



INgene EHR

Prod Ref: 15.EHR.K.5

Ensayo molecular para la detección de
Ehrlichia spp. en muestras biológicas

*Molecular assay for detection of
Ehrlichia spp. in biological samples*

Última Revisión / Last review 08-06-12

I. FUNDAMENTO TÉCNICO

En el **INGene EHR** se combinan diferentes técnicas de biología molecular e inmunología a fin de garantizar la fiabilidad del test y dentro de la complejidad de este tipo de ensayos, su facilidad de realización:

1. Técnicas de extracción, y amplificación específica, que garantizan los máximos grados de sensibilidad y especificidad.
2. Técnicas de clonaje y diseño de plásmidos que permiten la introducción de controles exhaustivos en todas y cada una de las fases del test.

En el **INGene EHR** se incluyen de modo sistemático controles externos que permiten valorar si cada uno de los pasos del ensayo se ha realizado de modo correcto (existen controles de amplificación y de revelado).

3. Técnicas de hibridación en placa y técnicas de marcaje de sondas que permiten diseñar sistemas de lectura de los resultados de la amplificación incrementando de modo considerable la sensibilidad del test y facilitando y lo que es más importante "objetivizando" el proceso de interpretación de resultados.

II. COMPOSICIÓN DEL KIT

			ELISA 48 reacciones
		Volumen	Nº Viales
AMPLIFICACIÓN	Mezcla A (primers específicos para EHR)	750 µl	2
	Mezcla B (mezcla de enzimas)	750 µl	2
	Control positivo A1 – Control de amplificación	30 µl	1
REVELADO	Placas de Streptavidina	48 poc.	1
	Tampón de revelado	40 ml	1
	Solución de desnaturalización	15 ml	1
	Sonda I – Sonda específica para EHR	90 µl	1
	Conjugado PO	90 µl	1
	Solución de lavado	250 ml	1
	Substrato	15 ml	1
	Solución de frenado	15 ml	1
	Control positivo R1 (revelado) – Control de ELISA	80 µl	1

A fin de evitar posibles equivocaciones, los reactivos se han marcado con diferentes colores, dependiendo del proceso en el que participen; así, todos los reactivos a emplear durante la amplificación aparecen marcados en color **AZUL** y los empleados en el revelado por ELISA en color **AMARILLO**.

III. NORMAS PARA LA CORRECTA CONSERVACIÓN DE LOS COMPONENTES DEL KIT

Los reactivos suministrados deben ser conservados a +4°C.

IV. MATERIALES NECESARIOS NO SUMINISTRADOS

- Hielo picado **MUY IMPORTANTE**, para el mantenimiento de los reactivos de amplificación durante su manipulación.
- Tubos Eppendorf de 1.5 ml y de 0,2 ó 0,5ml para termociclador.
- Puntas de pipeta con filtro.
- Pipetas de 1 hasta 1000 µl
- Tubos de ensayo para la preparación de las mezclas de amplificación, de soluciones de sondas y conjugados para revelado, etc...
- Termociclador.
- Lector de ELISA.
- Microfuga.

V. NORMAS BÁSICAS PARA EVITAR CONTAMINACIONES

En general deben mantenerse las siguientes precauciones:

- Mantener cuatro áreas independientes para la preparación de las muestras, la preparación de las mezclas de amplificación, la amplificación y el análisis de los productos obtenidos (las dos últimas podrían solaparse).
- En cada área específica utilizar solo material, batas y equipos independientes del resto de las áreas.
- Cambiarse de guantes siempre que se sospeche pueda haberse producido alguna contaminación.
- Nunca introducir productos amplificados en el área de preparación de muestras o preparación de mezclas de amplificación.
- Abrir y cerrar los tubos con especial cuidado. Evitar la creación de aerosoles.
- Mantener tanto los reactivos como las muestras cerradas el mayor tiempo posible.
- Mantener en el laboratorio estrictas normas de limpieza.

VI. RECOGIDA Y TRANSPORTE DE LAS MUESTRAS

El ensayo puede realizarse a partir de cualquier muestra biológica que el clínico pueda considerar de interés. Nuestra técnica ha sido estandarizada y contrastada con un elevado número de muestras de sangre y suero y garantizamos su perfecto funcionamiento cuando se trate de este tipo de muestras; ahora bien, en menor número también han sido probadas en punciones de médula ósea, biopsias de lesiones cutáneas y líquido sinovial. Cualquier otra muestra biológica no relacionada previsiblemente no debería resultar limitante para el desarrollo de la técnica.

