 Niederhöchstädter Str. 62 D-61476 Kronberg / Taunus Tel. +49-6173-607930	Gebrauchsinformation	CE
Version 2.7	RBC-FluoGene	QMS 11.17

RBC-FluoGene

Verwendungszweck:

Zur weiterführenden Blutgruppen-Bestimmung vortypisierter Proben durch Endpunkt-Fluoreszenzdetektion nach SSP-PCR sowie durch real-time PCR

IVD

Bestell-Nr.	Produkt	Reaktionen/ Test	Tests/ Platte	Tests/ Packung
001 086 040	RBC-FluoGene ABO basic	17	4	40
001 086 010	RBC-FluoGene ABO basic	17	1	10
001 081 030	RBC-FluoGene vERYfy	32	3	30
001 081 010	RBC-FluoGene vERYfy	32	1	10
001 091 101*	RBC-FluoGene vERYfy eXtend	96	1	10
001 082 040	RBC-FluoGene CDE	24	4	40
001 082 010	RBC-FluoGene CDE	24	1	10
001 083 040*	RBC-FluoGene D weak/variant	16	4	40
001 083 010*	RBC-FluoGene D weak/variant	16	1	10
001 085 010	RBC-FluoGene Rare	32	1	10
001 087 048	RBC-FluoGene D-Screen	1	12	48
001 088 048	RBC-FluoGene Vel-Screen	2	12	48
001 089 010	RBC-FluoGene KKD	16	1	10
001 090 010	RBC-FluoGene MNS	15	1	10

* Der Kaufpreis dieses Produktes beinhaltet nicht-übertragbare Rechte zur beschränkten Nutzung des Europäischen Patents EP 1 047 777 B1.

ÄNDERUNGEN ZUR VERSION 2.6:

- Deckblatt, Kopfzeile:
Version 2.7 & QMS 11.17
- Überarbeitung durch Markteinführung FluoQube

INHALTSVERZEICHNIS

1	ALLGEMEINE PRODUKTINFORMATIONEN.....	2
1.1	PRINZIP DER METHODE.....	2
1.2	RBC-FLUOGENE TESTSYSTEME.....	3
1.2.1	RBC-FLUOGENE ABO BASIC.....	3
1.2.2	RBC-FLUOGENE VERIFY.....	3
1.2.3	RBC-FLUOGENE CDE.....	3
1.2.4	RBC-FLUOGENE D WEAK/VARIANT.....	4
1.2.5	RBC-FLUOGENE RARE.....	4
1.2.6	RBC-FLUOGENE D-SCREEN.....	4
1.2.7	RBC-FLUOGENE VEL-SCREEN.....	4
1.2.8	RBC-FLUOGENE KKD.....	4
1.2.9	RBC-FLUOGENE MNS.....	5
1.2.10	RBC-FLUOGENE VERIFY EXTEND.....	5
2	MATERIAL.....	5
2.1	BESTANDTEILE DER RBC-FLUOGENE KITS.....	5
2.2	LAGERUNG UND HALTBARKEIT.....	6
2.3	ZUSÄTZLICH BENÖTIGTE MATERIALIEN.....	6
3	DURCHFÜHRUNG DER METHODE.....	6
3.1	PROBENGEWINNUNG.....	6
3.2	VORSICHTSMAßNAHMEN.....	6
3.3	EINEN JOB IN DER FLUOGENE SOFTWARE ANLEGEN.....	7
3.4	PCR / AMPLIFIKATION.....	7
3.4.1	PCR-ANSATZ RBC-FLUOGENE D-SCREEN UND RBC-FLUOGENE VEL-SCREEN.....	7
3.4.2	PCR-PROGRAMM (FÜR DEN GEBRAUCH MIT FLUOVISTA ANALYSEGERÄT).....	8
3.4.3	PCR-PROGRAMM (FÜR DEN GEBRAUCH MIT FLUOQUBE).....	8
3.5	FLUORESZENZDETEKTION.....	9
3.6	BERECHNUNG DER DATEN.....	9
4	AUSWERTUNG.....	9
5	LEISTUNGSDATEN/-BEWERTUNG.....	9
6	ALLGEMEINE WARNHINWEISE UND VORSICHTSMAßNAHMEN.....	10
7	TROUBLE SHOOTING.....	10
8	ERKLÄRUNG DER SYMBOLE.....	11
9	LITERATUR.....	11

