



Návod k použití souprav

## BAGene SSP soupravy



**Testovací soupravy pro ABO typizaci, RH typizaci, pro typizaci systémů Kell, Kidd, Duffy a MNS, vzácné krevní skupiny i pro HPA a HNA specifikaci molekulárně genetickými metodami**

předředěno, připraveno k použití

kat.č.	REF	6640	<b>ABO-TYPE</b>
kat.č.	REF	6641	<b>ABO-TYPE variant</b>
kat.č.	REF	6645	<b>RH-TYPE</b>
kat.č.	REF	6646	<b>Partial D-TYPE</b>
kat.č.	REF	6647	<b>Weak D-TYPE</b>
kat.č.	REF	6648	<b>D Zygotity-TYPE</b>
kat.č.	REF	6650	<b>KKD-TYPE</b>
kat.č.	REF	6652	<b>MNS-TYPE</b>
kat.č.	REF	6653	<b>Rare-TYPE</b>
kat.č.	REF	6660	<b>HPA-TYPE</b>
kat.č.	REF	66701	<b>HNA-TYPE</b>

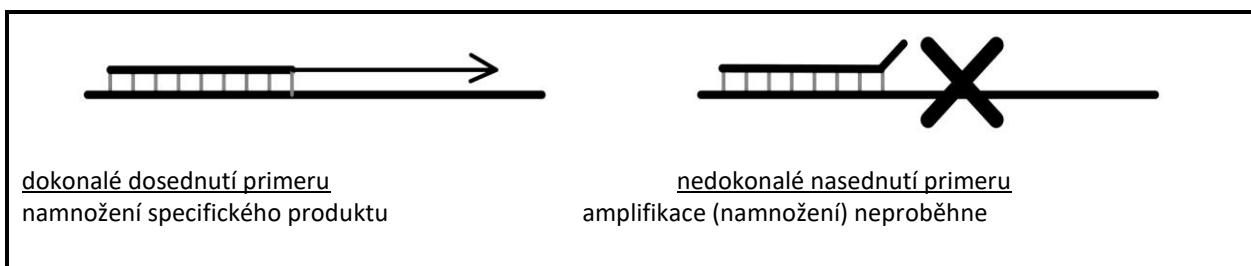
## Obsah

1. Popis výrobku	2
2. Materiál	3
2.1 Obsah BAGene DNA-SSP souprav	3
2.2 Potřebné vybavení a materiál	3
2.3 Skladování a trvanlivost	3
3. Údaje o kvalitě testu	4
4. Pracovní postup	4
4.1 Bezpečnostní pokyny a speciální poznámky	4
4.2 Izolace DNA	4
4.3 Amplifikace	5
4.4 Gelová elektroforéza	6
4.5 Dokumentace	7
4.6 Interpretace výsledků a omezení metody	7
4.6.1 Obecné	7
4.6.2 ABO-TYPE a ABO-TYPE variant	7
4.6.3 RH-TYPE	8
4.6.4 Partial D-TYPE	8
4.6.5 D Zygosity-TYPE	8
5. Varování	9
6. Problémy a jejich řešení	9
7. Literatura	10
8. Vysvětlení symbolů	10

## 1. Popis výrobku

Soupravy BAGene slouží k určování krevních skupin dárců, příjemců a těhotných žen pomocí molekulárně biologických metod. ABO-, ABO variant-, RH-, Partial D-, Partial D-, Weak D-, D Zygosity- a KKD-TYPE slouží k doplnění, vyjasnění a potvrzení výsledku sérologických testů. MNS-, HPA-, HNA- a Rare-TYPE soupravy mohou být použity i k samostatnému molekulárně biologickému typování bez dalších sérologických testů, pokud není stanoveno jinak (viz národní regulace).

Základním materiálem pro typizaci pomocí soupravy **BAGene** je purifikovaná (přečištěná) leukocytární DNA. Test je prováděn pomocí SSP (sequence specific primers – tj. primery specifické pro danou sekvenci) – PCR, (viz Obr. 1). Tato metoda je založena na zjištění, že extenze primeru, a tudíž i úspěšná PCR je závislá na přesně odpovídajících sekvencích na 3' koncích obou primerů. Proto pouze v případě, že primery zcela přesně odpovídají testované sekvenci, proběhne PCR a je možno následně pozorovat její produkt při gelové elektroforéze.



Obr. 1 Princip SSP-PCR

Složení jednotlivých směsí primerů umožňuje po vyhodnocení vyhodnocovacích diagramů jasnou identifikaci skupin ABO, RH, KEL, JK, FY, MNSs, vzácných skupin a HPA i HNA genotypů, tak jak je zobrazeno v odpovídajících interpretačních diagramech. Pro každou typizaci se používá určitý počet reakčních směsí, které jsou dodávány aliquotované (tj. již namíchané v potřebných množstvích) a sušené. Směsi v sobě již zahrnují vnitřní amplifikační kontrolu.

