

Návod k použití souprav

Wipe test

Kontaminační kontrola

Testovací souprava pro kontrolu kontaminace
využívající molekulárně - biologické metody

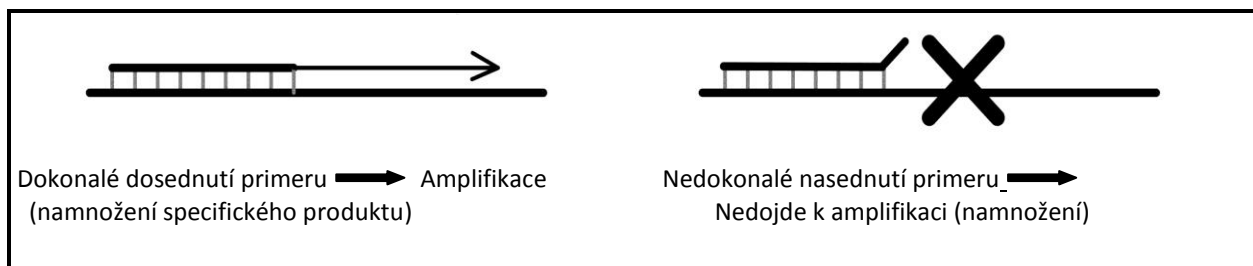
REF 7091

40 reakcí

1. Popis výrobku

Abychom zabránili vzniku a rozšíření kontaminace při HLA typizaci metodami PCR [1]. v prostorách a zařízení laboratoře a zachovali kvalitu reagensů (např. Taq Polymerázy), je nezbytné vše pravidelně kontrolovat na přítomnost DNA nebo amplifikátů (podle aktuálních EFI standardů).

Wipe test je uzpůsoben k průkazu kontaminace genomickou DNA nebo amplifikáty I. a II. HLA třídy. Test je založen na Sequence Specific Primers (t.j. primery specifické pro danou sekvenci) SSP – PCR (viz Obr.1) [2,3]. Tato metoda je založena na zjištění, že extenze primeru a tudíž i úspěšná PCR, je závislá na přesně odpovídajících sekvencích na 3' koncích obou primerů. Takže pouze v případě, že primery zcela přesně odpovídají testované sekvenci, proběhne PCR a je možno následně pozorovat její produkt při gelové elektroforéze.



Obr.1: Princip SSP-PCR

2. Materiál

2.1 Obsah souprav Wipe test

- 5 PCR stripů (každý s osmi mikrozkuvkami pro PCR) stačí na 40 reakcí (t.j. 13 kompletních Wipe testů). Předem aliquotované a vysušené reakční směsi se skládají z primerů specifických k jednotlivým alelám, vnitřních kontrolních primerů (specifických pro lidský gen G3PDH) a nukleotidů.
- 1x 1,1 ml 10xPCR pufr
- víčka ke stripům (5x8)
- návod k použití

2.2 Potřebné vybavení a materiál

- Taq polymeráza (5U/μl), (Happy Taq, [REF 70976](#)), nebo jiná Taq polymeráza uživatelem validovaná pro použití se soupravou Wipe test
- **Nepoužívejte Hot-Start Taq polymerázy!**
- Souprava **BAG EXTRA GENE I** ([REF 7059](#)) (volitelná) pro extrakci DNA z krve, lymfocytů či leukocytů, případně jiné vybavení pro izolaci genomické DNA
- pipety s rozsahem 0,5 - 250 μl
- sterilní špičky s integrovaným vnitřním filtrem
- filtrační papír
- DNA cyklér (seznam ověřených cyklérů najdete na straně 4)

Přístroje a chemikálie pro gelovou elektroforézu

- DNA agaróza
- 0,5 x TBE pufr (45 mM Tris, 45 mM kyselina boritá, 0,5 mM EDTA)
- ethidium-bromid (EtBr) **nebo peqGREEN**
- jednotka pro elektroforézu s hřebeny
- zdroj napětí (200-300 V, 200 mA)
- DNA délkový standard pro gelovou elektroforézu ([REF 7097](#))

Přístroje a potřeby pro dokumentaci a vyhodnocení výsledků

- zdroj UV záření (transiluminátor, $\lambda=220-310$ nm)
- fotoaparát (např. Polaroid) s filmy (Polaroid typ 667) nebo video s termálním papírem (např. typ KP65HM-CE)

2.3 Skladování a stabilita

Souprava je dodávána nezmražená. Skladujte všechny reagenty při teplotách ≤ -20 °C nebo při **2...8 °C** v temnu v zařízeních, kde je monitorována teplota. (**Vyvarujte se častého střídání skladovací teploty!**). Datum expirace je uvedeno na víčku každé z reagentů a je platné i po jejím otevření. Expirace uvedená na vnějším štítku soupravy je shodná s expirací té reagenty, která má v soupravě nejkratší expiraci.

