



Instrukcja używania testów do wykrywania kontaminacji na powierzchniach roboczych („wipe test”) przy typowaniu antygenów zgodności tkankowej HLA SSPGo™ firmy Biofortuna (Biofortuna SSPGo™ HLA Wipe Test BF-40-01)

wersja 2.

wrzesień 2011

1. Przeznaczenie

Test Biofortuna SSPGo HLA Wipe Test jest przeznaczony do monitorowania powierzchni roboczych oraz wyposażenia laboratoryjnego pod względem kontaminacji amplikonami powstałymi w wyniku reakcji PCR podczas stosowania produktów Biofortuna SSPGo.

2. Wprowadzenie

PCR jest czułą techniką podatną na kontaminację amplikonami DNA pochodzącymi z wcześniejszych reakcji PCR. Zanieczyszczenie może być przyczyną uzyskiwania fałszywie dodatnich wyników amplifikacji w kolejnych reakcjach PCR, co z kolei może prowadzić do uzyskania nieprawidłowych wyników genotypowania. Amplikony powstałe w wyniku reakcji PCR mogą powodować kontaminację odczynników i badanych próbek, jak również sprzętu laboratoryjnego, np. pipet. Dlatego też odczynniki i sprzęt laboratoryjny należy regularnie monitorować pod względem kontaminacji.

3. Opis testu

Każdy test SSPGo HLA Wipe Test składa się z paska z ośmioma probówkami do reakcji PCR zawierającymi bufor PCR poddany suszeniu sublimacyjnemu, polimerazę i primery swoiste dla genu HLA-DRA, gdzie powstaną amplikony o wielkości 187 pz z ludzkiego genomowego DNA. Ze względu na fakt, iż wszystkie zestawy firmy Biofortuna wykorzystują amplikony DRA jako kontrolę wewnętrzną, wszelkie zanieczyszczenia wynikające ze stosowania zestawów Biofortuna SSPGo będą posiadały zamplifikowany gen DRA i zostaną wykryte przez primery testu do wykrywania kontaminacji „wipe test”.

Każdy pasek z ośmioma probówkami bada maksymalnie trzy obszary pod względem obecności kontaminacji. Każdy pasek zawiera kontrolę dodatnią i ujemną, stanowiące integralną część reakcji oraz kontrole inhibicji dla każdego badanego obszaru. W celu przebadania danego obszaru pod kątem kontaminacji należy go najpierw przetrzeć za pomocą wymazówki, którą następnie zanurza się w wodzie. Woda ta jest stosowana jako matryca w teście do wykrywania kontaminacji „wipe test” oraz służy do utworzenia mieszaniny z genomowym DNA w stosunku 50:50 w teście inhibicji reakcji PCR.

Zaleca się regularne przeprowadzanie testów kontaminacji. Typowe obszary, które należy badać, to obszar przygotowywania DNA (pre-PCR), obszar konfiguracji PCR oraz obszar do wykonywania czynności po zakończeniu amplifikacji (post-PCR). Typowe elementy, które należy badać, to stoły robocze, pipety, wirówki, uchwyty lodówek i zamrażarek, klamki drzwi oraz statywy. Typowe roztwory, które należy badać, to bufor do przygotowywania próbek DNA oraz rozcieńczalniki DNA. Stosowane do wielu badań odczynniki wielokrotnego użytku, takie jak bufor PCR oraz polimeraza *Taq*, są szczególnie podatne na kontaminację, jednakże nie dotyczy to zestawów firmy Biofortuna, bowiem są one kompletne i wymagają jedynie dodania DNA.

4. Zawartość zestawu

- 12 pasków po 8 probówek do reakcji PCR, z których każda zawiera po 10 µl uprzednio dodanych primerów poddanych suszeniu sublimacyjnemu, polimerazę, dNTP* oraz bufor. Każdy opakowany w folię pasek służy do wykonania testu kontaminacji trzech obszarów. Poniżej pokazano schemat paska dla ośmiu probówek reakcyjnych.

