
 Niederhöchstädter Str. 62 D-61476 Kronberg / Taunus Tel. +49-6173-607930	Gebrauchsinformation	
Version 1.1	HLA-FluoGene ^{NX}	QMS 08.18

HLA-FluoGene^{NX}

Verwendungszweck:

Zur Bestimmung von HLA-Klasse I und II Allelen
durch Endpunkt-Fluoreszenzdetektion nach SSP-PCR sowie durch real-time PCR

IVD

Bestell-Nr.	Produkt	Reaktionen/ Test	Platte/ Test	Tests/ Packung
002 082 010	HLA-FluoGene ^{NX} ABCDRDQ	96	1	10
002 083 005	HLA-FluoGene ^{NX} Match	192	2	5

ÄNDERUNGEN ZUR ABARBEITUNG VON HERKÖMMLICHEN FLUOGENE TESTSYSTEMEN

- Aufgrund des verringerten Reaktionsvolumens (8 µl anstatt 15 µl) muss die FluoGene^{NX} Platte nach Zugabe des DNA-FluoMix-Gemisches kurz abzentrifugiert werden (siehe Seite 5).
- Unterschiedliche PCR-Protokolle für FluoGene^{NX} beachten!
Seite 5, Kapitel 3.4.1 PCR-Programm (für den Gebrauch mit FluoVista Analysegerät)
Seite 6, Kapitel 3.4.2 PCR-Programm (für den Gebrauch mit FluoQube)

ÄNDERUNGEN ZUR VERSION 1.0:

- Deckblatt, Kopfzeile:
Version 1.1 & QMS 08.18
- Seite 4, Kapitel 2.3, Seite 5, Kapitel 3.4, Seite 7, Kapitel 6, Erweiterung der Hinweissätze
- Seite 3, Kapitel 1.2, Seite 4, Kapitel 3.4, Negativkontrolle befindet sich auf Plattenposition H1

INHALTSVERZEICHNIS

1	ALLGEMEINE PRODUKTINFORMATIONEN.....	2
1.1	PRINZIP DER METHODE.....	2
1.2	HLA- FLUOGENE ^{NX} TESTSYSTEME.....	3
2	MATERIAL.....	3
2.1	BESTANDTEILE DER HLA- FLUOGENE ^{NX} KITS.....	3
2.2	LAGERUNG UND HALTBARKEIT.....	3
2.3	ZUSÄTZLICH BENÖTIGTE MATERIALIEN.....	4
3	DURCHFÜHRUNG DER METHODE.....	4
3.1	PROBENGEWINNUNG.....	4
3.2	VORSICHTSMAßNAHMEN.....	4
3.3	EINEN JOB IN DER FLUOGENE SOFTWARE ANLEGEN.....	4
3.4	PCR / AMPLIFIKATION.....	4
3.4.1	PCR-PROGRAMM (FÜR DEN GEBRAUCH MIT FLUOVISTA ANALYSEGERÄT).....	5
3.4.2	PCR-PROGRAMM (FÜR DEN GEBRAUCH MIT FLUOQUBE).....	6
3.5	FLUORESZENZDETEKTION.....	6
3.6	BERECHNUNG DER DATEN.....	6
4	AUSWERTUNG.....	6
4.1	VERWEIS AUF INTERNATIONALE STANDARDS.....	6
5	LEISTUNGSDATEN/-BEWERTUNG.....	6
6	ALLGEMEINE WARNHINWEISE UND VORSICHTSMAßNAHMEN.....	7
7	LIZENZVEREINBARUNG DYES AND QUENCHER.....	7
8	TROUBLE SHOOTING.....	8
9	ERKLÄRUNG DER SYMBOLE.....	9
10	LITERATUR.....	9

