

Istruzioni d'uso

HISTO TYPE / DNA-Wipetest

Controllo di contaminazione

Kit per la determinazione di contaminazioni
in biologia molecolare

REF 7091

40 Reazioni

1. Descrizione del prodotto

L'uso della *Polymerase Chain Reaction* (PCR[®]) nella tipizzazione HLA è diventata di routine negli ultimi anni. Poiché la PCR è un metodo molto sensibile è importante adottare le precauzioni necessarie ad evitare le contaminazioni che potrebbero portare a reazioni false-positive. Per impedire le contaminazioni e assicurare la qualità in un laboratorio, i materiali, le aree di laboratorio o i singoli reagenti (per es. Taq Polymerase) dovrebbero essere monitorati regolarmente per il DNA o gli amplificati (ogni due mesi, secondo gli standard EFI: L1.2200).

L'**HISTO TYPE / DNA-Wipetest** è ideale per la determinazione delle contaminazioni con DNA genomico o con geni HLA di I e II Classe amplificati. La procedura del test si basa sul metodo *Sequence Specific Primers* (SSP) -PCR (vedi Fig. 1) [2,3]. Questo metodo si basa su fatto che la riuscita della PCR dipende dall'esatto match di entrambi i primers in particolare all'estremità 3' [4]. Perciò l'amplificazione avviene solo se i primers sono complementari alla sequenza target, e di seguito è evidenziata dall'elettroforesi del gel di agarosio.

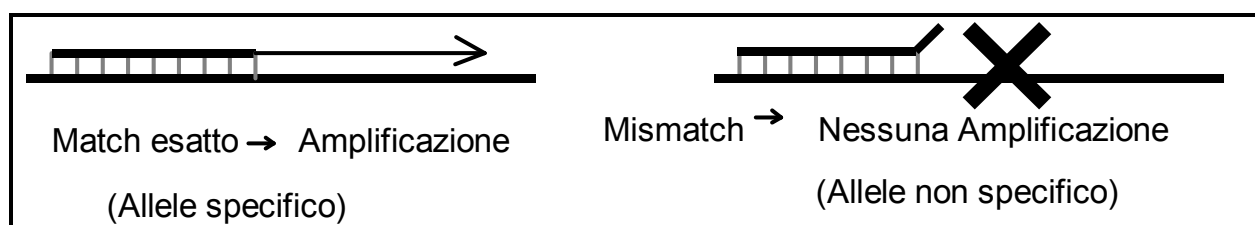


Fig. 1: Principio dell' SSP-PCR

2. Materiale

2.1 Contenuto degli HISTO TYPE / DNA-Wipetest

- ◆ 5 strisce HISTO TYPE (da 8 provette PCR sottili) sufficienti per 40 reazioni (13 wipetests). Le mix preseminate e liofilizzate includono i primer allele-specifici, i primer del controllo interno (specifici per il gene G3PDH umano) e i nucleotidi.
- ◆ 1 x 1,1 ml PCR-buffer 10 x
- ◆ 5 strisce da 8 provette ciascuna.
- ◆ Istruzioni d'uso.

2.2 Materiale supplementare

- ◆ Taq Polimerasi (5 U/μl), (es. HISTO TAQ, [REF](#) 70975). **Non utilizzare Taq polimerasi Hot-start!**
- ◆ **BAG EXTRA-GENE I** Kit ([REF](#) 7059, facoltativo) per l'estrazione di DNA da sangue / linfociti / leucociti o materiale per altri metodi di estrazione di DNA.
- ◆ Pipette (0,5-250 μl).
- ◆ Puntali sterili con filtro.
- ◆ Carta assorbente
- ◆ Termociclatore (per es. PTC 200 con coperchio termostato, MJ Research/ BioRad): una lista di termociclatori validati è disponibile a pag. 4.

Dispositivi e materiale per l'elettroforesi del gel

- ◆ Agarosio
- ◆ Buffer TBE 0,5x (45 mM di Tris, 45 mM di acido borico, 0,5 mM di EDTA).
- ◆ Etidio bromuro (EtBr).
- ◆ Cella elettroforetica con pettini.
- ◆ Alimentatore (200-300 V, 200 mA).
- ◆ DNA-length standard ([REF](#): 7097)

Dispositivi per l'interpretazione e la documentazione

- ◆ Transilluminatore UV (220-310 nm)
- ◆ Macchina fotografica (per es. sistema Polaroid) con pellicole (Polaroid tipo 667) o sistema di acquisizione video con carta termica (es. KP65HM-CE).