Probówka reakcyjna	Barwnik	Zastosowanie
1	czzerwony	kontrola dodatnia: DNA
2	purpurowy	kontrola ujemna: woda do nawilżenia wymazówki
3	niebieski	test inhibicji w obszarze 1: 50% DNA, 50% wody z materiałem z wymazówki (wody badanej)
4	purpurowy	test kontaminacji w obszarze 1
5	niebieski	test inhibicji w obszarze 2: 50% DNA, 50% wody z materiałem z wymazówki (wody badanej)
6	purpurowy	test kontaminacji w obszarze 2
7	niebieski	test inhibicji w obszarze 3: 50% DNA, 50% wody z materiałem z wymazówki (wody badanej)
8	purpurowy	test kontaminacji w obszarze 3

- 36 sterylnych wymazówek
- 12x8 wieczek do pasków PCR
- 1 instrukcja użytkowania
- 1 certyfikat badania (*Certificate of Analysis*)
- Karty charakterystyki można pobrać ze strony internetowej firmy Biofortuna: www.biofortuna.com. Jeśli pobranie tych danych ze strony internetowej nie powiedzie się, prosimy o kontakt z lokalnym dystrybutorem.

*CleanAmp™ dNTP zostały wykorzystane w produktach SSPGo firmy Biofortuna na mocy licencji udzielonej przez firmę Trilink Biotechnologies Inc.

5. Niedostarczone odczynniki i sprzęt

- odpowiednie pipety i jałowe końcówki, np. pipeta P10 z końcówkami o obj. 10 µl z filtrami
- ludzkie genomowe DNA o stężeniu 5-10 ng/µl do stosowania jako kontrola dodatnia
- zestaw/sprzęt do izolacji DNA
- spektrofotometr UV
- probówki polipropylenowe o poj. 2 ml
- jałowa woda o stopniu czystości Molecular Grade
- 96-dołkowy termocykler z pokrywą grzejącą. Płytki i probówki PCR stosowane w zestawach firmy Biofortuna posiadają walidację do stosowania w większości termocyklierów dostępnych na rynku, jak np. termocyklery MJ Research PTC-100, PTC-200, Hybaid MBS oraz Techne TC-512. Inne modele mogą wymagać dalszej walidacji przez użytkownika.
- odczynniki do elektroforezy żelowej (agaroza, bufor 0,5x TBE, marker masy cząsteczkowej do analizy fragmentów DNA o wielkości 1000 pz, bromek etydyny o stężeniu 10 mg/ml)
- sprzęt do elektroforezy żelowej (saneczki na żel, zasilacz, system do dokumentacji żeli z transiluminatorem UV)

6. Środki bezpieczeństwa i ostrzeżenia

- Testy powinny być wykonywane wyłącznie przez odpowiednio przeszkolony personel.
- Ze wszystkimi odczynnikami należy obchodzić się zgodnie z zasadami dobrej praktyki laboratoryjnej.
- Czynności poprzedzające reakcję PCR oraz następujące po niej należy wykonywać w osobnych pomieszczeniach. Nie należy przenosić materiałów używanych po zakończeniu reakcji PCR z powrotem do pomieszczenia, gdzie wykonywane były czynności poprzedzające reakcję PCR.
- **Ostrzeżenie o zagrożeniu biologicznym:** Wszystkie preparaty krwiopochodne należy traktować jako potencjalnie zakaźne.
- **Ostrzeżenie o zagrożeniu biologicznym:** Bromek etydyny jest substancją potencjalnie rakotwórczą. W przypadku jego stosowania należy zawsze nosić rękawiczki, fartuch laboratoryjny oraz okulary ochronne.
- **Ostrzeżenie o zagrożeniu biologicznym:** Należy zachować ostrożność podczas stosowania źródeł promieniowania UV – należy zawsze nosić rękawiczki, fartuch laboratoryjny oraz okulary ochronne. Nigdy nie należy patrzeć bezpośrednio w źródło światła UV.
- Karty charakterystyki są dostępne na stronie internetowej www.biofortuna.com.

7. Przechowywanie i stabilność

Zestawy Biofortuna SSPGo można przechowywać w temp. 4-30 °C. Odczynniki powinny być ponownie nawodnione poprzez dodanie próbek w ciągu 3 godzin od wyjęcia naczynek PCR z foliowych woreczków. Data ważności jest podana na opakowaniu. Nie stosować produktów po upływie daty ważności podanej na opakowaniu.

Nie stosować zestawów, jeśli woreczek foliowy jest rozdarty lub podziurawiony.

Należy upewnić się, czy po dodaniu DNA naczynka PCR są szczelnie zamknięte, w przeciwnym razie może dojść do parowania próbek podczas amplifikacji PCR. Należy zwracać szczególną uwagę na krawędzie i rogi naczynek.

