

DE

HLA SSP Kits

SSP-Reagenzienkit für die HLA-Typisierung auf DNA-Basis
Ready to use SSP reagent kit for DNA based HLA typing
Trousse de réactifs SSP pour le typage HLA, basé sur l'ADN
Kit di reagenti SSP per tipizzazione HLA basata sul DNA
Juego de reactivos SSP para la tipificación del antígeno

IVD

For In Vitro Diagnostic Use

HLA-A SSP	REF	826 201	CE 0197
HLA-B SSP	REF	826 206	CE 0197
HLA-C SSP	REF	826 212	CE
DRB SSP	REF	826 215	CE 0197
DQB SSP	REF	826 220	CE
ABDR SSPtray	REF	826 230	CE 0197
ABC SSPtray	REF	826 240	CE 0197

**Besondere Hinweise für den Anwender / Special remarks for the user /
Remarques importantes pour l'utilisateur / Avvertenze per l'utilizzatore /
Indicaciones importantes para el usuario:**

SSP TYPING KITS WITH TAQ-POLYMERASE - LIMITED LICENSE:

The purchase price of this product includes limited, non-transferable rights under U.S. Patents 4,683,202, 4,683,195 and 4,965,188 and their foreign counterparts, owned by Roche Molecular Systems, Inc. and F. Hoffmann-La Roche Ltd ("Roche"), to use only this amount of the product to practice the Polymerase Chain Reaction ("PCR") Process described in said patents solely for the HLA Typing applications of the purchaser solely for organ or tissue or bone marrow transplantation, and explicitly excludes analysis of forensic evidence or parentage determination. The right to use this product to perform and to offer commercial services for HLA Typing for organ or tissue transplantation using PCR, including reporting the results of the purchaser's activities for a fee or other commercial consideration, is also hereby granted. Further information on purchasing licenses to practise PCR may be obtained by contacting, in the United States, the Director of Licensing at Roche Molecular Systems, Inc. 1145 Atlantic Avenue, Alameda, California 94501, and outside the United States, the PCR Licensing Manager, F. Hoffmann-La Roche Ltd, Grenzacherstr. 124, CH-4070 Basel, Switzerland.

SSP TYPING KITS WITHOUT TAQ-POLYMERASE - DISCLAIMER OF LICENSE:

This product is optimized for use in the Polymerase Chain Reaction ("PCR") Process which is covered by patents owned by Roche Molecular Systems, Inc. and F. Hoffmann-La Roche Ltd ("Roche"). No license under these patents to use the PCR Process is conveyed expressly or by implication to the purchaser by the purchase of this product. Further information on purchasing licenses to practise PCR may be obtained by contacting, in the United States, the Director of Licensing at Roche Molecular Systems, Inc. 1145 Atlantic Avenue, Alameda, California 94501, and outside the United States, the PCR Licensing Manager, F. Hoffmann-La Roche Ltd, Grenzacherstr. 124, CH-4070 Basel, Switzerland.

REF	GB	Article number	IVD	GB	For in vitro diagnostic use			
	DE	Artikelnummer		DE	Nur zur in-vitro Diagnostik			
	ES	Artículo número		ES	Sólo para el diagnóstico in vitro			
	IT	Codice prodotto		IT	Solo per la diagnostica in vitro			
	FR	Référence du produit		FR	Pour le diagnostic in vitro			
	NL	Artikelnummer		NL	Voor in vitro gebruik			
	DK	Artikelnummer		DK	Til diagnostik brug i glas			
CZ	Katalogové číslo	CZ	Použití pro in vitro diagnostiku					
BLOCK	GB	PCR block	NC	GB	negative control	CK	GB	PCR cocktail
	DE	PCR-Block		DE	Negativkontrolle		DE	PCR-Cocktail
	ES	PCR bloque		ES	control negativo		ES	PCR coctel
	IT	PCR blocco		IT	controllo negativo		IT	PCR cocktail
	FR	PCR bloc		FR	contrôle négatif		FR	PCR cocktail
	NL	PCR blok		NL	negatieve controle		NL	PCR cocktail
	DK	PCR blok		DK	negativ kontrol		DK	PCR blanding
CZ	PCR blok	CZ	negativní kontrola	CZ	PCR koktejl			