1 ALLGEMEINE PRODUKTINFORMATIONEN**1.1 Prinzip der Methode**

Die molekularbiologischen FluoGene Detektionssysteme von **ino-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 eine Spezifikation des bestimmbar Merkmals ausschließlich die Sequenz des Primers am 3' Ende verantwortlich ist [2]. Für eine 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 RBC-FluoGene Testsysteme

Die RBC (Red Blood Cells)-FluoGene Testsysteme der **inno-train** ermöglichen eine molekulare Bestimmung der unterschiedlichen Blutgruppensysteme. Verschiedene, in PCR-Platten voraliquotierte und getrocknete Oligonukleotidmische dienen zur Amplifikation der genetischen Merkmale. Jeder dieser Oligonukleotidmische beinhaltet Primer und mit unterschiedlichen Fluoreszenzfarbstoffen markierte Sonden:

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

Die Position der Negativ-/Kontaminationskontrolle, welche HGH-spezifische Oligonukleotidmische enthält, trägt auf der Platte eine schwarze Farbmarkierung.

1.2.1 RBC-FluoGene ABO basic

Verantwortlich für die antigenen Eigenschaften der erythrozytären ABO-Rezeptoren sind Zuckerbausteine. Diese Kohlenhydrate werden nicht durch DNA-Sequenzen kodiert, sondern von Enzymen synthetisiert. Die Sequenz kohlenhydratspezifischer Glykosyltransferasen kann wiederum über PCR identifiziert werden. Die ABO Glykosyltransferasen übertragen Zuckerreste auf die „H-Substanz“, so dass durch N-Acetyl-Galaktosamin A-Antigene und/oder durch Galaktose B-Antigene gebildet werden.

Das RBC-FluoGene ABO basic System ist in der Lage, die häufigsten Merkmale A, A₂, B, O₁ und O₂ eindeutig voneinander zu unterscheiden.

1.2.2 RBC-FluoGene vERYfy

Dieses Testsystem eignet sich für die Typisierung unterschiedlicher Blutgruppensysteme. Serologisch befundene D-Ambiguitäten, unklare Blutgruppen polytransfundierter Patienten oder von Patienten, die Allo- oder Auto-Antikörper bilden und/oder einen positiven DAT Test zeigen, können mit diesem Kit gescreent und identifiziert werden.

Im Rhesus-System werden innerhalb des *RHD*-Gens die Exone 3, 5 und 10, sowie das *RHD* Pseudogen ψ (37 bp Insertion in Intron 3) detektiert, sowie die Allele C, c, E, e und C^w. Darüber hinaus werden mit diesem Kit die Blutgruppensysteme Kell (KEL1/KEL2), Kidd (JK1/JK2), Duffy mit den Allelen FY1(A), FY2(B), FYX und FYnull (GATA-box Mutation), MNS mit den Allelen MNS1(M), MNS2(N), MNS3(S), MNS4(s), U+var(P2) und U+var(NY) sowie Dombrock (DO1/DO2) typisiert.