8. Sposób użycia

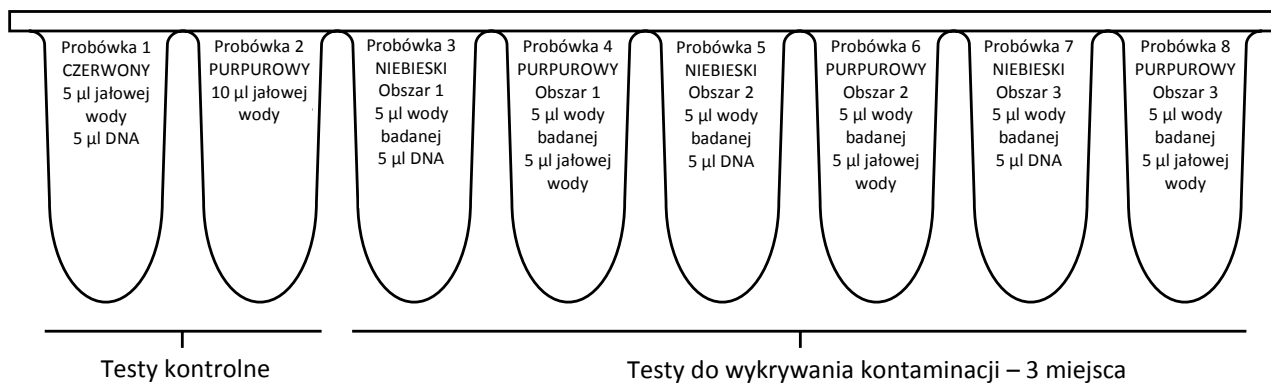
Uwaga:

Częstym źródłem kontaminacji są pipety stosowane do nastawiania reakcji PCR, dlatego też zaleca się przecierać końcówkę pipety oraz, jeśli to możliwe, wewnętrzną powierzchnię jej korpusu. Zaleca się także, by wszystkie testy do wykrywania kontaminacji przeprowadzać za pomocą pipet, które zostały już przebadane i dały wynik ujemny. W przypadku wykrycia kontaminacji należy postępować zgodnie z wytycznymi obowiązującymi w danym laboratorium w celu wyeliminowania kontaminacji, a następnie ponownie zbadać dane obszary.

1. W miejscu wolnym od DNA podpisać sterylne, wolne od DNaz, polipropylenowe probówki o poj. 2 ml dla każdego obszaru badanego za pomocą testu typu „wipe test”. Oznaczyć dodatkową probówkę jako „Kontrola ujemna”.
2. Używając pipety, o której wiadomo, że nie została zanieczyszczona, do każdej probówki o poj. 2 ml dodać po 500 µl jałowej, destylowanej wody o stopniu czystości Molecular Grade.
3. Zamoczyć sterylną wymazówkę z plastikowym aplikatorem w każdej probówce.
4. Przetrzeć badany obszar nawilżonym aplikatorem.
5. Ułamać lub odciąć plastikowy trzonek aplikatora i umieścić wymazówkę w wyjściowej probówce o poj. 2 ml, zawierającej wodę.
6. Krótco wymieszać na wytrząsarce typu wortex.
7. Wyjąć i usunąć wymazówkę za pomocą wyjąłowanej pęsety.
8. Wirować przez 1 minutę przy prędkości wynoszącej 10 000 do 13 000 obr./min w mikrowirówce w celu usunięcia strąków.
9. Otworzyć foliową torebkę z zestawem testowym. Wszystkie testy należy nawilżyć łączną objętością 10 µl płynu, jak pokazano na schemacie 1.
10. **Kontrola ujemna:** Dodać **10 µl** jałowej wody o stopniu czystości Molecular Grade do probówki kontroli ujemnej **2** (kolor purpurowy).
11. Dodać po **5 µl** jałowej wody do probówki reakcyjnej **1, 4, 6, 8**.