INHALT

1.	Einleitung	4
1.1	Verwendungshinweis	4
1.2	Theoretischer Hintergrund.....	4
1.3	Testprinzip	4
2.	Material	4
2.1	Inhalt der HLA SSP Kits.....	4
2.2	Allgemeine Sicherheitshinweise.....	5
2.3	Lagerung und Haltbarkeit.....	5
3.	Erforderliche Geräte	5
3.1	Programmierung des Thermocyclers.....	5
3.2	Gelelektrophorese.....	6
4.	Probenmaterial	6
4.1	DNA Isolierung.....	6
4.2	Probenvorbereitung.....	6
5.	Testdurchführung	7
5.1	Erforderliches Material.....	7
5.2	Zusätzlich erforderliches Material.....	7
5.3	PCR.....	7
5.4	Gelelektrophorese.....	8
6.	Ergebnisse	9
6.1	Auswertung.....	9
6.2	Grenzen des Verfahrens.....	9
6.3	Qualitätskontrolle.....	10
6.4	Spezifische Charakterisierung.....	10
7.	Fehlersuche	11
8.	Literatur	12

1. Einleitung

1.1 Verwendungszweck

HLA SSP Kits (SSP, Sequenz Spezifische Primer) werden zur Bestimmung der HLA Klasse I und Klasse II Merkmale auf DNA Ebene eingesetzt.

1.2 Theoretische Grundlagen

Das HLA-System ist ein komplexes, kodominant vererbtes Antigenensystem, welches im Immunsystem bei der Unterscheidung von „selbst“ und „nicht-selbst“ eine wichtige Rolle spielt. Bei einer Organtransplantation ist die Kompatibilität der HLA-Antigene zwischen Spender und Empfänger eine der Hauptkriterien für das Überleben des fremden Organs. Die Bestimmung der HLA-Antigene ist eine der Grundlagen für die Spender-Empfänger-Auswahl.

Neue Wege haben sich für die moderne Diagnostik mit der Einführung der Nachweismethoden auf DNA-Basis eröffnet. HLA-Antigene können sich durch den Austausch von nur einer Aminosäure auf der Polypeptidkette unterscheiden. Diese größtenteils identischen Strukturen mit Hilfe der Serologie zu unterscheiden ist meist nicht möglich. Das Auflösungsvermögen der serologischen Methode ist demzufolge begrenzt. Da die DNA-Sequenzen von den meisten HLA-Allelen inzwischen bekannt sind, ist es möglich Variationen dieser Sequenzen mittels synthetischer Oligonukleotide zu identifizieren. Durch Amplifikation genomischer DNA (PCR, Polymerase Chain Reaction) mit spezifischen Primerpaaren (SSP, Sequence Specific Primers) ist es nun möglich eine große Anzahl der bisher bekannten HLA-Allele zu identifizieren.

1.3 Testprinzip

HLA SSP Kits sind Testsysteme zur Typisierung von HLA-Merkmalen mit Hilfe der PCR-Technik. Die SSP-Methode nutzt Allel-spezifische Primer in der Amplifikationsreaktion zur Typisierung. Die Methode beruht auf dem Prinzip, dass nur Primer, deren Sequenzen vollständig komplementär zur Zielsequenz einer vorliegenden DNA-Probe sind, an diese DNA binden und in einer PCR-Reaktion ein Amplifikat erzeugen. Nicht-komplementäre Primer binden nicht an die DNA und es findet keine Amplifikation statt.

Der Nachweis der amplifizierten DNA erfolgt mit Hilfe der Agarose-Gelelektrophorese. Eine erfolgreiche Amplifikation erzeugt ein DNA-Fragment von definierter Länge, das im Gel als Bande erkennbar ist. Findet keine Amplifikation statt, fehlt diese Bande.

Die Zusammensetzung der Primermixtur erlaubt eine eindeutige Zuordnung der HLA-Merkmale. Einsatzgebiet des Nachweissystems ist die Bestimmung der individuellen HLA-Allele bei Organ Spendern und -empfängern sowie bei Patienten mit Blut- oder Blutkomponentensubstitution.

2. Material

2.1 Inhalt der HLA SSP Kits

Der Inhalt der HLA SSP Kits ist ausreichend für 24 Tests.

