

DK

# HLA SSP Kits

Klar til brug Sequence Specific Primers (SSP) reagens kit for DNA baseret HLA typning

IVD

For In Vitro Diagnostisk Brug

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

## Specielle bemærkninger for brugeren

### SSP TYPING TRAYS **MED** TAQ-POLYMERASE - BEGRÆNSET LICENSE:

Købsprisen for dette produkt inkluderer begrænset, ikke-overførbare rettigheder under U.S. Patent 4,683,202, 4,683,195 og 4,965,188 og deres udenlandske modparter, ejet af Roche Molecular Systems, Inc. og F. Hoffmann-La Roche Ltd ("Roche"), at bruge kun denne mængde af produktet for at udføre Polymerase Chain Reaction ("PCR") Processen beskrevet i nævnte patenter beregnet til anvendelse ved HLA Typning hos køberen kun for organ- eller vævs- eller knoglemarvstransplantation, og tydeligt udelukkelse af analyser på kriminelle beviser eller faderskabs bestemmelse. Retten til at bruge dette produkt til at udføre og at tilbyde erhvervmæssig service for HLA Typning for organ- eller vævstransplantation ved at anvende PCR, inklusive rapportering af resultaterne af køberens aktiviteter for betaling eller andre erhvervmæssige vederlag, er også hermed givet. Yderligere information om køb af licenser til at udføre PCR skal opnås ved at kontakte, i U.S.A., Direktøren for Licenskontoret hos Roche Molecular Systems, Inc. 1145 Atlantic Avenue, Alameda, California 94501, og udenfor U.S.A., PCR Licens Chef, F. Hoffmann-La Roche Ltd, Grenzacherstr. 124, CH-4070 Basel, Switzerland.

### SSP TYPING TRAYS **UDEN** TAQ-POLYMERASE - FRALÆGGELSE AF LICENS:

Dette produkt er optimeret for brug i Polymerase Chain Reaction ("PCR") Proces som er beskyttet af patenter ejet af Roche Molecular Systems, Inc. og F. Hoffmann-La Roche Ltd ("Roche"). Ingen licenser under disse patenter om brug af PCR Processen er udtrykkeligt overdraget eller underforstået for køberen ved køb af dette produkt. Yderligere information om at købe licenser til at udføre PCR kan opnås ved at kontakte, i U.S.A., Direktøren for Licenskontoret hos Roche Molecular Systems, Inc. 1145 Atlantic Avenue, Alameda, California 94501, og udenfor U.S.A., PCR Licens Chef, F. Hoffmann-La Roche Ltd, Grenzacherstr. 124, CH-4070 Basel, Switzerland.

<b>BLOCK</b>	PCR blok	<b>NC</b>	Negativ kontrol	<b>CK</b>	PCR blanding
--------------	----------	-----------	-----------------	-----------	--------------



189738/07 – 04/2016

# INDHOLD

<b>1. Introduktion</b> .....	4
1.1 Anvendelsesmåde .....	4
1.2 Oversigt og Forklaring .....	4
1.3 Analyseprincip .....	4
<b>2. Reagenser</b> .....	4
2.1 Indhold i HLA SSP Kit .....	4
2.2 Advarsler og Forholdsregler .....	5
2.3 Opbevaring og Opbevaringstid.....	5
2.4 Indikationer på Instabilitet eller Forringelse .....	5
<b>3. Instrumentelle Behov</b> .....	5
3.1 Programmering af Termocycler.....	5
3.2 Gel Elektroforese .....	6
<b>4. Prøveindsamling og Tilberedning</b> .....	6
4.1 DNA Isolering .....	6
4.2 Prøveindsamling og Tilberedning .....	6
<b>5. Fremgangsmåde</b> .....	7
5.1 Nødvendige Materialer .....	7
5.2 Ekstra Materiale Krav.....	7
5.3 PCR .....	7
5.4 Gel Elektroforese .....	9
<b>6. Resultater</b> .....	9
6.1 Evaluering .....	9
6.2 Metodens Begrænsninger .....	10
6.3 Kvalitets Kontrol .....	10
6.4 Specifikke Præstations Karakteristika .....	10
<b>7. Fejlfinding</b> .....	11
<b>8. Referencer</b> .....	12



189738/07 – 04/2016

## 1. INTRODUKTION

### 1.1 Anvendelsesmåde

HLA Sequence Specific Primers (SSP) kit er bestemt for bestemmelse af HLA Klasse I eller Klasse II alleller.

