



**Инструкции по использованию тест-системы Biofortuna SSPGo™
HLA Wipe Test BF-40-01**

Версия 2

Сентябрь 2011

1. Назначение

Тест Biofortuna SSPGo HLA Wipe Test предназначен для контроля за контаминацией лабораторных помещений и оборудования ПЦР-ампликонами, которые могут генерироваться продуктами Biofortuna SSPGo.

2. Введение

ПЦР является чувствительной технологией, допускающей контаминацию ДНК-ампликонами предыдущих процессов ПЦР. Контаминация может быть причиной ложноположительных амплификаций соответствующих реакций ПЦР, что может вести к некорректному генотипированию. Ампликон-ПЦР может контаминировать реагенты и образцы, а также лабораторное оборудование и пипетки. Реагенты и оборудование необходимо регулярно проверять на наличие следов контаминации.

3. Описание теста

В каждую тест-систему SSPGo HLA Wipe Test входит стрип из восьми лунок ПЦР с лиофилизированным буфером ПЦР, полимеразой и праймерами, специфическими для гена HLA-DRA и продуцирующими ампликон 187bp из человеческого геномного ДНК. Поскольку во всех наборах Biofortuna используется ампликон DRA в качестве мишени для праймеров внутреннего контроля, при любой контаминации наборами Biofortuna SSPGo будет присутствовать амплификация гена DRA, которая будет выявлена праймерами теста на контаминацию.

С помощью каждого стрипа из восьми лунок исследуется до трёх зон теста смыва на наличие контаминации. В каждый стрип входят положительный и отрицательный контроли, а также контроли реакции ингибирования для каждой зоны теста смыва. Для исследования зоны на наличие контаминации необходимо сначала смочить ватную палочку в воде, а затем протереть с её помощью потенциально контаминированную зону и опустить тампон в воду, которая впоследствии используется в качестве тестируемого образца смыва и как смесь 50:50 с геномной ДНК в исследовании ингибирования ПЦР.

Рекомендуется регулярно проводить исследование на наличие контаминации. Типичными областями, которые должны быть исследованы, являются зона подготовки ДНК, амплификационная зона и зона пост-амплификации. Типичное оборудование, подлежащее исследованию: рабочие столы, пипетки, центрифуги, ручки холодильника и морозильника, дверные ручки и держатели. К типичным растворам, которые необходимо исследовать, относятся буферы подготовки ДНК и дилуенты ДНК. Такие общие реагенты многократного использования как буфер ПЦР и полимеразы *Taq* особенно чувствительны к контаминации, но на них не влияют продукты Biofortuna, поскольку они являются готовым к использованию продуктом, и к ним требуется только добавить ДНК.

4. Содержимое набора

- 12 стрипов, в каждом 8 лунок ПЦР, содержат 10 мкл предварительно расфасованных замороженных сухих праймеров, полимеразу, дНТФ* и буфер. Каждый упакованный в фольгу стрип предназначен для исследования на контаминацию трёх зон. Формат восьми реакций показан ниже.

Реакция	Краситель	Использование
1	Красный	Положительный контроль: ДНК
2	Фиолетовый	Отрицательный контроль: вода для вымачивания тампона
3	Голубой	Зона 1 теста ингибирования: 50% ДНК, 50% воды смыва
4	Фиолетовый	Зона 1 теста смыва
5	Голубой	Зона 2 теста ингибирования: 50% ДНК, 50% воды смыва
6	Фиолетовый	Зона 2 теста смыва
7	Голубой	Зона 3 теста ингибирования: 50% ДНК, 50% воды смыва
8	Фиолетовый	Зона 3 теста смыва

- 36 стерильных тампонов
- 12x8 крышек ПЦР
- 1x Руководство по эксплуатации
- 1x Сертификат анализа
- Инструкцию по безопасному обращению с материалом (MSDS) можно получить на веб-сайте Biofortuna www.biofortuna.com. Если вы не можете скачать с сайта, обратитесь к местному дистрибьютору.

*дНТФ CleanAmp™ лицензированы Trilink Biotechnologies Inc для использования в продуктах Biofortuna SSPGo.