1 ALLGEMEINE PRODUKTINFORMATIONEN

1.1 Prinzip der Methode

Die molekularbiologischen FluoGene^{NX} Detektionssysteme von **inno-train** bauen auf der PCR-SSP (SSP: „*Sequence Specific Priming*“) auf. Die Polymerasekettenreaktion oder *Polymerase Chain Reaction* (PCR) ermöglicht eine Anreicherung (Amplifikation) von definierten DNA-Sequenzen [1]. Nach erfolgreicher Amplifikation der genomischen DNA-Targetsequenz liegt diese in nachweisbarer Konzentration vor. SSP ist eine Variante der PCR, bei der für die Spezifikation des bestimmbar Merkmals ausschließlich die Sequenz des Primers am 3' Ende verantwortlich ist [2, 3, 4, 5]. Für die vollständige PCR-SSP Analyse werden mehrere Amplifikationen parallel durchgeführt. Ansätze mit Primerbindung zeigen nach PCR ein spezifisches Amplifikat, Ansätze ohne diese Bindung hingegen nicht. In jedem Reaktionsansatz (Well) befinden sich neben den spezifischen Primern auch Primer zur Amplifikation einer internen Kontrolle (Gensequenz des Humanen Wachstumshormons, HGH). Falls kein spezifisches Produkt nach PCR vorliegt, muss das Amplifikat dieser internen Kontrolle nachweisbar sein. Der Nachweis der PCR-Produkte erfolgt über die Messung von Fluoreszenzsignalen und nicht gelelektrophoretisch wie bei konventionellen PCR Systemen. Jeder PCR-Ansatz enthält mindestens zwei in ihrem Emissionsspektrum unterscheidbare und an Oligonukleotidsonden gekoppelte Fluorochrome: mindestens ein Marker für die spezifischen Amplifikate und ein Marker für die interne HGH-Kontrolle.

Die Fluoreszenzdetektion kann als Endpunkt-Methode im Fluoreszenzreader (**inno-train** FluoVista) oder in Echtzeit während des PCR-Laufs im Real-Time PCR Gerät (**inno-train** FluoQube) erfolgen.

Bei der Endpunktdetektion werden vor und nach PCR die Emissionen der verschiedenen Fluorochrome im FluoVista detektiert und die Differenz mithilfe der FluoGene Auswertesoftware ermittelt.

Im FluoQube wird der Anstieg der Emissionen der verschiedenen Fluorochrome während des PCR-Laufs detektiert. Aus diesen Fluoreszenzwerten sowie dem CT-Wert (Cycle threshold, Beginn des exponentiellen Wachstums einer Amplifikationskurve) werden die Q-Werte ermittelt. Diese werden mithilfe der FluoGene Auswertesoftware als positiv oder negativ bewertet. Der Anstieg der Fluoreszenz- bzw. der Q-Werte über spezifische Schwellenwerte spiegelt eine positive Amplifikation wider.

1.2 HLA- FluoGene^{NX} Testsysteme

Die HLA-FluoGene^{NX} Testsysteme von **inno-train** ermöglichen mindestens eine niedrigauflösende Typisierung (1. Feld) der HLA Klasse I (HLA-A*, -B*, -C*) sowie der HLA Klasse II (HLA-DRB1*, -DRB3*, -DRB4* -DRB5*, -DQA1*/DQB1*, -DPA1*/DPB1*) Merkmale hinsichtlich der „Common Allele“ (CWD 2.0 <http://igdawg.org/cwd.html>).

Das HLA-FluoGene^{NX} Match System ermöglicht die Typisierung von HLA-A, -B, -C, -DRB1, 3, 4 & 5, -DQA1, -DQB1, -DPA1 und -DPB1 Allelen mit einer single antigen antibody Tests vergleichbaren Auflösung.

Verschiedene, in PCR-Platten voraliquotierte und getrocknete Oligonukleotidmixe dienen zur Amplifikation der genetischen Merkmale. Jeder dieser Oligonukleotidmixe beinhaltet Primer und mit unterschiedlichen Fluoreszenzfarbstoffen markierte Sonden:

- Eine HLA-spezifische Sonde (Fluorochrom 1)
- Eine HGH-spezifische Sonde zur Amplifikationskontrolle (Fluorochrom 2)
- Evtl. eine weitere HLA-spezifische PCR Sonde bei Multiplexreaktionen (Fluorochrom 3)

Die Negativ-/Kontaminationskontrolle, welche einen HGH-spezifisch Oligonukleotidmix enthält, befindet sich auf der Plattenposition H1 und ist über eine rote Färbung des Oligonukleotidmixes gekennzeichnet. Das HLA-FluoGene^{NX} Match System beinhaltet 192 Reaktionen auf zwei 96-well Platten („Plate A“ und „Plate B“), die beide eine Negativkontrolle enthalten.

