Gebrauchsanweisung
***Olerup* SSP® HLA-Typisierungskits ohne *Taq*-Polymerase**

Olerup SSP®
Gebrauchsanweisung

Für *In-Vitro*-Diagnostik

VERWENDUNGSZWECK
Olerup SSP® HLA-Typisierungskits sind qualitative Kits zur *in-vitro*-Diagnostik für die DNA-Typisierung von Allelen der HLA-Klasse I und HLA-Klasse II. Die Produkte werden von geschulten Experten in medizinischen Einrichtungen zur Bestimmung des HLA-Phänotyps verwendet. Das getestete Ausgangsmaterial ist DNA.

ZUSAMMENFASSUNG UND ERKLÄRUNG
Humane Leukozytenantigene (HLA) wurden früher mittels des Lymphozytotoxizitätstests bestimmt. Dieser Test wurde jedoch aufgrund der Fehlerrate und der ungenügenden Auflösung der verschiedenen Allele durch DNA-Typisierungstechniken auf der Grundlage der Polymerasekettenreaktion (PCR) ersetzt. Bei den meisten PCR-basierten Techniken wird der PCR-Prozess nur als Amplifikationsschritt der benötigten Ziel-DNA und als Post- Amplifikationsschritt zur Unterscheidung zwischen den verschiedenen benötigten Allelen verwendet. Im Gegensatz dazu findet die Unterscheidung zwischen den verschiedenen Allelen bei der PCR-SSP-Methode (sequenzspezifischer Primer – SSP) während des PCR-Prozesses statt. Dies verkürzt und vereinfacht den Post- Amplifikationsschritt zu einem einfachen Nachweisschritt mittels Gelelektrophorese. Die Ergebnisse des SSP-Tests sind entweder positiv oder negativ und somit ist keine komplizierte Interpretation der Ergebnisse mehr nötig. Zusätzlich ist die Typisierungsauflösung der PCR-SSP höher als für andere PCR- basierte Typisierungstechniken, da jedes Primerpaar zwei Sequenzmotive definiert, die in *cis* liegen, d.h. auf dem gleichen Chromosom. Außerdem wurde aufgrund der synthetischen Beschaffenheit der SSP-Reagenzien die Stabilität verbessert und die Lot-zu-Lot Variation verringert.

PRINZIP DER METHODE
Die PCR-SSP-Methode basiert auf dem Prinzip, dass vollständig oder fast vollständig übereinstimmende Oligonukleotid-Primer durch thermostabile DNA-Polymerasen ohne Eigenschaften zum Korrekturlesen ohne fehlende Übereinstimmungen am 3-‘Ende effizienter bei der PCR-Reaktion verwendet werden als nicht übereinstimmende Primer. Primerpaare sind darauf ausgelegt, dass sie zu einzelnen Allelen oder (einer) Gruppe(n) von Allelen passen und zwar je nach Ausmaß der benötigten Typisierungsauflösung. Mit genau kontrollierten PCR-Bedingungen ermöglichen passende oder fast vollständig passende Primerpaare eine Amplifikation, d. h. ein positives Ergebnis, wobei Primerpaare mit fehlenden Übereinstimmungen keine Amplifikation ermöglichen, d. h. ein negatives Ergebnis.

Nach dem PCR-Prozess werden die amplifizierten DNA-Fragmente nach Größe getrennt, z. B. durch Agarose-Gelelektrophorese, durch Färbung mit

Ethidiumbromid und Exposition gegenüber UV-Licht visualisiert, mittels Fotografie dokumentiert und interpretiert. Die Interpretation von PCR-SSP-Ergebnissen basiert auf dem Vorhandensein oder Nichtvorhandensein von (einem) spezifischen PCR-Produkt(en). Die relativen Größen der spezifischen PCR- Produkt(e) können bei der Interpretation der Ergebnisse behilflich sein. Die PCR- SSP-Methode für HLA wurde ursprünglich von O. Olerup in den Jahren 1991 und 1992 beschrieben[1,2].

Da der PCR-Prozess von verschiedenen Faktoren negativ beeinflusst werden kann (z. B. Pipettierfehler, zu geringe DNA-Konzentration, schlechte DNA-Qualität, Vorhandensein von PCR-Inhibitoren, Thermocyclergenauigkeit), ist ein internes positives Kontrollprimerpaar in jeder PCR-Reaktion enthalten[2]. Das interne positive Kontrollprimerpaar passt zu konservierten Bereichen des Gens für das humane Wachstumshormon, das bei allen humanen DNA-Proben vorhanden ist. In Gegenwart eines spezifischen PCR-Produktes von (einem) HLA-Allel(en) kann das Produkt des internen positiven Kontrollbandes schwach oder gar nicht vorhanden sein. Die von den spezifischen HLA-Primerpaaren erzeugten Amplicons sind kürzer als die Amplicons des internen positiven Kontrollprimers, jedoch länger als nicht inkorporierte Primer (siehe zu erwartende Werte).

REAGENZIEN

A. Identifizierung

Die *Olerup* SSP®-Typisierungskits enthalten getrocknete, sequenzspezifische Primer für die PCR-Amplifikation von HLA-Allelen und des Gens für das humane Wachstumshormon, PCR-Master-Mix ohne *Taq*-Polymerase ("Master Mix"), adhäsive PCR-Folien und die Gebrauchsinformation, die aus der Gebrauchsanweisung, chargenspezifischen Informationen und einem Arbeitsblatt besteht.

Die Primerlösungen sind vor-aliquotiert und in verschiedenen 0,2ml-Vertiefungen aus geschnittenen, dünnwandigen PCR-Platten getrocknet. Jede Vertiefung der Platte enthält eine getrocknete Primerlösung, die aus einem spezifischen Primer Mix besteht, d. h. aus allel- und gruppenspezifischen HLA-Primern sowie einem internen positiven Kontrollprimerpaar, das nicht zu der Allel-Sequenz passt und der DNA-Probe, Master-Mix und dH_2O hinzugefügt werden kann.

Die Primer sind auf eine optimale PRC-Amplifikation unter Verwendung von Master Mix und des empfohlenen Thermocycler-Programms ausgelegt (siehe Programmierung des Thermocycler).

Siehe die zur Verfügung gestellten chargenspezifischen Ausprägungs- und Interpretationstabellen oder das Arbeitsblatt für die spezifischen HLA-Allele, die durch jeden Primer Mix amplifiziert werden.

B. Warnungen und Vorsichtsmaßnahmen

1. Für *In-Vitro*-Diagnostik.
2. Dieses Produkt kann nicht als einzige Grundlage für eine klinische Entscheidung verwendet werden.
3. *Warnung vor Biogefährdung*: Alle Blutprodukte sind als potenziell infektiöses Material zu behandeln. Keines der heute bekannten Testverfahren kann zweifelsfrei ausschließen, dass die aus Humanblut gewonnenen Produkte keine Infektionserreger übertragen.
4. *Warnung vor Biogefährdung*: Das für die DNA-Färbung in der Agarose-Gelelektrophorese verwendete Ethidiumbromid ist ein Karzinogen. Tragen Sie bei seiner Verwendung daher geeignete persönliche Schutzkleidung.
5. *Achtung*: Tragen Sie, wenn Sie Gele betrachten oder fotografieren, UV-absorbierenden Augenschutz und sehen Sie nicht direkt in die UV-Lichtquelle.
6. Pipetten und andere Geräte, die für Verarbeitungen ***nach*** dem PCR-Prozess verwendet werden, sollten ***nicht*** für Verarbeitungen ***vor*** dem PCR-Prozess verwendet werden.
7. Ausführlichere Informationen finden Sie auf dem Sicherheitsdatenblatt (http://www.olerup-ssp.com).

C. Gebrauchsanweisung

Siehe Gebrauchsanleitung

D. Lagerungshinweise

Kitbestandteile im Dunklen und bei der auf dem Verpackungsetikett angegebenen Temperatur lagern.

Vor dem auf dem Verpackungsetikett aufgedruckten Verfallsdatum verwenden.