- 24 PCR-Blöcke **BLOCK**, bestehend aus PCR-Gefäßen, die die getrockneten Primer/Nukleotidgemische enthalten. Als Orientierungshilfe ist an der Position 1 (=H1) eine schwarze Markierung angebracht.
- PCR-Cocktail **CK** (gebrauchsfertig)
Der PCR-Cocktail beinhaltet PCR-Puffer (Endkonzentration: 1,5 mM MgCl₂, 50 mM KCl, 10 mM Tris-HCl, 0,001% Gelatine), Kresolrot und Glycerin.
- PCR-Deckelstreifen oder PCR Abdeckfolien
- Auswerteschemata, Reaktionsschema, Primerpositionen

Eine Negativkontrolle **NC** ist als zusätzliches PCR-Röhrchen (farblos) beigelegt, wenn sie nicht bereits im PCR-Block **BLOCK** integriert ist.

2.2 Allgemeine Sicherheitshinweise

Reagenzien nur zur in-vitro Diagnostik **IVD**

Achtung: Der Test ist nur von geschultem und autorisiertem Fachpersonal durchzuführen.

Achtung: Verwendung aller Reagenzien nur unter Beachtung der im Labor gültigen Vorschriften und Vorsichtsmaßnahmen. Patientenmaterial als potentiell infektiös betrachten. Nicht mit dem Mund pipettieren.

Achtung: Alle Testreagenzien sollten als potentiell infektiös gehandhabt werden und die entsprechenden Vorsichtsmaßnahmen getroffen werden.

Achtung: Benutzte PCR Blöcke sollten als potentiell infektiös gehandhabt werden und entsprechend der gültigen nationalen Richtlinien entsorgt werden.

Achtung: Keine Reagenzien nach Ablauf der auf den Etiketten vermerkten Verfallsdaten verwenden.

Achtung: Keine Reagenzien mit Verdacht auf mikrobielle Kontamination verwenden.

Achtung: Getrennte Pipettensätze für den Prä-PCR-Bereich und den Post-PCR-Bereich verwenden.

Achtung: **Ethidiumbromid**, das zum Anfärben der DNA in der Gelelektrophorese verwendet wird, **ist potentiell kanzerogen**. Beim Arbeiten mit gefärbten Gelen immer Schutzhandschuhe benutzen. Entsorgung durch Verbrennung.

Achtung: Beim Arbeiten mit UV-Licht immer einen UV-blockierenden Augenschutz verwenden.

Für detaillierte Informationen können Sicherheitsdatenblätter für alle Reagenzien von Biotest angefordert werden.

2.3 Lagerung und Haltbarkeit

Die SSP-Reagenzien (**BLOCK**, **CK**, **NC**) müssen bei 2...8°C gelagert werden. Das Verfalldatum befindet sich auf den Verpackungen der Kitkomponenten.

PCR-Blöcke **BLOCK** sind in Beutel eingeschweißt. Die in einem geöffneten Beutel verbleibenden, nicht verwendeten Blöcke sollten in der Originalverpackung verbleiben, die mit Tesafilm verschlossen wird, um das Eindringen von Feuchtigkeit zu vermindern. Angebrochene Verpackungen sollten innerhalb von 4 Wochen aufgebraucht werden.

3. Erforderliche Geräte

3.1 Programmierung des Thermocyclers

Programm HLA SSP:

Initiale Denaturierung:	94°C	2 Min.		
Denaturierung:	94°C	10 Sek.]	10 Zyklen
Annealing & Extension:	65°C	60 Sek.		
Denaturierung:	94°C	10 Sek.]	20 Zyklen
Annealing:	61°C	50 Sek.		
Extension:	72°C	30 Sek.		

Das nachstehende PCR-Programm ist an die Thermocycler der Fa. Perkin Elmer adaptiert. Die Aufheiz/Abkühlrate beträgt für den PE 9700 durchschnittlich 1°C/Sekunde für die Proben und die Temperaturgenauigkeit wird mit durchschnittlich ± 0,25°C im Bereich von 35-100°C angegeben. Andere Thermocycler als die empfohlenen müssen vom Anwender validiert werden. Thermocycler, die keine

justierbare Andruckplatte haben benötigen eine Adapter-Matte, um eine optimale Wärmeübertragung vom Heizdeckel zu den PCR-Röhrchen zu gewährleisten.