1.2.3 RBC-FluoGene CDE

Für die Ausprägung der CDE Rhesusmerkmale sind zwei auf Chromosom 1 lokalisierte Gene, das *RHD*-Gen und das *RHCE*-Gen, verantwortlich. Beide Gene bestehen aus zehn Exonen. Während die Bezeichnung Rhesus klein d das Fehlen des kompletten *RHD*-Gens und somit auch des D-Rezeptors ausdrückt, sind die Merkmale CcEe durch Sequenzunterschiede im *RHCE*-Gen charakterisiert. Zusätzlich detektiert das CDE Testsystem die beiden *RHCE* SNPs 733C>G und 1006G>T, wodurch man Vorhersagen auf den abgeleiteten RH:10/RH:20 (V/Vs) Phänotypen treffen kann. Die detaillierte Information, welche *RHCE*-Varianten diese SNPs aufweisen, ist der Spezifitätentabelle des jeweiligen Kits zu entnehmen. Aus Gründen der Übersichtlichkeit bildet die Software lediglich eine positive Detektion des SNPs ab.

Neben den D-positiven und D-negativen Phänotypen kommt es in seltenen Fällen (0,2 bis 1% bei Europäern) zur Ausprägung von sogenannten D-Varianten. Hier unterscheidet man die Partial-D-Typen (z.B. D-Kategorien) und die Weak-D-Typen.

Das vorliegende CDE Detektionssystem ermöglicht durch den molekularbiologischen Nachweis der verschiedenen Exone des *RHD*-Gens die Unterscheidung eines „normalen“ D-Typs von den verschiedenen Partial-D-Typen.

Durch den Austausch eines oder mehrerer Exone des *RHD*-Gens gegen die korrespondierenden Exone des *RHCE*-Gens entstehen sogenannte Hybride. Die bekanntesten dieser Hybride werden mit dem vorliegenden System nachgewiesen.

Zusätzlich erlaubt das System die Detektion der Merkmale C, c, E, e und C^w.

Wie von internationalen Fachverbänden gefordert, werden mit dem FluoGene CDE System auch die allelischen Varianten des *RHD* psi und d(C)ces erfasst. Weitere Informationen zum Auflösungsvermögen sind der entsprechenden Spezifitätentabelle zu entnehmen.

1.2.4 RBC-FluoGene D weak/variant

Die weak D Merkmale sind Allele des *RHD*-Gens auf Chromosom 1 und unterscheiden sich in ihrer immunogenen Proteinstruktur (extrazellulär) nicht vom D-Antigen. Die molekulare Charakteristik der weak D Typen sind verschiedene Punktmutationen, die jeweils einen Aminosäureaustausch im intrazellulären- oder transmembranen Bereich des betroffenen Antigens bewirken. Allen weak D Merkmalen gemeinsam ist die gegenüber D-positiven Zellen verminderte Rezeptordichte auf der Zelloberfläche. Die hierdurch geringere Konzentration von Rh/D-Epitopen auf der Erythrozytenmembran ist abhängig vom vorliegenden weak D Typ und kann zu einer sehr starken Abschwächung der Agglutination im klassischen Hämagglutinationstest führen. Durch Verwendung des FluoGene D weak wird eine eindeutige Bestimmung der häufigsten weak D Allele (Typ 1, 1.1, 2, 3, 4, 4.0, 4.1, 4.2 (DAR), 5, 14, 15, und 17) ermöglicht. Mindestens 95% aller beobachteten weak D Phänotypen können den weak D Allelen Typ 1 bis Typ 5 zugeordnet werden. Darüber hinaus werden die 3 häufigsten DEL Allele DEL(M295I), DEL(K409K) und DEL(IVS3+1G>A) detektiert.

1.2.5 RBC-FluoGene Rare

Das vorliegende Nachweissystem ermöglicht die Typisierung der seltenen Blutgruppenallele Diego (DI1/DI2), Wright (DI3/DI4), Cartwright (YT1/YT2), Lutheran (LU1/LU2), Kell (KEL3/KEL4 und KEL6/KEL7), Colton (CO1/CO2) und Knops (KN1/KN2). Die genannten Blutgruppensysteme sind biallelisch mit jeweils einem häufigen und einem selten auftretenden Allel.