E. Für die Verwendung notwendige Reinigung und Vorbereitung

Siehe Gebrauchsanleitung

F. Anzeichen für Instabilität

1. Verwenden Sie keine PCR-Röhrchen mit Sprüngen in den Vertiefungen oder Schäden an den oberen Rändern der Vertiefungen, da dies zu einer Evaporation während der PCR-Amplifikation führen kann. Verwenden Sie keine PCR-Deckelstreifen mit Sprüngen, da dies zu einer Evaporation während der PCR-Amplifikation führen kann.
2. Die Farbe der getrockneten Primer sollte rot sein. Eine gelbe Verfärbung der Primer deutet möglicherweise auf eine Zersetzung hin.

3. Der Master Mix sollte rot bis purpurn sein. Eine gelbe oder orange Verfärbung deutet möglicherweise auf eine Zersetzung hin.

INSTRUMENTELLE ANFORDERUNGEN

A. Instrumente

Es sollte ein Thermocycler mit mindestens den folgenden Eigenschaften verwendet werden:

- beheizbarer Deckel mit einer Temperatur von 104°C für eine ölfreie Verwendung
- Probenblock (Aluminium, Silber oder vergoldetes Silber) für die Verwendung mit entweder einer PCR-Platte mit 96 Vertiefungen oder dünnwandigen 0,2-ml-Reagenzgefäßen
- Aufheizrate von mindestens 0,7°C/Sekunde
  Bitte beachten: Die Olerup SSP Kits sind auf dem GeneAmp 9700 Thermocycler validiert worden. Dabei wurde der 9600 Modus verwendet. Wenn die Heizrate höher ist als das Äquivalent zu dem oben beschriebenen Modus, kann diese Einstellung einen Einfluss auf die Typisierungsergebnisse haben.
- Temperaturbereich von 4,0°C bis 99,9°C
- Temperaturgenauigkeit von ±0,25°C im Bereich von 35°C bis 99,9°C
- Temperaturkonstanz des Probenblocks von ≤0,75°C im Bereich von 55°C bis 95°C
- Temperaturkalibrierung auf eine Eichnorm (z. B. NIST) zurückführbar.

Programmieren Sie den Thermocycler mit den im nachfolgenden Abschnitt B angegebenen PCR-Zyklusparametern.

Besondere Informationen zum Thermocycler finden Sie in der Bedienungsanleitung des Herstellers. Thermocycler sollten gemäß den Akkreditierungsnormen der ASHI (Amerikanische Gesellschaft für Histokompatibilität und Immungenetik) oder der EFI (Europäische Vereinigung für Immungenetik) kalibriert werden.

Programmieren Sie den Thermocycler bevor Sie mit der Verwendung gemäß der unten beschriebenen Gebrauchsanleitung beginnen.

B. PCR-Zyklusparameter

1.	1 Zyklus	94ºC	2 min	Denaturierung
2.	10 Zyklen	94ºC	10 sec.	Denaturierung
		65ºC	60 sec.	Kühlen und Verlängerung
3.	20 Zyklen	94ºC	10 sec.	Denaturierung
		61ºC	50 sec.	Kühlen
		72ºC	30 sec.	Verlängerung
4.	Ende - Halten		RT	falls weniger als 8 Stunden
		4ºC		falls mehr als 8 Stunden

Gesamte Reagenzmenge in jeder Vertiefung, 10 µl.

Für alle *Olerup*-SSP®-Kits werden dieselben PCR-Thermocycler-Konditionen verwendet.

PROBENENTNAHME UND -VORBEREITUNG

Für die SSP-Typisierung wird extrahierte, hochreine DNA benötigt. DNA-Proben zu Verwendung in der PCR-SSP-HLA-Typisierung müssen wieder in dH_2O gelöst werden. Das A260/A280-Verhältnis sollte für eine ideale Bandenvisualisierung während der Elektrophorese 1,6 – 2,0 durch UV- Spektralphotometrie betragen.

Wir empfehlen die automatisierte DNA-Extraktion mit dem QIAGEN EZ1 DSP DNA Blood System. Als Ausgangsmaterial sollte ACD-Blut verwendet werden.

Alternativ kann die DNA durch jedes andere bevorzugte Verfahren extrahiert werden, das reine DNA ergibt. Wenn alternative Verfahren verwendet werden, sollte die DNA-Konzentration auf 30 ng/µl angepasst werden. ***Verwenden Sie für diese Verfahren kein heparinisiertes Blut.***

Empfohlene DNA-Konzentrationen bei Verwendung von:
durch EZ1 extrahierter DNA, 15 ng/µl.
durch andere Verfahren extrahierter DNA, 30 ng/µl.

Konzentrationen über 50 ng/µl erhöhen das Risiko einer unspezifischen Amplifikation und schwacher zusätzlicher Banden, vor allem für SSP-Typisierungen in der high resolution der HLA-Klasse I. Verdünnen Sie die extrahierte DNA gegebenenfalls in dH_2O.

DNA-Proben sollten nicht erneut in Lösungen gelöst werden, die Chelatbildner wie EDTA in Konzentrationen über 0,5 mM enthalten.

DNA-Proben können sofort nach der Extraktion verwendet werden und können ohne negative Auswirkungen bis zu 2 Wochen lang bei +4°C gelagert werden. DNA-Proben können bei -20°C oder kälter 9 Monate lang gelagert werden. Die Reinheit und Konzentration von extrahierten DNA-Proben, die längere Zeit gelagert wurden, sollte vor der HLA-Typisierung auf Akzeptanz geprüft werden.

DNA-Proben sollten bei +4°C oder kälter transportiert werden, damit Ihre Integrität während des Transports erhalten bleibt.

VERFAHREN

A. Im Kit enthaltene Materialien

1. *Olerup*-SSP®-PCR-Platten/-Röhrchen.

2. Master Mix ohne *Taq*-Polymerase (entsprechend der Menge der PCR-Röhrchen im Kit). Für alle *Olerup*-SSP®-Kits wird derselbe Master Mix verwendet.
3. Adhäsive PCR-Folien (den Platten des Kits entsprechende Anzahl).
4. Gebrauchsinformation.

B. Erforderliche, aber nicht im Kit enthaltene Materialien

1. DNA-Isolationskit, manuell oder automatisiert
2. UV-Spektralphotometer
3. Pipettierhilfen. Wir empfehlen elektronische Einkanalpipetten, die bis zu 10 µl Aliquote abgeben können, um die Mischung aus DNA, Master Mix und dH_20 in die Plattenvertiefungen zu geben.
4. Einweg-Pipettenspitzen
5. Polypropylenröhrchen
6. Vortex-Mixer
7. Mikrozentrifuge
8. PCR-Plattengestell
9. Thermocycler mit beheiztem Deckel für PCR mit 96 Vertiefungen, einem Temperaturgefälle des Heizblock von ≤ 0,75°C, und einer Platte/Halterung für dünnwandige Reagenzvertiefungen zu je 0,2 ml
10. Mikrowellenherd oder Heizplatte zum Erhitzen der Agaroselösungen
11. Elektrophorese-geeignete Agarose, z. B. FMC Seakem LE
12. 0,5 x TBE-Puffer; 1 x TBE-Puffer besteht aus 89 mM Tris-Borat, 2mM Dinatrium-EDTA und hat einen pH-Wert von 8,0
13. Ethidiumbromid-Tropfflasche, Produkt-Nr. 103.301-10
14. Pipettierhilfe für Gelauftrag. Wir empfehlen 8-Kanal-Pipetten für Gelauftrag, einstellbare Menge: 5-25 µl
15. DNA-Größenmarker zur Abdeckung der Bereiche 50 – 1 000 bp, z. B. 100-Basenpaarleiter, DNA-Größenmarker Produkt-Nr. 103.202-100 oder DNA-Größenmarker für kurze Gelwanderungen 103.203-100
16. Elektrophoresegerät/Netzteil
17. UV-Transilluminator
18. Fotografie- oder Bilddokumentationssystem
19. Roche-*Taq*-DNA-Polymerase, GMP-konform. [Katalog-Nr. 03 734 927 001 (1000 U) oder Nr. 03 734 935 001 (5000 U)].