A continuación se exponen algunas recomendaciones y/o limitaciones relativas al modo de obtención y envío de las muestras al laboratorio:

- La sangre se recogerá en citrato o EDTA y se transportará, a poder ser, en frío al laboratorio dentro de las primeras 24 horas; si se espera demora se enviará congelada.
- La utilización de HEPARINA en cualquiera de las muestras será limitante para el desarrollo correcto del ensayo, por tratarse de un potente inhibidor de la acción de ciertas enzimas involucradas en el ensayo.

VII. EXTRACCIÓN DE MATERIAL GENÉTICO

EXTRACCIÓN DE ADN

Se recomienda la utilización de un método con el cuál se obtenga una buena calidad de ADN (INGENASA puede suministrar un protocolo y buffer de extracción bajo pedido)

Determinación de la cantidad y calidad del ADN

Una vez aislado el ADN se recomienda chequear la calidad y cantidad del ADN aislado, realizando una medida de absorbancia.

PROTOCOLO RECOMENDADO

MATERIALES NECESARIOS (no suministrados)

- Tampón de extracción.
- Agua libre de DNAsas y RNAsas.
- Cloroformo.
- Isopropanol.
- Etanol 70% (-20°C).
- PBS Estéril (solo en el caso de que se trate de muestras de tejidos).
- Tubos Eppendorf de 1,5 ml.
- Microfuga.

PROCEDIMIENTO

Procedimiento previo a aplicar a las muestras de tejido:

Cortar un trozo de tejido de aproximadamente 2 mg y añadir PBS estéril hasta conseguir una concentración aproximada de 0,4 mg/ml. Homogeneizar la mezcla en condiciones de esterilidad, valiéndose de una jeringuilla o cualquier otro método que asegure una perfecta homogeneización.

Las muestras así tratadas, podrán seguir el mismo procedimiento de extracción que las muestras de suero:

1. Preparar tubos Eppendorf de 1,5 ml, para cada una de las muestras a analizar y uno adicional para el control negativo de extracción.
2. Añadir en cada uno de los tubos 100 µl de muestra (suero, o tejido procesado según procedimiento anterior) y 750 µl de tampón de extracción. Tratar del mismo modo a los controles de extracción.
3. Añadir 0.25 ml de cloroformo por cada 0.75ml de tampón de extracción. Agitar los tubos con la mano durante 15 segundos.
4. Homogeneizar las mezclas y mantenerlas a temperatura ambiente durante 5 minutos.
5. Centrifugar los tubos a 12000 g durante 15 minutos a +4°C. Tras la centrifugación en los tubos podrán diferenciarse dos fases, una acuosa en la parte superior y otra en la parte inferior del tubo, de color anaranjado. El ADN permanece en la fase superior acuosa.
6. Preparar tantos tubos Eppendorf de 1,5 ml como muestras se están procesando, marcar los tubos, y añadir a cada tubo 0,5 ml de isopropanol.

Transferir la fase acuosa, aproximadamente 350µl, a los tubos previamente preparados con isopropanol. Homogeneizar cada mezcla e incubar durante 10 minutos a -20°C.

7. Centrifugar nuevamente durante 10 minutos a 12000 g y decantar el sobrenadante. El ADN permanece en el pellet.
8. Añadir al tubo 1 ml de etanol 70% (frío, almacenado a -20°C) y mezclar cuidadosamente.
9. Centrifugar a 7500 g durante 15 minutos a +4°C.

10. Retirar el sobrenadante escurriendo bien el líquido sobrante en un papel de filtro. Dejar los tubos abiertos durante 10 minutos a fin de que se sequen.

PRECAUCIÓN: No secar nunca por completo ya que si deja que el pellet se seque por completo, el ADN se volverá insoluble.

11. Disolver el ADN en 50 µl de agua libre de ADNas, homogeneizar bien la mezcla y almacenar a 4°C hasta su procesamiento.

PRECAUCIÓN: Si se pretende dejar la amplificación para el día siguiente, congelar el ADN a -20°C.

