

PT

Instruções de utilização

Wipe Test

Instruções de utilização electrónica ver www.bag-healthcare.com

Controlo de contaminação

Kit de teste para a deteção de contaminação
numa base genética molecular

REF 7091

40 reações

1. Descrição do produto

Para evitar contaminações na tipificação do HLA [1] e assegurar a qualidade em laboratório, os materiais de trabalho, áreas de laboratório ou reagentes únicos (p. ex., Taq Polimerase) devem ser monitorizados regularmente relativamente ao DNA genómico ou amplificados (de acordo com a norma EFI).

O **Wipe Test** é adequado para a deteção de contaminações com DNA genómico ou amplificação dos genes de HLA de classe I e II. O procedimento de teste baseia-se nos Sequence Specific Primers (SSP)-PCR (ver Fig. 1) [2, 3]. Este método utiliza o facto de a extensão do iniciador, e por conseguinte, a PCR bem-sucedida dependerem de uma correspondência exata na extremidade de 3' de ambos os iniciadores. Por conseguinte, apenas se os iniciadores corresponderem totalmente à sequência alvo é que é obtida uma amplificação que é subseqüentemente visualizada por eletroforese em gel de agarose.

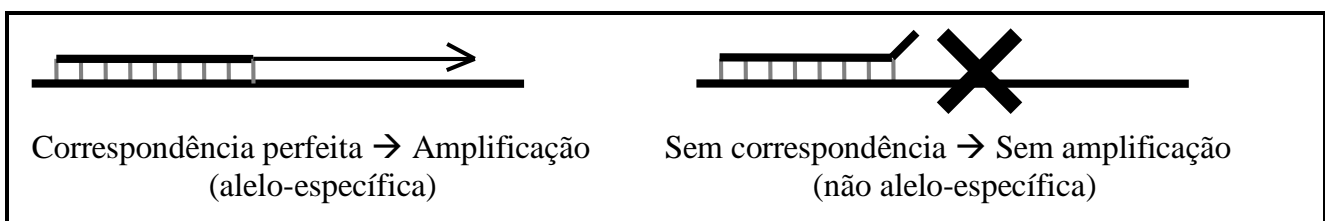


Fig. 1: Princípio de SSP-PCR

2. Material

2.1 Conteúdo do Wipe Test

- ◆ 5 tiras de PCR (8 tubos de PCR de espessura fina) suficientes para 40 reações (13 wipe tests). As misturas de reação pré-aliquotadas e secas consistem num conjunto de iniciadores específicos de alelos, iniciadores de controlo interno (específicos para o gene humano G3PDH) e nucleótidos.
- ◆ 1 x tampão 10x de PCR de 1,1 ml
- ◆ 5 x tiras de 8 tampas
- ◆ Instruções de utilização

2.2 Material complementar

- ◆ Taq Polimerase (5 U/ μ l), (Happy Taq, [REF](#) 70976) ou outra Taq Polimerase, validada com o Wipe test pelo utilizador)

Não use uma Taq Polimerase de arranque a quente!

- ◆ **BAG EXTRA-GENE I** Kit ([REF](#) 7059) (opcional) para a extração de DNA de sangue/linfócitos/leucócitos ou material para outros métodos de extração de DNA
- ◆ pipetas operadas por pistão (0,5-250 μ l)
- ◆ pontas esterilizadas com filtro integrado
- ◆ papel forrado a lã
- ◆ Ciclador de DNA (para uma lista dos cicladores validados, consulte a página 4)

Dispositivos e material para eletroforese em gel

- ◆ DNA agarose
- ◆ Tampão 0,5x TBE (45 mM de Tris, 45 mM de ácido bórico, 0,5 mM de EDTA)
- ◆ Brometo de etídio (EtBr)
- ◆ unidade de eletroforese submarina com escovas
- ◆ abastecimento energético (200 - 300 V, 200 mA)
- ◆ DNA com comprimento padrão ([REF](#) 7097)

Dispositivos de interpretação e documentação

- ◆ Fonte UV (220 - 310 nm)
- ◆ câmara (p. ex., sistema Polaroid) com rolos (Polaroid tipo 667) ou sistema de vídeo com papel térmico (ex. Typ KP65HM-CE)

2.3. Armazenamento e estabilidade

O kit é entregue sem arrefecimento. **Armazene todos os reagentes a $\leq -20^{\circ}\text{C}$ ou $2...8^{\circ}\text{C}$ no escuro (evite a variação frequente da temperatura de armazenamento).** Armazene em equipamentos com monitorização de temperatura.