2 MATERIAL

2.1 Bestandteile der HLA- FluoGene^{NX} Kits

- **Weißer, barcodierte 96er PCR-Platten mit beschrifteter Abdeckfolie**

Beinhalten die angefärbten und getrockneten Oligonukleotidmixe, die aus HLA-spezifischen und internen Kontrollprimern sowie fluoreszenzmarkierten Oligonukleotidsonden bestehen. Eine Typisierung besteht aus einer definierten Anzahl von Reaktionen (PCRs/Test, siehe Tabelle 1).

Tabelle 1: Kitspezifische Bestandteile

Kit	Tests/ Kit	PCRs/ Test	Anzahl PCR Platten	Anzahl FluoMix Gefäße	Anzahl optische Folie
HLA-FluoGene ^{NX} ABCDRDQ	10	96	10	10	10
HLA-FluoGene ^{NX} Match	5	192	10 (5x "Plate A", 5x "Plate B")	10	10

- **Reaktionsgefäße mit FluoMix**

Ein Reaktionsgefäß ist ausreichend für je eine Typisierung mit Ausnahme von HLA-FluoGene^{NX} Match. Bei diesem Test ist ein Reaktionsgefäß ausreichend für eine Platte.

Der FluoMix enthält dNTPs, PCR-Puffer und Taq-Polymerase.

- **Optische Folien zum Verschließen**

- **Gebrauchsinformation**

- **Kit- und Chargendokumentation:**

- Qualitätszertifikat
- Limitationen, Locus-übergreifende Reaktionen und CWD Tabelle
- Spezifitätentabelle
- Information-Sheet mit Änderungen zur Vorgängercharge

- **Versionierte Lot Files Update CD mit:**

Kitdateien und Alleldatenbanken zum Import in die FluoGene Software mit Anleitung

2.2 Lagerung und Haltbarkeit

Die HLA-FluoGene^{NX} Kits werden gekühlt verschickt. Nach Erhalt der Ware sollte diese bei mindestens -20°C gelagert werden. Die Haltbarkeiten der Einzelkomponenten und des Gesamtsystems sind auf dem jeweiligen Etikett ausgewiesen.

2.3 Zusätzlich benötigte Materialien

Zur Amplifikation

- Aqua dest. (ohne Eigenfluoreszenz), z.B. „LiChrosolv“ (Merck)
- Proben-DNA (Ratio A_{260}/A_{280} : $1,8 \pm 10\%$)
- Pipetten (1 – 1000 µl)
- Pipettenspitzen mit Filter
- Dispensierhilfe
- Thermocycler bei Endpunktdetektion (siehe 3.4.2)
- FluoPad, Kompressionspad zum Schutz der optischen Folie (**inno-train**, Art.-Nr.: 002 07C P01)
- FluoApp, Applikator zum Andrücken der optischen Folie (**inno-train**, Art.-Nr.: 002 07F A01)
- Plattenzentrifuge

Zur Detektion und Auswertung

- **inno-train** FluoVista Analysegerät (Art.-Nr.: 006 010 001) oder
- **inno-train** FluoQube Real-Time PCR Gerät (Art.-Nr.: 005 010 001)*
- FluoGene Auswertesoftware

* HLA-FluoGene^{NX} ABCDRDQ ist ausschließlich für den Gebrauch mit FluoQube validiert.

3 DURCHFÜHRUNG DER METHODE

3.1 Probengewinnung

Als Ausgangsmaterial sollte EDTA- oder Citrat-Blut verwendet werden, da Heparinreste nach erfolgter DNA-Extraktion die PCR inhibieren können. Bei der DNA-Extraktion aus Blut dienen die Leukozyten als DNA-Quelle, generell kann zur Methodendurchführung aber genomische DNA jeglicher Herkunft verwendet werden (Haare, Gaumenabstrich etc.).

Die Konzentration der Proben-DNA muss vor Testansatz bestimmt werden. Die Proben-DNA sollte gelöst und verdünnt in Aqua dest. (ohne Eigenfluoreszenz) in einer Konzentration von 1 ng/µl vorliegen. Alternativ kann die DNA auch unverdünnt zum FluoMix gegeben werden und mit H₂O auf eine Endkonzentration von 0,5 ng/µl eingestellt werden. Der Reinheitsquotient OD_{260}/OD_{280} sollte $1,8 \pm 10\%$ betragen.