VIII. AMPLIFICACIÓN DEL MATERIAL GENÉTICO

MATERIALES NECESARIOS

- Hielo picado.
- ADN extraído de las muestras.
- Mezcla A1 - **MANTENER EN HIELO PICADO SIEMPRE QUE ESTÉ FUERA DEL REFRIGERADOR**
- Mezcla B - **MANTENER EN HIELO PICADO SIEMPRE QUE ESTÉ FUERA DEL REFRIGERADOR**
- Control positivo de amplificación - Control A1.

PROCEDIMIENTO

- Preparar y marcar convenientemente, tantos tubos para la amplificación como muestras vayan a procesarse, añadir un tubo adicional para el control positivo de amplificación, y otro para el control negativo.
- Sacar las mezclas A1 y B. Agitarlos ligeramente para su correcta homogenización.
- Preparar la mezcla de amplificación en volumen necesario para el número de muestras que vayan a procesarse. El volumen a mezclar de cada reactivo por cada una de las muestras será:

Mezcla A1	25 µl
Mezcla B	25 µl
Volumen de mezcla / muestra =	50 µl

El tubo donde vaya a realizarse la mezcla, es conveniente que se mantenga en todo momento en hielo picado. Es conveniente así mismo, preparar la

mezcla en exceso (calcular un 10% adicional de todos los reactivos) a fin de que compensar las posibles pérdidas de volumen durante los pipeteos. Una vez preparada la mezcla homogeneizar correctamente. Disponer los tubos previamente etiquetados en hielo picado y añadir a cada uno 50 µl de la mezcla así preparada.

- Añadir a cada uno de los tubos 3 µl de la muestra de ADN extraído previamente, 3 µl de control positivo A1 (control de amplificación) al tubo correspondiente y 3 µl de agua al tubo marcado como control negativo. Mezclar suavemente el contenido de cada tubo y asegurarse de que todo el líquido se encuentra depositado en el fondo del tubo. Si no fuera así, centrifugar ligeramente hasta conseguirlo.
- Programar el termociclador con arreglo a las siguientes condiciones:

- Predesnaturalización:** 3 min a 94°C
- Amplificación PCR:** 1 min a 94°C
1 min a 72°C } x40ciclos
- Extensión Final:** 1 ciclo de 10 min a 72°C

Mantener a 4°C hasta retirar del termociclador.

IX. DETECCIÓN EN ELISA

MATERIALES

- Placas de Streptavidina.
- Control Positivo de Revelado (R1).
- Tampón de revelado.
- Solución de desnaturalización - **PRECAUCIÓN** este reactivo es una base fuerte y debe ser manejado con cuidado.
- Sonda I - Sonda específica para EHR
- Conjugado peroxidasa (PO) - Concentrado 100x. Solamente se realizará la dilución del conjugado inmediatamente antes de ser utilizado y se preparará el volumen estrictamente necesario, ya que una vez diluido permanece activo durante poco tiempo.
- Solución de lavado.
- Substrato.
- Solución de frenado.

PROTOCOLO DE REALIZACIÓN DEL ENSAYO

Los oligonucleótidos empleados en el ensayo **Ingene EHR** han sido previamente marcados con biotina, de modo que los productos de la amplificación, en caso de haberse producido amplificación, se unirán a la streptavidina que tapiza los pocillos de la placa. Tras la desnaturalización de los fragmentos unidos, añadiremos una sonda especialmente diseñada de modo complementario a una región interna del fragmento amplificado que igualmente ha sido previamente marcada.

Favoreciendo las condiciones de hibridación, ésta se producirá en los pocillos donde se procesen muestras positivas y podremos poner de manifiesto esta hibridación añadiendo un conjugado PO, capaz de unir específicamente la sonda marcada, que podremos fácilmente revelar cuando añadamos el substrato adecuado a la PO, como en cualquier ELISA.

Este proceso se llevará a cabo con cada una de las muestras. Cuando la sonda marcada que se añada sea la específicamente diseñada para revelar la amplificación de un fragmento específico de EHR, podremos revelar la presencia o no de EHR en la muestra que hemos procesado.

PROCEDIMIENTO

1.- Preparación de la placa.

Sacar el número de pocillos que sean necesarios de la nevera y dejar atemperar durante al menos 15 minutos, antes de comenzar el ensayo.