3.2 Gelelektrophorese

Durchführung der Gelelektrophorese siehe Abschnitt 5.

4. Probenmaterial

4.1 DNA Isolierung

Genomische DNA kann aus allen kernhaltigen Zellen gewonnen werden. Am einfachsten ist die Isolierung aus Zellsuspensionen (Blut, Buffy Coat, Kulturzellen). Es existieren eine ganze Reihe von Protokollen für die Isolierung von DNA aus Zellen. Für die PCR-SSP Testung kommen nur solche Verfahren in Frage, die DNA in ausreichender Qualität und Quantität für die PCR liefern, wie z.B. die Aussalzmethode (2).

Unter den Anbietern kommerzieller DNA-Extraktionskits sind z.B. "Puregene" der Fa. Genra Systems oder "Super Quick Gene" der Fa. Analytical Genetic Testing Center geeignet.

4.2. Probenvorbereitung

4.2.1 Proben

Zur Typisierung ist antikoaguliertes peripheres Blut (z.B. Natriumcitrat, EDTA) erforderlich. Informationen zur Lagerung und Stabilität der Blutproben ist bei dem Anbieter des DNA-Extraktionskits zu erfragen und muss vom Anwender validiert werden.

4.2.2 Kontamination

Verunreinigungen der DNA durch PCR-Inhibitoren wie Hämoglobin, Heparin, Ethanol u.a. können empfindliche Störungen der PCR zur Folge haben. Aus diesem Grunde sollte z.B. **kein** Heparinblut, sondern Citrat- oder EDTA-Blut als Ausgangsmaterial für die DNA-Isolierung verwendet werden. Wenn der Patient heparinisiert ist muss eventuell eine andere DNA-Isolierungsmethode oder ein anderes Ausgangsmaterial zur DNA Isolierung eingesetzt werden.

4.2.3 Hämolyisiertes Probenmaterial

Der Einsatz von lipämischen oder hämolyzierten Proben ist zu vermeiden. Proben ohne Antikoagulanzen oder mehrfach gefrorenes und wieder aufgetautes Material sollte vermieden werden, da diese Bedingungen nicht gewährleisten, dass die daraus isolierte DNA in ausreichender Qualität und Quantität vorliegt.

4.2.4 DNA Quantität

Die isolierte DNA in sterilem, destilliertem Wasser resuspendieren und die Konzentration auf 100 ± 50 ng/ μ l einstellen. DNA **sollte nicht** in Reagenzien **resuspendiert werden**, die Chelatbildner enthalten, wie z.B. **EDTA** in einer Konzentration $> 0,5$ mM.

4.2.5 DNA Qualität

Die Konzentrationsbestimmung der DNA erfolgt durch Messung der optischen Dichte (OD) bei 260 nm (A_{260}). Ein Wert A_{260} von 1 (= 1 OD) entspricht ca. 50 μ g/ml doppelsträngiger DNA.

Zur Bestimmung von Verunreinigungen der DNA mit Protein wird zusätzlich die Absorption bei 280 nm gemessen und der Quotient A_{260}/A_{280} gebildet. Reine DNA weist ein Verhältnis A_{260}/A_{280} von 1,8 oder höher auf. A_{260}/A_{280} -Werte unter 1,8 sind Hinweise auf Verunreinigungen durch Protein.

Bei einem Wert $A_{260}/A_{280} = 1,5$ liegt der Proteinanteil in der DNA-Präparation bei ca. 50%.

Gute PCR-SSP Testergebnisse erfordern DNA mit einem Quotienten A_{260}/A_{280} von $\geq 1,6$.

➡ Die Reinheit und Konzentration der DNA ist von entscheidender Bedeutung für optimale Testergebnisse.

Die isolierte DNA kann bei -20°C über einen längeren Zeitraum (mehr als 1 Jahr) gelagert werden. Einzelheiten zur Lagerung und Stabilität der isolierten DNA ist der technischen Information des Herstellers des verwendeten DNA Extraktionskits zu entnehmen.

5. Durchführung

5.1 Erforderliches Material

Siehe Punkt 2.1 Inhalt des HLA SSP Kits.