C. Arbeitsanleitung

Siehe Gebrauchsanleitung

Gebrauchsanweisung
Olerup SSP® HLA-Typisierungskits ohne _Taq_-Polymerase

GEBRAUCHSANLEITUNG

A. Vorbereitung der Proben

1. Isolieren Sie genomische DNA aus Leukozyten enthaltenden Proben nach einem Verfahren Ihrer Wahl (siehe Probenentnahme und -vorbereitung oben).
2. Spezielle Informationen über Vorbereitung und Lagerung von Proben finden Sie oben unter Probenentnahme und -vorbereitung.
3. Führen Sie die PCR-Amplifikation mit der gereinigten DNA-Probe unter Verwendung eines *Olerup*-SSP®-Typisierungskits durch oder lagern Sie die DNA-Probe bis zur Typisierung.

B. Vorbereitung Reagenz/Ausrüstung

1. Programmieren Sie einen Thermocycler, um das *Olerup*-SSP®-PCR-Programm zu starten (siehe Instrumentelle Anforderungen – PCR-Zyklusparameter oben).
2. Halten Sie *Taq*-Polymerase bereit (5 Einheiten/µl), bei -20°C lagern.
3. Bereiten Sie ein Elektrophorese-Gel vor (siehe Abschnitt C – **Gelelektrophorese-Vorbereitung** unten.

C. Gelelektrophorese-Vorbereitung

Für *Olerup*-SSP®-Gelsystem 96 (Produkt-Nr. 103.101-01)

1. Aufbau
   - Richten Sie die Gießkammer für 1 Gel (Produkt-Nr. 103.101-31) oder die Gießkammer für 3 Gele (Produkt-Nr. 103.101-33) mit der Libellenblase und den drei höhenverstellbaren Beinen aus.
   - Stellen Sie die Gelplatte(n) in die Gießkammer.
2. Vorbereitung 2% (w/v) Agarose-Gel
   Verwenden Sie qualitativ hochwertige Elektrophorese-geeignete Agarose, die 50 – 2.000 DNA-Basenpaarfragmente lösen kann.
   - Geben Sie 150 ml destilliertes Wasser und 2 g Agarose zu 5 ml 10 x Tris-Borat-EDTA-Puffer (10 x TBE-Puffer) in eine 500 ml Glasflasche.
   - Lösen Sie die Agarose durch Erhitzen in einem Mikrowellenofen auf, bis sich 100 ml homogene Lösung gebildet haben.
   - Lassen Sie die gelöste Gellösung auf 60°C abkühlen, z. B. in einem Wärmeschrank.
   - Färben Sie das Gel, indem Sie Ethidiumbromid (10 mg/ml) hinzugeben, 5 µl pro 100 ml Gellösung. Verwenden Sie für eine einfache Handhabung unsere Ethidiumbromid-Tropfflaschen (Produkt-Nr. 103.301-10). **Hinweis: Ethidiumbromid ist ein Karzinogen. Tragen Sie bei seiner Verwendung daher geeignete persönliche Schutzkleidung.**
   - Geben Sie 100 ml der Gellösung auf die Gelplatte in der Gießkammer. Schieben Sie 6 Gelkämme (Produkt-Nr. 103.101-21) in die Spalten der Gelplatte.
   - Lassen Sie das Gel 15 Minuten setzen.

- Geben Sie 750 ml 0,5 x TBE-Puffer in den Gelbehälter. Tauchen Sie die Gelplatte in die Gelkammer und entfernen Sie die 6 Gelkämme vorsichtig, indem Sie sie anheben.

Falls Sie alternative Elektrophoresesysteme verwenden, halten Sie sich an die Gebrauchsanweisungen des Herstellers. Damit sie mit den *Olerup*-SSP®- HLA-Typisierungskits verwendet werden können, müssen diese Systeme PCR-Produkte in der Größenordnung von 50 bis 1.100 Basenpaaren auflösen können.

D. Arbeitsanleitung

1. Entnehmen Sie die folgenden benötigten Reagenzien aus dem Kühlschrank mit der angegebenen Lagertemperatur: die zu testenden DNA-Proben, die SSP-Kit(s), die Menge an Master Mix und *Taq*-Polymerase (5 Einheiten/µl), die für die ausgewählte(n) DNA-Probe(n)/Kit(s) benötigt wird. Bei Zimmertemperatur (20 bis 25°C) auftauen.

Für alle *Olerup*-SSP®-Kits wird derselbe Master Mix verwendet.

2. Mischen Sie die DNA-Probe(n) kurz auf dem Vortex.
3. Stellen Sie die SSP-Kit(s) in eine Thermocycler-Halterung

4. Kits für low und high resolution

- Mischen Sie den Master Mix auf, bevor Sie Aliquote entnehmen.
- Geben Sie mit der manuellen Einkanalpipette bei Raumtemperatur Master Mix, *Taq*-Polymerase (5 Einheiten/µl) und dH_2O in ein 0,5-ml- oder ein 1,5-ml-Röhrchen. (Siehe nachfolgende Tabelle 1 für die richtigen Mengen.)
- Verschließen Sie die Röhrchen und mischen Sie sie 5 Sekunden lang. Zentrifugieren Sie die Röhrchen in einer Mikrozentrifuge, um die Flüssigkeit von den Seiten des Röhrchens nach unten zu schleudern.
- <u>Kits mit niedriger Auflösung:</u> Geben Sie mit einer manuellen Einkanalpipette 8 µl der Mischung aus Master Mix – *Taq*-Polymerase – dH_2O sowie 2 µl dH_2O in die Vertiefung der Negativkontrolle der Primerplatte, d. h. die Vertiefung mit den Primerpaaren der Negativkontrolle.
- Geben Sie mit einer manuellen Einkanalpipette bei Raumtemperatur die DNA-Proben zur restlichen Mischung aus Master Mix – *Taq*-Polymerase – dH_2O. (Siehe nachfolgende Tabelle 1 für die richtigen Mengen.)
- Verschließen Sie die Röhrchen und mischen Sie sie 5 Sekunden lang. Zentrifugieren Sie die Röhrchen in einer Mikrozentrifuge, um die Flüssigkeit von den Seiten des Röhrchens nach unten zu schleudern.
- Geben Sie mit einer elektrischen Einkanalpipette 10 µl der Reagenzprobenmischung in jede Vertiefung der Primerplatte, mit Ausnahme der Vertiefung für die Negativkontrolle.

Gebrauchsanweisung
Olerup SSP® HLA-Typisierungskits ohne *Taq*-Polymerase

- Kits mit hoher Auflösung: Geben Sie mit einer manuellen Einkanalpipette bei Raumtemperatur die DNA-Proben zur Mischung aus Master Mix – *Taq*-Polymerase – dH_2O. (Siehe nachfolgende Tabelle 1 für die richtigen Mengen.)
- Verschließen Sie die Röhrchen und mischen Sie sie 5 Sekunden lang. Zentrifugieren Sie die Röhrchen in einer Mikrozentrifuge, um die Flüssigkeit von den Seiten des Röhrchens nach unten zu schleudern.
- Geben Sie mit einer elektrischen Einkanalpipette 10 µl der Reagenzprobenmischung in jede Vertiefung

Tabelle 1: Mengenangaben zu Komponenten, die pro Test für die unterschiedliche Anzahl an Primer Mixen benötigt werden, wenn der Master Mix ohne *Taq*-Polymerase verwendet wird.