Serán necesarios:

- 2 pocillos para los controles de ELISA (uno para el positivo y otro para el negativo).
- 1 pocillo para cada muestra analizada. Incluyendo como tales, además de las propias muestras, todos los controles de extracción y amplificación que se hayan introducido en el ensayo.

Identificar convenientemente cada uno de los pocillos.

2.- Adición de las muestras.

Una vez atemperados, dispensar 150 µl de tampón de revelado a cada uno de los pocillos. Añadir a cada uno de los pocillos 10 µl de la muestra a analizar (el producto de la PCR). Homogenizar en cada pocillo su contenido con precaución, evitando la contaminación entre pocillos e incubar la placa durante 30 minutos a temperatura ambiente.

3.- Desnaturalización de las cadenas de ADN.

Preparar solución de desnaturalización 1x a partir de la suministrada (4x) de la siguiente forma:

$$Vf = n \times 170 \mu l$$

Solución Desnaturalización 1x = Vf/4 de solución desnaturalización + 3Vf/4 de H₂O.

Sin retirar el contenido, añadir en cada pocillo 150 µl de solución de desnaturalización. Homogenizar la mezcla cuidadosamente y mantener durante 10 minutos a temperatura ambiente (si es posible, hacer la incubación en agitación).

4.- Lavado.

Lavar 5 veces los pocillos con solución de lavado.

RECOMENDACIONES PARA LA REALIZACIÓN DE LOS LAVADOS: Los lavados pueden realizarse mediante un lavador automático de placas o mediante una micropipeta que permita dispensar la cantidad de 300 µl por pocillo. Tras las incubaciones, realizar los lavados según las siguientes instrucciones:

Eliminar el contenido de la placa volcándola bruscamente para evitar el intercambio de fluidos entre los pocillos. Como precaución el vaciado de los pocillos debe realizarse con cuidado, ya que la solución desnaturalizante es altamente irritante.

Distribuir unos 300 µl de solución de lavado por pocillo.

Agitar suavemente la placa evitando el intercambio de material entre pocillos.

Volcar la placa bruscamente para vaciar su contenido.

Repetir el proceso cuantas veces sea indicado en el procedimiento.

Antes de eliminar el contenido del último lavado, asegurarse de tener preparado el reactivo a utilizar inmediatamente. No debe mantenerse la placa en seco.

Tras el último lavado, sacudir la placa boca abajo sobre un papel de filtro absorbente.

5.- Adición de la sonda específica.

Se suministra 100x concentrada por lo que antes de su utilización, deberá ser diluida en tampón de revelado. El volumen de sonda diluida a preparar, deberá ser el justo y necesario para el número de pocillos a ensayar, ya que una vez diluido, el volumen restante no utilizado deberá ser desechado. El volumen a preparar en cada caso será:
(1,7 µl de sonda en 170 µl de tampón de revelado) x n
Donde n es el número de pocillos sobre los que se añadirán la sonda específica.

Una vez preparadas, añadir 150 µl de sonda específica sobre cada pocillo. Incubar la placa durante 30 minutos a 57°C.

6.- Lavado.

Lavar 5 veces los pocillos, del mismo modo que se especifica en el paso 4.

7.- Adición del conjugado.

El conjugado se suministra 100x concentrado, por lo que previamente a su utilización, deberá diluirse adecuadamente en tampón de revelado. Puesto que una vez diluido este reactivo pierde fácilmente su actividad, deberá prepararse únicamente el volumen estrictamente necesario para el número de pocillos que se estén utilizando. El volumen a preparar será por lo tanto:

$$(1,7 \mu l \text{ de conjugado suministrado en } 170 \mu l \text{ de tampón de revelado}) \times n$$

Donde es el número total de pocillos que estemos utilizando

Una vez preparado, añadir 150µl en cada uno de los pocillos, e incubar durante 20 minutos a temperatura ambiente.

8.- Lavado.

Lavar 4 veces los pocillos con solución de lavado, del mismo modo que se especifica en el paso 4, y lavar una vez mas con agua destilada. Escurrir cuidadosamente la placa sobre un papel de filtro.

9.- Revelado.

Añadir en cada pocillo 150 µl de sustrato y mantener la placa a temperatura ambiente y en oscuridad durante 10 minutos, transcurridos los cuales, añadir 100µl de solución de parada.

10.- Lectura.

Leer los valores de DO para cada pocillo en un espectrofotómetro utilizando un filtro de 450 nm.