### 1.2 Oversigt og Forklaring

HLA systemet er et komplekst, kodominant nedarvet system af antigener som spiller en vigtig rolle i immunsystemet ved at sætte det i stand til at skelne "selv" fra "non-selv". I organtransplantationer, er HLA forlidelighed mellem donor og recipient en af hovedfaktorerne for transplantatets overlevelse. Af denne grund er bestemmelse af de individuelle kombinationer af HLA antigener brugt som en basis for udvælgelsen af donorer og recipienter.

Nye dimensioner er blevet åbnet med moderne diagnostik ved udviklingen af DNA-baserede analysemetoder. HLA antigener varierer delvist fra hinanden ved kun en enkelt aminosyre indeni polypeptid kæden. Genkendelse af disse stort set identiske strukturer ved serologisk testning er næsten umuligt; af den grund, er opløsningskapaciteten af metoden begrænset. Da DNA sekvenserne af de mest vigtige HLA alleller nu er kendt, kan variationer i sekvenserne identificeres på DNA niveau ved hjælp af syntetiske oligonukleotider. Ved at benytte amplifikationer af genomisk DNA (PCR, **P**olymerase **C**hain **R**eaction) sammen med specifikke primerpar (SSP, **S**equen**S**pecific **P**rimers) er det muligt at identificere et stort antal af HLA alleller med molekylære analyse metoder.

### 1.3 Analyseprincip

HLA SSP Kits er test systemer for typning af HLA karakteristiker ved at bruge PCR teknikker. For typning med SSP metoden anvendes allel-specifikke primere i amplifikations reaktionen. Metoden er baseret på princippet om, at kun primere, hvis sekvens er perfekt komplementær til det på mål sekvensen af DNA prøven, som er tilstede vil binde sig til dette DNA og producere et amplifikat i PCR reaktionen. Non-komplementære primere vil på den anden side ikke binde sig til DNA og ingen amplifikation vil finde sted.

Det amplificerede DNA bestemmes ved at bruge agarose gel elektroforese. Succesfuld amplifikation vil generere et DNA fragment af defineret længde, som ses som et bånd i gelen. Hvis ingen amplifikation har fundet sted er dette bånd ikke tilstede.

Sammensætningen af primerne tillader positiv identifikation af HLA karakteristika. Området for denne opsætning af detektions system er bestemmelse af individuelle HLA alleller hos organdonorer og recipienter og hos patienter, som modtager blodtransfusion eller blodkomponent substitutions terapi.

## 2. REAGENSER

### 2.1 Indhold i HLA SSP Kits

Indholdet af HLA SSP Kits er tilstrækkeligt for 24 prøver.

- eller 24 PCR-blokke **BLOCK** henholdsvis hver bestående af PCR rør i blokke som indeholder den tørrede primer/nukleotid blanding. Som en hjælp til identifikation er et sort mærke placeret ved position 1 (=H1).
- PCR blanding **CK** (klar til brug)  
Blandingen indeholder PCR-buffer (1.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 50 mM KCl, 10 mM Tris-HCl, 0.001% gelatine), glycerol og kresol rød.
- PCR dækstrimmel eller PCR dæktape.
- Arbejdsskema, reaktions mønsterkort, primer positions skema

Negativ kontrol **NC** er pakket separat som ekstra PCR rør (farveløs), hvis den ikke er inkluderet i PCR blokken **BLOCK**.

