



Biofortuna SSPGo™ HLA Wipe Test BF-40-01 Kullanım Talimatları

Sürüm 2

Eylül 2011

1. Kullanım Amacı

Biofortuna SSPGo HLA Wipe Test, laboratuvar alanları ve donanımının, Biofortuna SSPGo ürünlerinden kaynaklanabilecek PCR (Polimeraz Zincir Reaksiyonu) amplikon kontaminasyonu bakımından izlenmesinde kullanılmak üzere tasarlanmıştır.

2. Giriş

PCR, önceki bir PCR'den gelen DNA amplikonu ile kontaminasyona duyarlı, hassas bir tekniktir. Kontaminasyon, sonraki PCR'lerde yanlış pozitif amplifikasyona yol açabilir, bu da hatalı genotiplemeye neden olabilir. PCR amplikonu reaktifler ve numunelerin yanı sıra pipetler gibi laboratuvar donanımlarını kontamine edebilir. Reaktifler ve donanım, kontaminasyon işaretleri açısından düzenli olarak izlenmelidir.

3. Test Tanımı

Her bir SSPGo HLA Wipe Test, dondurularak kurutulmuş PCR tamponu, polimeraz ve HLA-DRA genine özgü primerler içeren sekiz PCR kuyulu bir şeritten oluşur ve insan genomik DNA'sından 187bp amplikon üretir. Tüm Biofortuna kitlerinde dahili kontrol olarak DRA amplikonundan yararlandığı için, Biofortuna SSPGo kitlerinin kullanımından kaynaklanan her türlü kontaminasyon DRA geni amplifikasyonu içerecek ve Wipe Test primerleri tarafından tespit edilecektir.

Sekiz kuyulu her şerit, en fazla üç silme testi bölgesini kontaminasyon açısından test eder. Her şeritte tümleşik pozitif ve negatif kontrol reaksiyonları ile her bir silme testi bölgesi için inhibisyon kontrol reaksiyonları bulunur. Bir bölgeyi kontaminasyon açısından test etmek için, alan öncelikle bir temizleme çubuğuyla silinir, ardından bu çubuk suya sokulur. Bu su, wipe testinde bir şablon şeklinde ve PCR inhibisyon testi olarak genomik DNA içeren 50:50 karışım şeklinde kullanılır.

Düzenli olarak kontaminasyon testi yapılması tavsiye edilir. Test edilecek tipik bölgeler DNA preparatı alanı, PCR ayarlama alanı ve amplifikasyon sonrası alanı içerir. Test edilecek tipik öğeler çalışma tezgahları, pipetler, santrifüjler, soğutucu ve dondurucu tutamakları, kapı topuzları ve rafları içerir. Test edilecek tipik solüsyonlar DNA preparatı tamponları ve DNA dilüentlerini içerir. PCR tamponları ve *Taq* polimerazı gibi bir defadan fazla kullanılabilen ortak reaktifler, kontaminasyona özellikle duyarlıdır ancak, Biofortuna ürünleri eksiksiz olduğu ve yalnızca DNA eklenmesini gerektirdiği için Biofortuna kitlerini etkilemezler.

4. Kit İçeriği

- Her biri önceden dağıtılmış ve dondurularak kurutulmuş 10µl primer, polimeraz, dNTP'ler* ve tampon içeren 8 PCR kuyulu 12 şerit. Folyo ile ambalajlanmış her şerit, üç kontaminasyon bölgesini test etmek üzere tasarlanmıştır. Sekiz reaksiyon şeridi formatı aşağıda gösterilmiştir.