Validación del ensayo

Antes de proceder a interpretar los resultados obtenidos en el ensayo de amplificación, debemos verificar que el ELISA se ha realizado correctamente, para ello comprobaremos los valores de los controles de ELISA:

- El valor de DO para el Control Negativo de ELISA debe ser inferior a 0,220
- El valor de DO para el Control Positivo de ELISA, debe ser superior a 1

En el caso de que estos valores no se cumplan, significará que el procedimiento de ELISA no se ha desarrollado de

un modo correcto, por lo que deberá repetirse el ELISA. NO INDICA EN NINGÚN CASO QUE LA PCR SE HAYA REALIZADO INCORRECTAMENTE.

Valoración de las muestras

Se considerarán **POSITIVAS** las muestras que desarrollen valores de DO superiores en 0,155 unidades al valor de DO del control negativo.

Se considerarán **NEGATIVAS** las muestras que desarrollen valores de DO, por debajo de este valor.

X. INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS DE ELISA

Validación del procedimiento de amplificación

Para verificar si se ha desarrollado correctamente el procedimiento de amplificación, valoraremos el comportamiento de los Controles de Amplificación en el ELISA.

Cuando el Control Positivo de Amplificación, pueda considerarse positivo en el ELISA, mientras que el Control Negativo de Amplificación se mantenga en el rango de los valores negativos, podremos asegurar que el proceso de Amplificación se ha desarrollado de modo conveniente.

Interpretación de resultados

Una vez comprobada la ausencia de errores en el proceso, podremos valorar el resultado de las muestras:

Todas las muestras que hayan desarrollado valores de DO positivos en el ELISA, deberán considerarse como positivas, es decir que contienen material genético de EHR.

Todas las muestras que hayan desarrollado valores de DO negativos en el ELISA, deberán considerarse como NEGATIVAS, es decir que no contienen EHR.

I. TECHNICAL BASIS

In INgene EHR different techniques of molecular biology and immunology are combined in order to guarantee the reliability of the test and, as far as the complexity of this type of assay, allows its ease of performance:

1. Extraction techniques, specific retrotranscription and amplification techniques which guarantee the maximum degree of sensitivity and specificity.
2. Cloning techniques and design of plasmids which allow introducing exhaustive controls into each and every phase of the test. The INgene EHR incorporates external controls in a systematic way, which allows evaluating whether each of the assay steps has been carried out correctly. The kit includes an extraction, amplification and development control.
3. On-plate hybridisation techniques and techniques for labelling probes that allow the design of systems to read amplification results, which considerably increase the sensitivity of the test, facilitating it and – more importantly – “objectivising” the results interpretation process.

II. KIT COMPOSITION

			ELISA 48 reactions
		Volume	Nr Vials
AMPLIFICATION	Mixture A1 (specific primers for EHR)	750 µl	2
	Mixture B (enzyme mixture)	750 µl	2
	Positive control A1 – Amplification control	30 µl	1
DEVELOPMENT	Streptavidine Plate	48 poc.	1
	Development buffer	40 ml	1
	Desnaturalisation solution	15 ml	1
	Probe I – specific probe for EHR	90 µl	1
	Conjugate PO	90 µl	1
	Washing solution	250 ml	1
	Substrate	15 ml	1
	Stop solution	15 ml	1
	Positive control R1 (development) – ELISA Control	80 µl	1

To avoid any possible confusion, the reagents have been labelled with different colours depending on the process they are involved in. Thus, all reagents to be used during amplification have been labelled in **BLUE** and those used for developing in **YELLOW**.

III. GUIDELINES FOR THE CORRECT CONSERVATION OF THE KIT COMPONENTS

Supplied reagents must be maintained at +4°C.

IV. MATERIALS REQUIRED WHICH ARE NOT SUPPLIED

- VERY IMPORTANT: crushed ice to store the amplification reagents during handling.
- 0.2 or 0.5 ml Eppendorf tubes for thermocycler.
- Pipette tips with filter.
- 1 to 1000 µl pipettes.
- Assay tubes for the preparation of the amplification mixtures, probe solutions and conjugates for development, etc...
- Thermocycler.
- ELISA reader.
- Microfuge.