## 2.2 Advarsler og Forholdsregler

Kun til In Vitro Diagnostik IVD

**Advarsel:** Analysen skal udføres af veluddannede og autoriserede bioanalytikere.

**Advarsel:** Alle reagenser skal behandles i overensstemmelse med god laboratorie praksis (GLP) ved at anvende passende forholdsregler. Desuden at behandle alle patient prøver som potentielt smittefarlige. Afpipetér ikke med munden.

**Advarsel:** Anvend ikke reagenser hvor udløbsdatoen trykt på etiketten er overskredet.

**Advarsel:** Anvend ikke reagenser med tydelige tegn på grumsethed eller mikrobiel forurening.

**Advarsel:** Pipetter anvendt til **Efter**-PCR håndteringer må **ikke** anvendes til **Før**-PCR håndteringer.

**Advarsel:** Biorisiko Advarsel: Etidium bromid som anvendes til farvning af DNA er potentielt karcinogent. Anvend altid beskyttelses handsker ved håndtering af farvede geler.

**Advarsel:** Biorisiko Advarsel: Alle blodprodukter skal behandles som potentielt smittefarlige.

**Advarsel:** Alle brugte PCR blokke skal behandles som potentielt smittefarlige og skal destrueres i overensstemmelse med gældende nationale retningslinier.

**Advarsel:** Anvend UV-blokkerende øjebeskyttelse, og se ikke direkte på UV lyskilden, når gelene bedømmes eller fotograferes.

Se Materialernes Sikkerheds Data Skema for detaljerede informationer.

## 2.3 Opbevaring og Opbevaringstid

SSP reagenserne skal opbevares ved 2...8°C. Udløbsdatoen er trykt på pakningen med kit komponenter. PCR blokkene er forseglet i poser.

## 2.4 Indikationer på Instabilitet eller Forringelse

Når først poserne er åbnet, skal tiloversblevne ubrugte PCR blokke opbevares i deres originale poser forseglet med tape, eller varmeforseglet for at undgå ophobning af fugt under opbevaringen. Når først PCR blokkene er åbnet, skal de anvendes inden 4 uger fra åbningsdatoen.

## 3. Instrumentelle Behov

### 3.1 Programmering af Termocycler (Thermal cyclers)

Program HLA SSP:

Initiel Denaturering:	<b>94°C</b>	<b>2 min.</b>		
Denaturering:	<b>94°C</b>	<b>10 sec.</b>	]	<b>10 omgange</b>
Annealing & Ekstension:	<b>65°C</b>	<b>60 sec.</b>		
Denaturering:	<b>94°C</b>	<b>10 sec.</b>	]	<b>20 omgange</b>
Annealing:	<b>61°C</b>	<b>50 sec.</b>		
Ekstension:	<b>72°C</b>	<b>30 sec.</b>		

PCR programmet vist nedenfor er tilpasset til Perkin-Elmer Thermocycler. Varme/køle forholdet på PE 9700 er i gennemsnit 1°C/seconds for prøven og temperatur nøjagtigheden er ± 0.25°C i området 35-100°C. Andre Termocyclere end det rekommanderede skal valideres af brugeren.

Termocyclere, som ikke har justerbar trykplade, skal have en måtte som mellemstykke for at garantere optimal varme transport fra varmedækket til PCR rørene.

### 3.2 Gel Elektroforese

Henvisning til elektroforese i Fremgangsmåde Sektion 5.

## 4. Prøveindsamling og Tilberedning

### 4.1 DNA Isolering

Genomisk DNA kan fås fra alle kerneholdige celler. Den simpleste metode er at isolere DNA fra celle suspensionen (blod, buffycoat eller dyrkede celler). Der eksisterer en umådelig stor række af forskellige protokoller for isolering af DNA fra celler. For PCR-SSP testning skal kun de metoder som giver DNA af tilstrækkelig kvalitet og kvantitet for PCR tages i betragtning, f.eks. udsaltnings metoder (Ref.2).

