

Wischtest

Kontaminationskontrolle

Testkit zur Erfassung von Kontaminationen
auf molekulargenetischer Basis

REF 7091

40 Reaktionen

1. Produktbeschreibung

Der Einsatz der Polymerase Chain Reaction (PCR) für die HLA-Typisierung ist inzwischen zur Routine geworden. Da es sich bei der PCR um eine äußerst sensitive Methode handelt, müssen besondere Vorsichtsmaßnahmen ergriffen werden, um Kontaminationen und damit falsch-positive Reaktionen zu vermeiden (siehe auch 3.1).

Zur Vermeidung von Kontaminationen und damit zur Qualitätssicherung in einem Labor, sollten regelmäßig Arbeitsgeräte, Laborbereiche oder auch einzelne Reagenzien (z.B. Taq Polymerase) auf Verunreinigungen überprüft werden (nach EFI Richtlinie L1.2200 alle 2 Monate).

Der Wischtest ist hervorragend zur Erfassung von Kontaminationen durch genomische DNA oder Amplifikate aus den HLA Klassen I und II geeignet.

Die Testdurchführung basiert auf der Sequence Specific Primer-(SSP)[®] PCR (Abb. 1) [2,3]. Diese Methode nutzt die Tatsache, dass für eine erfolgreiche Reaktion beide Primer - speziell am sogenannten 3'-Ende - keine Fehlpaarungen aufweisen dürfen. Somit führt nur eine vollständige Übereinstimmung der Primer mit einer Zielsequenz zu einem Amplifikat, welches durch eine anschließende Gelelektrophorese sichtbar gemacht wird.



Abb. 1: Prinzip der SSP-PCR

2. Material

2.1 Inhalt des Wischtests

- ◆ 5 PCR Streifen (à 8 dünnwandige PCR GefäÙe) ausreichend für 40 Reaktionen (13 Wischtests). Die vorpipettierten und getrockneten Reaktionsansätze bestehen aus einem allelspezifischen Primer-Set für die HLA Klassen I und II, internen Kontroll-Primern (spezifisch für das humane G3PDH Gen) und Nukleotiden.
- ◆ 1 x 1,1 ml 10x PCR-Puffer
- ◆ 5 x 8er-Streifen Deckel
- ◆ Gebrauchsinformation

2.2 Zusätzlich erforderliches Material

- ◆ Taq-Polymerase (5 U/µl)
- ◆ **BAG EXTRA-GENE** Kit zur DNA-Extraktion aus Blut / Lymphozyten / Leukozyten oder Material für andere DNA-Extraktions-Methoden
- ◆ Kolbenhubpipetten (0,5-250 µl)
- ◆ sterile Spitzen, ggf. mit Filter
- ◆ Vliespapier
- ◆ DNA-Cycler (z. B. PTC 100-96V mit "Hot Bonnet"; Fa. BioRad)

Geräte und Material für die Gelelektrophorese

- ◆ DNA-Agarose
- ◆ 0,5 x TBE-Puffer (45 mM Tris, 45 mM Borsäure, 0,5 mM EDTA)
- ◆ Ethidiumbromid (EtBr)
- ◆ Flachgelkammer mit Kämmen
- ◆ Spannungsgeber (200 - 300 V, 200 mA)
- ◆ DNA-Längenstandard (Best.-Nr.: 7097)

Geräte zur Auswertung und Dokumentation

- ◆ UV-Leuchtplatte (220-310 nm)
- ◆ Photoeinrichtung (z.B. Polaroid-System) mit Filmen (Polaroid Typ 667)

2.3 Lagerung und Haltbarkeit

Der Kit wird ungekühlt versandt. Nach Erhalt werden alle Kit-Reagenzien bei -20...-80°C lichtgeschützt gelagert. Die Haltbarkeitsdauer ist den Etiketten auf den jeweiligen Reagenzien zu entnehmen und gilt auch nach dem ersten Öffnen. Die auf dem Außenetikett angegebene Haltbarkeit gilt für alle im Kit enthaltenen Reagenzien. Den 10x PCR-Puffer kurz vor Gebrauch auftauen.