V. BASIC PRECAUTIONS TO AVOID CONTAMINATION

In the following, the precautions and recommendations to avoid any contamination and/or false results are detailed. If you are performing this assay for the first time, we recommend reading it through before using the kit. In general, the following precautions should be followed:

- Keep four separate areas for the preparation of samples, the preparation of the amplification mixtures, the amplification and the analysis of the products obtained (the latter two may overlap).
- In each designated area use material, lab-coats and equipment dedicated only to that area, i.e. do not allow it to cross boundaries.
- Change gloves every time any contamination is suspected.
- Never introduce amplified products into the sample preparation area or the area for the preparation of amplification mixture.
- Take special care when opening and closing the tubes. Avoid creation of aerosols.
- Maintain both reagents and samples closed as long as possible.
- Follow strict cleaning regulations inside the laboratory.

VI. COLLECTION AND TRANSPORT OF SAMPLES

The assay can be performed using any biological sample considered of interest by the clinician. Our technique has been standardised and contrasted with a considerable number of blood and serum samples. Other unrelated biological samples are not expected to limit the development of the technique.

The following are some recommendations and/or limitations relating to the method of obtaining and sending the samples to the laboratory:

- Use of heparin in any of the samples will limit the correct development of the assay, as it strongly inhibits the action of certain enzymes involved in the assay.
- Serum samples must be cooled from the moment they are obtained until they are processed. Processing needs to occur within 24 hours after obtaining the samples. In case a longer time is envisaged, we recommend freezing the samples.
- Tissue samples should be taken under the most aseptic conditions possible and be cooled immediately. As in the case of the sera, they will need to be kept refrigerated until they are processed, if the latter is scheduled within 24 hours, otherwise they should be frozen.

VII. EXTRACTION OF GENETIC MATERIAL

DNA EXTRACTION

The extraction of nucleic acids is a crucial point for the subsequent development of the PCR technique. Therefore, using a method that yields good-quality DNA is recommended (INGENASA Extraction could be provided under request).

Determining the quantity and quality of the DNA

Once the DNA has been isolated, it is recommended to check its quality and quantity.

SUGGESTED PROTOCOL

REQUIRED MATERIALS (Not supplied)

- Extraction buffer.
- DNAase-RNAase-free water.
- Chloroform.
- Isopropanol.
- Ethanol 70% (-20°C).
- Sterile PBS (only in the case of tissue samples).
- 1.5 ml Eppendorf tubes.
- Microfuge.

PROCEDURE

Initial preparation of tissue samples:

Cut a piece of tissue of approx. 2 mg and add sterile PBS until a concentration of approximately 0.4 mg/ml is reached. Homogenise the mixture under sterile conditions using a syringe or any other method ensuring complete homogenisation.

The samples treated in this way can follow the same extraction procedure as the serum samples.

1. Prepare 1.5 ml Eppendorf tubes for each of the samples to be analyzed plus one additional tube for negative extraction controls.
2. Add 100 µl of sample (serum or processed tissue according to previous procedure) and 750 µl extraction buffer. Follow the same procedure for the extraction control.
3. Add 0.25 ml of chloroform per every 0.75 ml of extraction buffer. Shake the tubes manually for 15 seconds.
4. Homogenise the mixtures and keep them at room temperature for 5 minutes.
5. Centrifuge the tubes at 12000 g for 15 minutes at +4°C.
6. Two phases can be differentiated after centrifugation, an aqueous one in the upper part and another one with an orange tinge, in the bottom

- part of the tube. The DNA remains in the upper aqueous phase.
- Prepare as many 1.5 ml Eppendorf tubes as samples being processed, label the tubes and add 0.5 ml of isopropanol to each one. Transfer the aqueous phase, approx. 350 µl, to the tubes previously prepared with isopropanol. Homogenise each mixture and incubate for 10 minutes at -20°C.
 - Centrifuge again for 10 minutes at 12000 g and decant the supernatant. The DNA stays in the pellet.
 - Add 1 ml of ethanol 70% (cold, stored at -20°C) to the tube and mix carefully.
 - Centrifuge at 7500 g for 15 minutes at +4°C.
 - Remove the supernatant by letting the excess liquid drain thoroughly on top of a filter paper. Leave the tubes open for 10 minutes to allow them to dry. **CAUTION:** *Never allow them to dry completely as the DNA will become insoluble if the pellet dries out completely.*
 - Dissolve the DNA in 50 µl of DNase-free water, thoroughly homogenise the mixture and store at 4°C until processing. **CAUTION:** *if amplification is not immediate, keep DNA at -20°C.*

VIII. AMPLIFICATION OF THE GENETIC MATERIAL

REQUIRED MATERIALS

- Crushed ice.
- DNA extracted from the samples.
- Mixture A1 – **KEEP IN CRUSHED ICE AT ALL TIMES**
- Mixture B – **KEEP IN CRUSHED ICE AT ALL TIMES WHILE OUTSIDE THE FREEZER.**
- Amplification control – Control A1.
- DNase-RNase-free water.