1.2.6 RBC-FluoGene D-Screen

Das Testsystem ermöglicht die Detektion der *RHD*-Exone 3, 5 und 10 in nur einer Reaktion. Dabei wird Exon 10 durch die Farbe 1 detektiert, die Exone 3 und 5 gemeinsam durch Farbe 2 und die interne HGH-Kontrolle durch Farbe 3. Der Screening-Test eignet sich zum Beispiel um serologisch negative *RHD* Spenderproben molekular zu bestätigen. Bei positiven Screening-Reaktionen sollten die Proben weiter ausdifferenziert werden.

1.2.7 RBC-FluoGene Vel-Screen

Obwohl die Vel-Blutgruppe bereits 1952 beschrieben wurde, war ihr genetischer Hintergrund bis 2013 unbekannt. Eine homozygote Deletion von 17 Nukleotiden in Exon 3 des *SMIM1* Gens auf Chromosom 1p36 verursacht den seltenen Vel-negativen Phänotyp.

1.2.8 RBC-FluoGene KKD

Dem **Kell**-System liegt ein Genkomplex auf dem Chromosom 7 mit wenigstens 3 Genloci zugrunde. Auf Locus 1 können sich die Merkmale K+k- (KEL*01.01) und k+ (KEL*02), auf Locus 2 die Merkmale Kp(a+) (KEL*02.03) und Kp(b+) sowie auf Locus 3 Js(a+) (KEL*02.06) und Js(b+) wechselseitig vertreten. Die Unterscheidung zwischen KEL*01.01 / KEL*02, in der serologischen Nomenklatur als K (Kell) und k (Cellano) bekannt, beruht auf einem Aminosäureaustausch von Threonin zu Methionin an Position 193 (p. Thr193Met). Mit dem RBC-FluoGene KKD Kit können die Allele KEL*01.01 und KEL*02 sowie die Allele der Loci Kp und Js detektiert werden.

Wichtiger Hinweis: Die Erweiterung des Kits um die Merkmale Kp(a+), Kp(b+), Js(a+) und Js(b+) gilt erst ab Charge R989077S. Die benötigten Pipettierolumina haben sich gegenüber Vorgängerchargen nicht verändert.

Das **Kidd**-System besteht aus insgesamt drei unterschiedlichen Merkmalen, Jka (JK*01), Jkb (JK*02) und Jk- (JKnull). Die Allele JK*01 und JK*02 unterscheiden sich durch einen Sequenzunterschied in Exon 9, der zum Aminosäureaustausch an Position 280 (p.Asn280Asp) des Antigens führt. JK*01 und JK*02 werden im RBC-FluoGene KKD Kit nachgewiesen.

Das **Duffy**-System (*DARC*-Gen) beinhaltet die durch das RBC-FluoGene KKD Kit zu detektierenden Allele FY*01, FY*02, FY*X und FY*null (GATA), die sich am Genort wechselseitig vertreten. In der serologischen Nomenklatur entspricht das FY*01 Allel dem Fy^a Antigen und das FY*02 Allel dem Fy^b Antigen. Das nur schwach exprimierte Allel FY*X wird serologisch als Fy^b weak (=Fy^X) detektiert. Im Gegensatz zu

serologischen Methoden ermöglicht das RBC-FluoGene KKD Kit eine eindeutige Detektion des immunologisch relevanten Antigens Fy^{b weak} (FY^X).

Das in der mitteleuropäischen Bevölkerung mit einer Häufigkeit von ca. 1,4% vertretene Allel FY*null (GATA (Fy-)) bildet keinen Fy-Rezeptor aus. Da *Plasmodium Vivax* den Duffy-Rezeptor zur Malariainfektion benötigt, stellt ein derartiges FY*null Allel einen Selektionsvorteil dar, weshalb die Häufigkeit dieses Allels in Gebieten mit hohem Malaria-Risiko (z.B. Afrika) auf bis zu 68% ansteigt. Außerdem übernimmt das Duffy-System Aufgaben als Chemokin-Rezeptor.