3. Testdurchführung

3.1 Vorsichtsmaßnahmen

Bei der PCR handelt es sich um eine äußerst sensitive Methode. Besondere Vorsichtsmaßnahmen sind zu beachten, um Kontaminationen und damit falsche Reaktionen zu vermeiden:

- ◆ prinzipiell mit Handschuhen (möglichst puderfrei) arbeiten
- ◆ bei jedem Pipettierschritt neue Spitzen (mit Filtereinsatz oder integriertem Stempel) verwenden
- ◆ zwei getrennte Arbeitsbereiche für die Prä-Amplifikation (DNA-Isolierung, Ansetzen der Reaktionen) und die Post-Amplifikation (Amplifikation, Gel-Elektrophorese, Dokumentation); möglichst zwei getrennte Räume
- ◆ Geräte und andere Materialien nur an den jeweiligen Arbeitsplätzen verwenden und nicht austauschen

3.2 DNA-Isolierung

Für die Testung der Positiv-Probe wird Leukozyten-DNA benötigt. Bestens geeignet für die Isolierung ist der **BAG EXTRA-GENE** Kit, welcher ohne Einsatz von giftigen Chemikalien oder Lösungsmitteln in kurzer Zeit reine DNA aus Vollblut liefert. Weiterhin sind andere in der Literatur beschriebene Methoden [5] wie die Cetyltrimethylammoniumbromid (CTAB)-Methode oder Phenol-Chloroform Reinigung geeignet, DNA mit ausreichender Reinheit zu erhalten. Heparin kann unter Umständen die PCR-Reaktion hemmen [6]. Es wird daher der Einsatz von EDTA- oder Citrat-Blut für die Typisierung empfohlen. Die DNA sollte einen Reinheitsindex (Extinktionsverhältnis OD_{260} / OD_{280}) zwischen 1.6 und 2.0 aufweisen.

3.3 Amplifikation

Der vorpipettierte Reaktionsmix beinhaltet bereits die allelspezifischen Primer, Nukleotide sowie die Primer der internen Amplifikationskontrolle und liegt in getrockneter Form vor. Je Testung werden 3 **vorgetropfte** und **getrocknete** Reaktionsansätze mit einem Endvolumen von 20 µl eingesetzt.

3.3.1 Testablauf "Wischtest"

- 1,5 ml Reaktionsgefäße mit den zu untersuchenden Bereichen (z.B. Arbeitsplatte, Türgriff,...) beschriften und je **200 µl steriles Aqua dest.** hineinpipettieren.
- Für jeden Testbereich ein Stück Vlies (ca. 1 cm²) in das jeweilige Reaktionsgefäß eintauchen und mit dem befeuchteten Vlies den Testbereich abwischen.
- Das Vlies wird in das jeweilige Reaktionsgefäß gesteckt und 2 Stunden bei Raumtemperatur in den 200 µl Aqua dest. inkubiert. Nach Ablauf der Zeit wird das Vlies verworfen.
- Die gewünschte Anzahl der PCR Gefäße (je drei für einen Testbereich) aus dem Gefrierschrank entnehmen und den 10x PCR-Puffer auftauen. Ein Gefäß mit "Testbereich", eines mit "Positivkontrolle" und das dritte mit "Inhibitionskontrolle" beschriften.
- Herstellen der **Taq-Vorverdünnung** (Minimum 5 Reaktionen):
Ansatz für Anzahl der gewünschten Reaktionen + 2 herstellen: ⇒ Kurz vortexen

	pro 1 Reaktion	5 Reaktionen	8 Reaktionen
10x PCR-Puffer	2 µl	10,0 µl	16 µl
Taq Polymerase (5 U/µl)	0,12 µl	0,60 µl	0,96 µl

- In die beschrifteten Reaktionsgefäße die folgenden Reaktionsmixe pipettieren:

	Testbereich	Positivkontrolle	Inhibitionskontrolle
steriles Aqua dest	14 µl	17 µl	13 µl
Probe des Testbereichs	4 µl	-	4 µl
genomische DNA (40ng/µl)	-	1 µl	1 µl
Taq-Vorverdünnung	2 µl	2 µl	2 µl

7. Die Gefäße werden mit den dafür vorgesehenen Deckeln **dicht** verschlossen. Es ist darauf zu achten, dass die Deckelinnenseiten und die oberen Ränder nicht mit den Fingern berührt werden, um Verunreinigungen zu vermeiden. Puder von Latex-Handschuhen (Talkum) ist ein starker Inhibitor der PCR! Weiterhin sollte darauf geachtet werden, daß sich die gesamte Reaktionslösung im Gefäßboden befindet. Wenn nicht, sollte dies durch leichtes Tippen der Platten auf die Arbeitsplatte geschehen.
8. Die Reaktionsgefäße in den Cyler stellen (auf festen Sitz achten!) und das PCR-Programm starten.
Ein Überschichten der Ansätze mit Mineralöl ist bei Verwendung eines beheizten Deckels **nicht** nötig !