3.2 Vorsichtsmaßnahmen

Da nach dem Ansatz der PCR durch das geschlossene System von HLA-FluoGene^{NX} kein PCR-Produkt austreten kann, besteht kein Risiko einer Kontamination. Aufgrund von bestehenden Richtlinien empfehlen wir weiterhin die folgenden Sicherheitsmaßnahmen:

Zur Vermeidung von Kontaminationen innerhalb der PCR Methode:

- Räumliche Trennung des Prä-PCR-Bereichs (DNA-Isolierung, -Lagerung, PCR-Ansatz) vom Post-PCR-Bereich (Thermocycler, Fluoreszenzreader)
- Bestandteile des Post-PCR-Bereichs dürfen nicht in den Prä-PCR-Bereich gelangen.
- Verwenden Sie Pipettenspitzen mit Aerosolschutz im Prä-PCR-Bereich.

Zur Durchführung molekularbiologischer Methoden in der HLA-Typisierung:

- Erfahrungen in der HLA- sowie DNA-Diagnostik sind notwendig.

3.3 Einen Job in der FluoGene Software anlegen

Für die zu testenden FluoGene^{NX} PCR-Platten und DNA-Proben muss entsprechend der FluoGene Software Gebrauchsinformation ein neuer Job angelegt werden. Die FluoGene Software generiert automatisch ein PCR-Protokoll als Arbeitsvorlage mit allen notwendigen Angaben.

3.4 PCR / Amplifikation

Der Methodenablauf ist in allen HLA- FluoGene^{NX} Kits gleich:

- ⇒ Die optischen Folien sollen bei Raumtemperatur gelagert werden, um ein Beschlagen der Folie zu vermeiden!
- ⇒ PCR-Platte, FluoMix und DNA-Proben auftauen.
- ⇒ Die Negativ-/Kontaminationskontrolle befindet sich auf der Plattenposition H1 und ist durch eine rötliche Färbung des Oligonukleotidmixes gekennzeichnet.
- ⇒ Der FluoMix ist gebrauchsfertig und für eine Typisierung aliquotiert. Ausnahme ist das HLA- FluoGene^{NX} Match Testsystem: hier ist der FluoMix für eine Platte aliquotiert. Vor DNA-Zugabe den FluoMix gründlich vortexen und 4 µl in das Negativkontrollgefäß pipettieren.

- ⇒ 4 µl Aqua dest. in das Negativkontrollgefäß geben.
- ⇒ Danach verdünnte DNA (Konz. 1 ng/µl ± 50%) zum restlichen FluoMix zugeben (Volumen siehe Tabelle), erneut gründlich vortexen und in 8 µl-Aliquots auf die verbleibenden Gefäße der Typisierung verteilen (vorzugsweise mit einem Handdispenser am oberen Rand der Gefäßwände).

Alternativ kann auch die in der Tabelle angegebene DNA-Menge in den FluoMix gegeben werden und auf das entsprechende Endvolumen mit H₂O aufgefüllt werden.

Die bereits pipettierten Reaktionen zeigen zur besseren Übersicht eine schwache Färbung (Negativkontrolle: rötlich, spezifische Reaktionen: bläulich).

Kit	Volumen FluoMix	Volumen Proben-DNA (1 ng/µl ± 50%) / Test	DNA-Menge (± 50%)	Endvolumen FluoMix, H ₂ O und DNA
HLA-FluoGene ^{NX} ABCDRDQ, Match	420 µl	420 µl	420 ng	840 µl

