikatorens plastpinne, og legg den i det opprinnelige 2 ml-røret med vann.
6. Vorteks et kort øyeblikk.
7. Fjern og kast vattipinnen med steril pinsett.
8. Sentrifuger 1 minutt ved 10 000 til 13 000 o/min i en mikrosentrifuge for å fjerne partikler.
9. Åpne analysefolieposen. Alle analysene må rehydreres med i alt 10 µl væske som angitt i diagram 1.
10. **Negativ kontroll:** Tilsett **10 µl** sterilt vann av molekylærbiologisk kvalitet til den negative kontrollreaksjonen **2** (lilla).
11. Tilsett **5 µl** sterilt vann til reaksjonene **1, 4, 6, 8**.
12. **Positiv kontroll:** Tilsett **5 µl** av 10 ng/µl humant genomisk DNA til reaksjon **1** (rød reaksjon) og reaksjonene **3, 5 og 7** (blå).
13. **Avtørkingsanalysereaksjoner:** Tilsett **5 µl** sentrifugert væske (avtørkingsvann) fra avtørkingsområde 1 til reaksjon **3** og **4**, fra avtørkingsområde 2 til reaksjon **5** og **6**, og fra avtørkingsområde 3 til reaksjon **7** og **8**.
14. Alle reaksjonene har nå 10 µl rehydrert volum som angitt i diagram 1. Sett de medfølgende lokkene på reaksjonene, og fortsett med SSPGo PCR-standardparametrene som angitt nedenfor.

Diagram 1.



MERKNAD OM RESUSPENSERING: Se til at PCR-blandingene blir resuspendert med prøvene innen 3 timer fra brettet blir tatt ut av folieposen.

MERKNAD OM PCR-PLATENS/-STRIPSENS HØYDEPROFIL: Det anbefales at platenes og stripsenes høydeprofil er den samme når de plasseres i den samme PCR-maskinen. Ulike høydeprofiler kan forårsake dårlig kontakt med PCR-maskinens oppvarmede lokk. Det kan resultere i dårlig eller mislykket PCR-amplifikasjon.

PCR-parametre

Følgende PCR-parametre skal brukes: Se til at stigetiden (ramp speed) er minst 1 °C per sekund, og aktiver det oppvarmede lokket. Fullstendig bruksanvisning finnes i termosyklusproduzentens bruksanvisning. Termosyklere skal kalibreres i samsvar med akkrediteringsreglene fra American Society of Histocompatibility and Immunogenetic (ASHI) eller European Federation of Immunogenetics (EFI).

Denaturering	94 °C	5 minutter		
Denaturering	96 °C	15 sekunder	←	10 sykluser
Annealing	66 °C	50 sekunder		
Elongering	72 °C	30 sekunder		
Denaturering	96 °C	15 sekunder	←	20 sykluser
Annealing	64 °C	50 sekunder		
Elongering	72 °C	30 sekunder		
HOLD	15 °C			

Gelelektroforese

Disse instruksjonene gjelder bare horisontal agarosegelelektroforese: Forbered en 2 % agarosegel i 0,5 x TBE-buffer. Når gelen er avkjølt til ca. 60 °C, tilsettes etidiumbromid til en endelig konsentrasjon på 0,5 µg/ml. Støp gelen og sett inn mikroplatekammer (f.eks. 12 x 8 brønner med 9 mm mellomrom). Når gelen er stivnet, fjernes kammene, og gelen dekkes med 0,5 x TBE-buffer. Overfør minimum 5 µl og maksimum 10 µl fra hver brett- eller stripsreaksjon til den tilsvarende brønnen på gelen, og noter hvor hver reaksjon befinner seg. En 100 bp-ladder kan være til hjelp når størrelsen skal bestemmes. Kjør gelen ved 10 V/cm i 20 minutter.

Se bruksanvisningen fra produsenten av elektroforesesystemet for spesifikke opplysninger om utstyret. Gelene fotograferes med et UV-geldokumentasjonssystem med UV-transilluminator.