5. Не поставляемые реагенты и оборудование

- Соответствующие дозаторы и стерильные наконечники с фильтрами, напр., P10 и 10-мкл наконечники.
- Геномная ДНК человека, 5-10 нг/мкл, используемый как положительный контроль.
- Набор/оборудование для изоляции ДНК.
- Спектрофотометр в УФ.
- 2-мл полипропиленовые пробирки.
- Деионизированная вода (Molecular Grade).
- Термоциклер, 96 лунок, с нагревающей крышкой. ПЦР-плашки и пробирки, поставляемые в наборах Biofortuna, подходят для большинства типов термоциклеров, представленных на рынке, включая MJ Research PTC-100, PTC-200, Hybaid MBS и Techne TC-512. Возможно, пользователю потребуется подтвердить использование других моделей.
- Реагенты для гель-электрофореза (агароза, 0,5x TBE, ДНК-маркер молекулярного веса 1000bp, 10 мг/мл Ethidium Bromide).
- Оборудование для гель-электрофореза (ёмкость для геля, источник питания, система гель-документации с прибором для УФ-просвечивания).

6. Безопасность и предупреждения

- Тесты должны проводиться только квалифицированными специалистами.
- Обращайтесь со всеми реагентами в соответствии с правилами лабораторной практики.
- Рабочие зоны лаборатории для пред- и пост-ПЦР стадий должны быть разделены. Не вносите никакие материалы стадии пост-ПЦР в зоны пробоподготовки и пред-ПЦР.
- **Предупреждение о биологической опасности:** Обращайтесь со всеми продуктами крови как с потенциально инфекционными.
- **Предупреждение о биологической опасности:** Бромид этидия является потенциальным канцерогеном. При его использовании всегда надевайте перчатки, лабораторный халат и защитные очки.
- **Предупреждение о биологической опасности:** При использовании источников УФ-излучения соблюдайте меры предосторожности: всегда надевайте перчатки, лабораторный халат и защитные очки. Никогда не смотрите без защитных очков на источник ультрафиолетового излучения.
- Таблицы факторов риска доступны на www.biofortuna.com.

7. Хранение и стабильность

Храните наборы Biofortuna SSP Go kit при 4-30°C. После того как вы достали ячейки ПЦР из фольгированных пакетов, добавьте в реагенты образец в течение 3 часов. См. на упаковке срок годности. Не используйте продукты после истечения срока годности.

Не используйте наборы, если фольгированные пакеты порваны или проколоты.

Убедитесь в том, что ячейки ПЦР плотно закрыты после добавления ДНК во избежание испарения во время ПЦР-амплификации. Особо обратите внимание на края и углы.

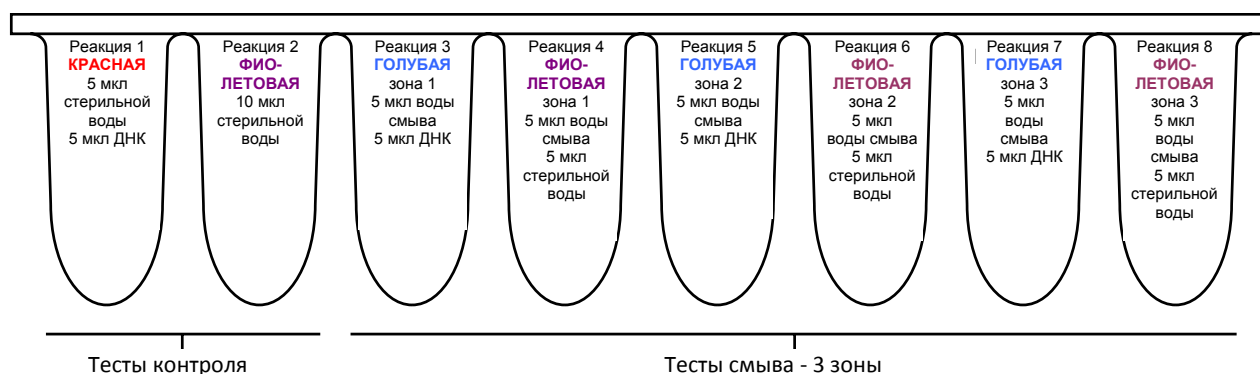
8. Инструкции по использованию

Примечание:

Частым источником контаминации являются пипетки ПЦР, рекомендуется протирать тампоном кончик пипетки и внутри полый части. Рекомендуется также проводить исследования на наличие контаминации с помощью пипетки, которая по результатам предыдущей проверки не была законтаминирована. Если обнаружена контаминация в какой-либо зоне, следуйте инструкциям вашей лаборатории по её устранению и повторно исследуйте эту зону.