Anzahl der Primer Mixe pro Test	Menge an Master Mix (µl)	Menge an DNA (µl)	Menge dH_2O (µl)	Menge an *Taq*-Polymerase (µl)
2	12	8	19.7	0.3
3	15	10	24.6	0.4
4	18	12	29.5	0.5
5	21	14	34.4	0.6
6	24	16	39.4	0.6
7	27	18	44.2	0.8
8	30	20	49.2	0.8
9	33	22	54.1	0.9
10	36	24	59	1.0
11	39	26	63.9	1.1
12	42	28	68.9	1.1
13	45	30	73.8	1.2
14	48	32	78.7	1.3
15	51	34	83.6	1.4
16	54	36	88.6	1.4
17	60	40	98.4	1.6
18	63	42	103.3	1.7
19	66	44	108.2	1.8
20	69	46	113.2	1.8
21	72	48	118.1	1.9
22	75	50	123	2.0
23	78	52	127.9	2.1
24	81	54	132.8	2.2

Anzahl der Primer Mixe pro Test	Menge an Master Mix (µl)	Menge an DNA (µl)	Menge dH_2O (µl)	Menge an *Taq*-Polymerase (µl)
25	87	58	142.7	2.3
26	90	60	147.6	2.4
27	93	62	152.5	2.5
28	96	64	157.4	2.6
29	99	66	162.4	2.6
30	102	68	167.3	2.7
31	105	70	172.2	2.8
32	108	72	177.1	2.9
36	126	84	206.6	3.4
40	138	92	226.3	3.7
44	150	100	246	4.0
48	162	108	265.7	4.3
52	174	116	285.4	4.6
56	186	124	305	5.0
60	198	132	324.7	5.3
64	210	140	344.4	5.6
68	228	152	373.9	6.1
72	240	160	393.6	6.4
76	252	168	413.3	6.7
80	264	176	433	7.0
84	276	184	452.6	7.4
88	288	192	472.3	7.7
92	300	200	492	8.0
96	312	208	511.7	8.3

Die oben aufgeführten empfohlenen Mengen sind so berechnet, dass Pipettenvariationen und Flüssigkeitsverluste an den Innenseiten der Röhrchen kompensiert werden können.

Gebrauchsanweisung
Olerup SSP® HLA-Typisierungskits ohne _Taq_-Polymerase

1. **Kombikits A-B-DR, A-B-C, A-B-DR-DQ und DPB1-DQ-DR und HLA-C-Kit mit hoher Auflösung**
   - Mischen Sie den Master Mix.
   - Geben Sie mit einer manuellen Einkanalpipette bei Raumtemperatur 8,3 µl *Taq*-Polymerase (5 Einheiten/µl) und 511,7 µl dH_2O in das im Kit enthaltene 1,5-ml-Röhrchen, das 312 µl Master Mix enthält.
   - Verschließen Sie die Röhrchen und mischen Sie sie 5 Sekunden lang. Zentrifugieren Sie die Röhrchen in einer Mikrozentrifuge, um die Flüssigkeit von den Seiten des Röhrchens nach unten zu schleudern.
   - Geben Sie mit einer manuellen Einkanalpipette 8 µl der Mischung aus Master Mix – *Taq*-Polymerase – dH_2O sowie 2 µl dH_2O in die Vertiefung der Negativkontrolle Nr. 96, d. h. die Vertiefung mit den Primerpaaren der Negativkontrolle.
   - Geben Sie mit einer manuellen Einkanalpipette bei Raumtemperatur 206 µl DNA-Proben zur restlichen Mischung aus Master Mix – *Taq*-Polymerase – dH_2O.
   - Verschließen Sie die Röhrchen und mischen Sie sie 5 Sekunden lang. Zentrifugieren Sie die Röhrchen in einer Mikrozentrifuge, um die Flüssigkeit von den Seiten des Röhrchens nach unten zu schleudern.
   - Geben Sie mit einer elektrischen Einkanalpipette 10 µl der Reagenzprobenmischung in jede Vertiefung des SSP-Kits, mit Ausnahme der Vertiefung für die Negativkontrolle Nr. 96 des SSP-Kits.

Wichtig:

Pipettieren Sie die Probe immer oberhalb des PCR-Röhrchens, um eine Kreuzkontamination zwischen den Vertiefungen zu vermeiden. Berühren Sie die Innenseite der Vertiefung mit der Pipettenspitze, damit die Probe am Rand der Vertiefung nach unten laufen kann. Überprüfen Sie, ob alle Proben in jeder Vertiefung nach unten gelaufen sind. Falls nicht, klopfen Sie vorsichtig auf die Tischoberfläche, damit alle Proben in den Vertiefungen nach unten rutschen, bevor Sie mit der PCR beginnen.

2. Decken Sie die SSP-Primer mit den im Kit enthaltenen adhäsiven PCR-Siegeln ab. Stellen Sie sicher, dass alle Reagenzvertiefungen vollständig verschlossen sind, um Evaporationsverluste während der PCR-Amplifikation zu vermeiden. Das *Olerup*-SSP®-Druckkissen (Produkt-Nr. 103.505-06) kann auf den adhäsiven PCR-Folien angebracht werden, um eine Evaporation während des Wärmezyklus zu verhindern.
3. Schieben Sie die Primerplatte(n) mit einem geeigneten Röhrchenplatten-Adapter in den Thermocycler. Zwischen dem PCR-Aufbau und dem Wärmezyklus dürfen nicht mehr als 5 Minuten vergehen.
4. Geben Sie Ihre *Olerup*-SSP®-Programmnummer ein und die Reagenzmenge 10 µl.
5. Starten Sie das PCR-Programm. Das Programm läuft circa 1 Stunde und 20 Minuten.

6. Entnehmen Sie die PCR-Platten aus dem Thermocycler. Untersuchen Sie die PCR-Platte daraufhin, ob sich in jeder PCR-Vertiefung in etwa dieselbe Menge Flüssigkeit befindet. Führen Sie mit den Proben eine Elektrophorese durch (siehe Abschnitt E – Gelelektrophorese unten). Interpretieren Sie die Typisierungsergebnisse mit den ***chargenspezifischen Interpretations- und Auswertungstabellen oder dem Arbeitsblatt*** (siehe Erwartete Werte unten).

E. Gelelektrophorese

1. Richten Sie die Primerplatte und die Gelbox nach Abschluss der PCR-Reaktion aus. Die Vertiefungen müssen von links nach rechts und von oben nach unten angeordnet sein.
2. Entfernen Sie vorsichtig den Deckelstreifen, ohne die PCR-Produkte zu verschütten.
3. Übertragen Sie die PCR-Produkte der Reihe nach auf das 2 % Agarose-Gel. (Es muss kein Gelauftragspuffer hinzugegeben werden.) Es wird empfohlen, für den Gelauftrag eine 8-Kanal-Pipette zu verwenden.
4. Geben Sie einen DNA-Größenmarker (100 Basenpaarleiter, DNA-Größenmarker Produkt-Nr. 103.202-100 oder DNA-Größenmarker für kurze Gelwanderungen 103.203-100) in eine Vertiefung jeder Reihe.
5. Decken Sie die Gelkammer mit ihrem Deckel ab.
6. Führen Sie bei 8-10 V/cm 15-20 Minuten lang eine Elektrophorese des Gels in 0,5 x TBE-Puffer durch (Puffer nicht mehrfach verwenden).
7. Schieben Sie die Gelplatte mit dem Gel in einen UV-Transilluminator.
8. Fotografieren Sie das Gel mit oder ohne Gelplatte.
9. Markieren Sie das Foto gemäß den Vorschriften des Labors.

QUALITÄTSKONTROLLE

Die HLA-Testrichtlinien der ASHI schreiben vor, dass eine Vertiefung für die negative (Kontaminierungs-) Kontrolle Teil jedes PCR-Aufbaus sein muss. (Standards for Accredited Laboratories, Amerikanische Gesellschaft für Histokompatibilität und Immungenetik, letzte revidierte Normen, durch den Vorstand der ASHI genehmigt: 31. August 2007, letzte Version der Leitlinie von Januar 2008). Eine Vertiefung für die Negativkontrolle ist in den Kits mit niedriger Auflösung HLA-A, HLA-B, HLA-C und DR, den Kits HLA-C mit hoher Auflösung für häufige Allele und DQB1 mit hoher Auflösung für häufige Allele, in den Kombiplatten-Kits A-B-DR, A-B-C, A-B-DR-DQ, DPB1-DQ-DR und DQ-DR und DQA1*02,05;DQB1*02,03:02 und HLA-B*57:01 enthalten.

Siehe Gelinterpretation auf Seite 14.

ERGEBNISSE

Chargenspezifische Zelllinien-Validierungsblätter und Analysezertifikate sind in jedem Kit enthalten.