12. **Kontrola dodatnia:** Dodać po 5 µl ludzkiego genomowego DNA o stężeniu 10 ng/µl do próbówki reakcyjnej **1** (kolor czerwony) oraz do próbówki reakcyjnej **3, 5 oraz 7** (kolor niebieski).
13. **Reakcje testu do wykrywania kontaminacji „wipe test”:** Dodać po 5 µl odwirowanego płynu (wody zawierającej materiał z wymazówki, czyli wody badanej) z 1. badanego obszaru do próbówki reakcyjnej **3 i 4**, z 2. badanego obszaru - do próbówki reakcyjnej **5 i 6** oraz z 3. obszaru badanego - do próbówki reakcyjnej **7 i 8**.
14. Wszystkie próbówki reakcyjne posiadają po 10 µl objętości ponownie nawodnionych materiałów, jak pokazano na schemacie 1. Zamknąć próbówki za pomocą dostarczonych wieczek i kontynuować badanie przy użyciu tradycyjnych parametrów reakcji PCR za pomocą zestawu SSPGo, jak pokazano poniżej.

Schemat 1.



KOMENTARZ DOTYCZĄCY TWORZENIA ZAWIESINY: Upewnić się, czy mieszaniny PCR utworzyły zawiesinę z badanymi próbkami w ciągu 3 godzin od wyjęcia płytki z foliowego woreczka.

KOMENTARZ DOTYCZĄCY WYSOKOŚCI PŁYTKI PCR/PROBÓWEK W PASKU: Zaleca się, aby wysokość płytek oraz probówek w paskach była taka sama, jeśli są wkładane do tego samego urządzenia do PCR. Różne wysokości mogą spowodować niewystarczający kontakt płytek lub probówek z pokrywą grzejną aparatu do PCR. Może to przyczynić się do zmniejszenia wydajności amplifikacji metodą PCR lub też jej braku.

Parametry reakcji PCR

Dla reakcji PCR należy stosować poniższe parametry. Upewnić się, czy parametr szybkości zmiany temperatury (ang. *ramp speed*) jest ustawiony na co najmniej 1 °C na sekundę, a następnie włączyć pokrywę grzejną. Pełne instrukcje dotyczące sposobu użycia, patrz instrukcja obsługi termocyklera. Termocyklery powinny być skalibrowane zgodnie z regułami akredytacyjnymi Amerykańskiego Towarzystwa Zgodności Tkankowej i Immunogenetyki (*American Society of Histocompatibility and Immunogenetics, ASHI*) lub Europejskiej Federacji Immunogenetyki (*European Federation of Immunogenetics, EFI*).

Denaturacja	94 °C	5 minut	
Denaturacja	96 °C	15 sekund	← 10 cykli
Annealing	66 °C	50 sekund	
Polimeryzacja	72 °C	30 sekund	
Denaturacja	96 °C	15 sekund	← 20 cykli
Annealing	64 °C	50 sekund	
Polimeryzacja	72 °C	30 sekund	

HOLD (utrzymanie temperatury) 15 °C

Elektroforeza żelowa

Poniższe wskazówki dotyczą elektroforezy poziomej na żelu agarozowym: Przygotować 2% żel agarozowy w buforze 0,5x TBE. Po schłodzeniu żelu do temperatury ok. 60 °C dodać bromek etydyny do uzyskania końcowego stężenia wynoszącego 0,5 µg/ml. Wylać żel i umieścić w nim grzebienie standardu „microtitre” (np. 12 x 8 zagłębień w odstępach 9 mm). Po zastygnięciu żelu wyjąć grzebienie i zalać żel buforem 0,5x TBE. Przenieść co najmniej 5 µl, lecz nie więcej niż 10 µl każdej reakcji z płytki lub paska probówek do odpowiedniego zagłębienia na żelu, zapisując położenie każdej reakcji. Do określania wielkości cząsteczek można skorzystać ze wzorca masy 100 pz. Prowadzić rozdział przez 20 minut w polu elektrycznym o natężeniu 10 V/cm.

Szczegółowe informacje na temat poszczególnych urządzeń/wyposażenia, patrz instrukcje użytkownika wytwórcy aparatu do elektroforezy. Obrazowanie żeli powinno być przeprowadzone z użyciem systemu do dokumentacji żeli z transiluminatorem UV.

9. Interpretacja

Wyniki badań dla obszarów, z których pobrano próbki, są ważne wyłącznie wtedy, gdy kontrola dodatnia daje wynik dodatni, a kontrola ujemna daje wynik ujemny.

Badania dla obszarów, z których pobrano próbki, są ważne wyłącznie wtedy, gdy odpowiadające badanie kontroli inhibicji daje wynik dodatni.

W przypadku obecności kontaminacji produktem PCR lub próbką DNA powinno się zaobserwować amplikony o wielkości 187 pz. Obecność wszelkich rozmazanych obrazów lub prążków o różnych rozmiarach także może wskazywać na kontaminację produktem reakcji PCR, natomiast obecność primerów-dimerów oraz innych artefaktów polimeryzacji primerów o wielkości mniejszej niż 100 pz należy zignorować.