3. Provádění testů

3.1 Bezpečnostní pokyny

PCR je vysoce citlivá metoda. Musí být dodržována zvláštní bezpečnostní opatření, aby bylo v co nejvyšší míře vyloučeno nebezpečí kontaminace vzorků a tím i falešných výsledků:

- Používejte při práci rukavice (pokud možno bez pudru).
- Pro každé pipetování používejte nové sterilní špičky (s integrovaným filtrem).
- Vyčleňte oddělené pracovní prostory pro jednotlivé pracovní kroky - t.j. před-amplifikační (izolace DNA a příprava reakčních směsí) a post-amplifikační (gelová elektroforéza a dokumentace), nejlépe ve dvou místnostech.
- Používejte pomůcky a přístroje jen pro daný krok a nepřenášejte je.

3.2 Izolace DNA

Pro pozitivní kontrolu potřebujeme DNA z leukocytů. Např. **BAG EXTRA-GENE I** souprava je vhodným řešením, neboť čistá DNA může být získána z plné krve za krátkou dobu a to bez použití toxických chemikálií a rozpouštědel. Ovšem i jiné v literatuře popsané komerční metody, např. kolonkové, poskytují dostatečně čistou DNA. Přítomnost heparinu v reakční směsi může inhibovat PCR [6]. Proto se doporučuje použití EDTA nebo citrátové krve.

DNA by měla mít index čistoty:

- $OD_{260} / OD_{280} \geq 1,5$ a $< 2,0$ (indikuje případnou kontaminaci RNA/proteiny)
- $OD_{260} / OD_{230} > 1,8$ (indikuje případnou kontaminaci solemi, uhlovodíky (cukry) nebo organickými rozpouštědly)

Hodnocení a kontrola kvality Wipe testu byla provedena s DNA, která byla izolována pomocí soupravy EXTRA GENE I nebo soupravou od firmy Qiagen.

3.3 Amplifikace

Všechny předředěné a sušené reakční směsi již obsahují set primerů specifický k alelám, primery vnitřní kontroly a nukleotidy. Parametry amplifikace jsou optimalizovány a nastaveny pro celkový objem reakce 20 μ l. Pro každou zkoušku se používají tři reakce.

Při hodnocení a kontrole kvality Wipe testu byla použita polymeráza Happy Taq (REF 70976).

3.3.1 Provedení Wipe testu

1. Označíme 1,5 ml reakční zkumavky podle kontrolované oblasti (např. pracovní stůl, klika dveří...) a do každé přidáme **200 μ l sterilní H₂O**.
2. Pro každou odpovídající oblast namočíme ústřížek filtračního papíru do odpovídající zkumavky a takto navlhčeným setřeme testovanou oblast.
3. Vhodíme ústřížek do zkumavky a inkubujeme po dobu 2 hodin při pokojové teplotě ve 200 μ l sterilní H₂O. Po uplynutí této doby ústřížek vyhodíme.

4. Vyjmeme požadovaný počet PCR mikrozkušavek a 10 x PCR pufr ze soupravy. Označíme si zkumavky, jednu jako „testovaná oblast“, druhou „pozitivní kontrola“ a třetí jako „inhibiční kontrola“.

5. Připravíme si **ředěnou Taq polymerázu** s pufr (minimálně pro pět reakcí) a jemně promixujeme na vortexu.

Připravujte tuto směs v množství: počet reakcí +2.

	1 reakce	5 reakcí	8 reakcí
10xPCR pufr	2 µl	10 µl	16 µl
Taq polymeráza (5U/µl)	0,12 µl	0,6 µl	0,96µl

6. Do označených reakčních zkumavek pipetujeme tyto směsi:

	testovaná oblast	pozitivní kontrola	inhibiční kontrola
sterilní H ₂ O	14µl	17µl	13µl
vzorek z testované oblasti	4µl	-	4µl
genomická DNA (40ng/µl)	-	1µl	1µl
Taq polymeráza + PCR pufr	2µl	2µl	2µl

7. Pevně uzavřete reakční zkumavky odpovídajícím víčkem. Dávejte pozor, abyste se nedotkli vnitřní části víčka ani horního okraje reakčních zkumavek prsty z důvodu nebezpečí kontaminace. Pudr z rukavic je silný inhibitor PCR!
Lehce hýbejte destičkou tak, aby se modrý pelet na dně reakční komůrky rozpustil. Veškerá reakční směs by měla být na dně reakční komůrky.