Amplifikationsprotokoll

Programm-Schritt	Zeit	Temp.	Anzahl Zyklen
Erste Denaturierung	5 Min.	96° C	1 Zyklus
Denaturierung	20 Sek.	96° C	5 Zyklen
Annealing+Extension	60 Sek.	68° C	
Denaturierung	20 Sek	96° C	10 Zyklen
Annealing	50 Sek.	64° C	
Extension	45 Sek	72° C	
Denaturierung	20 Sek	96° C	15 Zyklen
Annealing	50 Sek.	61° C	
Extension	45 Sek	72° C	
Extension	5 Min	72° C	1 Zyklus

Cycler-Typen:

PTC100 / 200 (MJ Research / Fa. BioRad)
und
GeneAmp PCR-System 9600 / 9700 (bitte Heizrate vom 9600 verwenden) (ABI)

Da Cyler verschiedener Hersteller sich in ihrem Verhalten unterscheiden und sogar verschiedene Cycler eines Typs unterschiedlich kalibriert sein können, muss ggf. das Amplifikationsprotokoll optimiert werden.

Werden andere Cycler-Typen eingesetzt oder Reaktionsparameter (z.B. Volumen) geändert, so muß das Amplifikationsprotokoll neu optimiert werden. Prinzipiell kann folgendermaßen vorgegangen werden:

Bei **falsch positiven** Reaktionen (unspezifische Banden):

Erhöhung der Annealing-Temperatur in 1°C-Schritten.

Bei **falsch negativen** Reaktionen (fehlende Banden und/oder Amplifikationskontrollen):

Erniedrigung der Annealing-Temperatur in 1°C-Schritten und / oder Erhöhung der Annealing-Zeiten in 5-Sekunden-Schritten und / oder Erhöhung der Denaturierungs-Zeiten in 5-Sekunden Schritten.

Es wird empfohlen nur regelmäßig kalibrierte Cycler zu verwenden. Hierfür eignet sich gut der BAG-Cycler Check Kit (Bestellnr.: 7104).

Die Qualitätskontrollen wurde mit Cyclern des Typs PTC 200 bzw. 100 (MJ Research) und 9700 (ABI) durchgeführt.

3.4 Gelelektrophorese

Die Auftrennung und Auswertung der Amplifikationsprodukte erfolgt durch Elektrophorese über ein (Horizontal-) Agarose-Gel. Als Laufpuffer wird 0,5 x TBE (45 mM Tris, 45 mM Borsäure, 0,5 mM EDTA) - Puffer empfohlen. Die Gelstärke sollte 2,0 - 2,5% Agarose betragen. Vor dem Probenauftrag sollte das Gel mindestens 30 Min. polymerisieren. Nach Beendigung der Amplifikation werden die Proben dem Cycler entnommen und die kompletten Ansätze vorsichtig in jeweils eine Tasche des Gels pipettiert. Die Zugabe von Probenpuffer ist nicht mehr nötig. Zusätzlich sollte eine Tasche mit einem DNA-Längenstandard für den Größenvergleich beladen werden. Die elektrophoretische Auftrennung erfolgt bei 10-12 V/cm (bei 20 cm Gel-Länge ca. 200-240 V) für 20-40 Min.. Nach abgeschlossenem Lauf wird das komplette Gel für 30-45 Min. in einer Ethidiumbromid(EtBr)-Lösung (ca. 0,5 µg/ml EtBr in H₂O oder TBE-Puffer) gefärbt. Alternativ kann auch EtBr (0,5 µg/ml) dem Elektrophorese-Puffer oder dem Agarose-Gel zugesetzt werden. Im Bedarfsfall kann das Gel für ca. 20-30 Min. in H₂O entfärbt werden.

3.5 Dokumentation und Auswertung

Zur Dokumentation wird das Gel auf einen UV-Transilluminator (220-310 nm) gelegt und mit einer geeigneten Kamera (z.B. Polaroid, Film Typ 667) fotografiert. Belichtungszeit und Blende sind so zu wählen, daß die Banden scharf gezeichnet sind und sich gegen den dunklen Hintergrund abheben (Näherungswerte: Blende 11, Belichtungszeit 1 Sekunde).