1.2.9 RBC-FluoGene MNS

Mit dem RBC-FluoGene MNS Testsystem werden die Allele GYPA*01 (GYPA*M) und GYPA*02 (GYPA*N) (entspricht den Phänotypen MNS:1 (oder M+) und MNS:2 (oder N+)), sowie die Allele GYPB*03 (GYPB*S) und GYPB*04 (GYPB*s) (entspricht den Phänotypen MNS:3 (oder S+) und MNS:4 (oder s+)) detektiert. Des Weiteren werden die Allele U+var(P2) (GYPB*P2/GYP*He(P2)), U+var(P3) (GYPB*04N.01) sowie U+var(NY) (GYPB*NY/GYP*He(NY)) nachgewiesen.

Wichtiger Hinweis: Die Erweiterung des Kits um das Merkmal U+var(P3) gilt erst ab Charge R990087S. Für frühere Chargen gelten andere Pipettierolumina. Details zu den benötigten Volumina entnehmen Sie bitte der Tabelle auf Seite 7.

1.2.10 RBC-FluoGene vERYfy eXtend

RBC-FluoGene vERYfy eXtend wurde für die erweiterte Blutgruppentypisierung entwickelt und stellt eine Kombination der **inno-train** Blutgruppen-Typisierungskits dar. Mit nur einem Test lassen sich die Merkmale der Systeme RHD/RHCE, KEL, JK, FY, MNS, DO, LU, YT, DI, VEL, CO und KN untersuchen. Weitere Informationen entnehmen Sie bitte dem Kit beiliegender Spezifitätentabelle.

2 MATERIAL

2.1 Bestandteile der RBC-FluoGene Kits

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

Beinhalten die angefärbten und getrockneten Oligonukleotidmische, die aus Blutgruppen-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
ABO basic	40	17	10	40	10
ABO basic	10	17	10	10	10
vERYfy	30	32	10	30	10
vERYfy	10	32	10	10	10
CDE	40	24	10	40	10
CDE	10	24	10	10	10
D weak/variant	40	16	10	40	10
D weak/variant	10	16	10	10	10
Rare	10	32	10	10	10
D-Screen	48	1	4	4	4
Vel-Screen	48	2	4	4	4
KKD (ab Charge R989077S)	10	16	10	10	10
MNS (ab Charge R990087S)	10	15	10	10	10
vERYfy eXtend	10	96	10	10	10

- **Reaktionsgefäße mit FluoMix**

Ein Reaktionsgefäß ist ausreichend für je eine Typisierung, mit Ausnahme von D-Screen und Vel-Screen. Hier wird ein Reaktionsgefäß pro Platte mit 12 Typisierungen verwendet.

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

- **Optische Folien zum Verschließen**
- **Gebrauchsinformation**
- **Kit- und Chargendokumentation**
 - Qualitätszertifikat
 - Spezifitätentabelle
 - Information-Sheet mit Änderungen zur Vorgängercharge
- **Versionierte Lot Files Update CD mit:**
Kitdateien und Allelbanken zum Import in die FluoGene Software mit Anleitung

2.2 Lagerung und Haltbarkeit

Die RBC-FluoGene Kits werden gekühlt verschickt. Nach Erhalt der Ware sollte diese bei -20°C bis -30°C gelagert werden. Die Haltbarkeiten der Einzelkomponenten und des Gesamtsystems sind auf dem jeweiligen Etikett ausgewiesen.

2.3 Zusätzlich benötigte Materialien

Zur Amplifikation	Zur Detektion und Auswertung
<ul style="list-style-type: none"> • 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 (15 μl) • 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) 	<ul style="list-style-type: none"> • inno-train FluoVista Analysegerät (Art.-Nr.: 006 010 001) oder • inno-train FluoQube Real-Time PCR Gerät (Art.-Nr.: 005 010 001) • FluoGene Auswertesoftware

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 H_2O auf eine Endkonzentration von 0,5 ng/ μl eingestellt werden. Der Reinheitsquotient $\text{OD}_{260}/\text{OD}_{280}$ sollte $1,8 \pm 10\%$ betragen.