5.2 Zusätzlich erforderliches Material

5.2.1 Probenmaterial (DNA)

- UV-Spektralphotometer

5.2.2 PCR

- Taq DNA Polymerase (5 U/µl, z.B. PE Applied Biosystems)
- Thermocycler mit beheizbarem Deckel (z.B. PE 9600, PE 9700 Fa. PE Applied Biosystems)
- verstellbare Pipetten
- Eppendorf Multipette mit Combitips (10 µl)
- Pipettenspitzen mit Filter
- destilliertes Wasser (dH₂O)

5.2.3 Gelelektrophorese

- Agarose (für die Molekularbiologie)
- Gelkammer
- 5 x TBE-Puffer
 - Tris(hydroxymethyl)-aminomethan (Base)
 - Borsäure (H₃BO₃)
 - Na₂EDTA
- Ethidiumbromidlösung (10 mg/ml)
- DNA-Längenstandard (50-1000 bp Marker) (nicht unbedingt erforderlich)
- Magnetrührer mit Heizplatte oder Mikrowellengerät
- verstellbare Pipetten
- Polaroid-Kamera mit UV-Filter, Polaroidfilm Typ 667
- UV-Transilluminator (~ 200 - 300 nm)
- Netzgerät
- destilliertes Wasser (dH₂O)

5.3 PCR (Polymerase Chain Reaction)

5.3.1 Vorsichtsmaßnahmen

Die PCR ist eine äußerst empfindliche Methode, um selbst geringste Mengen an DNA effektiv zu vermehren. Daraus folgt, dass selbst Spuren kontaminierender DNA in einer Probe in der PCR-Reaktion amplifiziert werden und das Testergebnis verfälschen können. Eine besondere Kontaminationsquelle ist amplifizierte DNA, die mit Proben in Kontakt kommt, die noch zu amplifizieren sind. Zur Vermeidung von Kontaminationen mit amplifiziertem Material empfiehlt sich eine strenge räumliche Trennung der Arbeitsbereiche wie folgt:

1. Prä-PCR-Bereich:
Alle Arbeiten vor der PCR (DNA-Isolierung und Lagerung, Ansetzen der PCR, Herstellung und Lagerung von Reagenzien und Lösungen zur DNA-Extraktion und PCR).
2. Post-PCR-Bereich:
Thermocycler, Gelelektrophorese, Auswertung, Lagerung von amplifizierter DNA.
Geräte und Verbrauchsmaterialien aus dem Post-PCR-Bereich dürfen nicht in den Prä-PCR-Bereich gelangen.
3. Für die Arbeiten im Prä-PCR-Bereich sollten Pipetten mit Aerosolschutz (Pipettenspitzen mit Filter) benutzt werden. Es wird empfohlen, bei jeder Amplifikation eine negative Kontrolle mitzuführen, um Kontamination mit fremder DNA anzuzeigen.

5.3.2 Durchführung einer HLA-SSP-Typisierung

- (1) Für eine HLA Typisierung einer DNA-Probe werden PCR Reaktionen mit einem Reaktionsvolumen von 10 µl je PCR-Röhrchen durchgeführt. Die schwarze Markierung auf dem PCR-Block **BLOCK** dient als Orientierungshilfe (Position H1).

- (2) Für **jede Typisierung** in einem Eppendorf-Gefäß einen **Mastermix** mit folgenden Komponenten ansetzen:

PCR-Cocktail **CK**
 Taq DNA Polymerase (5U/µl)
 dH₂O

Gut mischen und von diesem Gemisch 10 µl in die **NC** geben. Erst danach DNA (ca. 100 ± 50 ng/µl) zugeben und gut mischen.

Die je nach Test zu pipettierenden Volumina sind der folgenden Tabelle zu entnehmen:

Anzahl der PCR Reaktionen	Zusammensetzung des Mastermixes bei:				
	8	18	24	48	96
PCR Cocktail CK	44 µl	100 µl	120 µl	228 µl	440 µl
Taq DNA Polymerase	0,7 µl	1,5 µl	1,8 µl	3,5 µl	7 µl
dH ₂ O	55 µl	125 µl	150 µl	288 µl	550 µl
DNA (ca. 100 ± 50 ng/µl)	11 µl	25 µl	30 µl	57 µl	110 µl

- (3) Von diesem Mastermix sind jeweils 10 µl zu den getrockneten, spezifischen Primermixes zu pipettieren. Dies erfolgt am besten mit einer Multipette. Es ist dabei zu beachten, dass die Pipettenspitze nicht mit den Primern in Berührung kommt. Um ein Verschleppen der Primer zu vermeiden ist der Mastermix an die Gefäßwand zu pipettieren.
- (4) Die PCR-Streifen mit den beigelegten PCR-Deckelstreifen/Folien fest verschließen. Die Platte in den Thermocycler überführen und die PCR mit dem Programm HLA SSP starten.