1. В зоне, свободной от ДНК, пометьте стерильную, не содержащую ДНКазы, полипропиленовую 2-мл пробирку для каждой зоны, которая должна быть исследована в тесте смыва. Пометьте дополнительную пробирку 'отрицательный контроль'.
2. Заведомо неконтаминированной пипеткой добавьте 500 мкл стерильной, очищенной на молекулярном уровне, дистиллированной воды в каждую 2-мл пробирку.
3. Смочите стерильные тампоны на пластиковых аппликаторах в каждой пробирке.
4. Протрите зону, которую требуется исследовать, смоченным наконечником аппликатора.
5. Оторвите или отрежьте пластиковое основание аппликатора и поместите тампон в 2-мл пробирку с водой.
6. Немного перемешивайте на вортексе.
7. Удалите стерильным пинцетом тампон и утилизируйте его.
8. Цетрифугируйте 1 минуту при скорости 10000 - 13000 об\мин в микроцентрифуге, чтобы удалить твёрдые частицы.
9. Откройте пакет из фольги. В каждую лунку требуется добавить по 10 мкл жидкости, как показано на рис. 1.
10. **Отрицательный контроль:** Добавьте **10 мкл** стерильной, очищенной на молекулярном уровне воды в реакцию отрицательного контроля **2** (фиолетовая).
11. Добавьте **5мкл** стерильной воды в реакции **1, 4, 6, 8**.
12. **Положительный контроль:** Добавьте **5мкл** 10 нг/мкл геномной ДНК человека в реакции **1** (красная реакция) и **3, 5 и 7** (голубые реакции).
13. **Реакции теста смыва:** Добавьте по **5 мкл** отцентрифугированной воды (воды смыва) из зоны смыва 1 в реакции **3 и 4**, из зоны смыва 2 в реакции **5 и 6** и из зоны смыва 3 в реакции **7 и 8**.
14. Во всех реакциях сейчас по 10 мкл регидрированного объёма, как показано на рис. 1. Закройте поставляемыми крышками реакции и продолжайте тест SSPGo PCR, как показано далее.

Рисунок 1.



РЕСУСПЕНДИРОВАНИЕ, ПРИМЕЧАНИЕ: Смеси ПЦР должны быть ресуспендированы с образцами в течение 3 часов после извлечения плашки из пакета из фольги.

ПРОФИЛЬ ВЫСОТЫ ПЛАШЕК/СТРИПА ПЦР, ПРИМЕЧАНИЕ: Рекомендуется, чтобы высота плашек и стрипов при помещении их в одну и ту же машину ПЦР была одинаковой. Разные профили высоты могут вести к плохому контакту с нагретой крышкой машины ПЦР. Это может быть причиной слабой или ошибочной ПЦР-амплификации.

Параметры ПЦР

Следует использовать следующие параметры ПЦР. Скорость температурного нагрева должна составлять по крайней мере 1°C в секунду, подключите нагреваемую крышку. Подробные инструкции по использованию находятся в руководстве по эксплуатации производителя термоциклера. Термоциклер должен быть откалиброван в соответствии с правилами аккредитации Американского общества гистосовместимости и иммуногенетики (American Society of Histocompatibility and Immunogenetic) (ASHI) или Европейской федерации иммуногенетики (European Federation of Immunogenetics) (EFI).

Денатурировать	94°C	5 минут		
Денатурация	96°C	15 секунд	←	10 циклов
Отжиг	66°C	50 секунд		
Удлинение	72°C	30 секунд		
Денатурация	96°C	15 секунд	←	20 циклов
Отжиг	64°C	50 секунд		
Удлинение	72°C	30 секунд		
Остановка (HOLD)	15°C			

Гель-электрофорез

Эти инструкции относятся к горизонтальному электрофорезу в агарозном геле:

Приготовьте 2% агарозный гель в 0,5x буфере TBE. Когда гель охладится до температуры приблизительно 60°C, добавьте бромид этидия, конечная концентрация должна быть 0,5 мкг/мл. Залейте гель и установите пластиковые гребёнки (напр., 12x8 лунок с расстоянием 9 мм). Затем удалите гребёнки и поместите гель в 0,5x буфер TBE. Перенесите минимум 5 мкл и максимум 10 мкл из каждой платы или стрипа в соответствующую лунку на геле, отмечая позицию каждой реакции. Используйте масс-лэддер в 100 bp для установления размера полученных полос. Условия электрофореза - 20 минут при 10в/см.