Reaksiyon	Boya	Kullanım
1	Kırmızı	Pozitif Kontrol: DNA
2	Mor	Negatif Kontrol: temizleme çubuğunu ıslatmak için kullanılan su
3	Mavi	Bölge 1 İnhibisyon Testi: %50 DNA, %50 wipe water
4	Mor	Bölge 1 Wipe Testi
5	Mavi	Bölge 2 İnhibisyon Testi: %50 DNA, %50 wipe water
6	Mor	Bölge 2 Wipe Testi
7	Mavi	Bölge 3 İnhibisyon Testi: %50 DNA, %50 wipe water
8	Mor	Bölge 3 Wipe Testi

- 36 adet steril temizleme çubuğu
- 12x8 PCR kapağı
- 1x kullanım talimatları
- 1x Analiz Sertifikası
- MSDS www.biofortuna.com adresindeki Biofortuna web sitesinden indirilebilir. Web sitesinden indiremiyorsanız lütfen yerel dağıtıcınızla iletişim kurun.

*CleanAmp™ dNTP'ler, Biofortuna SSPGo ürünlerinde kullanım için Trilink Biotechnologies Inc ruhsatına sahiptir.



5. Tedarik Edilmeyen Reaktifler ve Donanım

- Uygun pipetleyiciler ve steril uçlar, örn. 10µl'lik filtre uçlarına sahip P10 pipetleyici.
- Pozitif kontrol olarak kullanılmak üzere 5-10ng/µl'de insan genomik DNA'sı.
- DNA izolasyon kiti/donanımı.
- UV spektrofotometresi.
- 2ml polipropilen tüpler.
- Steril moleküler kalitede su.
- Isıtılmış kapaklı 96 kuyulu termal döngü. Biofortuna kitlerde kullanılan PCR plakaları ve tüpleri, MJ Research PTC-100, PTC-200, Hybaid MBS ve Techne TC-512 termal döngüleri dahil olmak üzere, piyasadaki termal döngülerin büyük bir kısmı ile kullanılmak üzere valide edilmiştir. Farklı modeller kullanıcı tarafından tekrar validasyon yapılmasını gerektirebilir.
- Jel elektroforez reaktifleri (agaroz, 0.5x TBE, 1000bp DNA moleküler ağırlık markörü, 10mg/ml Etidyum Bromür).
- Jel elektroforez donanımı (jel depoları, güç beslemesi, UV transillüminatörlü jel dokümantasyon sistemi).

6. Güvenlik ve Uyarılar

- Testler yalnızca uygun eğitimi almış personel tarafından yapılmalıdır.
- Tüm reaktifleri İyi Laboratuvar Uygulaması uyarınca işleyin.
- PCR öncesi ve sonrası alanları birbirinden ayrı tutun. PCR sonrası malzemeleri PCR öncesi alana geri getirmeyin.
- **Biyolojik Tehlike Uyarısı:** Tüm kan ürünlerini potansiyel enfeksiyöz olarak işleyin.
- **Biyolojik Tehlike Uyarısı:** Etidyum Bromür potansiyel bir karsinojendir. Bu maddeyi kullanırsanız, daima eldiven, laboratuvar önlüğü ve koruyucu gözlük kullanın.
- **Biyolojik Tehlike Uyarısı:** UV kaynakları kullanırken dikkatli olun, daima eldiven, laboratuvar önlüğü ve koruyucu gözlük kullanın. Asla UV ışık kaynağına doğrudan bakmayın.
- Malzeme Güvenlik Bilgi Formlarına www.biofortuna.com adresinden ulaşabilirsiniz.

7. Saklama ve Stabilité

Biofortuna SSPGo kitleri 4-30 °C'de saklanabilir. PCR kapları folyo torbalardan çıkarıldıktan sonra reaktifler 3 saat içinde numune ile rehidrasyona tabi tutulmalıdır. Son kullanma tarihi için ambalaja bakın. Ambalajda basılı tarih geçtikten sonra ürünleri kullanmayın.

Folyo torba yırtılmış ya da delinmişse kitleri kullanmayın.

PCR amplifikasyonu sırasında buharlaşmaya neden olabileceğinden, DNA ekledikten sonra PCR kaplarının sıkıca kapatıldığından emin olun. Kenarlara ve köşelere özellikle dikkat edin.