5.4 Gelelektrophorese

Der Nachweis der PCR-Produkte erfolgt durch die Agarose-Gelelektrophorese und anschließender Detektion der DNA-Banden im UV-Licht.

5.4.1 Vorbereitung der Reagenzien

- **5 x TBE-Puffer** (0,445 M Tris-Borat, 0,0125 M EDTA):
 54 g Tris(hydroxymethyl)-aminomethan (Base)
 27,5 g Borsäure (H₃BO₃)
 4,65 g Na₂EDTA
 ad 1000 ml mit Aqua dest., Lagerung bei Raumtemperatur
- **Ethidiumbromidlösung** (10 mg/ml)
 100 mg Ethidiumbromid in 10 ml dH₂O lösen und bei 2...8° C unter Lichtausschluss lagern.
Achtung: Ethidiumbromid ist mutagen und giftig. Beim Umgang mit Ethidiumbromid (auch in verdünnter Form) Schutzhandschuhe tragen. Bei Berührung mit der Haut sofort mit viel Wasser abwaschen.
- **1 x TBE-Puffer**
 1:5 Endverdünnung des 5 x TBE-Puffers in demineralisiertem Wasser.

5.4.2 Durchführung

Es wird ein 2 % Agarosegel hergestellt. Dazu 5 g Agarose in 250 ml 1 x TBE durch Aufkochen vollständig zur Lösung bringen. Die Lösung unter Rühren auf < 60° C abkühlen lassen und 4 µl Ethidiumbromidlösung zupipettieren. Die Agaroselösung blasenfrei in die vorbereiteten und abgedichteten Gelträger gießen. Kämme einsetzen (10 µl Taschen) und bei RT mindestens 10 Minuten stehen lassen. Nach dem Erstarren der Agarose das Gel in die Gelkammer einsetzen. Die Kämme herausnehmen und das Gel mit 1 x TBE überschichten. Die Geltaschen sollten komplett mit Puffer bedeckt sein. Den gesamten PCR-Ansatz (10 µl) in die Geltaschen pipettieren.

Zur Kontrolle der Größe der PCR-Produkte wird das Mitführen eines geeigneten Molekulargewichts-Standards (50-1000 bp Marker) bei der Elektrophorese empfohlen. Die Elektrophorese erfolgt für 15 -25 Minuten bei 8 V/cm (Elektrodenabstand). Die Laufstrecke des Kresolrots sollte 1-1,5 cm betragen.

5.4.3 Dokumentation

Nach Beendigung der Elektrophorese wird das Gel auf einen UV-Transilluminator gelegt und zur Interpretation und Dokumentation der Ergebnisse fotografiert.

Achtung: Gegen die UV-Strahlen einen geeignetem Gesichtsschutz tragen.

6. Ergebnisse

6.1 Auswertung

Die Biotest HLA-Primermixe enthalten Kontrollprimer, die ein 1069 bp langes Fragment des humanen Wachstumshormons (human growth hormone, HGH) amplifizieren. Diese Primer sind niedriger konzentriert als die allelspezifischen Primerpaare und dienen der Kontrolle über den erfolgreichen Verlauf der PCR. Die Amplifikation erfolgt in der Regel immer, d.h. sowohl in Gegenwart als auch Abwesenheit eines allel- oder gruppenspezifischen PCR-Fragmentes. Die Kontrollbande ist daher i.a. in allen PCR-Ansätzen sichtbar. In Gegenwart eines HLA-spezifischen PCR-Produkts kann die Kontrollbande schwach oder sogar völlig ausfallen. Dies stellt keine Einschränkung dar, denn in solchen Fällen ist die Kontrolle über den Verlauf der PCR durch die spezifische Bande gegeben.