PROCEDURE

- Prepare and appropriately label as many tubes for the amplification as samples to be processed adding an additional tube for the negative extraction control.
 - Take mixture A1 and mixture B out of the freezer keeping them in crushed ice. Shake them lightly to ensure correct homogenisation. Prepare an appropriate amount of amplification mixture for the number of samples to be processed. The volume of each reagent to be mixed for each of the samples is:

Mixture A1	25 µl
Mixture B	25 µl
Final volume of mixture	50 µl
 - The tube used for mixing should be kept in crushed ice at all times. Likewise, it is recommendable to prepare an excess amount of mixture (calculate an extra 10% for all reagents) in order to compensate for possible losses of volume during pipetting. Once the mixture is prepared, homogenise correctly. Place the tubes previously labelled in crushed ice and add 50 µl of the mixture prepared in this way to each tube.
 - Add 3 µl of previously extracted DNA samples to each tube, 3 µl of positive control A1 (amplification control) to the corresponding tube and 3 µl of water to the tube labelled as negative control. Carefully mix the contents of each tube and ensure that all the liquid has been deposited at the bottom of the tube. If not, the tubes may be centrifuged lightly until this occurs.
 - Set the thermocycler to the following conditions:
 - **Pre-denaturalisation:** 3 min at 94 °C
 - **PCR Amplification:**

1 min at 94°C	}	40 Cycles
1 min at 72°C		
 - **Final extension:** 1 cycle of 5 min. at 72°C
- Maintain samples at 4°C until removal from thermocycler.

IX. DETECTION ELISA

MATERIALS

- Streptavidin plates
- Development Positive Control (R1)
- Developing buffer
- Denaturalisation solution – **CAUTION:** This reagent is a strong base and must be handled with care. This reagent is four times concentrated and needs to be diluted at the time of use.
- Probe I – specific for EHR
- Conjugate peroxidase (PO) – 100 x concentrated. Dilute conjugate only immediately before use and only prepare exact volume required, as it remains active for a short time once diluted.
- Washing solution.
- Substrate
- Stop solution

ASSAY PERFORMANCE PROTOCOL

Technical basis of the ELISA on-plate development.

The oligonucleotides used in the INGene EHR assay have been previously labelled with biotin so that the

amplification products – in case amplification occurs – will link to the streptavidin which lines the wells of the plate.

Following denaturalisation of the linked fragments, we add a specially designed probe which is complementary to an interDNA region of the amplified fragment that has also previously been labelled.

Under favourable conditions, hybridisation will occur in those wells where positive samples are being processed, and this hybridisation may be revealed by adding a PO conjugate which is able to specifically link the labelled probe. This in turn, can easily be developed by adding the adequate substrate to the PO as in any ELISA.

Procedure

- Preparation of the plate

Take out the required number of wells from the fridge and allow standing for at least 15 minutes before starting the assay.

You will need:

- 2 wells for the ELISA controls (one for the positive and one for the negative).
- 1well for each sample analyzed which – apart from the actual sample – includes all extraction and amplification controls which have been introduced into the assay.

Conveniently label each of the wells.

2.- Adding the samples

Once they reach room temperature, dispense 150 µl of developing buffer into each of the wells. Add 10µl of the sample to be analyzed (the product of the PCR) to each well. Homogenise the content of each well taking care to avoid any cross-contamination of wells, and then incubate the plate for 30 minutes at room temperature.

3.- Denaturalisation of the DNA chains

Prepare 1x denaturalisation solution from the one supplied (4x) in the following way:

$$Vf = n \times 170\mu l$$

Denaturalisation solution 1x = Vf/4 of denaturalisation solution + 3Vf/4 of H₂O.

Without removing the content, add 150 µl of denaturalisation solution to each well. Carefully homogenise the mixture and maintain at room temperature for 10 minutes (if possible, shake during incubation).