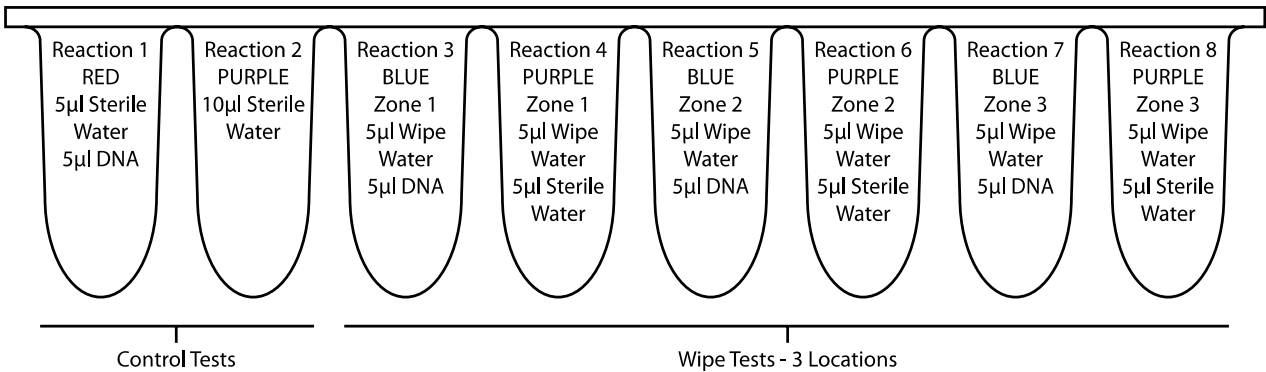
8. Kullanım Talimatları

Not:

PCR pipetleri sıklıkla kontaminasyona yol açabilen bir kaynak olup pipet ucunun ve mümkünse haznenin iç kısmının silinmesi tavsiye edilir. Ayrıca tüm kontaminasyon testlerinin, test edilerek negatif olduğu gösterilmiş bir pipetle yapılması da tavsiye edilir. Kontaminasyon bulunursa, kontaminasyonu ortadan kaldırmak ve bölgeleri yeniden test etmek için laboratuvarınızın yönergelerini uygulayın.

1. DNA içermeyen bir konumda, test edilecek her silme testi bölgesi için 2ml'lik steril bir DNase içermeyen polipropilen tüpünü etiketleyin. Fazladan bir tüpü 'Negatif Kontrol' olarak etiketleyin.
2. Kontaminasyon içermediği bilinen bir pipet kullanarak, 2ml'lik tüplerin her birine 500µl steril, moleküler kalitede distile su ekleyin.
3. Tedarik edilen steril plastik aplikatör temizleme çubuğunu her silme testi tüpünde ıslatın.
4. Test edilecek bölgeyi nemlendirilmiş aplikatörle silin.
5. Aplikatörün plastik sapını koparın ya da kesin ve orijinal 2ml'lik su tüpüne yerleştirin.
6. Kısa bir süre vorteksleyin.
7. Steril forseps ile temizleme çubuğunu çıkarın ve atın.
8. Partikül maddeyi gidermek için, mikrosantrifüj içinde 1 dakika boyunca 10,000 ila 13,000 rpm'de santrifüje tabi tutun.
9. Testin folyo torbasını açın. Tüm testler şema 1'de gösterildiği gibi toplam 10µl sıvı ile rehidrasyona tabi tutulmalıdır.
10. **Negatif kontrol:** Negatif kontrol reaksiyonuna **2 (mor) 10µl** steril moleküler kalitede su ekleyin.
11. Reaksiyon **1, 4, 6** ve **8'e 5µl** steril su ekleyin.
12. **Pozitif kontrol:** Reaksiyona **1** (kırmızı reaksiyon) ve reaksiyonlara **3, 5 ve 7** (mavi) 10ng/µl insan genomik DNA'sından **5µl** ekleyin.
13. **Wipe testi reaksiyonları:** silme bölgesi 1'den reaksiyon **3 ve 4'e**, silme bölgesi 2'den reaksiyon **5 ve 6'ya** ve silme bölgesi 3'ten reaksiyon **7 ve 8'e 5µl** santrifüje tabi tutulmuş sıvı (wipe water) ekleyin.
14. Artık tüm reaksiyonlarda şema 1'de gösterildiği gibi, 10µl rehidrasyona tabi tutulmuş hacim vardır. Reaksiyonlara tedarik edilen kapakları takın ve aşağıda gösterilen normal SSPGo PCR parametreleriyle devam edin.