Die Testinterpretation beruht darauf, ob eine spezifische DNA-Bande im Gel vorhanden ist oder nicht. Die Größe der amplifizierten DNA-Fragmente muss nicht, kann aber als Hilfestellung bei der Testauswertung berücksichtigt werden.

Für die Auswertung wird das Muster der spezifischen Banden auf das beigefügte Auswerteschema übertragen und das Typisierungsergebnis mit Hilfe des Reaktionsschemas abgelesen.

Gel Interpretation

	positive Reaktion	positive Reaktion	negative Reaktion	keine Amplifikation
Gel Tasche				
Kontrollbande	keine	-----		keine
spezifische Bande			keine	keine
Primerdimer				

6.2 Grenzen des Verfahrens

1. Die Intensität der Banden kann aufgrund der Qualität und Menge der eingesetzten DNA variieren. Die Quantität des PCR Produktes entspricht der Intensität der durch das UV Licht sichtbaren Bande.
2. Beim Ausfall von 1 oder 2 PCR-Amplifikationen muss geprüft werden, ob deren positive Bewertung zu einem Typisierungsergebnis führt. Ist dies der Fall, so ist der Test zu wiederholen. Führt die positive Bewertung der fehlenden Amplifikationen zu keinem Typisierungsergebnis und wurden eindeutig zwei Allele nachgewiesen, sind keine weiteren Maßnahmen einzuleiten. Wurde jedoch nur 1 Allel nachgewiesen, so ist der Test zu wiederholen.
3. Der Einsatz von anderer Taq DNA Polymerase als der empfohlenen von PE Applied Biosystems kann zu Ausfällen aber auch zu unspezifisch falsch positiven PCR-Amplifikationen führen.
4. DNA Proben sollten direkt nach der Isolierung verwendet werden. Eine längere Lagerung (mehr als 1 Jahr) ist bei -20°C möglich.
5. Die Richtigkeit der Ergebnisse kann nur gewährleistet werden, wenn alle hier aufgeführten Instruktionen strikt eingehalten werden.
6. Diesen Test nur zur initialen HLA-Bestimmung einsetzen. Weiter klinische und diagnostische Ergebnisse sollten zur Absicherung einer Transplantation herangezogen werden.

7. Die Bio-Rad HLA SSP Typisierungskits können nicht alle Allelkombinationen auflösen.

6.3 Qualitätskontrolle

Zur Qualitätskontrolle jeden einzelnen Primerpaares werden die Produktionschargen mit einem DNA-Panel überprüft.

Eine Chargeneingangskontrolle sollte mit heterozygoten Allelkombinationen durchgeführt werden, die möglichst viele Primermixe abdeckt.

6.4 Spezifische Charakterisierung

Mit Bio-Rad SSP Kits und anderen kommerziell erhältlichen SSP und SSO Kits wurden 167 Probanden (unausgewählte Tranplantationsempfänger und potentielle Spender aus 2 geographisch getrennten Gebieten) vergleichend getestet. Es konnte eine 100%ige Übereinstimmung (167/167) zwischen den Bio-Rad SSP Ergebnissen und den anderen SSP und SSO Ergebnissen festgestellt werden.