O prazo de validade é indicado no rótulo de cada reagente e também é válido para reagentes abertos. A estabilidade, conforme indicada no rótulo exterior, refere-se ao reagente com a estabilidade menor contido no kit.

3. Procedimento de teste

3.1 Condições de segurança

A PCR é um método particularmente sensível. Respeite as medidas de segurança especiais de forma a evitar a contaminação e consequentes reações falsas:

- ◆ Use luvas durante o trabalho (sem pó, se possível).
- ◆ Use novas pontas com cada passo de pipetagem (com filtro integrado).
- ◆ Use áreas de trabalho separadas para pré-amplificação (isolamento de DNA e preparação das reações) e pós-amplificação (eletroforese em gel, documentação). De preferência, use duas salas separadas.
- ◆ Use dispositivos e outros materiais apenas nos locais respetivos e não os troque.

3.2 Isolamento de DNA

Para o controlo positivo, é necessário o DNA dos leucócitos. Ex.: o **BAG EXTRA-GENE I** kit é o mais adequado para o isolamento do DNA pois o DNA puro pode ser obtido sem a utilização de químicos tóxicos ou solventes. Adicionalmente, os métodos comerciais baseados em colunas ou contas ou outros métodos descritos na literatura são adequados para providenciar um DNA de pureza suficiente. A presença de heparina inibe potencialmente a PCR [6]. Por conseguinte, recomenda-se EDTA ou citrato de sangue para a tipificação do grupo sanguíneo.

O DNA deve ter os seguintes índices de pureza:

- OD_{260}/OD_{280} = contaminação com RNA: $>1,5$ e $<2,0$
- OD_{260}/OD_{230} = contaminação com sal, hidrato de carbono ou solventes orgânicos: $>1,8$

A avaliação e controlo de qualidade do Wipe Test foram efetuados com DNA, extraído através do EXTRA-GENE I ou Kits Qiagen.

3.3 Amplificação

A mistura de reação pré-aliquotada e seca já contém um conjunto de iniciadores alelo-específicos, iniciadores de controlo interno e nucleótidos. Os parâmetros de reação são otimizados a um volume final de 20 μ l. Para cada teste, são usadas três reações.

A avaliação e controlo de qualidade do Wipe Test foram feitos com Happy Taq (REF 70976).

3.3.1 Procedimento de teste para o Wipe Test

1. Os recipientes de reação de 1,5 ml estão identificados com o nome das áreas examinadas (p. ex., bancada de trabalho, maçaneta da porta, etc.) e enchidos com **200 µl de água destilada esterilizada**.
2. Para cada área de teste, é mergulhado um pedaço de lã no respetivo recipiente de reação e a área de teste é limpa com a lã molhada.
3. Coloque a lã no respetivo recipiente de reação e incube durante 2 horas à temperatura ambiente em 200 µl de água destilada. Após este tempo, a lã é eliminada.
4. **Retire o número necessário de recipientes de PCR e o tampão 10x de PCR do kit.** Rotule um recipiente com "área de teste", um com "controlo positivo" e o terceiro com "controlo de inibição".
5. Prepare a **pré-diluição da Taq** (mínimo de 5 reações) e agite brevemente a mistura com uma depuração centrífuga.