Liegt keine Kontamination vor, darf in der "Testbereich" Probe **keine** Bande erscheinen. Kontaminationen werden durch folgende Banden angezeigt:

Kontamination mit Amplifikat: **78 bp** und/oder **104 bp** und/oder **282 bp**

Kontamination mit genomischer DNA: **282 bp** und evtl. **78 bp**, **104 bp**, **176 bp**,
ca. **580 bp**

In der Positivkontrolle und in der Inhibitionskontrolle muß ein Bandenmuster wie bei einer Kontamination mit genomischer DNA zu sehen sein. Liegen in der Positivkontrolle keine Amplifikate vor, so hat keine PCR-Reaktion stattgefunden. Wenn die Positivkontrolle in Ordnung ist, aber in der Inhibitionskontrolle keine Banden zu sehen sind, so muß davon ausgegangen werden, daß beim Abwischen des Testbereichs inhibitorische Substanzen in die Probe gelangt sind. In diesem Fall beweist eine saubere "Testbereich" Probe nicht, dass der Testbereich tatsächlich nicht verunreinigt ist.

4. Warn- und Entsorgungshinweise

Ethidiumbromid ist ein stark mutagenes Reagenz. Hautkontakt und Kontaminationen vermeiden ! Die Gebrauchsinformation sowie die Warn- und Entsorgungshinweise des entsprechenden Herstellers sind zu beachten !

Der Transilluminator sendet sehr kurzwelliges UV-Licht aus, das Verbrennungen der Haut und der Netzhaut hervorrufen kann. UV-Gesichtsschutz tragen!






Sämtliche für den Test verwendete Materialien biologischen Ursprungs, die zur Gewinnung von DNA verwendet werden (z.B. Blut, sonstige Körperflüssigkeiten) sollten als potentiell infektiös betrachtet werden. Beim Umgang mit biologischen Materialien werden deshalb angemessene Sicherheitsvorkehrungen empfohlen (nicht mit dem Mund pipettieren; Schutzhandschuhe bei der Testdurchführung tragen; Händedesinfektion nach der Testdurchführung).

Biologische Materialien müssen vor der Entsorgung inaktiviert werden (z.B. durch Autoklavieren). Einwegmaterialien sind nach Gebrauch zu autoklavieren oder zu verbrennen. Verschüttetes potentiell infektiöses Material sollte unverzüglich mit einem saugfähigen Papiertuch entfernt werden und der kontaminierte Bereich mit einem geeigneten Desinfektionsmittel oder 70%igem Ethanol desinfiziert werden. Material, dass für die Entfernung von Verschüttetem benutzt wurde, muss vor der Entsorgung inaktiviert werden (z.B. durch Autoklavieren).

5. Literatur

1. Bodmer, J. et al., 1997. Tissue Antigens **49**:297-321
2. Newton CR, 1989. Nucleic Acids Res. **17**:2503-2516
3. Olerup, O., Zetterquist H., 1992. Tissue Antigens **39**:225-235
4. Lu, Y.H. and Négre, S., 1993. Trends in Genetics **9**:297
5. Maniatis et al., 1989. Molecular Cloning: A Laboratory Manual.
New York: Cold Spring Harbour Laboratory
6. Beutler, E. et al., 1990. BioTechniques **9**:166
7. Bunce, M., 1995. Tissue Antigens **46**:355-367

6. Erklärung der Symbole auf den Etiketten

	Lagertemperatur
	Lot-Nr.
	Verwendbar bis
	Bestell-Nr.
	Gebrauchsinformation beachten

① Die SSP-Methode entspricht der geschützten Bezeichnung ARMSTM der Firma ZENECA, Manchester. Die Methode ist geschützt unter der europäischen Patentnummer 0 332 435 B1 und wird mit Einverständnis der Firma ZENECA benutzt.



BAG Health Care GmbH
Amtsgerichtsstraße 1-5
35423 Lich/Germany

Tel.: +49 (0) 6404 / 925-0 www.bag-healthcare.com
Fax: +49 (0) 6404 / 925-250 info@bag-healthcare.com

Auftragsannahme/Ordering:
Tel.: +49 (0) 6404 / 925-450
Fax: +49 (0) 6404 / 925-460
verkauf@bag-healthcare.com

Customer Service:
Tel.: +49 (0) 6404 / 925-125
Fax: +49 (0) 6404 / 925-421
service@bag-healthcare.com