GRENZEN DES VERFAHRENS

1. Der PCR-SSP-Prozess muss unter streng kontrollierten Testbedingungen durchgeführt werden, um eine angemessen diskriminierende Amplifikation sicherzustellen. Das in der Gebrauchsanweisung beschriebene Verfahren muss streng eingehalten werden.
2. Die extrahierte DNA-Probe liefert das Muster für den spezifischen PCR-Amplifikationsprozess. Die gereinigte DNA sollte daher ein A260/A280-Verhältnis zwischen 1,6 und 2,0 haben, um eine ideale Bandvisualisierung durch Elektrophorese zu erreichen.
3. Alle Instrumente, z. B. Thermocycler, Pipettierhilfen, müssen gemäß den Herstellerangaben kalibriert sein.
4. Chargenspezifische Informationen befinden sich in der Gebrauchsinformation: Chargenspezifische Informationen und auf dem chargenspezifischen Arbeitsblatt.
5. Auf Grundlage der durchgeführten Tests wurden die folgenden Stoffe mit drei (3) Extraktionsverfahren zu den aufgeführten Konzentrationen bewertet und es wurde befunden, dass sie die Testleistung nicht beeinträchtigen.

Extraktionsverfahren	Störende Substanzen	Konzentration störender Substanzen*
EZ1 DSP DNA Blood System	Bilirubin	200 mg/l
	Hämoglobin	200 g/l
	Triglyceride	30 g/l
	Protein	110 g/l
QIAamp DSP DNA Blood Kit	Bilirubin	200 mg/l
	Hämoglobin	200 g/l
	Triglyceride	18,2 g/l
	Protein	77-96 g/l
Gentra PureGene Methode	Bilirubin	200 mg/l
	Hämoglobin	200 g/l
	Triglyceride	18,2 g/l
	Protein	119-146 g/l

6. Die PCR-Platten sind mit den meisten auf dem Markt erhältlichen Thermocyclern kompatibel. Siehe Tabelle zur Thermocycler-Kompatibilität unten. Die Tabelle ist nur als Richtlinie gedacht.

Gebrauchsanweisung
Olerup SSP® HLA-Typisierungskits ohne _Taq_-Polymerase

Compatibility Table		
Hersteller	**Thermocycler**	
Biometra	Uno	+
	Uno II	+
	Tpersonal Cycler	-
	T1 Thermocycler	+
	T3 Thermocycler	-
	TGradient	+
	TRobot	+
Bio-Rad	Genecycler	-
	iCycler™	+
	MyCycler	+
Corbett Research	Palm Cycler™	-
Eppendorf	Mastercycler® Gradient	+
	MasterCycler EP Gradient	+
	M384	-
Ericomp	SingleBlock System	+
	TwinBlock System	+
	Deltacycler I	+
ThermoHybaid	PCR Sprint	-
	PCR Express, Px2, PxE	+
	MultiBlock System and MBS®	+
	Touchdown	+
	Omnigene	+
	Omn-E	+
MJ Research™	PTC-200 DNA Engine™	+
	PTC-225/220/221 DNA Tetrad™/ Dyad™	+
	PTC-100™ with 96-well block	+
MWG	Primus 96	+
	Primus 384	-
	TheQ Lifecycler™	+
ABI	GeneAmp® 2400	-
	Geneamp® 2700\2720	+
	Geneamp® 9600	+
	Geneamp® 9700	+
	Geneamp® 9800 FAST Block	-
Stratagene	Robocycler	+
Takara	TP 240	-
	TP 3000	+
Techne	TC-412/512	+
	Touchgene Gradient	+
	Flexigene	+
	Genius	+
G-Storm	GS1/GS4/GSX	-

7. Die Leistung dieses Kits, welches den Master Mix ohne *Taq*-Polymerase verwendet, wurde nur mit der GMP-konformen Roche-*Taq*-DNA-Polymerase (Katalog-Nr. 03 734 927 001 oder Nr. 03 734 935 001) validiert. Die Testleistung ist bei der Verwendung anderer Enzyme unbekannt und muss durch den Nutzer bestimmt und validiert werden.

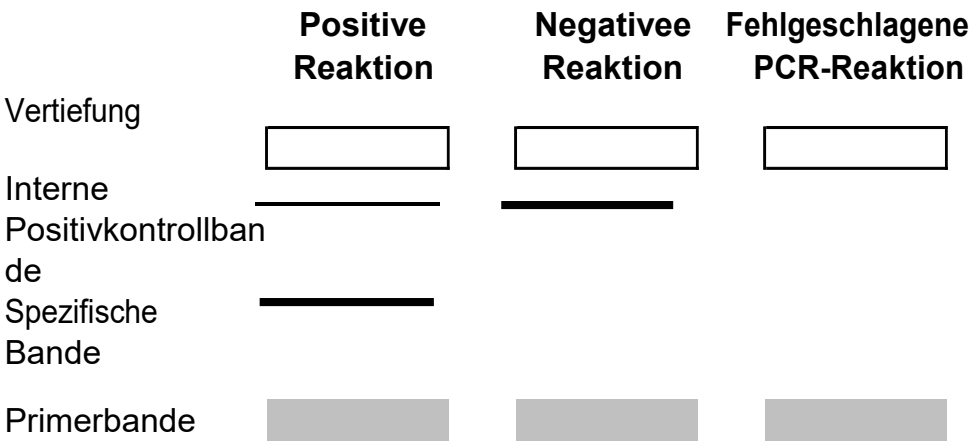
ERWARTETE WERTE

A. Datenanalyse

Untersuchen Sie das Gelphoto sorgfältig und bestimmen Sie die positiven Amplifikate.

1. Eine schneller wandernde, kürzere Bande lässt sich auf einer Gellinie beobachten, wenn (ein) spezifische(s) HLA-Allel(e) verstärkt wurde(n). Dies zeigt ein positives Testergebnis an.
   a. Halten Sie das Vorhandensein und Nichtvorhandensein spezifischer PCR-Produkte fest.
   b. Es ist sinnvoll, die in der chargenspezifischen Gebrauchsinformation angegebenen relativen Längen der spezifischen PCR-Produkte bei der Interpretation der Gelergebnisse zu kontrollieren. Für viele Amplifikate gibt es zwei oder mehr mögliche Längen spezifischer PCR-Produkte. Diese Vertiefungen enthalten mehrere Primerpaare, die je nach HLA- Allel(en) der Proben-DNA unterschiedlich große PCR-Produkte erzeugen.
   c. Vergleichen Sie das Muster der Gellinien der spezifischen PCR-Produkte mit den Informationen der chargenspezifischen Interpretations- und Auswertungstabellen, um die HLA-Typisierung der Proben-DNA zu erhalten.
2. Eine langsamer wandernde und längere interne Positivkontrollbande sollte in allen Gellinien (außer in der Gellinie der Negativkontrolle) zur Kontrolle einer erfolgreichen Amplifikation sichtbar sein. Die interne Positivkontrollbande kann in positiven Gellinien schwach sein oder fehlen.
   a. Halten Sie das Vorhandensein und die relative Länge der internen Positivkontrollbande fest. Unterschiedlich große Kontrollbanden helfen bei der richtigen Orientierung der Typisierung sowie bei der Identifizierung des Kits.
   b. Das Nichtvorhandensein von internen Positivkontrollbanden ohne spezifische PCR-Produkte weist auf eine fehlgeschlagene PCR-Reaktion hin.
      i. Falls HLA-Allele bei (einer) fehlgeschlagenen PCR- Reaktion(en) bestimmt werden können und die fehlgeschlagene(n) PCR-Reaktion(en) die Allelzuordnung nicht ändert/ändern, muss der Test nicht wiederholt werden.
      ii. Falls die fehlgeschlagene(n) PCR-Reaktion(en) jedoch die HLA-Allelzuordnung ändern könnte(n), muss die Typisierung wiederholt werden.
3. Das Vorhandensein von spezifischen PCR-Produkten oder einer internen Positivkontrollbande in (einer) Linie(n) der Negativkontrolle weist auf eine Kontaminierung mit PCR-Produkt(en) hin und macht alle Testergebnisse ungültig. Primeroligomere in einer Größenordnung von 40 bis 60 Basenpaaren können in der/den Linie(n) der Negativkontrolle beobachtet werden. Dies stellt keine Kontamination dar.