Probówka reakcyjna	Barwnik	Zastosowanie	Wynik	Wniosek	Działanie
1	czerwony	Kontrola dodatnia	187 pz, wynik dodatni	Badanie ważne. Odpowiednie DNA. Efektywna reakcja PCR.	
			Brak amplifikacji	Badanie nieważne.	Powtórzyć całe badanie z użyciem innej kontroli DNA.
2	purpurowy	Kontrola ujemna	187 pz, wynik dodatni	Badanie nieważne. Obecność kontaminacji w wodzie i/lub na pipecie.	Badać z użyciem innej wody i pipety.
			Brak amplifikacji	Badanie ważne. Brak kontaminacji w wodzie.	
3, 5, 7	niebieski	Test inhibicji	187 pz, wynik dodatni	Test kontaminacji ważny. Brak inhibitorów.	
			Brak amplifikacji.	Test kontaminacji nieważny. Obecność potencjalnych inhibitorów.	Wyczyścić obszar sterylną wodą, powtórzyć.
4, 6, 8	purpurowy	Test kontaminacji (<i>wipe test</i>)	187 pz, wynik dodatni	Obecność kontaminacji.	Odizolować i wyczyścić stosowane pipety. Wyczyścić zanieczyszczony obszar roztworem przeznaczonym do usuwania DNA. Powtórzyć badanie.
			Brak amplifikacji	Wynik testu kontaminacji ujemny. Brak kontaminacji.	

10. Procedury zapewnienia i kontroli jakości

Badanie testu: Amplikon PCR pochodzący z zestawu firmy Biofortuna został pozostawiony do wyschnięcia na powierzchni typu „solid surface”. Test do wykrywania kontaminacji przeprowadzono na nierozcieńczonym amplikonie, a następnie na amplikonie w rozcieńczeniach od 1×10^1 do 1×10^{15} . Amplikon został wykryty w rozcieńczeniach do 1×10^{15} włącznie.

Genomowe DNA pozostawiono do wyschnięcia na powierzchni typu „solid surface”. Test do wykrywania kontaminacji przeprowadzono na genomowym DNA o stężeniu $100 \text{ ng}/\mu\text{l}$, a następnie w rozcieńczeniach od 1×10^1 do 1×10^{15} . DNA wykryto w rozcieńczeniach do 1×10^3 .

11. Bibliografia

- 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): Arkusz z danymi o próbce

Arkusz danych o próbce Zaleca się, aby sporządzić kopie tego arkusza przed rozpoczęciem wykonywania testu, bowiem zestaw testu do wykrywania kontaminacji na powierzchniach roboczych zawiera odpowiednią liczbę testów dla 36 obszarów (3 obszary na każdy pasek z 8 próbkami, 12 pasków w zestawie).

Data przeprowadzenia badania:

Badanie przeprowadził(a):









Zatwierdził(a):

Inne informacje:

Numer partii zestawu:

Probówka	Barwnik	Zastosowanie (patrz ulotka)	Wynik badania	Działanie	Informacje o próbce
1	czerwony	kontrola dodatnia: DNA			
2	purpurowy	kontrola ujemna: woda			
3	niebieski	test inhibicji w obszarze 1			
4	purpurowy	test kontaminacji w obszarze 1			
5	niebieski	test inhibicji w obszarze 2			
6	purpurowy	test kontaminacji w obszarze 2			
7	niebieski	test inhibicji w obszarze 3			
8	purpurowy	test kontaminacji w obszarze 3			

13. Objaśnienia użytych symboli

	Liczba testów
	Sprawdź w ulotce.
	Miejsce produkcji
	Do diagnostyki <i>in vitro</i>
	Data ważności
 4°C → 30°C	Temperatura przechowywania
	Numer partii
	Numer katalogowy

14. Dane kontaktowe wytwórcy

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



15. Tłumaczenia

Française : Traductions disponibles
 Deutsch: Übersetzungen verfügbar
 Español: Traducciones disponibles
 Italiano: Traduzioni disponibili
 Český: 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

Historia wersji

Niniejszy dokument jest wersją 2.
 Wprowadzono poprawki do wskazówek podanych w rozdziale 8. oraz w numeracji rozdziałów.