- ⇒ PCR-Platte mit adhäsiver optischer Folie abdecken und durch festes und gleichmäßiges Andrücken verschließen (Einmal-Laborhandschuhe und einen Andruckspatel, z.B. FluoApp von **inno-train** verwenden). Fingerabdrücke und Verschmutzung auf der Folie vermeiden.
- ⇒ **PCR-Platte kurz abzentrifugieren**
- ⇒ Während der gesamten Methodendurchführung müssen Flüssigkeitsspritzer und Kondensflüssigkeit auf der Folie unbedingt vermieden werden. Bei Bedarf PCR-Platte ca. 30 sec. im Thermocycler mit eingeschalteter Deckelheizung inkubieren.
- ⇒ **Bei Gebrauch des FluoVista Analysegeräts: Der Pre-Read muss innerhalb von 15 Minuten nach PCR-Ansatz durchgeführt werden.** Dazu PCR-Platte in **inno-train** FluoVista Analysegerät übertragen. Hierbei ist zu beachten, dass die richtige Orientierung der PCR-Platte durch Metallstifte auf der FluoVista Carrier Plate vorgegeben wird. Diese wird bei richtiger Orientierung (gezackte Längsseite zeigt nach rechts) automatisch in das Gerät eingezogen und darf nicht mit Gewalt eingeschoben oder herausgezogen werden.
- ⇒ PCR-Platte in Thermocycler oder FluoQube übertragen, ein sauberes FluoPad auflegen (bzw. auf sauberen Heizdeckel achten) und PCR starten.
Hinweis: HLA-FluoGene^{NX} ABCDRDQ ist ausschließlich für den Gebrauch mit FluoQube validiert.
- ⇒ **Bei Gebrauch des FluoVista Analysegeräts: Der Post-Read muss innerhalb von 15 Minuten nach Ende der PCR durchgeführt werden.** Die Platte kann nach erfolgter 3-minütiger Abkühlung auf 20°C direkt gemessen werden.

3.4.1 PCR-Programm (für den Gebrauch mit FluoVista Analysegerät)

1x Initial	40 Zyklen	Abkühlung	
96°C 2 min.	96°C 15 sec. 60°C 30 sec. 68°C 5 sec.	20°C 3 min.	20°C max. 15 min.

Validierte Thermocycler und Hinweise:

Hersteller	Modell	Heizrate	Wichtiger Hinweis
Applied Biosystems	GeneAmp PCR System 9700	Max.	Aluminiumblock nicht geeignet
Applied Biosystems	Veriti	9700 Mode	-
Analytik Jena	Biometra TProfessional 96	2,5°C	-

Die Verwendung abweichender Thermocycler muss vom Anwender validiert werden.

3.4.2 PCR-Programm (für den Gebrauch mit FluoQube)

Die Einstellungen der PCR und Leseparameter des FluoQube sind bei Auslieferung schon voreingestellt und werden durch ein geschütztes Template automatisch angewendet.

1x Initial	38x Zyklen
96°C 2 min.	96°C 15 sec.
	60°C 18 sec. (+ Read*)
	68°C 5 sec.

* Die Fluoreszenzmessung erfolgt während des 60°C-Schritts. Es müssen die Kanäle „Blue“, „Green“ und „Orange“ angewählt sein. Der FluoQube muss mit einer Heizrate von 2,5 °C/sec programmiert werden. Diese Einstellungen sind bei Verwendung der „FluoGene.rts“ Vorlage vorgegeben.

Das PCR-Programm wurde mit dem FluoQube Real Time PCR Gerät validiert.

Die Verwendung des qTOWER³ (Analytik Jena) ist unter gewissen Voraussetzungen möglich. Dazu muss vor Anwendung der FluoGene^{NX} Methode ein Servicebesuch von **inno-train** stattfinden, um bestimmte Einstellungen am Gerät vorzunehmen und die entsprechend zu erwerbende Software zu installieren. Nähere Informationen erhalten Sie dazu per Telefon unter 06173-607930 oder per E-Mail an swi.support@inno-train.de.

3.5 Fluoreszenzdetektion

- ⇒ Die Endpunkt-Fluoreszenzdetektion erfolgt im **inno-train** FluoVista Analysegerät (Post-Read). Hier ist darauf zu achten, dass ein Beschlagen der optischen Folie durch Kondensation vermieden (s.o.) und die Messung innerhalb von 15 min. nach Ende des PCR-Programms durchgeführt wird.
- ⇒ Die Fluoreszenzdetektion mittels **inno-train** FluoQube erfolgt während des PCR-Laufs.

3.6 Berechnung der Daten

- ⇒ Erfolgt automatisch durch die FluoGene Software.

4 AUSWERTUNG

Die Auswertung kann nach Endpunkt-Fluoreszenzdetektion (Pre- und Post-Read) sowie nach real-time PCR erfolgen.

Bei der Endpunktdetektion werden vor und nach PCR die Emissionen der verschiedenen Fluorochrome im FluoVista als Fluoreszenzwert detektiert und die Differenz als Deltawert mithilfe der FluoGene Auswertesoftware ermittelt.