9. Tolkning

Analyseresultater for avtørkede områder er gyldige bare hvis den positive kontrollen er positiv og den negative kontrollen er negativ.

Analysen for avtørkede områder er gyldige bare hvis den tilsvarende hemmingskontrollanalysen er positiv.

Et 187 bp-amplikon observeres hvis det foreligger PCR-kontaminering eller DNA-kontaminering. Smears eller bånd av forskjellige størrelser kan også tyde på PCR-kontaminering, men primer-dimer og andre primerutvidelsesartefakter på mindre enn 100 bp bør ignoreres.

Rx	Farge	Bruk	Resultat	Konklusjon	Tiltak
1	Rød	Positiv kontroll	187 bp +ve	Gyldig analyse. Eget DNA. Effektiv PCR.	
			Ingen amplifikasjon	Ugyldig analyse.	Gjenta hele analysen med annen DNA-kontroll.
2	Lilla	Negativ kontroll	187 bp +ve	Ugyldig analyse. Kontaminert vann og/eller pipette.	Kontroller med annet vann og annen pipette.
			Ingen amplifikasjon	Gyldig analyse. Ikke kontaminert vann.	
3, 5, 7	Blå	Hemmings-analyse	187 bp +ve	Gyldig avtørkingsanalyse. Ingen hemmere til stede.	
			Ingen amplifikasjon	Ugyldig avtørkingsanalyse. Potensielle hemmere til stede.	Rengjør område med sterilt vann, gjenta.
4, 6, 8	Lilla	Avtørkings-analyse	187 bp +ve	Kontaminering er til stede.	Isoler og rengjør benyttet pipette. Rengjør forurenset område med løsning beregnet på fjerning av DNA. Gjenta analyse.
			Ingen amplifikasjon	Negativ avtørkingsanalyse. Ingen kontaminering.	

10. Kvalitetssikring og -kontroll

Analysetesting: PCR-amplikon fra et Biofortuna-kit ble satt til tørking på et fast underlag. Avtørkingsanalysen ble utført på amplikonet ufortynnet og deretter i fortynninger fra 1×10^1 til 1×10^{15} . Amplikonet ble påvist i fortynninger opp til og med 1×10^{15} .

Genomisk DNA ble satt til tørking på et fast underlag. Avtørkingsanalysen ble utført på gDNA ved 100 ng/ μ l og deretter i fortynninger fra 1×10^1 til 1×10^{15} . DNA-et ble påvist i fortynninger opp til 1×10^3 .

11. Referanser

- 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-avtørkingsanalyse (v2): Prøveark

Prøveark Det anbefales at dette prøvearket fotokopieres før bruk, siden kitet med avtørkingsanalyse har nok analyser til 36 områder (3 avtørkingsområder per 8-brønners strips, 12 strips per kit).

Analysedato:

Analyse utført av:

Godkjent av:

Annen informasjon:

Kitets lotnummer:









Reaksjon	Farge	Bruk (se Instruksjoner)	Analyse- resultat	Tiltak	Prøveinformasjon
1	Rød	Positiv kontroll: DNA			
2	Lilla	Negativ kontroll: vann			
3	Blå	Hemmingsanalyse for område 1			
4	Lilla	Avtørkingsanalyse for område 1			
5	Blå	Hemmingsanalyse for område 2			
6	Lilla	Avtørkingsanalyse for område 2			
7	Blå	Hemmingsanalyse for område 3			
8	Lilla	Avtørkingsanalyse for område 3			



IVD



13. Symbolforklaring

	Antall analyser
	Se bruksanvisning
	Produksjonssted
	<i>In vitro</i> -diagnostikk
	Utløpsdato
	Oppbevaringstemperatur
	Lotnummer Katalognummer
	Katalognummer

14. Produsentens kontaktopplysninger

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



15. Oversettelser

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

Revisjonshistorikk

Dette er versjon 2 av dokumentet.
 Rettet instruksjoner i avsnitt 8 og kapittelnummerering.

