

DE

Gebrauchsinformation

Wischttest

Elektronische Gebrauchsinformation siehe www.bag-diagnostics.com

Kontaminationskontrolle

Testkit zur Nachweis von Kontaminationen
auf molekulargenetischer Basis

REF 7091**40 Reaktionen**

1. Produktbeschreibung

Zu Vermeidung von Kontaminationen bei der HLA-Typisierung [1] und damit zur Qualitätssicherung im Labor, sollten regelmäßig Arbeitsgeräte, Laborbereiche oder auch einzelne Reagenzien (z.B. Taq Polymerase) auf Verunreinigungen mit genomischer DNA oder Amplifikaten überprüft werden (entsprechend der aktuellen EFI Richtlinie).

Der Wischtest ist sehr gut zum Nachweis 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.

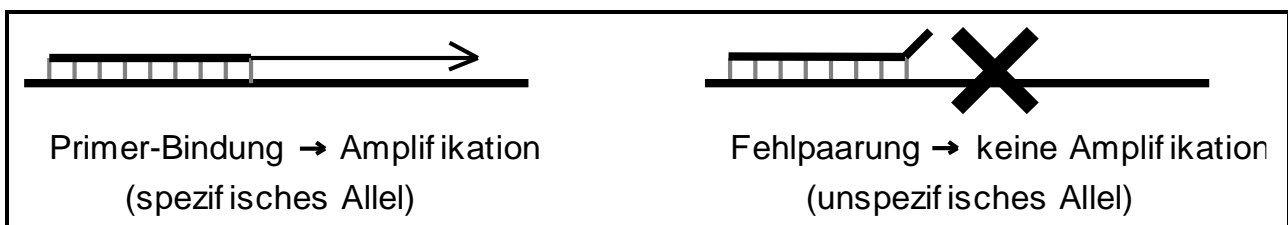


Abb. 1: Prinzip der SSP-PCR

Version: 10/2020 / Stand: 2020-08 Änderungen gegenüber Version 9/2019 sind gelb markiert!

2. Material

2.1 Inhalt des Wischtests

- ◆ 5 PCR Streifen (à 8 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), Happy Taq (REF 70976) oder eine andere vom Anwender mit dem Wischtest validierte Taq-Polymerase
Bitte keine Hot-start Taq Polymerase verwenden!
- ◆ **BAG EXTRA-GENE I** Kit (REF 7059) (optional) 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 (Liste der validierten Cycler siehe Kapitel 3.3.1)

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 (REF 7097)

Geräte zur Auswertung und Dokumentation

- ◆ UV-Leuchtplatte (220 - 310 nm)
- ◆ Photoeinrichtung (z.B. Polaroid-System mit Filmen Polaroid Typ 667 oder Video-System mit Thermopapier Typ KP65HM-CE)

2.3 Lagerung und Haltbarkeit

Der Kit wird ungekühlt versandt. Nach Erhalt das Kit bei $\leq -20^{\circ}\text{C}$ lichtgeschützt lagern. Die PCR-Streifen können auch bei 2...8°C gelagert werden, ein häufiges Wechseln der Lagertemperatur sollte aber vermieden werden. Der 10x PCR-Puffer muss bei $\leq -20^{\circ}\text{C}$ gelagert werden. Die Lagerung sollte in temperaturüberwachten Geräten erfolgen.

Die Haltbarkeitsdauer ist den Etiketten auf den jeweiligen Reagenzien zu entnehmen und gilt auch nach dem ersten Öffnen. Die auf dem Außenetikett angegebene Haltbarkeit entspricht dem Kitbestandteil mit der kürzesten Haltbarkeit.

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 von DNA ist z.B. der **BAG EXTRA-GENE I** Kit, welcher ohne Einsatz von giftigen Chemikalien oder Lösungsmitteln in kurzer Zeit reine DNA aus Vollblut liefert. Weiterhin sind kommerziell erhältliche Säulchen- bzw. Beads-Methoden oder andere in der Literatur beschriebene Methoden geeignet, DNA mit ausreichender Reinheit zu erhalten. Heparin kann unter Umständen die PCR-Reaktion hemmen [5]. Es wird daher der Einsatz von EDTA- oder Citrat-Blut für die Typisierung empfohlen.

Die DNA sollte folgende Reinheitsindices aufweisen:

- $OD_{260}/OD_{280} = >1,5$ und $<2,0$ (Indikator für Kontaminationen mit RNA/Proteinen)
- $OD_{260}/OD_{230} = >1,8$ (Indikator für Kontaminationen mit Salzen, Kohlenhydraten oder organischen Lösungsmitteln)

Für die Evaluierung und die Qualitätskontrollen des Wischtests wurden DNA-Proben eingesetzt, die mit EXTRA GENE I oder Qiagen-Kits isoliert wurden.