Im FluoQube wird der Anstieg der Emissionen der verschiedenen Fluorochrome während des PCR-Laufs detektiert. Aus diesen Fluoreszenzwerten sowie dem CT-Wert (Cycle threshold, Beginn des exponentiellen Wachstums einer Amplifikationskurve) werden die Q-Werte ermittelt.

Diese errechneten Werte werden mithilfe der FluoGene Auswertesoftware als positiv oder negativ bewertet. Der Anstieg der Fluoreszenz- bzw. der Q-Werte über spezifische Schwellenwerte spiegelt dabei eine positive Amplifikation wider. Liegt der jeweilige Wert unter dem Schwellenwert, wird die Reaktion negativ bewertet.

Bei einer positiven spezifischen Reaktion kann aufgrund kompetitiver Primereffekte die interne Kontrollreaktion ausfallen. Fällt die Kontrollreaktion hingegen in einer Reaktion aus, bei der auch die spezifische Reaktion negativ ist, wird diese Reaktion nicht in die Auswertung einbezogen und in der FluoGene Software mit einem roten Fragezeichen markiert.

Ausführliche Informationen entnehmen Sie der Gebrauchsinformation der FluoGene Software.

4.1 Verweis auf internationale Standards

Auf Grundlage der gängigen EFI-Richtlinien sollten homozygote Ergebnisse mit anderen Methoden und/oder Familienuntersuchungen verifiziert werden. Auf dem Befund der FluoGene Software wird nur eine nachgewiesene Allelgruppe aufgelistet, z.B. HLA-C*03.

5 LEISTUNGSDATEN/-BEWERTUNG

Im Rahmen der Leistungsbewertungsstudien wurden alle HLA- FluoGene^{NX} Kits mit molekularbiologisch vortypisierten Proben getestet. In allen Kits zeigte sich eine 100%ige Ergebnisübereinstimmung.

Im Rahmen der Qualitätskontrollen wird jeder Oligonukleotidmix auf korrekte Positivität und Negativität getestet.

Bei Einsatz von 7,5 ng DNA pro Reaktionsgefäß erhält man ein sicheres Typisierungsergebnis. Die Zusammensetzung der Oligonukleotidmische erlaubt eine zuverlässige Identifikation der auf den Spezifitätentabellen angegebenen HLA-Allele. HLA-FluoGene^{NX} ermöglicht mindestens eine niedrigauflösende Typisierung (1.Feld) der HLA Klasse I (HLA-A*, -B*, -C*) sowie der HLA Klasse II (HLA-DRB1*, -DRB3*, -DRB4*, -DRB5*, -DQA1*/DQB1*, -DPA1*/DPB1*) Merkmale hinsichtlich der „Common Allele“ (CWD 2.0 <http://igdawg.org/cwd.html>). Die Richtigkeit und Reproduzierbarkeit der Reaktivität der einzelnen Oligonukleotidmische wurde anhand von Kontrollproben mit bekannten Merkmalen überprüft.

Die Qualität der Ergebnisse, die mit den HLA-FluoGene^{NX} Kits erzielt werden, hängt entscheidend von den verwendeten Reagenzien und Materialien ab. Daher wird empfohlen, die Tests mit den unter Punkt 2.3 beschriebenen zusätzlich benötigten Materialien durchzuführen. Alle Abweichungen von diesem Verfahren (z.B. Verwendung alternativer Thermocycler) müssen durch den Anwender validiert werden.