Blandt leverandører af kommercielle DNA ekstraktions kits er passende produkter som "Puregene" fra Genra Systems og "Super Quick Gene" fra The Analytical Genetic Testing Center inkluderet.

### 4.2 Prøveindsamling og Tilberedning

#### 4.2.1 Prøven

Typning udføres ved at bruge antikoaguleret perifert blod (f.eks. Na-citrat, EDTA). For blodprøvers opbevaring og stabilitets informationer, venligst referer til den tekniske information leveret med ekstraktions test kittet af producenten, og det skal bruger-valideres.

#### 4.2.2 Kontamination

Kontamination af DNA med PCR inhibitorer, så som hæmoglobin, heparin, ethanol, etc. kan resultere i alvorlig interferens med PCR reaktionen. Af denne grund må heparinblod ikke bruges som start materiale for DNA isoleringen. Brug i stedet enten citrat eller EDTA blod. Hvis patienten er i heparin terapi brug en alternativ kilde af DNA.

#### 4.2.3 Hæmolyserede Prøver

Undgå brug af lipæmiske eller hæmolyserede Prøver. Brug af prøver taget uden antikoagulans eller nedfrosset/optøet gentagne gange rekommanderes ikke, eftersom disse betingelser sandsynligvis ikke giver tilstrækkelig kvantitet eller kvalitet af DNA til testning.

#### 4.2.4 DNA Kvantitet

DNA prøven, som skal bruges, skal resuspenderes i sterilt destilleret vand med en koncentration af ca.  $100 \pm 50$  ng/ $\mu$ l. DNA **må ikke resuspenderes** i opløsninger som indeholder kelaterende midler, **så som EDTA**, over 0.5 mM i koncentration.

#### 4.2.5 DNA Kvalitet

Bestemmelsen af koncentrationen af DNA udføres ved at måle den optiske densitet (OD) ved 260 nm ( $A_{260}$ ). Værdien  $A_{260} = 1$  (= OD 1.0) svarer ca. til 50  $\mu$ g/ml af dobbelt-strengt DNA.

For at bestemme graden af kontamination af DNA med protein, udføres en ekstra måling ved 280 nm og forholdet  $A_{260}/A_{280}$  beregnes. Rent DNA vil give et  $A_{260}/A_{280}$  forhold på 1.8 eller højere. Værdier for  $A_{260}/A_{280}$  på mindre end 1.8 indikerer kontamination af DNA med protein. Ved et  $A_{260}/A_{280}$  forhold på 1.5 er procenten af protein i DNA præparationen ca. 50 %.

For at opnå gode PCR-SSP resultater kræves DNA med et  $A_{260}/A_{280}$  forhold  $\geq 1.6$ .

☉ Renheden og koncentrationen af DNA er af afgørende vigtighed for at opnå optimale test resultater.

DNA prøven skal anvendes umiddelbart efter isoleringen eller opbevares ved  $-20^{\circ}\text{C}$  eller lavere for udvidet opbevaringstid (over 1 år) uden nogen negative indvirkninger på resultaterne.

For opbevarings og stabilitets informationer for isoleret DNA, venligst referer til teknisk information leveret med DNA ekstraktions test kit af producenten.

## 5. Fremgangsmåde

### 5.1 Nødvendige Materialer

Se 2.1 Indhold i HLA SSP Kit

### 5.2 Ekstra Materiale Krav

#### 5.2.1 Prøve Materiale (DNA)

- UV spektrofotometer

#### 5.2.2 PCR

- Taq DNA polymerase (5 U/μl, f.eks. Perkin Elmer)
- Termocycler med opvarmet dække (f.eks. PE 9600, PE 9700 Perkin Elmer)
- Justérbare pipetter
- Eppendorf Multipette med kombitips (10 μl)
- Pipettetips med filter
- Distilleret vand (dH<sub>2</sub>O)