2.3. Conservazione e stabilità

Il kit è fornito senza ghiaccio secco. Conservare tutti i reagenti a $\leq -20^{\circ}\text{C}$ or $2...8^{\circ}\text{C}$ al buio, in un dispositivo a temperatura controllata (**si prega di evitare frequenti cambi della temperatura di conservazione!**). La data di scadenza viene indicata sull'etichetta di ogni reagente ed è valida anche per i reagenti aperti. La stabilità indicata sull'etichetta esterna si riferisce al reagente contenuto nel kit con la stabilità più breve.

3. Dati per l'esecuzione

3.1 Condizioni di sicurezza

La PCR è un metodo particolarmente sensibile. Si dovrebbero osservare condizioni speciali di sicurezza per evitare contaminazioni e di conseguenza false reazioni:

- ◆ Indossare i guanti durante il lavoro (se possibile senza polvere).
- ◆ Usare nuovi puntali per ogni semina (con filtro integrato).
- ◆ Lavorare in aree separate per la pre-amplificazione (estrazione del DNA e preparazione delle reazioni) e post-amplificazione (elettroforesi del gel e documentazione). Usare preferibilmente due stanze separate.
- ◆ Usare dispositivi ed altro materiale solo nelle rispettive aree e non scambiarli.

3.2 Estrazione del DNA

Per il controllo positivo è richiesto DNA da leucociti. Per es. il **BAG EXTRA-GENE** kit è ideale per l'estrazione poichè il DNA puro lo si può ottenere da sangue intero in breve tempo senza usare reagenti chimici tossici o solventi. Inoltre, altri metodi descritti nella letteratura o metodiche basate su colonne o biglie di purificazione sono idonei per fornire una sufficiente purezza del DNA. La presenza di eparina potenzialmente inibisce la PCR^① [6]. Perciò per la tipizzazione si consiglia sangue in EDTA o in citrato. Il DNA dovrebbe mostrare i seguenti indici di purezza:

- OD_{260}/OD_{280} = contaminazione con RNA: > 1.5 e < 2.0 .
- OD_{260}/OD_{230} = contaminazione da sali, carboidrati o solventi organici: > 1.8 .

La valutazione e il controllo di qualità del Wipe test è stata condotta con DNA estratto con kit EXTRA GENE I o Qiagen.

3.3 Amplificazione

La mix prealiquotata e liofilizzata contiene un set di primer allele specifico, primers del controllo interno e i nucleotidi. I parametri di amplificazione sono ottimizzati ad un volume finale di 20 µl. Per ogni test vengono utilizzate tre reazioni.

La valutazione e il controllo di qualità del Wipe test è stata condotta con HISTO TAQ (REF 70975) o Taq polimerasi della Qiagen.

3.3.1 Procedura per il wipetest

- 1.: Le provette di reazione da 1,5 ml vanno contrassegnate con il nome dell'area esaminata (per es. banco di lavoro, maniglia...) e riempite con **200 µl di acqua distillata sterile**.
- 2.: Per ogni area del test viene immerso un pezzetto di carta assorbente nella rispettiva provetta di reazione e strofinare l'area con la carta bagnata.

- 3.: Mettere la carta nella rispettiva provetta di reazione e incubare per 2 ore a temperatura ambiente nei 200 µl di acqua distillata. Dopo questo periodo la carta viene rimossa.
- 4.: Prelevare il numero richiesto di provette HISTO TYPE da -20° C e scongelare il PCR-buffer 10x a temperatura ambiente. Contrassegnare una provetta con “area del test” e una seconda con “controllo positivo” e una terza con “controllo inibitore”.
- 5.: Preparare la Taq prediluita (minimo 5 reazioni) e agitare brevemente la miscela con il vortex. Preparazione della Taq prediluita per un numero di reazioni +2:

	per 1 reazione	5 reazioni	8 reazioni
PCR-buffer10x	2 µl	10.0 µl	16 µl
Taq Polymerase (5 U/µl)	0.12 µl	0.60 µl	0.96 µl