	Übereinstimmung	Nicht-Übereinstimmung	Total	%
N	167	0	167	100
%	100%	0%		

N = Probenanzahl

7. Fehlersuche

PROBLEM	URSACHE	LÖSUNG
Keine Banden sichtbar.	Ethidiumbromid fehlt im Gel.	Gel im Färbebad (1xTBE Puffer mit 0,5 µg/ml Ethidiumbromid) nachfärben.
MW Standard sichtbar PCR Produkte nicht sichtbar	Fehler im PCR-Ansatz: Zugabe von DNA oder Taq-Polymerase vergessen	PCR-Ansatz wiederholen
	Falsche Temperaturzyklusbedingungen	PCR-Programm im Thermocycler überprüfen. Das vorgegebene Programm gilt für die empfohlenen Thermocycler PE 9600, PE 9700. Andere Thermocycler als die empfohlenen müssen vom Anwender validiert werden. Andere Thermocycler als die empfohlenen Geräte können andere Heiz- und Kühlgeschwindigkeiten haben. Mögliche Variationen des PCR-Programms: Beim Auftreten von unspezifischen Amplifikationen können stringenteren Bedingungen durch schrittweises Anheben der Annealingtemperatur um 1°C geschaffen werden. Umgekehrt können falsch negative Amplifikationen Ursache von zu stringenten PCR Bedingungen sein. In diesem Fall empfiehlt sich eine schrittweise Absenkung der Annealingtemperatur um 1°C. Die Denaturierungszeit von 10 auf 20 Sekunden verlängern. Die Extensionszeit von 30 auf 60 Sekunden verlängern
Ausfall von ein oder mehreren PCR Amplifikationen (Kontrollbande und spezifisches Amplifikat).		Beim Ausfall von 1 oder 2 PCR-Amplifikationen muss geprüft werden, ob deren positive Bewertung zu einem Typisierungsergebnis führt. In dies der Fall, so ist der Test zu wiederholen. Führt die positive Bewertung der fehlenden Amplifikationen zu keinem Typisierungsergebnis und wurden eindeutig zwei Allele nachgewiesen, sind keine weiteren Maßnahmen einzuleiten. Wurde jedoch nur 1 Allel nachgewiesen, so ist der Test zu wiederholen. Beim Ausfall von mehr als 2 PCR-Amplifikationen ist der Test zu wiederholen.
Schwache spezifische Banden im Gel, keine oder sehr schwache Kontrollbanden.	Zu wenig DNA eingesetzt.	doppelte DNA-Menge einsetzen (dH ₂ O in Ansatz reduzieren); ca. 100 ng DNA pro PCR-Ansatz verwenden.
	PCR-Inhibitoren im Ansatz: z.B. Ethanol, Hämoglobin, Heparin, Beads	EDTA- oder Citratblut als Ausgangsmaterial verwenden; (DNA-Pellet nach dem Waschen mit Ethanol gut trocknen).
	pH-Wert der DNA-Lösung zu sauer (Farbveränderung des PCR-Cocktails nach DNA-Zugabe)	Erneutes Fällen der DNA und Lösen in Aqua dest.
	Falsche Temperaturzyklusbedingungen.	siehe oben
Schwache spezifische Banden im Gel,	DNA-Konzentration zu hoch	DNA verdünnen; zu hohe DNA Konzentration oder nicht gut gelöste DNA kann in einzelnen Fällen zum Ausfall der spezifischen Bande führen.
	DNA in Puffer gelöst, der einen Inhibitor für die PCR-Reaktion enthält	Erneutes Fällen der DNA und Lösen in Aqua dest.
	Falsche Temperaturzyklusbedingungen	siehe oben
Kontrollbanden vorhanden, spezifische Banden vorhanden, aber zusätzlich eine oder mehrere schwache unspezifische Banden vorhanden (falsch positive Reaktionen)	DNA-Konzentration zu hoch	DNA verdünnen;
	Kreuzreaktionen mit anderen Allelen	Auswerteschema beachten
	Unzureichende DNA-Qualität oder Kontamination der DNA	DNA neu isolieren
Bande im PCR-Ansatz der Negativ-Kontrolle	versehentlich DNA in Ansatz der Negativkontrolle pipettiert	evtl. Ansatz wiederholen bzw. entsprechenden Vermerk auf Auswertedokumentation machen
	Kontamination der Reagenzien	Reagenzien austauschen

8. Literatur/ References/ Références bibliographiques/ Bibliografia/ Bibliografía

1. Graham DE (1978)
The isolation of high molecular weight DNA from whole organisms or large tissue masses.
Anal Biochem 85: 609-613
2. Miller SA, Dykes DD, Polesky HF (1988)
A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells.
Nucl Ac Res 16: 1215
3. Olerup O, Zetterquist H (1992)
HLA-DR typing by PCR amplification with sequence-specific primers (PCR-SSP) in two hours: An alternative to serological DR typing in clinical practice including donor recipient matching in cadaveric transplantation.
Tissue Antigens 39: 225-335.
4. Bunce M, O'Neill CM, Barnado MCNM, Krausa P, Browning MJ, Morris PJ, Welsh KI (1995)
Phototyping: comprehensive DNA typing for HLA-A, B, C, DRB1, DRB3, DRB4, DRB5 & DQB1 by PCR with 144 primer mixes utilizing sequence-specific primers (PCR-SSP)
Tissue Antigens 46:355-367.