#### 5.2.3 Gel elektroforese

- Agarose (for molekulær biologi)
- Gelkammer (tilstrækkelig for gel med mindst 25 lommer)
- 5x TBE buffer
  - Tris(hydroxymetyl)-aminometan (base)
  - Borsyre (H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>)
  - Dinatrium EDTA
- Ethidium bromid opløsning (10 mg/ml)
- DNA streng (f.eks. 50 – 1000 bp markør)
- Magnetisk omrører med varm plade eller mikrobølger
- Justérbare pipetter
- Polaroid camera med UV filter og Polaroid film type 667
- UV transilluminator (ca. 200 – 300 nm)
- Strømforsyning
- Distilleret vand (dH<sub>2</sub>O)

## 5.3 PCR (Polymerase Chain Reaction)

### 5.3.1 Sikkerheds forholdsregler

PCR er en ekstremt sensitiv metode som effektivt kan forøge selv den mindste mængde af DNA. Det følger heraf at selv spor af kontamineret DNA i en prøve kan forøges i PCR reaktionen og dermed give falske test resultater. En speciel kilde til kontamination er amplificeret DNA som kommer i kontakt med prøver som stadig skal amplificeres. For at undgå kontamination med amplificeret materiale anbefales det at arbejdsområdet er skarpt adskilt som følger:

1. *Før-PCR området:*  
Alt arbejde udført før PCR (DNA isolering og opbevaring, forberedelse til PCR, produktion og opbevaring af reagenser og opløsninger for DNA ekstraktionen og PCR).
2. *Efter-PCR området:*  
Termocycler, gel elektroforese, evaluering, opbevaring af amplificeret DNA.  
Udstyr og utensilier fra Efter-PCR området må ikke tages ind i Før-PCR området.
3. Når man arbejder i Før-PCR området skal pipetter med aerosol beskyttelse anvendes (tips med filter). Det anbefales at en negativ kontrol inkluderes i test proceduren som en indikation på kontamination med fremmed DNA.

### 5.3.2 Fremgangsmåde for HLA SSP typningen

- (1) For HLA typning af en DNA prøve, skal PCR reaktioner med et reaktions volumen på 10µl i hver PCR rør udføres. Det sorte mærke skal ses som en hjælp for korrekt orientering af PCR blokken **BLOCK** (position H1).
- (2) I et Eppendorf reaktions rør, forbered for **hver typning en master blanding** som indeholder følgende komponenter:

PCR blanding **CK**  
 Taq DNA polymerase (5 U/µl)  
 dH<sub>2</sub>O  
 (se tabellen nedenfor for forskellige konfigurationer)

Bland godt og afpipetter 10 µl af denne blanding til den negative kontrol **NC**. Tilsæt derefter DNA (ca. 100 ± 50 ng/µl)  
 (se tabellen nedenfor for forskellige konfigurationer)

og bland komponenterne godt.

Når først master blandingen er tilberedt, fortsæt straks med næste trin 5.3.2 (3)

Antal af PCR reaktioner	Master blanding for konfiguration med				
	8	18	24	48	96
PCR blanding <b>CK</b>	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 <sub>2</sub> 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) Fra denne master blanding, afpipetter 10 µl til hver af de tørrede primer blandinger (H1-A1; H2-A2; H3-A3). Dette gøres lettest ved at bruge en multipipette. Vær opmærksom på at pipettespidsen ikke kommer i kontakt med primeren for at undgå carry-over af primeren. Af denne grund afpipetter master blandingen mod brøndens vægge.

Forsegl omhyggeligt PCR stripsene ved at bruge den leverede PCR dækstrimmel eller tape. Overfør bakken til termocycleren og start PCR med programmet til HLA SSP.

## 5.4 Gel Elektroforese

PCR produkterne identificeres ved at bruge agarose gel elektroforese efterfulgt af påvisning af DNA båndene i UV lys.