- 6.:Pipettare le seguenti mix nelle provette da PCR contrassegnate:

	area del test	controllo positivo	controllo inibitore
acqua distillata sterile	14 µl	17 µl	13 µl
campione dell'area del test	4 µl	-	4 µl
DNA genomico (40ng/µl)	-	1 µl	1 µl
Prediluizione della Taq	2 µl	2 µl	2 µl

- 7.: Chiudere bene le provette con i rispettivi tappi. Assicurarsi di non toccare con le dita la parte interna dei tappi ed il bordo superiore delle provette, per evitare la contaminazione. Il talco dei guanti è un'inibitore potente della PCR. Scuotere leggermente la piastra verso il basso per dissolvere il pellet blu sul fondo della piastra. Tutte le soluzioni PCR devono depositarsi sul fondo.
- 8.: Mettere le provette di reazione nel termociclatore e chiudere il coperchio in modo che le provette di reazione non si deformino riscaldandosi. Iniziare il programma PCR[®]. Se viene usato un coperchio termostato **non** è necessario aggiungere olio minerale all'interno delle provette!

Parametri di amplificazione:

Programma	Tempo	Temp.	Numero di cicli
Prima denaturazione	5 Min	96°C	1 ciclo
Denaturazione	20 Sec	96°C	5 cicli
Annealing+Estensione	60 Sec	68°C	
Denaturazione	20 Sec	96°C	10 cicli
Annealing	50 Sec	64°C	
Estensione	45 Sec	72°C	
Denaturazione	20 Sec	96°C	15 cicli
Annealing	50 Sec	61°C	
Estensione	45 Sec	72°C	
Estensione finale	5 Min	72°C	1 ciclo

Termociclatori validati:

PTC 100 / 200 (MJ Research/ BioRad), GeneAmp PCR-System 9600 / 9700 (utilizzare in modalità 9600) (ABI), Mastercycler ep Gradient S (utilizzare la funzione “simulate Mastercycler gradient) (Eppendorf) e TProfessional (Biometra).

L'utilizzo di termociclatori con riscaldamenti o raffreddamenti molto veloci può inficiare i risultati, si consiglia quindi di utilizzare ramp rate ridotte (~2.5°C/s).

Poichè i termociclatori di produttori diversi hanno performance diverse ed anche i singoli apparecchi dello stesso tipo possono funzionare in modo diverso, potrebbe essere necessario ottimizzare i parametri di amplificazione.

Per ottimizzare il Vs. apparecchio seguire le istruzioni seguenti:

Con reazioni **false positive** (bande non specifiche, *additional types*): aumentare la temperatura di annealing di 1°C .

Con reazioni **false negative** (bande assenti): diminuire la temperatura di annealing di 1°C e/o aumentare i tempi di annealing di 5 secondi e/o aumentare i tempi di denaturazione di 5 secondi.

Si consiglia di usare solo termociclatori regolarmente calibrati. Per questo il BAG-Cycler Check kit è ideale (REF: 7104).

I test per il controllo di qualità sono stati eseguiti su un PTC-100 e C1000 (MJ Research/BioRad), 9700 (ABI), Mastercycler epGradient S (Eppendorf) e Tprofessional (Biometra).

3.4 Gel elettroforesi

La separazione dei prodotti ottenuti con l'amplificazione si effettua tramite gel di agarosio in elettroforesi orizzontale. Si consiglia come tampone per l'elettroforesi TBE 0,5 x (45 mM di tris, 45 mM di acido borico, 0.5 mM di EDTA). La concentrazione del gel dovrebbe essere 2.0 - 2.5% di agarosio. Lasciare polimerizzare il gel per almeno 30 minuti prima di caricare il campione. Al termine dell'amplificazione, prelevare i campioni dal termociclatore e caricare con attenzione ciascuna miscela di reazione (10 µl) in ogni pozzetto del gel. Inoltre caricare 10 µl di DNA length standard per la valutazione del peso molecolare. La corsa elettroforetica è eseguita a 10-12 V/cm (con elettrodi distanti 20 cm, 200-240 V circa) per 20-40 min. Al termine della corsa il gel viene immerso in una soluzione di etidiobromuro (EtBr) (circa 0.5 µg/ml di EtBr in H₂O o buffer TBE). In alternativa l'EtBr (0.5 µg/ml) può essere aggiunto al buffer per elettroforesi o al gel di agarosio. Se necessario rimuovere l'EtBr in eccesso immergendo il gel in H₂O o buffer TBE 0,5 x per 20-30 minuti.