6 ALLGEMEINE WARNHINWEISE UND VORSICHTSMAßNAHMEN

- ⇒ Bei Proben humanen Ursprungs besteht auch nach DNA-Extraktion ein potentielles Infektionsrisiko. Deshalb sollten bei der Durchführung der FluoGene^{NX} Methode Handschuhe und Arbeitsmittel getragen und alle Empfehlungen zum Umgang mit infektiösem Material eingehalten werden.
- ⇒ Mangelhaftes Patientenmaterial kann das Analysenergebnis beeinträchtigen.
- ⇒ Die Fluoreszenzfarbstoffe sind lichtempfindlich. Daher sollten die Platten zügig abgearbeitet werden.
- ⇒ Nach Ablauf der Haltbarkeit sollten Reagenzien nicht mehr verwendet werden.
- ⇒ Verwenden Sie nur die dem Kit beiliegenden optischen Folien zum Verschließen der FluoGene^{NX} Platten.
- ⇒ Zur Messung der Fluoreszenz ausschließlich das **inno-train** FluoVista Analysegerät oder **inno-train** FluoQube Real-Time PCR Gerät verwenden.
- ⇒ Das Kit HLA-FluoGene^{NX} ABCDRDQ ist ausschließlich für den Gebrauch mit FluoQube validiert.
- ⇒ Die Auswertung der HLA-FluoGene^{NX} Produkte erfolgt ausschließlich über die FluoGene Software.
- ⇒ Die Reagenzien sind nur chargenbezogen einsetzbar.
- ⇒ Die Vorgaben dieser Gebrauchsinformation zur Abarbeitung des FluoGene^{NX} Assays sind strikt einzuhalten. Abweichungen können zu falsch positiven oder falsch negativen Reaktionen der Primer-/Sondenmische und somit zu Fehltypisierungen führen.

Nähere Informationen und Hilfestellung per Telefon unter: 06173-607930, oder per E-Mail an support@inno-train.de

7 LIZENZVEREINBARUNG DYES AND QUENCHER

“HilyteTM” is a trademark of Anaspec, Inc., “QXL[®]” is a registered trademark of Anaspec, Inc., “DDQITM” are trademarks of Kaneka Eurogentec SA.

QXL, Hilyte, DDQI, DDQII, are licenced pursuant to an agreement with Kaneka Eurogentec S.A., and these products are sold exclusively for diagnostic purposes.

Elitech Dyes and Quenchers

“EclipseTM Dark Quencher”, “EclipseTM Quencher” are trademarks of ELITechGroup, Inc., “Yakima Yellow[®]”, “AquaPhluor[®]”, “Redmond Red[®]” and “Eclipse[®]” are registered trademarks of ELITechGroup, Inc.















Use of this product (including but not limited to Yakima Yellow[®] and EclipseTM Dark Quencher) is covered by patents owned by ELITechGroup, Inc., and sublicensed by Kaneka Eurogentec S.A. Such patents include without limitation the following US patents and corresponding patent claims outside the US: US6,699,975, US 6,790,945, US 7,662,942, US 6,653,473, US 6,972,339, 7,541,454, 7,671,218, 7,767,834, 8,163,910, 6,727,356. Further information on purchasing licences may be obtained by contacting licensing@eurogentec.com.