B. Gelinterpretation



1. Ein DNA-Größenmarker (100 Basenpaarleiter, DNA-Größenmarker Produkt- Nr. 103.202-100 oder DNA-Größenmarker für kurze Gelwanderungen 103.203-100) sollte in einer Vertiefung jeder Gelreihe oder gemäß den örtlichen Laborakkreditierungsrichtlinien eingesetzt werden.
2. Es können Banden entstehen, die länger als die internen Positivkontrollbanden sind. Diese sollten bei der Interpretation der Typisierungsergebnisse außer Acht gelassen werden.
3. Nicht verwendete Primer bilden eine unscharfe Bande, die kürzer als 50 Basenpaare ist.
4. Es können möglicherweise Primeroligomerprodukte beobachtet werden. Diese sind länger als die Primerbande jedoch kürzer als die spezifischen Banden.

SPEZIFISCHE LEISTUNGSMERKMALE

Qualitätskontrolle der Kit-Lose

Jede Primerlösung wird getestet und mit einer Reihe von 48 DNA-Proben von stark ausgeprägten Zelllinien der IHWC verglichen (siehe die chargenspezifischen Zelllinien-Validierungsblätter in der Gebrauchsinformation (Chargenspezifische Information)).

Verfahrensvergleich

Es wurde eine Studie durchgeführt, um die *Olerup*-SSP®-HLA-Typisierungskits mit und ohne *Taq*-Polymerase im PCR-Master-Mix zu vergleichen. Zweck dieser Studie war nachzuweisen, dass eine manuelle Zugabe die Untersuchungsergebnisse nicht beeinflusst und verschiedene *Taq*-Polymerase-Chargen zu denselben Ergebnissen führen. Die Studie enthielt die Typisierung

mit niedriger Auflösung der HLA-A, -B (Klasse I) und -DRB (Klasse II) von 15 DNA-Proben mit bekanntem HLA-Genotyp, die von der International Histocompatibility Workshop Collection bereitgestellt wurden. Die Proben wurden von anderen Personen vorbereitet und kodiert als jenen, welche die Tests durchgeführt haben. Das Testpersonal wusste nicht, welche HLA-Typen die Proben hatten. Jede Probe wurde entsprechend den Anweisungen der Gebrauchsinformation jeder Prüfung parallel mit der *Olerup*-SSP®-HLA-A-B- DR-Kombiplatte mit PCR-Master-Mix ohne *Taq*-Polymerase ("Test") und der *Olerup*-SSP®-HLA-A-B-DR-Kombiplatte mit PCR-Master-Mix einschließlich *Taq*-Polymerase ("Kontrolle") getestet. Alle Tests wurden im Labor der *Olerup* SPP AB in Saltsjöbaden, Schweden, unter Verwendung einer Kit-Charge oder von zwei *Taq*-Polymerase-Chargen durchgeführt. In der Studie wurde die GMP-konforme Roche-*Taq*-DNA-Polymerase verwendet. Die Tests aller Proben bestanden aus einer Typisierung mit niedriger Auflösung mit der Olerup-SSP®-HLA-A-B-DR-Kombiplatte mit: 1) PCR-Master-Mix einschließlich Taq-Polymerase (von der FDA genehmigter Test) (Kontrolltest), 2) PCR-Master-Mix plus Roche-Taq-DNA-Polymerase, GMP-konformes Produkt, 5 Einheiten/µl; Chargen-Nr. 1 (Testcharge Nr. 1), und 3) PCR-Master-Mix plus Roche-Taq- DNA-Polymerase, GMP-konformes Produkt, 5 Einheiten/µl; Chargen-Nr. 2 (Testcharge Nr. 2). Der Nachweis erfolgte nach der PCR mittels Gelelektrophorese. Die Ergebnisse sind nachfolgend zusammengefasst.

Vergleich	Übereinstimmung			
	Klasse-I-Typisierungsergebnisse (Anzahl an Übereinstimmungen/Gesamt)		Klasse-II-Typisierungsergebnisse (Anzahl an Übereinstimmungen/Gesamt)	% Übereinstimmung (95-%-Vertrauensbereich[a])
	HLA-A	HLA-B	HLA-DRB	
Testcharge Nr. 1 / Kontrollcharge	15/15	15/15	15/15	100% (84.7 – 100.0%)
Testcharge Nr. 1 / Konsens[b]	15/15	15/15	15/15	100% (84.7 – 100.0%)
Testcharge Nr. 2 / Kontrollcharge	15/15	15/15	15/15	100% (84.7 – 100.0%)
Testcharge Nr. 2 / Konsens	15/15	15/15	15/15	100% (84.7 – 100.0%)
Testcharge Nr. 1 / Testcharge Nr. 2	15/15	15/15	15/15	100% (84.7 – 100.0%)

[a] Auswertungsmethode
[b] Konsensergebnis der International Histocompatibility Workshop Collection

REFERENZEN

1. Olerup O, Zetterquist H. *HLA-DRB1*01* subtyping by allele-specific PCR-amplification: A sensitive, specific and rapid technique. *Tissue Antigens* 1991: **37**: 197-204.
2. Olerup O, Zetterquist H. HLA-DR typing by PCR amplification with sequence-specific primers (PCR-SSP) in 2 hours: An alternative to serological DR typing in clinical practice including donor-recipient matching in cadaveric transplantations. *Tissue Antigens* 1992: **39**: 225-235.
3. Die derzeitigen HLA-Allele sind zu finden unter:
   a. http://www.ebi.ac.uk/imgt/hla oder
   b. http://www.anthonynolan.org.uk/HIG.

PROBLEMBEHEBUNG

Problem	Ursache	Maßnahme
Keine Amplifikation (weder eine Amplifikation der internen Kontrollfragmente noch der spezifischen Amplifikationen).	DNA-Menge zu gering.	Messen Sie die DNA-Konzentration und überprüfen Sie, ob die hinzugegebene Menge stimmt. Eine RNA-Kontamination kann zu einer spektralphotometrischen falsch hohen DNA-Konzentration führen. Extrahieren Sie die DNA erneut sorgfältig mit frisch zubereiteten Lösungen. Wir empfehlen die automatisierte DNA-Extraktion mit dem QIAGEN EZ1 DSP DNA Blood System.
	Die DNA enthält PCR-Inhibitoren, z. B. Proteine, Ethanol (aus den Ausfällungsschritten), übrig gebliebene Matrizen aus DNA-Reinigungsprodukten der Festphase.	Messen Sie die DNA-Qualität. Wir empfehlen ein A260/A280-Verhältnis von 1,6 – 2,0 durch UV-Spektralphotometrie. Befolgen Sie die DNA-Extraktionsanleitung des Herstellers genau. Extrahieren Sie die DNA erneut. Wir empfehlen die automatisierte DNA-Extraktion mit dem QIAGEN EZ1 DSP DNA Blood System.
	Die DNA wurde aus heparinisiertem Blut extrahiert.	Verwenden Sie nicht heparinisiertes Blut oder DNA-Extraktionsverfahren für heparinisiertes Blut.
	Die DNA wurde in einem EDTA enthaltenden Puffer gelöst.	Extrahieren Sie die DNA erneut und lösen Sie sie in dH_20.