См. подробную информацию о специальном оборудовании в инструкциях производителя системы для электрофореза. Изображение гелей должно быть сформировано с использованием системы геле-документации с прибором для УФ-просвечивания.

9. Интерпретация

Результаты исследования зон, обработанных тампонами, действительны, только если значение положительного контроля положительное, а отрицательного контроля - отрицательное.

Тесты исследования зон, обработанных тампонами, действительны, только если соответствующее значение контроля ингибирования положительное.

При контаминации ПЦР или контаминации ДНК должен присутствовать ампликон 187bp. Любой «шмер» или полоски всех размеров могут также указывать на контаминацию ПЦР, но димеры праймеров и другие артефакты удлинения праймера менее 100bp должны игнорироваться.

Rx	Краситель	Использование	Результат	Вывод	Действия
1	Красный	Положительный контроль	187bp +ve	Тест валидный. ДНК приемлемая. ПЦР успешная	
			Нет амплификации	Тест невалидный	Повторить весь тест с другим контролем ДНК
2	Фиолетовый	Отрицательный контроль	187bp +ve	Тест невалидный. Вода и/или пипетка контаминированы	Тестировать с другой водой и пипеткой
			Нет амплификации	Тест валидный. Вода не контаминирована	
3, 5, 7	Голубой	Тест ингибирования	187bp +ve	Тест смыва валидный. Нет ингибиторов	
			Нет амплификации	Тест смыва невалидный. Присутствуют потенциальные ингибиторы	Очистить зону стерильной водой, повторить
4, 6, 8	Фиолетовый	Тест смыва	187bp +ve	Имеется контаминация	Изолировать и очистить использованную пипетку. Очистить контаминированную зону раствором, который удаляет ДНК. Повторить тест.
			Нет амплификации	Тест смыва отрицательный. Нет контаминации	

10. Обеспечение и контроль качества

Проведение исследования: ПЦР-ампликон из набора Biofortuna высушивали на поверхности твёрдого тела. Тест смыва (wipe test) проводили с использованием ампликона в неразведённом виде, а затем в разведениях от 1×10^1 до 1×10^{15} . Ампликон был обнаружен в разведениях до и включая 1×10^{15} .

Геномную ДНК высушивали на поверхности твёрдого тела. Тест смыва (wipe test) проводили с использованием геномной ДНК в концентрации 100 нг/мкл, а затем в разведениях от 1×10^1 до 1×10^{15} . ДНК была обнаружена в разведениях до 1×10^3 .

11. Библиография

- 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. Тест смыва Biofortuna HLA Wipe Test (v2): Таблица регистрации образца

Таблица регистрации образца. Рекомендуется ксерокопировать эту таблицу регистрации образца до использования, так как набора теста смыва (Wipe Test) достаточно для исследования 36 зон (3 зоны смыва на каждый стрип по 8 лунок, 12 стрипов в наборе).

Дата теста:

Тест проведён:









Одобен:

Другая информация:

Номер серии набора:

Реакция	Краситель	Использование (см. инструкции)	Результат теста	Действия	Информация по образцу
1	Красный	Положительный контроль: ДНК			
2	Фиолетовый	Отрицательный контроль: Вода			
3	Голубой	Зона 1 теста ингибирования			
4	Фиолетовый	Зона 1 теста смыва			
5	Голубой	Зона 2 теста ингибирования			
6	Фиолетовый	Зона 2 теста смыва			
7	Голубой	Зона 3 теста ингибирования			
8	Фиолетовый	Зона 3 теста смыва			

13. Используемые символы

	Количество тестов
	См. инструкции по использованию
	Местоположение производителя
	In Vitro диагностика
	Срок годности
	Температура хранения
	Номер серии
	Номер по каталогу

14. Контактная информация производителя

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. Переводы**

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

Ревизия

Данный документ – версия 2

Исправления: инструкции раздела 8 и нумерация разделов