Şema 1.



YENİDEN SÜSPANSİYON NOTU: Tepsinin folyo poşetten çıkarılmasını izleyen 3 saat içinde PCR karışımlarının numunelerle yeniden süspansiyon haline getirilmesini sağlayın.

PCR PLAKASI/ŞERİDİ YÜKSEKLİK PROFİLİ NOTU: Plakaların ve şeritlerin yükseklik profilinin, aynı PCR makinesine yerleştirildiklerinde eşdeğer olması tavsiye edilir. Farklı yükseklik profilleri PCR makinelerinin ısıtılan kapağıyla yeterli temas sağlanmamasına neden olabilir. Bu da, yetersiz ya da başarısız PCR amplifikasyonuna yol açabilir.

PCR Parametreleri

Aşağıdaki PCR parametreleri kullanılmalıdır. Yükselme hızlarının saniyede en az 1 °C olmasını sağlayın ve ısıtılan kapağı etkinleştirin. Tüm kullanım talimatlarını görmek için, lütfen termal döngü üreticisinin kullanım kılavuzuna bakın. Termal döngüler, American Society of Histocompatibility and Immunogenetic (ASHI) veya European Federation of Immunogenetics (EFI) akreditasyon kuralları uyarınca kalibre edilmelidir.

94 °C'de	5 dakika denatüre edin	
96 °C'de	15 saniye denatüre edin	← 10 döngü
66 °C'de	50 saniye sertleştirin	
72 °C'de	30 saniye genişletin	
96 °C'de	15 saniye denatüre edin	← 20 döngü
64 °C'de	50 saniye sertleştirin	
72 °C'de	30 saniye genişletin	
15 °C'de BEKLETİN		

Jel Elektroforezi

Bu talimatlar yatay agaroz jel elektroforezi için geçerlidir: 0.5x TBE tamponu içinde %2'lik agaroz jel hazırlayın. Jel soğuyarak yaklaşık 60 °C'ye düştüğünde, 0.5 µg/ml'lik nihai konsantrasyona sahip olacak şekilde etidyum bromür ekleyin. Jeli eritin ve içine mikrotitre biçimlendirme tarakları sokun (örn. 9 mm boşluklu 12x8 kuyu). Katılaştıktan sonra tarakları çıkarın ve jeli 0.5x TBE tamponu ile kaplayın. Her bir tepsi ya da şerit reaksiyonundan en az 5 µl, en fazla 10 µl'lik bir miktarı, her reaksiyonun pozisyonuna dikkat ederek, jel üzerindeki ilgili kuyuya aktarın. 100 bp'lik bir merdiven, boyutun belirlenmesine yardımcı olabilir. Jeli 20 dakika boyunca 10 V/cm'de çalıştırın.

Özel donanım ayrıntıları için elektroforez sisteminizin üreticisinin kullanım talimatlarına bakın. Jeller, UV transillüminatörlü bir UV jel dokümantasyon sistemi kullanılarak görüntülenmelidir.

9. Yorum

Silinen bölgelerin test sonuçları yalnızca, pozitif kontrolün pozitif, negatif kontrolün ise negatif olması halinde geçerlidir.

Silinen bölgeler üzerinde yapılan testler yalnızca, ilgili inhibisyon kontrol testinin pozitif olması halinde geçerlidir.

PCR kontaminasyonu veya DNA kontaminasyonu varsa, 187bp amplikon gözlenmelidir. Farklı boyutlardaki herhangi bir smear veya bant da PCR kontaminasyonuna işaret edebilir, fakat 100bp'den küçük primer-dimer ve diğer primer genişleme artefaktları göz ardı edilmelidir.