Problem	Ursache	Maßnahme
Fortsetzung: **Keine Amplifikation (weder eine Amplifikation der internen Kontrollfragmente noch der spezifischen Amplifikationen).**	Unbeabsichtigte Zufuhr von Bleichmittel im Test	Überprüfen Sie Bereiche, in denen möglicherweise Bleichmittel zugeführt werden könnten.
	Die Kits werden nicht bei geeigneten Temperaturen gelagert.	Lagern Sie die Kits bei -20°C.
	Der Thermocycler funktioniert nicht richtig.	Kalibrieren Sie den Thermocycler und überprüfen Sie das PCR-Programm. Ein Thermocycler, der für regelmäßige PCR-SSP-Typisierungen verwendet wird, sollte alle 6-12 Monate kalibriert werden.
	Nicht ausreichende Berührung des Thermocycler-Heizblocks (und -Deckels) mit der SSP-Typisierungsplatte.	Verwenden Sie die richtige Platte/Halterung für 0,2 ml dünnwandige Reagenzvertiefungen (siehe Bedienungsanleitung des Thermocyclers).
Ausfälle	PCR-Folie/PCR-Röhrchendeckel, die nicht fest verschlossen sind, führen zu einer Evaporation und daher zum Ausfall der Amplifikation.	Stellen Sie sicher, dass die PCR-Folie/alle Deckel fest verschlossen sind. Das *Olerup*-SSP®-Druckkissen (Produkt-Nr. 103.505-06) kann auf den adhäsiven PCR-Folien angebracht werden, um eine Evaporation während des Wärmezyklus zu verhindern.
	Fehler beim Gelauftrag.	Überprüfen Sie, ob die richtige Anzahl an Vertiefungen befüllt wurde und ob jede Vertiefung in etwa dieselbe Menge PCR-Mischung enthält.
	Verwendung von nicht kalibrierten Pipetten.	Kalibrieren Sie alle Pipetten regelmäßig gemäß den

		Empfehlungen des Herstellers.
	Pipettierfehler.	Pipettieren Sie sorgfältiger.
	Master Mix und Proben-DNA wurden vor der Verwendung nicht richtig vermischt.	Mischen Sie sie vor der Verwendung kurz mit dem Vortex-Mixer. Wir empfehlen die Durchmischung mit dem Vortex-Mixer nach jeder Reihe.
	Eine ungleichmäßige Menge DNA/Master-Mix-Mischung wurde in die Vertiefungen gegeben.	Pipettieren Sie sorgfältiger.

Problem	Ursache	Maßnahme
Schwache interne Kontrollfragmente.	Unreine DNA.	Messen Sie die DNA-Qualität. Das A260/A280-Verhältnis sollte 1,6 – 2,0 durch UV-Spektralphotometrie betragen. Eine RNA-Kontamination kann zu einer spektralphotometrischen falsch hohen DNA-Konzentration führen. Zersetzte DNA führt zu Schlieren in den Gellinien. Extrahieren Sie die DNA erneut sorgfältig mit frisch zubereiteten Lösungen. Wir empfehlen die automatisierte DNA-Extraktion mit dem QIAGEN EZ1 DSP DNA Blood System.
	DNA-Menge zu gering.	Messen Sie die DNA-Konzentration und stellen Sie diese auf 30 ng/µl bzw. 15 ng/µl für DNA, die durch das QIAGEN EZ1 DSP DNA Blood System extrahiert wurde, ein. Eine RNA-Kontamination kann zu einer spektralphotometrischen falsch hohen DNA-Konzentration führen. Zersetzte DNA führt zu Schlieren in den Gellinien. Extrahieren Sie die DNA erneut sorgfältig mit frisch zubereiteten Lösungen. Wir empfehlen die automatisierte DNA-Extraktion mit dem QIAGEN EZ1 DSP DNA Blood System.

Problem	Ursache	Maßnahme
Fortsetzung: **Schwache interne Kontrollfragmente.**	Zu hohe Ausglühtemperatur, der Thermocycler ist nicht kalibriert.	Kalibrieren Sie den Thermocycler und überprüfen Sie das PCR-Programm. Ein Thermocycler, der für regelmäßige PCR-SSP-Typisierungen verwendet wird, sollte alle 6-12 Monate kalibriert werden.
	Der PCR-Master-Mix wurde länger als 2 Wochen bei +4°C gelagert.	Lagern Sie den PCR-Master-Mix richtig.
Unspezifische Amplifikation (Leitern oder Schlieren)	Zu hohe DNA-Konzentration verwendet.	Messen Sie die DNA-Konzentration und stellen Sie diese auf 30 ng/µl bzw. 15 ng/µl für DNA, die durch das QIAGEN EZ1 DSP DNA Blood System extrahiert wurde, ein. Einige Primerlösungen führen häufiger zu unspezifischen Amplifikationen, siehe Fußnoten in jeder chargenspezifischen Auswertungstabelle.
	Unreine DNA.	Alle Fragmente, die größer als die internen Kontrollfragmente sind, sollten bei der Interpretation der erhaltenen Ergebnisse außer Acht gelassen werden. Überprüfen Sie die DNA-Qualität. Extrahieren Sie die DNA erneut. Wir empfehlen die automatisierte DNA-Extraktion mit dem QIAGEN EZ1 DSP DNA Blood System. Einige Primerlösungen führen häufiger zu unspezifischen Amplifikationen, siehe Fußnoten in jeder chargenspezifischen Auswertungstabelle.

Problem	Ursache	Maßnahme
Die Amplifikationssignale werden mit der Zeit immer schwächer.	Die Ethidiumbromid-Agarose-Gelfärbelösung ist alt.	Stellen Sie eine neue Ethidiumbromid-Lösung her, um eine bessere Färbung des Agarose-Gels und ein besseres Signal zu erhalten. Die Primertrübung kann leicht erkannt werden, wenn die Färbung des Agarose-Gels normal ist.
	Eine der UV-Lampen ist kaputt.	Überprüfen Sie die UV-Licht-Ausrüstung. Die Primertrübung kann leicht erkannt werden, wenn das UV-Licht normal ist.
	Zu geringe DNA-Konzentration verwendet.	Messen Sie die DNA-Konzentration und stellen Sie diese auf 30 ng/µl bzw. 15 ng/µl für DNA, die durch das QIAGEN EZ1 DSP DNA Blood System extrahiert wurde, ein.
	Zu hohe Ausglühtemperatur, der Thermocycler ist nicht kalibriert.	Kalibrieren Sie den Thermocycler und überprüfen Sie das PCR-Programm. Ein Thermocycler, der für regelmäßige PCR-SSP-Typisierungen verwendet wird, sollte alle 6-12 Monate kalibriert werden.
Ungewöhnliche Amplifikationsmuster.	Die falsche chargenspezifische Interpretationstabelle/das falsche Arbeitsblatt wird verwendet.	Überprüfen Sie die Chargennummer des verwendeten Produkts und der verwendeten Interpretationstabelle/des Arbeitsblatts.
	Falsche Reihenfolge beim Gelauftrag.	Überprüfen Sie die Anordnung der Mischungen und Gellinien.
	Das Amplifikationsmuster enthält ein falsches Positivergebnis.	Siehe unten.
	Das Amplifikationsmuster enthält ein falsches Negativergebnis.	Siehe unten.

Problem	Ursache	Maßnahme
Falsch positive Amplifikationen.	DNA-Kontamination.	Verwenden Sie Handschuhe, Pipettenspitzen mit Sperren (Filterverschlüsse) und getrennte Räume für die Handhabung vor der PCR-Behandlung und nach der PCR-Behandlung. Stellen Sie die richtige Handhabung aller Proben in allen Schritten sicher. Suchen Sie mit dem Kit *Olerup* SSP® Wipe Test nach Kontaminationen.
	Unreine DNA.	Messen Sie die DNA-Qualität. Befolgen Sie die DNA-Extraktionsanleitung des Herstellers genau. Testen Sie andere DNA-Extraktionssysteme. Extrahieren Sie die DNA erneut. Wir empfehlen die automatisierte DNA-Extraktion mit dem QIAGEN EZ1 DSP DNA Blood System.
	Zu hohe DNA-Konzentration verwendet.	Messen Sie die DNA-Konzentration und stellen Sie diese auf 30 ng/µl bzw. 15 ng/µl für DNA, die durch das QIAGEN EZ1 DSP DNA Blood System extrahiert wurde, ein.
	Ausglühtemperatur zu gering.	Kalibrieren Sie den Thermocycler und überprüfen Sie das PCR-Programm. Ein Thermocycler, der für regelmäßige PCR-SSP-Typisierungen verwendet wird, sollte alle 6-12 Monate kalibriert werden.
	Große Verzögerung zwischen dem PCR-Aufbau und dem Beginn des Wärmezyklus.	Die Verzögerung vor dem Wärmezyklus sollte nicht mehr als 5 Minuten betragen.
	Verzögerung zwischen der Platzierung der Typisierungsplatten im Thermocycler und dem Beginn des Zyklus.	Verwenden Sie einen vorgeheizten Thermocycler.