3.2 Vorsichtsmaßnahmen

Da nach dem Ansatz der PCR durch das geschlossene System von RBC-FluoGene 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 Blutgruppen-Typisierung

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

3.3 Einen Job in der FluoGene Software anlegen

Für die zu testenden FluoGene 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 RBC-FluoGene Kits gleich mit Ausnahme von RBC-FluoGene D-Screen und RBC-FluoGene Vel-Screen (siehe 3.4.1):

- ⇒ PCR-Platte, FluoMix und DNA-Proben auftauen.
- ⇒ Die Negativ-/Kontaminationskontrolle ist im schwarz markierten Gefäß.
- ⇒ Der FluoMix ist gebrauchsfertig und für eine Typisierung aliquotiert. Vor DNA-Zugabe den FluoMix gründlich vortexen und 7,5 µl in das Negativkontrollgefäß pipettieren.
- ⇒ 7,5 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 15 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
ABO basic, KKD, D weak/variant, MNS (ab Charge R990087S)	150 µl	150 µl	150 ng	300 µl
CDE	210 µl	210 µl	210 ng	420 µl
vERYfy, Rare	270 µl	270 µl	270 ng	540 µl
MNS (bis Charge R990076S)	90 µl	90 µl	90 ng	180 µl
vERYfy eXtend	780 µl	780 µl	780 ng	1560 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 vorsichtig auf der Arbeitsplatte abklopfen, so dass sich die gesamte Flüssigkeit am Boden der Reaktionsgefäße sammelt.

Optional: 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.

3.4.1 PCR-Ansatz RBC-FluoGene D-Screen und RBC-FluoGene Vel-Screen

Die D-Screen und Vel-Screen Testsysteme bestehen aus 12 Typisierungen pro Platte. Es ist keine Negativkontrolle enthalten. Falls Sie eine Negativkontrolle mitführen wollen, können Sie hierfür eine der 12 Reaktionen nutzen. Pipettieren Sie dafür 7,5 µl FluoMix und 7,5 µl H₂O direkt auf die Platte.

Die Reaktionen befinden sich in den Reihen B1-B6 und F1-F6 (D-Screen) bzw. B1-B6 (Vel+), C1-C6 (Vel-) und F1-F6 (Vel+) und G1-G6(Vel-).

D-Screen:

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A												
B	1	3	5	7	9	11						
C												
D												
E												
F	2	4	6	8	10	12						
G												
H												

Vel-Screen:

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A												
B	1+	3+	5+	7+	9+	11+						
C	1-	3-	5-	7-	9-	11-						
D												
E												
F	2+	4+	6+	8+	10+	12+						
G	2-	4-	6-	8-	10-	12-						
H												

Hinweis: die Software belegt die Platten spaltenweise von oben nach unten. Daher muss die Auftragung der DNA-FluoMix Gemische ebenfalls von oben nach unten und von links nach rechts erfolgen (entsprechend der Nummerierung in der Graphik).

Ein FluoMix Gefäß (120 µl Volumen D-Screen bzw. 230 µl Vel-Screen) reicht für eine Platte mit 12 Typisierungen aus.

Kit	Volumen FluoMix inkl. Totvolumen	Volumen Proben-DNA (1 ng/µl ± 50%) / Test inkl. Totvolumen	DNA-Menge (± 50%) in 15 µl Endvolumen	Endvolumen FluoMix, H ₂ O und DNA
D-Screen	9 µl	9 µl	7,5 ng	15 µl
Vel-Screen	17 µl	17 µl	7,5 ng	2x 15 µl

Die DNA und der FluoMix müssen gründlich gemischt werden, bevor sie auf die Platte pipettiert werden.

Alternativ: es können auch direkt 7,5 µl FluoMix und 7,5 µl DNA (1 ng/µl) in die Platte pipettiert werden, dann muss die Platte aber nach dem Verschließen mit der optischen Folie kurz abzentrifugiert werden.