3.5 Documentazione ed interpretazione

Per la documentazione visualizzare il prodotto di amplificazione usando un transilluminatore UV (220-310 nm) e fotografare con una macchina fotografica, un filtro e una pellicola adatti (per es. polaroid con pellicole 667, sistema di acquisizione video, stampante termica KP65HM-CE). Scegliere i tempi di esposizione e di apertura in modo che le bande siano ben visibili e risaltino sullo sfondo scuro (per esempio apertura 11, tempo di esposizione 1 secondo).

Se l'area non è contaminata non dovrebbe essere visibile alcuna banda nell'area del test campione.

Le contaminazioni sono indicate dalle seguenti bande:

Contaminazione da amplificato: **78 bp e/o 104 bp e/o 282 bp**

Contaminazione da DNA genomico: **282 bp** e possibilmente **78 bp, 104 bp, 176 bp, ca. 580 bp.**

Il controllo positivo ed il controllo inibitore dovrebbero mostrare un'insieme di bande come quello che ci si attende in presenza del DNA genomico. Se nel controllo positivo non ci sono amplificati, non ha avuto luogo alcuna reazione di PCR e l'intero test non può essere interpretato. Se il controllo positivo mostra il corretto insieme di bande, ma non ci sono bande visibili nel controllo inibitore, erano presenti inibitori nell'area del test. In questo caso un "area del test" pulita non prova che non ci siano realmente contaminazioni presenti.

4. Avvertenze e precauzioni

L'etidibromuro è un potente mutageno. Indossare i guanti quando si maneggiano gels o soluzioni contenenti EtBr! Fare riferimento alle istruzioni, alle avvertenze e alle precauzioni d'uso del produttore! Il transilluminatore UV emette onde molto corte che possono causare bruciature alla pelle e alla retina. Usare una maschera per la protezione facciale UV!

Tutti i materiali biologici impiegati per l'estrazione del DNA, per es. sangue o tessuto umano, devono essere maneggiati come potenzialmente infetti. Si consigliano precauzioni di sicurezza appropriate quando si maneggiano materiali biologici (non pipettare con la bocca; indossare guanti monouso quando si maneggia materiale biologico e si esegue il test; al termine del test disinfettare le mani).

Il materiale biologico deve essere inattivato prima dello smaltimento (per es. in autoclave). Il materiale smaltito deve essere autoclavato dopo l'uso.

La fuoriuscita di materiale potenzialmente infetto deve essere rimosso immediatamente con carta assorbente e le aree contaminate pulite con un disinfettante standard o con etanolo al 70%. Il materiale usato per pulire le fuoriuscite, incluso i guanti, devono essere inattivato prima dello smaltimento (per es. in autoclave).

5. Riferimenti

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. Spiegazione dei simboli usati sulle etichette

	Temperatura di conservazione
	Utilizzare fino a
	Consultare le istruzioni d'uso
	Sufficiente per n test
CONT	Contenuto, contiene
CONTROL CC	Controllo di contaminazione
IFU	Istruzioni d'uso
LOT	Numero di lotto
OR	Oppure
PCRBUF 10x	Buffer PCR, 10x concentrato
PCRCAP	Tappini PCR
PCRSTRIP	Strip PCR
REACTIONMIX	Mix di reazione
REF	Numero di catalogo
RTU	Pronto all'uso

Per le istruzioni d'uso in altre lingue si veda:

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

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

o telefonare al: +49 (0)6404-925-125



BAG Health Care GmbH

Amtsgerichtsstraße 1-5
35423 Lich/Germany

Tel.: +49 (0) 6404 / 925 - 0

Fax: +49 (0) 6404 / 925 - 250

www.bag-healthcare.com

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