### 5.4.1 Fremstilling af Reagenser

- **5x TBE buffer** (0.445 M tris-borat, 0.0125 M EDTA):  
 54 g Tris(hydroxymet yl)-aminometan (base)  
 27.5 g Borsyre (H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>)  
 4.65 g Dinatrium EDTA  
 ad 1000 ml med destilleret vand, opbevares ved stuetemperatur.
- **Ethidium bromid opløsning** (10 mg/ml)  
 Opløs 100 mg ethidium bromid i 10 ml destilleret vand og opbevar det ved 2...8 °C beskyttet mod lys.  
**Advarsel: Ethidium bromid er mutagent og giftigt. Bær altid beskyttelseshandsker når der arbejdes med ethidium bromid (også i fortyndet form). I tilfælde af kontakt med huden,**  
**vask det straks af med rigelige mængder af vand.**
- **1x TBE buffer**  
 1:5 slutfortynding af 5x TBE bufferopløsning i demineraliseret vand.



### 5.4.2 Fremgangsmåde for gelelektroforese

En 2 % opløsning af agarose tilberedes ved at koge 5 g agarose i 250 ml af 1x TBE indtil opløsningen bliver klar. Lad opløsningen køle ned til under 60 °C tilsæt derefter 4 µl ethidium bromid opløsning.

Placér den forseglede gel bakke på en vandret overflade. Fyld agarose opløsningen i den forseglede gel holder med så få bobler som muligt, og placér en kam for at danne lommer med en størrelse på ca. 10 µl.

Efter polymerisation (ca. 30 minutter ved stuetemperatur), hæld gelen i gelkammeret som er blevet fyldt med 1x TBE buffer. Fjern kammene. Gellommerne skal være fuldstændigt dækket med buffer.

Fjern dæk forseglingen/stripsene og afpipetér hele PCR blandingen i gellommerne.

Størrelsen af PCR produktet er målt ved at inkludere en passende molekylvægt standard i elektroforesen (f.eks. 50 – 1000 bp markør).

Elektroforesen udføres nu i 15 – 25 minutter ved 8 V/cm (elektrode afstanden).

### 5.4.3 Dokumentation

Når elektroforesen er færdig, placeres gelen på en UV transilluminator (passende ansigts beskyttelse mod UV stråling skal anvendes). Et Polaroid billede kan fremstilles for evaluering og dokumentation af resultaterne.

## 6. Resultater

### 6.1 Evaluering

HLA primer blandingen indeholder kontrolprimer som amplificerer et 1069 bp fragment af humant vækst hormon (HGH). Koncentrationen af disse primere er ca. en femtedel af det allel-specifikke primerpar og formålet er at sørge for en intern kontrol på succesfuld PCR amplifikation. Denne amplifikation forekommer generelt altid, d.v.s. både ved tilstedeværelsen og ved mangel på allel- eller gruppe-specifik PCR fragment. Kontrolbåndet kan derfor generelt ses i alle PCR reaktioner. Fra tid til anden kan kontrolbåndet ses svagt eller fuldstændigt manglende ved tilstedeværelse af allel-specifik HLA PCR produkt. Dette er ikke en begrænsning i metoden, da det specifikke bånd sørger for et check på succesfuld PCR kørsel.

Kompositionen af primerne tillader positiv identifikation af HLA karakteristika. Tolkningen er baseret på enten om et specifikt bånd er tilstede på gelen eller ikke.

Størrelsen af de amplificerede DNA fragmenter skal ikke nødvendigvis tages i betragtning når testen evalueres, ikke desto mindre kan det være nyttigt for tolkningen af testen.

For evaluering er mønstret af de specifikke bånd overført til medsendte resultatark. Typnings resultaterne aflæses ved hjælp af reaktions mønstret.