8. Vložte reakční zkumavky do termocykléru a pevně uzavřete víko tak, aby se mikrozkušavky při zahřívání nezdeformovaly. Zahajte PCR program. Převrstvení reakční směsi v mikrozkušavkách minerálním olejem **není** u cyklérů s nastavitelným a vyhříváním víkem **nutné**.

Parametry amplifikace:

Krok	Teplota	Čas	Počet cyklů
první denaturace	96°C	5 minut	1 cyklus
denaturace	96°C	20 sekund	5 cyklů
annealing + prodlužování	68°C	60 sekund	
denaturace	96°C	20 sekund	10 cyklů
annealing	64°C	50 sekund	
prodlužování	72°C	45 sekund	
denaturace	96°C	20 sekund	15 cyklů
annealing + prodlužování	61°C	50 sekund	
prodlužování	72°C	45 sekund	
závěrečné prodlužování	72°C	5 minut	1 cyklus

Ověřené typy cyklérů:

PTC 100/200/C1000 (MJ Research/ BioRad), GeneAmp PCR System 9600/9700 (použití rychlosti ohřevu 9600), **Veriti** (ABI), Mastercycler epGradient S (použití funkce "simulovat gradient Mastercycleru"), (Eppendorf) a Tprofessional (Biometra)

Prosíme, nepoužívejte cykléry s hliníkovým blokem (např. u GeneAmp PCR-System 9600 / 9700).

V případě, že používáte tepelné cykléry s vysokou rychlostí ohřevu a ochlazování, doporučujeme tuto rychlost snížit (~ 2,5 °C / sec).

Termocykléry od různých výrobců pracují poněkud odlišně a dokonce se mohou lišit jednotlivé přístroje stejného typu, proto může vzniknout potřeba optimalizovat parametry amplifikace pro váš konkrétní cyklér.

Pro optimalizaci postupujte následovně:

Při **falešně pozitivních** reakcích (nespecifické proužky/bandy, další typy atd.) zvyšujte teplotu annealingu v krocích po 1 °C.

Při **falešně negativních** výsledcích (t.j. chybějící proužky/bandy a/nebo amplifikační kontroly) snižujte v krocích po 1 °C teplotu annealingu a/nebo prodlužujte dobu trvání annealingu postupně po 5 sekundách, a/nebo prodlužujte dobu trvání denaturace postupně po 5 sekundách.

Doporučujeme používat jen pravidelně kalibrované cykléry.

Pro provedení kalibrace vašeho cykléru lze použít např. soupravu BAG-CYCLER CHECK kit (REF 7104, 71044).

Testy kvality výše uvedených výrobků byly prováděny na cyklérech PTC 200, resp. C1000 (MJ Research / BioRad), 9700 (ABI), Mastercycler epGradient S (Eppendorf) a Tprofessional (Biometra).

3.4 Gelová elektroforéza

Separace (oddělení) produktů amplifikace je prováděna pomocí horizontální gelové elektroforézy na agarózovém gelu. Jako pufr by měl být pro elektroforézu použit 0,5 x TBE (45 mM Tris, 45mM kyselina boritá, 0,5 mM EDTA). Koncentrace gelu by měla být 2,0 - 2,5% agarózy. Nechte gel polymerizovat alespoň 30 minut před nanesením vzorků. Po provedení amplifikace v cykléru z něho vyjměte vzorky a přeneste celkový objem pečlivě do jamek v gelu. Neopomeňte dát do samostatné jamky též 10 µl DNA délkového standardu pro měření délky fragmentů. Elektroforetická separace se provádí při 10-12 V/cm (se vzdáleností mezi elektrodami cca 20 cm a napětí 200V -240V), po dobu 20-40 minut. Po proběhnutí elektroforézy je nutné gel obarvit v roztoku ethidium bromidu (EtBr, přibližně 0,5 µg EtBr na 1ml H₂O nebo TBE pufru) po dobu 30 - 40 min. Alternativním postupem barvení je přidání EtBr (0,5 µg/ml) do elektroforetického pufru či přímo do gelu. Pokud je to nutné, lze odstranit přebytečný EtBr namočením gelu do vody nebo 0,5 x TBE pufru na cca 20 - 30 minut.

Místo ethidium bromidu lze na obarvení gelu použít peqGREEN. Při tomto postupu přidejte peqGREEN do rozehřáté agarózy, když roztok agarózy chladne a má cca 55°C (1,6 µl peqGreen / 100 ml roztoku agarózy) a jemným zatočením promíchejte.