4.- Washing

Wash the wells 5 times with washing solution.

RECOMMENDATIONS FOR WASHING CYCLES:

The washing cycles can be performed using an automatic plate washer or a micropipette which allows dispensing 300 µl per well. Following incubation, wash according to the following instructions:

Remove the content of the plate by swiftly turning it upside down so as to avoid the exchange of fluids between wells. As a precaution, emptying of the wells should be done with care, as the denaturalising solution is highly irritating.

Dispense 300 µl of washing solution per well.

Carefully shake the plate avoiding the exchange of material between wells.

Swiftly turn the plate upside down to empty its content.

Repeat the process as often as indicated in the procedure.

Before removing the content of the last wash, make sure the next reagent is ready for immediate use. The plate must not stay dry.

After the last wash shake the plate upside down over an absorbent filter paper.

5.- Adding the specific probe

They are supplied 100x concentrated; therefore they need to be diluted in developing buffer before use. Volume of diluted probe to be prepared should be the exact volume required for the number of wells to assay, as any leftover will have to be discarded. The volume required in each case is:

$$(1.7 \mu l \text{ of probe in } 170 \mu l \text{ of developing buffer}) \times n$$

Where n is the number of wells to which the specific probe will be added.

Incubate the plate for 30 minutes at 57°C.

Remove the content from the wells.

6.- Wash

Wash the wells 5 times following the procedure specified under step 4.

7.- Adding of the conjugate

The conjugate is supplied 100x concentrated; therefore it needs to be diluted accordingly in developing buffer before use. As this reagent easily loses its activity once diluted, prepare only the exact volume required for the number of wells being used. The required volume is as follows:

$$(1.7 \mu l \text{ of conjugate supplied in } 170 \mu l \text{ of developing buffer}) \times n$$

Where n is the total number of wells in use

Once prepared, add 150µl to each of the wells and incubate for 20 minutes at room temperature.

8.- Wash

Wash the wells 4 times with washing solution according to the procedure specified under step 4, and wash once more with distilled water. Drain the plate carefully over a filter paper.

9.- Development

Add 150 µl of substrate to each well and allow the plate to stand at room temperature and in darkness for 10 minutes. Then add 100µl of stop solution.

10.- Reading

Read the OD values for each well with a spectrophotometer using a filter of 450 nm.

Validation of the assay

Before proceeding to the interpretation of the results obtained in the amplification assay, one has to verify that the ELISA has been performed correctly. For this, the ELISA control values need to be checked:

- The OD value for the negative ELISA control must be lower than 0.220
- The OD value for the positive ELISA control must be higher than 1.

If these values are not fulfilled, the ELISA procedure has not been performed correctly and needs to be repeated. THIS DOES NOT IMPLY THAT THE PCR HAS BEEN CARRIED OUT INCORRECTLY.

Evaluation of the samples

Samples which develop OD values above 0.155 units of the OD value of the negative control are considered **POSITIVE**.

Samples which develop OD values below this value are considered **NEGATIVE**.

X. INTERPRETATION OF RESULTS

Validation of the extraction procedure

To check whether the extraction process has been completed correctly, the behaviour of the extraction controls in the ELISA is evaluated.

If the positive extraction control can be considered positive in the ELISA while the negative extraction control stays within the range of negative values, the extraction process can be regarded as successfully completed.

control stays within the range of negative values, the amplification process can be regarded as successfully completed.

Interpretation of results

Once the possibility of errors in the process has been excluded, the result of the samples can be evaluated.

Validation of the amplification procedure

To check whether the amplification process has been completed correctly, the behaviour of the amplification controls in the ELISA is evaluated.

If the positive amplification control can be considered positive in the ELISA while the negative amplification

All the samples which show positive OD results in the ELISA should be considered positive, i.e. they contain genetic material of EHR.

All the samples that have shown negative OD values in the ELISA should be considered **NEGATIVE**, i.e. they do not contain genetic material of EHR.

Developed and manufactured in Spain by:

INMUNOLOGIA Y GENETICA APLICADA, S.A.
C/ Hnos. García Noblejas, 39
28037- MADRID (SPAIN)
Tif: +34 91368.05.01/04
Fax: +34 91 408.75.98
E-mail: ingenasa@ingenasa.es
www.ingenasa.es