Preparação de pré-diluição da Taq para o número de reações + 2 :

	1 reação	5 reações	8 reações
Tampão 10x de PCR	2 µl	10,0 µl	16 µl
Taq polimerase (5 U/µl)	0,12 µl	0,60 µl	0,96 µl

6. Pipete as seguintes misturas de reação nos recipientes de PCR rotulados:

	área de teste	controlo positivo	controlo de inibição
água destilada esterilizada	14 µl	17 µl	13 µl
amostra da área de teste	4 µl	-	4 µl
DNA genómico (40 ng/µl)	-	1 µl	1 µl
Pré-diluição da Taq	2 µl	2 µl	2 µl

7. Feche bem os tubos com as respetivas tampas. Assegure que não toca na parte interior das tampas nem nas extremidades superiores dos tubos com os dedos para evitar contaminação. O pó das luvas é um forte inibidor da PCR! Agite ligeiramente a placa para baixo para dissolver os grânulos no fundo da tira. Toda a solução da PCR deve fixar-se no fundo. Se necessário, a tira deve ser brevemente girada para baixo.
8. Coloque os tubos de reação no termociclador e aperte a tampa para que os recipientes da reação não se deformem com o calor. Inicie o programa de PCR. Sobrepor as misturas de reação com óleo mineral **não** é necessário se for usada uma cobertura aquecida e ajustada!

Parâmetros de amplificação:

Programa-passo	Tempo	Temp.	N.º de ciclos
Primeira desnaturação	5 min.	96 °C	1 ciclo
Desnaturação	20 seg.	96 °C	5 ciclos
Hibridização+Extensão	60 seg.	68 °C	
Desnaturação	20 seg.	96 °C	10 ciclos
Hibridização	50 seg.	64 °C	
Extensão	45 seg.	72 °C	
Desnaturação	20 seg.	96 °C	15 ciclos
Hibridização	50 seg.	61 °C	
Extensão	45 seg.	72 °C	
Extensão final	5 min.	72 °C	1 ciclo

Tipos de cicladores validados:

PTC 100/200/C1000
(MJ Research/BioRad),
GeneAmp PCR-System
9600 / 9700 (use taxa de aquecimento de 9600),
Veriti (ABI),
Mastercycler epGradient S
(use função "simular gradiente Mastercycler")
(Eppendorf),
Tprofessional (Biometra)

Não use um bloco de aquecimento de alumínio (p. ex., GeneAmp PCR-System 9600 / 9700).

Ao usar termocicladores com uma taxa de aquecimento e arrefecimento muito rápida, recomenda-se o uso de uma taxa de aquecimento e arrefecimento mais lenta (~2,5 °C/seg.).

Como os cicladores de diferentes fabricantes têm um desempenho diferente e até máquinas individuais de um tipo podem ser calibradas de forma diferente, pode ser necessário otimizar os parâmetros de amplificação. Se outros modelos, para além dos cicladores validados referidos acima, forem utilizados, estes têm de ser validados pelo utilizador.

Para otimizar a sua máquina, use o seguinte guia:

Com reações **falso-positivas** (bandas não específicas, determinações adicionais): Aumente a temperatura de hibridização em passos de 1 °C.

Com reações **falso-negativas** (bandas em falta): Diminua a temperatura de hibridização em passos de 1 °C e/ou aumente os períodos de hibridização em passos de 5 segundos e/ou aumente os períodos de desnaturação em passos de 5 segundos.

Recomenda-se usar apenas cicladores calibrados regularmente. Para isto, o BAG CYCLER CHECK kit é bastante apropriado (REF 7104, 71044).

Os testes de controlo de qualidade foram feitos em PTC-200 resp. C1000 (MJ Research / BioRad), 9700 (ABI), Mastercycler epGradient S (Eppendorf) e Tprofessional (Biometra).

3.4 Eletroforese em gel

A separação dos produtos de amplificação é feita por eletroforese através de um gel horizontal de agarose. Como tampão de eletroforese, recomenda-se tampão 0,5x TBE (45 mM de tris, 45 mM de ácido bórico, 0,5 mM de EDTA). A concentração de gel deve ser de 2,0 - 2,5% de agarose. Deixe o gel polimerizar pelo menos 30 minutos antes de carregar as amostras. Depois de a amplificação ter sido concluída, retire as amostras do termociclador e coloque as misturas de reação completas cuidadosamente em cada ranhura do gel. Adicionalmente, aplique 10 µl do DNA de comprimento padrão para a comparação de tamanhos. A separação da eletroforese é feita a 10 - 12 V/cm (com 20 cm de distância entre os elétrodos, aprox. 200 - 240 V), durante 20 - 40 min. Após o funcionamento ter sido concluído, todo o gel é tingido numa solução de brometo de etídio (EtBr) (aprox. 0,5 µg/ml de EtBr em H₂O ou tampão TBE) durante 30 - 40 min. Como alternativa, pode também ser adicionado EtBr (0,5 µg/ml) ao tampão de eletroforese ou ao gel de agarose. Se necessário, o excesso de EtBr pode ser removido imergindo o gel em H₂O ou tampão 0,5x TBE durante 20 - 30 minutos.