Rx	Boya	Kullanım	Sonuç	Hüküm	Eylem
1	Kırmızı	Pozitif kontrol	187bp pozitif	Test geçerli. DNA uygun. PCR etkili	
			Amplifikasyon yok	Test geçersiz	Tetkikin tümünü farklı bir DNA kontrolüyle tekrarlayın
2	Mor	Negatif Kontrol	187bp pozitif	Test geçersiz. Su ve/veya pipet kontamine olmuştur	Farklı su ve pipetle test edin
			Amplifikasyon yok	Test geçerli. Su kontamine olmamıştır	
3, 5, 7	Mavi	İnhibisyon Testi	187bp pozitif	Silme testi geçerli. İnhibitör yok	
			Amplifikasyon yok	Silme testi geçersiz. Potansiyel inhibitörler var	Alanı steril su ile temizleyin, tekrar edin
4, 6, 8	Mor	Wipe Testi	187bp pozitif	Kontaminasyon var	Kullanılan pipeti izole edin ve temizleyin. Kontamine olmuş alanı, DNA'yı gidermek üzere tasarlanmış solüsyonla temizleyin. Testi tekrarlayın.
			Amplifikasyon yok	Silme testi negatif. Kontaminasyon yok	

10. Kalite Güvence ve Kalite Kontrol

Tetkik testi: Bir Biofortuna Kitinden alınan PCR amplikonu katı bir yüzey üzerinde kurumaya bırakılmıştır. Seyreltilmemiş amplikon ve ardından 1×10^1 ile 1×10^{15} arası dilüsyonlar üzerinde silme testi yapılmıştır. 1×10^{15} de dahil olmak üzere, bu değere kadar çıkan dilüsyonlarda amplikon tespit edilmiştir.

Genomik DNA katı bir yüzey üzerinde kurumaya bırakılmıştır. $100 \text{ ng}/\mu\text{l}$ 'deki gDNA üzerinde ve ardından 1×10^1 ile 1×10^{15} arası dilüsyonlar üzerinde silme testi yapılmıştır. 1×10^3 değerine kadar çıkan dilüsyonlarda DNA tespit edilmiştir.

11. Referanslar

- 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 Testi (v2): Numune Kayıt Sayfası

Numune Kayıt Sayfası Wipe Test Kiti 36 bölge için yeterli teste sahip olduğu için (8 kuyulu şerit başına 3 silme bölgesi, kit başına 12 şerit), kullanımdan önce bu numune kayıt sayfasının fotokopisinin çekilmesi tavsiye edilir.

Test Tarihi:

Testi yapan:









Onaylayan:

Diğer bilgiler:

Kit Lot Numarası:

Reaksiyon	Boya	Kullanım (Talimatlara bakın)	Test Sonucu	Eylem	Numune Bilgileri
1	Kırmızı	Pozitif Kontrol: DNA			
2	Mor	Negatif Kontrol: Su			
3	Mavi	Bölge 1 İnhibisyon Testi			
4	Mor	Bölge 1 Wipe Testi			
5	Mavi	Bölge 2 İnhibisyon Testi			
6	Mor	Bölge 2 Wipe Testi			
7	Mavi	Bölge 3 İnhibisyon Testi			
8	Mor	Bölge 3 Wipe Testi			

13. Kullanılan Semboller Kılavuzu

	Test Sayısı
	Kullanım Talimatlarına Bakın
	Üretim Tesisi
	İn Vitro Tanı Amaçlı
	Son Kullanma Tarihi
	Saklama Sıcaklığı
	Lot Numarası
	Catalogue number

14. Üretici İletişim Bilgileri

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



15. Çeviriler

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

Sürüm geçmişi

Bu doküman 2. sürümdür.
 Bu sürümde 8. Bölüm talimatları ve bölüm numaraları düzeltilmiştir.