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

1x Initial	40x Zyklen	Abkühlung	
95°C 2 min.	95°C 15 sec. 60°C 60 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	
Analytik Jena	Biometra TAdvanced	2,5°C	Denaturierungstemperatur muss in allen Schritten auf 96°C programmiert werden.

Die Verwendung abweichender Thermocycler muss vom Anwender validiert werden.

3.4.3 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 49 sec. (+ Read*)

* Die Fluoreszenzmessung erfolgt während des 60°C-Schritts. Es müssen die Kanäle „Blue“, „Green“ und „Orange“ angewählt sein. Der Cycler muss mit einer Heizrate von 2,5 °C/sec programmiert werden.

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

Die Verwendung des qTOWER³ (Analytic Jena) ist unter gewissen Voraussetzungen möglich. Dazu muss vor Anwendung der FluoGene 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 mit in die Auswertung einbezogen und in der FluoGene Software mit einem roten Fragezeichen markiert.

Ausführliche Informationen entnehmen Sie der Gebrauchsinformation der FluoGene Software.

5 LEISTUNGSDATEN/-BEWERTUNG

Im Rahmen der Leistungsbewertungsstudien wurden alle RBC-FluoGene 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 Oligonukleotidmixe erlaubt eine zuverlässige Identifikation der auf den Spezifitätentabellen angegebenen RBC-Allele. Die Richtigkeit und Reproduzierbarkeit der Reaktivität der einzelnen Oligonukleotidmixe wurde anhand von Kontrollproben mit bekannten Merkmalen überprüft.

Die Qualität der Ergebnisse, die mit den RBC-FluoGene 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 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 Platten.
- ⇒ Zur Messung der Fluoreszenz ausschließlich das **inno-train** FluoVista Analysegerät oder **inno-train** FluoQube Real-Time PCR Gerät verwenden.
- ⇒ Die Reagenzien sind nur chargenbezogen einsetzbar.
- ⇒ Die Vorgaben dieser Gebrauchsinformation zur Abarbeitung des FluoGene Assays sind strikt einzuhalten. Abweichungen können zu falsch positiven oder falsch negativen Reaktionen der Primer-/Sondenmixe und somit zu Fehltypisierungen führen.







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







7 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 PCR das FluoPad.
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	Vor jedem Read Platte auf korrekte	

Problem	Mögliche Ursache	Lösung
Ausfall von Reaktionen / falsch negative Reaktionen	FluoVista Carrier Plate 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.	Positionierung kontrollieren. Platte innerhalb von 15 Minuten nach PCR-Ansatz messen und stets im Dunkeln verwahren.
Falsch positive Reaktionen	Zu geringes Aliquotivolumen verwendet Zu hohe DNA-Konzentration Falsche Amplifikations-Bedingungen Rote oder gelbe Stifte auf Platte verwendet Bei pre-Messung Luftblase im Well Verdunstung aufgrund undichter Folienaufbringung 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	Pipetteneinstellung überprüfen. DNA-Konzentration bestimmen und auf 1 ng/µl einstellen. Verdünnen Sie die DNA mit fluoreszenzfreiem Aqua dest. Thermocycler überprüfen. Zur Durchführung der Methode validiert sind die Cycler: siehe Punkte 3.4.2 und 3.4.3. Nur schwarze oder blaue Markierungen setzen. Potentielle Luftblasen durch Abklopfen oder ggf. Anzentrifugieren zerstören. FluoApp zum Festdrücken der Folie benutzen. Auf festen Sitz an den Rändern achten. 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.

8 ERKLÄRUNG DER SYMBOLE

-  Begleitdokumente beachten
-  Chargen-Bezeichnung
-  Gebrauchsinformation beachten
-  obere Temperaturgrenze beachten
-  Inhalt ausreichend für <n> Bestimmungen
-  FluoMix

-  Verwendbar bis
-  Bestellnummer
-  Hersteller
-  In Vitro Diagnostikum
-  PCR-Platte
-  optische Folie

9 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.