3.5 Dokumentace a interpretace

Pro vizualizaci a dokumentaci vašich výsledků prosviňte gel po provedení elektroforézy UV světlem (transiluminátor, $\lambda = 220-310$ nm) a vyfotografujte odpovídajícím fotoaparátem (digitálním či klasickým), filtry a filmem (např. použijte systému Polaroid, film typ 667 nebo video systém, termální papír KP65HM-CE). Nastavte čas i clonu tak, aby jednotlivé proužky jasně vystupovaly proti pozadí a žádné nechyběly (např. clona 11, čas přibližně 1s).

Pokud není testovaná oblast kontaminována, nesmí být žádný proužek v „testované oblasti“ viditelný.

Pokud došlo ke kontaminaci, lze pozorovat následující proužky:

kontaminace **amplifikátem**: proužky o délce: **78 bp** (bp = páru bazí) a/nebo **104 bp** a/nebo **282 bp**.

kontaminaci **genomickou DNA**: proužky o délce: **282 bp** a někdy též **78 bp, 104 bp, 176bp, cca 580 bp**.

Pozitivní a inhibiční kontrola musí ukazovat vzor proužků stejný jako při kontaminaci genomickou DNA. Pokud nejsou patrné žádné amplifikáty v pozitivní kontrole, nedošlo k PCR a test nelze interpretovat. Pokud je pozitivní kontrola v pořádku, ale v inhibiční kontrole nejsou patrné žádné proužky, znamená to, že testovaná oblast nesla blokátory PCR. V tomto případě tedy nelze vyloučit ani v případě výsledku „nekontaminováno“ pro testovanou oblast nějaký typ kontaminace.

4. Varování a bezpečnostní pokyny

Ethidium bromid (v textu zkracován často jako EtBr) je silný mutagen. Noste rukavice při manipulaci s gely nebo roztoky obsahujícími EtBr! Prostudujte pečlivě varování a bezpečnostní pokyny výrobce! Velmi krátké vlny používané při prosvěcování gelu UV zářením mohou způsobit popáleniny na kůži a především na sítnici. Používejte ochranné pomůcky, jako jsou ochranné obličejové masky!

Veškerý biologický materiál používaný pro extrakci DNA, t.j. krev a lidské tkáně je nutno považovat za potenciálně infekční a s jako takovým s ním musí být zacházeno. Při práci s biologickým materiálem by tedy měly být dodržovány odpovídající pracovní postupy (např. nepipetovat ústy, používat jednorázové rukavice, dezinfikovat ruce po ukončení práce).

Biologický materiál by měl být deaktivován před likvidací např. sterilizací v autoklávu. Jednorázové pomůcky, špičky atd. by měly být před likvidací také deaktivovány v autoklávu nebo spáleny.





Pokud dojde k rozlití potenciálně infekčního materiálu, měl by být tento okamžitě odstraněn papírovými utěrkami a místo ošetřeno standardními dezinfekčními prostředky nebo 70% alkoholem. Veškerý materiál použitý k čištění by měl být před likvidací deaktivován (viz výše).

Likvidace vzorků, nepoužitých reagensů a dalších materiálů podléhá místní legislativě.

5. Literatura

1. Bodmer, J., 1993. Immunogenetics **37**:79-94
2. Olerup, O., Zetterquist H., 1992. Tissue Antigens **39**:225-235
3. Olerup, O., Zetterquist H., 1993. Tissue Antigens **41**:55-56
4. Lu, Y.H. and Négre, S., 1993. Trends in Genetics **9**:297
5. Green and Sambrook, 2012. 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. Vysvětlení symbolů použitých na etiketách

	Teplota skladování
	Použitelné do
	Čtěte návod k použití
	Dostatečný pro n testů
CONT	Obsah, obsahuje
CONTROL CC	Kontrola kontaminace
IFU	Návod k použití
LOT	Číslo šarže
OR	Nebo
PCRBUF 10x	PCR pufr, 10x koncentrovaný
PCRCAP	PCR víčko
PCRSTRIP	PCR strip
REACTIONMIX	Reakční směs
REF	Katalogové číslo
RTU	Připraveno k použití

Návody k použití v jiných jazycích hledejte na:

<http://www.bag-healthcare.com>

<http://service.bag-healthcare.com>

nebo volejte: +49 (0)6404-925-125

BAG Health Care GmbH
Na Hlinách 555/17, Praha 8, 182 00
Tel.: 286 840 508, Fax: 286 840 510, Mobil: 777 227 437
info@bag-healthcare.cz, www.bag-healthcare.cz