8 TROUBLE SHOOTING

Problem	Mögliche Ursache	Lösung
Ausfall von Reaktionen / falsch negative Reaktionen	Zu hohes Aliquotiervolumen verwendet	Pipetteneinstellung überprüfen.
	Mangelhafte DNA-Qualität	Photometrische Bestimmung des Reinheitsgrads der DNA. Der Quotient der Extinktionen bei $\lambda=260$ nm und $\lambda=280$ nm sollte bei 1,8 liegen.
	Magnetische Beads im PCR-Ansatz	Beads über Magnet oder Zentrifugation abtrennen.
	PCR-Inhibitoren im Aqua dest.	Frisches Aqua dest. benutzen.
	Zu geringe DNA-Konzentration	DNA-Konzentration bestimmen und auf 1 ng/ μ l einstellen. Verdünnen Sie die DNA mit fluoreszenzfreiem Aqua dest.
	Mastermix-DNA-Gemisch nicht ausreichend gemischt	Mastermix-DNA-Gemisch gründlich vortexen.
	Mastermix nicht in Well pipettiert	Optische Kontrolle. Nach Zugabe des Mastermixes färbt sich die Lösung bläulich.
	Mastermix mit Luftblasen in Well pipettiert	Optische Kontrolle. Falls Sie Luftblasen bemerken, sollten Sie die PCR Platte kurz abzentrifugieren oder vorsichtig auf der Tischkante abklopfen.
	Falsche Amplifikations-Bedingungen	Thermocycler überprüfen. Zur Durchführung der Methode validiert sind die Cycler: siehe Punkte 3.4.2 und 3.4.3.
	Reaktionsgefäße nicht richtig verschlossen (zu hoher Verlust an Probenvolumen nach PCR)	Achten Sie darauf, dass die Folie fest sitzt. Benutzen Sie hierfür den FluoApp. Verwenden Sie während der das FluoPad.
Falsch positive Reaktionen	Flüssigkeitsspritzer auf optischer Folie	Folienwechsel
	Beschlagene oder dreckige optische Folie	Inkubieren Sie die Platte erneut im Thermocycler mit eingeschalteter Deckelheizung (ca. 30 Sekunden) oder tauschen Sie die Folie aus. Berühren Sie die Folie nur mit sauberen Einmal-Handschuhen. Achten Sie darauf, dass der FluoVista nicht im direkten Zug der Klimaanlage steht.
	Platte sitzt bei post-Messung nicht richtig auf FluoVista Carrier Plate	Vor jedem Read Platte auf korrekte Positionierung kontrollieren.
	Zeitraum zwischen PCR-Ansatz und pre-Messung länger als 15 Minuten und / oder Lagerung zwischen PCR-Ansatz und pre-Messung, bzw. zwischen Thermocycler und post-Messung im Licht.	Platte innerhalb von 15 Minuten nach PCR-Ansatz messen und stets im Dunkeln verwahren.
	Zu geringes Aliquotiervolumen verwendet	Pipetteneinstellung überprüfen.
Falsch positive Reaktionen	Zu hohe DNA Konzentration	DNA Konzentration bestimmen und auf 1 ng/ μ l einstellen. Verdünnen Sie die DNA mit fluoreszenzfreiem Aqua dest.
	Falsche Amplifikations-Bedingungen	Thermocycler überprüfen. Zur Durchführung der Methode validiert sind die Cycler: siehe Punkte 3.4.2 und 3.4.3.
	Rote oder gelbe Stifte auf Platte verwendet Bei pre-Messung Luftblase im Well	Nur schwarze oder blaue Markierungen setzen. Potentielle Luftblasen durch Abklopfen oder ggf. Anzentrifugieren zerstören.
	Verdunstung aufgrund undichter Folienaufbringung	FluoApp zum Festdrücken der Folie benutzen. Auf festen Sitz an den Rändern achten.

Problem	Mögliche Ursache	Lösung
Falsch positive Reaktionen	Zu langer Zeitraum zwischen PCR-Reaktion und post-Messung Flüssigkeitsspritzer auf optischer Folie Beschlagene oder dreckige optische Folie Zeitraum zwischen PCR-Ansatz und pre-Messung länger als 15 Minuten	Messen Sie die Endpunkt-Fluoreszenz maximal 15 min nach Ablauf des PCR-Programms. Folienwechsel Inkubieren Sie die Platte erneut im Thermocycler mit eingeschalteter Deckelheizung (ca. 30 Sekunden) oder tauschen Sie die Folie aus. Berühren Sie die Folie nur mit sauberen Einmal-Handschuhen. Achten Sie darauf, dass der FluoVista nicht im direkten Zug der Klimaanlage steht. Platte innerhalb von 15 Minuten nach PCR-Ansatz messen.

9 ERKLÄRUNG DER SYMBOLE

	Begleitdokumente beachten		Verwendbar bis
	Chargen-Bezeichnung		Bestellnummer
	Gebrauchsinformation beachten		Hersteller
	obere Temperaturgrenze beachten		In Vitro Diagnostikum
	Inhalt ausreichend für <n> Bestimmungen		PCR-Platte
	FluoMix		optische Folie
	Positiv-Kontroll-DNA		Negativ-Kontroll-DNA

10 LITERATUR

- Mullis KB, Faloona F: Specific synthesis of DNA in vitro via polymerase catalysed chain reaction. Meth. Enzym. 1987;155:335-350
- Newton CR, Graham A, Heptinstall E, Powell SJ, Summers C, Kalsheker N, Smith JC, Markham AF: Analysis of any point mutation in DNA. The amplification refractory mutation system (ARMS). Nucleic Acids Research 1989;17:2503-2516.
- Olerup O, Zetterquist H: 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 1992;39:225-235.
- Bunce M, O'Neill CM, Barnardo MCNM, Krausa P, Browning MJ, Morris PJ, Welsh KI: 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 1995;46:355-367.
- Bunce M, Young NT, Welsh KI: Molecular HLA Typing – The brave new world. Transplantation 1997;64:1505-1513.