3.5 Documentação e interpretação

Para documentação, visualize a amplificação de PCR usando um transiluminador UV (220 - 310 nm) e fotografe-a com uma máquina, rolo e filtros adequados (p. ex., Polaroid, rolo tipo 667 ou sistema de vídeo, papel térmico KP65HM-CE). Escolha o tempo de exposição e a abertura de forma a que as bandas sejam esticadas ao máximo e se destaquem contra o fundo preto.

Se a área de teste não for contaminada, **nenhuma** banda deve ser visível na amostra da área de teste. As contaminações são indicadas pelas seguintes bandas:

Contaminação com amplificado: **78 bp e/ou 104 bp e/ou 282 bp**
Contaminação com DNA genómico: **282 bp** e possivelmente **78 bp, 104 bp, 176 bp, aprox. 580 bp**

O controlo positivo e o controlo de inibição devem mostrar um padrão de banda de acordo com o esperado com DNA genómico. Se não houver amplificações no controlo positivo, não tiver ocorrido nenhuma reação de PCR e o teste não puder ser interpretado. Se o controlo positivo mostrar o padrão correto de banda, mas não houver bandas visíveis no controlo de inibição, os inibidores devem ter estado presentes na área de teste. Neste caso, uma amostra de "área de teste" limpa não comprova que não há contaminação na área de teste.

4. Avisos e precauções

O brometo de etídio é um mutagénio poderoso. Use luvas quando manusear géis ou soluções que contenham EtBr! Note as instruções de utilização e os avisos e precauções do fabricante! O transiluminador irradia uma luz UV de onda muito curta que pode causar queimaduras na pele e na retina. Use uma máscara facial de proteção contra UV!

Tudo o que é utilizado para a extração de DNA usa material biológico, p. ex., sangue ou tecido humano, e deve ser manuseado como sendo potencialmente infeccioso. Quando manusear material biológico, recomenda-se tomar precauções de segurança apropriadas (não pipetar com a boca, usar luvas descartáveis quando manusear material biológico e desempenhar o teste, desinfetar as mãos quando tiver acabado o teste).

O material biológico deve ser desativado antes de ser eliminado (p. ex., por autoclave). Os descartáveis devem ser autoclavados ou incinerados após a utilização.

O derrame de material potencialmente infeccioso deve ser imediatamente removido com papel absorvente e as áreas contaminadas limpas com um desinfetante padrão adequado ou com uma solução de 70% de álcool. O material usado para limpar derrames, incluindo luvas, deve ser inativado antes de ser eliminado (p. ex., por autoclave).








A eliminação de todas as amostras, reagentes não utilizados e desperdício deve ser feita de acordo com as regulamentações do país, federais, estatais e locais.

A ficha de segurança (MSDS) está disponível para download em:
www.bag-healthcare.com.

5. Referências

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 Nègre, 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. Explicação dos símbolos usados nos rótulos

	Temperatura de armazenamento / Limites de temperatura
	Temperatura de armazenamento / Limite inferior de temperatura
	Prazo de validade
	Consulte as instruções de utilização
	Atenção
	Suficiente para "n" ensaios
	Fabricante
CONT	Conteúdo, contém
CONTROL CC	Controlo de contaminação
IFU	Instruções de utilização
LOT	Código do lote
OR	ou
PCRBUF 10x	Tampão de PCR, concentração de 10x
PCRCAP	Tampas de PCR
PCRSTRIP	Tiras de PCR
REACTIONMIX	Misturas de reação
REF	Referência de catálogo
RTU	Pronto a usar

Para instruções de utilização noutros idiomas, consulte:

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

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

ou ligue para: +49 (0)6404-925-125