### Gel Tolkning

	Positiv reaktion	positiv reaktion	negativ reaktion	non-amplifikation
Gel lomme				
Kontrol bånd	intet	-----		intet
Specifikt bånd			intet	intet
Primer bånd				

### 6.2. Metodens Begrænsninger

1. Intensiteten af positive bånd vil variere som følge af kvaliteten og mængden af PCR produktet. Kvaliteten af PCR produktet vil direkte påvirke intensiteten af båndene visualiseret på UV illuminatoren. I tilfælde af manglende intern kontrolbånd og ingen alleler, skal testen gentages.
2. DNA prøver skal anvendes straks efter isolering eller opbevares ved -20°C eller lavere for længere opbevaringstid (over 1 år) uden nogen indvirkninger på test resultaterne.
3. Præstationen af testen kan kun garanteres hvis vedlagte instruktioner følges nøjagtigt.
4. Denne test skal kun anvendes for initial HLA typning. Andre kliniske og diagnostiske fund skal desuden tages i betragtning, når beslutning om egnethed for transplantation skal tages.
5. Brug af HLA SSP typnings kit kan ikke løse alle kombinationer.

### 6.3 Kvalitets Kontrol

Hvert produceret lot kontrolleres mod et panel af DNA prøver repræsentativt for specifik bestemmelse af primerne og det er tilgængeligt på anfordring.

Kvalitets kontrol af nye lot numre udføres ved typning af en kombination af kendte heterozygote allelle kombinationer, som vil reagere med de fleste primer blandinger i kittet.

### 6.4 Specifikke Præstations Karakteristika

Bio-Rad SSP Typnings kit bliver sammenlignet med et SSP typnings kit og et SSO typnings system ved at teste 167 prøver (tilfældigt udvalgte transplantations kandidater og potentielle donorer) på to geografisk klart adskilte lokationer. Der var 100% overensstemmelse (167/167) mellem Bio-Rad SSP Typnings kittets resultater og resultaterne opnået ved at bruge SSP og SSO testene.

	Overensstemmelse	Uoverensstemmelse	Total	%
N	167	0	167	100
%	100%	0%		

N = Antal prøver

## 7. Fejlfinding

PROBLEM	ÅRSAG	LØSNING
<b>Agarose gelelektroforese</b>		
Ingen synlige bånd.	Ingen ethidium bromid i gelen.	Farvning af gelen i et farvningsbad (1xTBE bufferet med 0.5 µg/ml ethidium bromid).
Svage specifikke bånd i gelen, ingen kontrol bånd.	DNA fra heparinblod.	Brug EDTA eller citratblod som begyndelses materiale.
	Rester af etanol i DNA.	Efter vask af DNA knappen med etanol, tillad fuldstændig tørring.
	For lidt DNA anvendt.	Brug ca. 100 ng DNA pr. PCR reaktion.
PCR produkterne ikke synlige, MW standard synlig.	Ikke korrekte betingelser for temperatur cyclus.	Check termocyclerens PCR program. Det beskrevne program passer til den anbefalede termocycler fra Perkin Elmer. Andre termocyclere som den anbefalede skal bruger-valideres.
		Forlæng denaturerings tiden fra 10 sek. til 20 sek.
		Forlæng ekstentions tiden fra 30 sek. til 60 sek.
		Andre termocyclere end anbefalede kan have forskellige varme og kølings forhold. I disse tilfælde, anbefales det at ændre PCR protokollen: Hvis uspecifikke reaktioner forekommer hæv annealerings temperaturen i trin på 1°C, som vil danne mere stringente reaktions betingelser.
		Falske negative amplifikation kan skyldes for stringente reaktions betingelser. I dette tilfælde anbefales en reduktion af annealerings temperaturen i trin på 1°C.
Kontrol bånd mangler ind i mellem.		Hvis to alleller kan positivt identificeres, behøver man ikke gøre noget. Hvis det ikke er tilfældet, anbefales det at gentage testen. Hvis to alleller ikke kan positivt identificeres, anbefales det at gentage testen.

## 8. Referencer

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.
5. Blasczyk R, Hahn U, Wehling J, Huhn D, Salama A (1995)  
Complete subtyping of the HLA-A locus by sequence-specific amplification followed by  
direct sequencing or single-strand conformation polymorphism analysis.  
Tissue Antigens 46:86-95.