Problem	Ursache	Maßnahme
Fortsetzung: **Falsch positive Amplifikationen.**	Zu viel Ethidiumbromid verwendet.	Verwenden Sie die empfohlene Menge Ethidiumbromid.
	Falsche Interpretation eines Produkts als eine spezifische Bande.	Überprüfen Sie die richtige Bandengröße und die Fußnoten auf der chargenspezifischen Interpretationstabelle/dem Arbeitsblatt und der Ausprägungstabelle.
	Das Amplifikationsmuster enthält ein falsches Positivergebnis.	Überprüfen Sie, ob alle spezifischen Amplifikationen die richtige Größe haben, oder ob ein Produkt (Verschleppung, Primerdimer) fälschlicherweise als Amplifikation interpretiert wurde.
	Falsche Reihenfolge beim Gelauftrag.	Überprüfen Sie die Anordnung der Mischungen und Gellinien.
Falsch negative Amplifikationen.	Der Thermocycler ist nicht richtig kalibriert.	Kalibrieren Sie den Thermocycler und überprüfen Sie das PCR-Programm. Ein Thermocycler, der für regelmäßige PCR-SSP-Typisierungen verwendet wird, sollte alle 6-12 Monate kalibriert werden. Falls das Problem durch die Kalibrierung nicht behoben wurde, typisieren Sie den Test mit einer Referenzprobe derselben Ausprägung erneut. Falls das negative Ergebnis bestätigt wird, kontaktieren Sie den Kundendienst.
	Falsche Reihenfolge beim Gelauftrag.	Überprüfen Sie die Anordnung der Mischungen und Gellinien.

Problem	Ursache	Maßnahme
Allgemeine Gelprobleme (verschwommene Gele und/oder verschmierte Linien).	Degenerierte DNA-Probe.	Erscheint als Schliere in den Gellinien. Isolieren Sie DNA aus einer frischen Probe.
	Starke Schlierenbildung in willkürlichen Vertiefungen.	Ungleichmäßige DNA-Suspensionen. Stellen Sie sicher, dass die Proben-DNA gelöst ist, bevor Sie Ihr Aliquot entnehmen. Mischen Sie die gelöste DNA-Probe mit dem Vortex-Mixer.
	PCR-Produkt ist aus der Vertiefung geflossen.	Richten Sie die Pipettenspitzen sorgfältig mit den Gelvertiefungen aus und verteilen Sie sie langsam.
	Der Elektrophoresepuffer ist möglicherweise zu warm.	Stellen Sie einen neuen TBE-Puffer her. Stellen Sie eine niedrigere Spannung ein.
	Agarose-Gel mit dem falschen Masseprozent wurde verwendet.	Stellen Sie sicher, dass das empfohlene 2 % Agarose-Gel verwendet wird.
	Agarose ist nicht vollständig aufgelöst.	Kurz erneut erhitzen, um die Agarose aufzulösen.
	Falsche TBE-Konzentration.	Verwenden Sie die empfohlene 0,5 x TBE-Konzentration.
	Gel nicht ausgekühlt.	Das Gel kann erst 15 Minuten nach Guss verwendet werden.
	Das Gel ist zu alt.	Gießen Sie das Gel nicht zu früh im Voraus.
	Der verwendete Gelkamm hat zu dicke Kerben.	Verwenden Sie dünne Kämme (4 x 1 mm).
	Die Gelplatte ist nicht UV-durchlässig.	Entfernen Sie vor der Betrachtung das Gel von der Gelplatte.
	Das Gelbild ist zu hell.	Zu viel Ethidiumbromid verwendet. Überprüfen Sie die Kameraeinstellungen.
	Das Gelbild ist zu dunkel.	Verwenden Sie die empfohlene Menge Ethidiumbromid. Überprüfen Sie die Kameraeinstellungen.

Problem	Ursache	Maßnahme
Generelle Probleme mit falsch negativen Amplifikationen oder ähnliche Probleme, die sich in - von Lauf zu Lauf - uneinheitlichen Ergebnissen zeigen.	Die Einstellung für die Heizrate ist zu hoch.	Bitte beachten: Die Olerup SSP Kits sind auf dem GeneAmp 9700 Thermocycler validiert worden. Dabei wurde der 9600 Modus verwendet. Wenn die Heizrate höher ist als das Äquivalent zu dem oben beschriebenen Modus kann diese Einstellung einen Einfluss auf die Typisierungsergebnisse haben.

Gebrauchsanweisung
***Olerup* SSP® HLA-Typisierungskits ohne *Taq*-Polymerase**

IN DIESEM DOKUMENT/PRODUKT VERWENDETE HANDELSMARKEN.

Olerup SSP®ist eine eingetragene Handelsmarke von *Olerup* SSP AB.
Qiagen™ ist eine Handelsmarke von QIAGEN.

HINWEIS FÜR DEN KÄUFER: Die *Olerup*-SSP®-Kits ohne *Taq*-Polymerase – Dieses Produkt wurde für eine Verwendung in Polymerasekettenreaktionsverfahren ("PCR") mit der GMP-konformen Roche-*Taq*-Polymerase (Katalog-Nr. 03 734 927 001 oder Nr. 03 734 935 001) optimiert, welche in den Schutzbereich von Patenten der Roche Molecular Systems, Inc. und der F. Hoffmann-La Roche Ltd. (“Roche") fallen kann. Das Labor ist dafür verantwortlich, sich mit der Roche Molecular Systems, Inc. in Verbindung zu setzen und so zu ermitteln, ob gemäß diesen Patenten eine Lizenz erforderlich ist.

GARANTIE

Olerup SSP AB sichert dem ursprünglichen Käufer zu, dass seine Produkte bei normaler Handhabung und Verwendung keine Material- und Bearbeitungsfehler aufweisen. *Olerup* SSP ABs einzige Verpflichtung gemäß dieser Garantie ist es, Produkte, die nicht den auf der Produktbeschreibung genannten Leistungsstandards entsprechen, kostenlos zu ersetzen.
Diese Garantie gilt nur für Produkte, die gemäß den Empfehlungen von *Olerup* SSP AB gehandhabt und gelagert wurden. Produkte, die geändert, falsch verwendet oder missbraucht wurden, werden nicht von dieser Garantie gedeckt. Alle Forderungen gemäß dieser Garantie müssen *Olerup* SSP AB schriftlich zusammen mit einer Kopie der Eingangsrechnung zugesandt werden. Diese Garantie gilt an Stelle aller anderen Garantien, ob ausdrücklich oder stillschweigend, einschließlich der Zusicherung der Gebrauchstauglichkeit und der Gewährleistung, dass das Produkt für einen bestimmten Zweck geeignet ist. *Olerup* SSP AB ist in keinem Fall für beiläufig entstandene oder mittelbare Schäden haftbar.
Dieses Produkt darf nur mit schriftlicher Genehmigung durch *Olerup* SSP AB, Franzengatan 5, SE-112 51 Stockholm, Schweden, neu gestaltet, wieder verpackt oder auf irgendeine Weise weiterverkauft werden.
Behandeln Sie alle Proben als potentiell infektiös. Alle Arbeiten sollten mit Handschuhen und angemessener Schutzkleidung ausgeführt werden.

ZUSICHERUNG

Olerup SSP AB gewährleistet, dass die Primer in den *Olerup*-SSP®-Typisierungsplatten die im Arbeitsblatt, den chargenspezifischen Auswertungs- und den Interpretationstabellen der Gebrauchsinformation angegebenen Eigenschaften aufweisen.

ADRESSEN:

Hersteller:
Olerup SSP AB, Franzengatan 5, SE-112 51 Stockholm, Sweden.
Tel.: +46-8-508 939 00717 88 27
Fax: +46-8-717 88 18
E-Mail: olerup-se@caredx.com
Webseite: http://www.labproducts.caredx.com

Vertrieben durch:
Olerup GmbH, Löwengasse 47 / 6, AT-1030 Wien, Österreich.
Tel.: +43-1-710 15 00
Fax: +43-1-710 15 00 10
E-Mail: olerup-at@caredx.com
Webseite: http://www.labproducts.caredx.com

Olerup Inc., 901 S. Bolmar St., Suite R, West Chester, PA 19382
Tel.: 1-877-OLERUP1
Fax: 610-344-7989
E-Mail: olerup-us@caredx.com
Webseite: http://www.labproducts.caredx.com

Wenden Sie sich für Informationen über CareDx-Händler weltweit an die **Olerup GmbH**.