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.

Die Evaluierung und die Qualitätskontrollen des Wischtests wurden mit der Happy Taq (REF 70976) durchgeführt.

3.3.1 Testablauf "Wischtest"

- 1,5 ml Reaktionsgefäße mit den zu untersuchenden Bereichen (z.B. Arbeitsplatte, Türgriff, etc.) 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.
- Den 10x PCR-Puffer kurz vor Gebrauch auftauen. Die gewünschte Anzahl PCR Gefäße (je drei für einen Testbereich) aus dem Kit entnehmen.** 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 Reaktionsmische 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

- Die Gefäße mit den dafür vorgesehenen Deckeln **dicht** verschließen. 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 Schütteln der Streifen geschehen. Gegebenenfalls den Streifen kurz anzentrifugieren.
- Die Reaktionsgefäße in den Cycler 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	Temp.	Zeit	Anzahl Zyklen
Erste Denaturierung	96°C	5 Min	1 Zyklus
Denaturierung	96°C	20 Sek	5 Zyklen
Annealing+Extension	68°C	60 Sek	
Denaturierung	96°C	20 Sek	10 Zyklen
Annealing	64°C	50 Sek	
Extension	72°C	45 Sek	
Denaturierung	96°C	20 Sek	15 Zyklen
Annealing	61°C	50 Sek	
Extension	72°C	45 Sek	
Extension	72°C	5 Min	1 Zyklus

Validierte Cycler-Typen:

PTC 100 / 200 / C1000 (MJ Research/BioRad),
 GeneAmp PCR-System 9600/ /9700 (bitte Heizrate vom 9600 verwenden), Veriti (ABI),
 Mastercycler epGradient S (bitte Funktion „simulate Mastercycler gradient“ verwenden) (Eppendorf),
 Tprofessional (Biometra)

Keine Aluminiumheizblöcke verwenden (z.B. GeneAmp PCR-System 9600/9700)!

Bei Cyclern mit sehr schnellen Heiz- und Kühlraten wird empfohlen, eine etwas langsamere Heiz- und Kühlrate (~2,5°C/sec) zu wählen.

Da Cyler verschiedener Hersteller sich in ihrem Verhalten unterscheiden und sogar verschiedene Cycler eines Typs unterschiedlich kalibriert sein können, muss bei Verwendung anderer Cycler ggf. das Amplifikationsprotokoll optimiert bzw. diese Geräte vom Anwender validiert 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 CYCLER CHECK (REF 7104, 71044).

Die Qualitätskontrollen wurde mit Cyclern des Typs PTC 200 bzw. C1000 (MJ Research/BioRad), 9700 (ABI), Mastercycler epGradient S (Eppendorf) und Tprofessional (Biometra) 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 Minuten polymerisieren. Nach Beendigung der Amplifikation werden die Proben dem Cyclus 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 Minuten. Nach abgeschlossenem Lauf wird das komplette Gel für 30 - 45 Minuten 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 Minuten 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 oder Video-System mit Thermopapier Typ KP65HM-CE) fotografiert. Belichtungszeit und Blende sind so zu wählen, dass die Banden scharf gezeichnet sind und sich gegen den dunklen Hintergrund abheben.

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, das für die Entfernung von Verschüttetem benutzt wurde, muss vor der Entsorgung inaktiviert werden (z.B. durch Autoklavieren).








Die Entsorgung aller Proben, ungebrauchter Reagenzien und Abfälle sollte entsprechend der Gesetzgebung des jeweiligen Landes und der lokalen Behörden erfolgen.

Eine Erklärung zum Sicherheitsdatenblatt (SDS) kann unter www.bag-diagnostics.com heruntergeladen werden.

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. 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. Erklärung der Symbole auf den Etiketten

	Lagertemperatur / Temperaturbegrenzung
	Lagertemperatur / Unterer Temperaturgrenzwert
	Verwendbar bis
	Gebrauchsinformation beachten
	Achtung
	Ausreichend für n Tests
	Hersteller
CONT	Inhalt, enthält
CONTROL CC	Kontaminationskontrolle
IFU	Gebrauchsinformation
LOT	Lot-Nr.
OR	Oder
PCRBUF 10x	PCR-Puffer, 10x konzentriert
PCRCAP	PCR-Deckel
PCRSTRIP	PCR-Streifen
REACTIONMIX	Reaktionsmische
REF	Bestell-Nr.
RTU	Gebrauchsfertig