## 2. Materiál

### 2.1. Obsah souprav BAGene

- BAGene destičky/stripy určené pro typizaci krevních skupin. Aliquotované a vysušené reakční směsi se skládají z primerů specifických pro dané alely, primerů vnitřní kontroly (specifické pro gen HGH – lidský růstový hormon nebo genomické sekvence chromozomu I (90 kbp 5' Rhesus Boxu)) a nukleotidů. První reakční směs je vyznačena na destičce/stripu. Na každém stripu či destičce je vyznačeno také číslo šarže.
- 10xPCR pufr
- Víčka ke stripům (ve stripech po 8)
- Návod k použití a vyhodnocovací diagram
- Informace pro vyhodnocení (pouze souprava ABO-TYPE variant)

### 2.2. Potřebné vybavení a materiál

- Happy Taq (REF 70977) (nebo jiná Taq polymeráza validovaná se soupravami BAGene uživatelem). Polymeráza HappyTaq je dodávána zdarma se soupravami BAGene.
- **Nepoužívejte Hot-start Taq Polymerázu** (např. Ampli Taq Gold)
- Souprava **BAG EXTRA GENE** (REF 7059 (možnost) pro extrakci DNA z krve, lymfocytů či leukocytů, případně jiné vybavení pro izolaci DNA
- Pipety s rozsahem 0,5-250 µl
- Sterilní špičky s integrovaným vnitřním filtrem
- DNA cyklér (seznam viz strana 6)
- DNA agaróza
- 0,5 x TBE pufr (45 mM Tris, mM kyselina boritá, 0,5 mM EDTA)
- Ethidium-bromid (EtBr)
- Jednotka pro elektroforézu
- Zdroj napětí (200-300 V, 200 mA)
- DNA délkový standard (REF 7097)
- Zdroj UV záření (transiluminátor,  $\lambda=220-310$  nm)
- Zařízení na dokumentaci gelů

### 2.3. Skladování a stabilita

Soupravy BAGene se dodávají při pokojové teplotě. Polymeráza HappyTaq je dodávána na suchém ledu. Po obdržení skladujte veškeré reagentie při teplotách  $\leq -20^{\circ}\text{C}$ . Datum expirace je uvedeno na etiketě každé z reagentií a je platné i pro již otevřené reagentie. Doba skladovatelnosti uvedená na vnějším popisku se vztahuje na reagentii s nejkratší dobou životnosti. Rozpouštějte 10xPCR pufr těsně před použitím.

## 3. Údaje o kvalitě testu

Složení směsi primerů zaručuje přesnou identifikaci alel zobrazených na interpretačních diagramech a vychází ze současně známých sekvencí.

Přesnost a opakovatelnost specifit každé směsi primerů je potvrzována pro každou šarži pomocí kontrolních DNA vzorků se známými specifitami. Alely, které nejsou v současnosti dostupné a nebyly testovány z důvodů jejich vzácnosti, jsou v pracovních listech a vyhodnocovacích diagramech značeny **n.t.** (not tested currently, doposud netestováno).

Studie výkonosti byly prováděny pro všechny soupravy BAGene DNA-SSP na předem typizovaných vzorcích. Některé směsi nemohly být testovány na pozitivní reakci, neboť jsou specifické pro vzácné alely, které nejsou dostupné pro testování. Toto je uvedeno v pracovním protokolu nebo tabulce specifit. Výzkum prokázal jasnou shodu s předcházejícími sérologickými a/nebo genomickými typizacemi. V průběhu studií nebyla nalezena žádná neshoda.

Vzorky DNA použité ve studiích byly extrahovány pomocí soupravy EXTRA GENE I (vysolovací metoda) a pomocí soupravy Qiagen (kolonková metoda).

Soupravy BAGene byly validovány s použitím polymerázy Happy Taq (REF 70976). Při použití jiného enzymu je třeba validovat tento enzym uživatelem.

Správná typizace je garantována při použití 50 - 100 ng DNA na reakci. Výjimkou je souprava D Zygosity-TYPE, ve které je vhodná, díky delšímu PCR programu, nižší koncentrace DNA a to 30 - 50 ng na reakci.

## 4. Pracovní postup

### 4.1. Bezpečnostní pokyny a speciální poznámky

PCR je vysoce citlivá metoda, která by měla být prováděna osobou se zkušeností s prací v molekulárně biologické laboratoři a s typizací krevních skupin. Současné poznatky z transfuzní medicíny a určování krevních skupin stejně jako transfuzní anamnézy musí být brány v potaz, aby se snížilo možné riziko falešných typizací, obzvláště v případech, kdy molekulárně biologicky a sérologicky získané výsledky nejsou ve shodě. Genotypizace ABO, RHD/RHCE a KKD by měly být prováděny po vyhodnocení sérologických testů.

Práce vyžaduje velkou opatrnost, je nutné vyloučit kontaminaci vzorků a současně i falešných výsledků:

- používejte při práci rukavice (pokud možno bez pudru)
- pro každé pipetování používejte nové sterilní špičky (s integrovaným filtrem)
- vyčleňte oddělené pracovní prostory pro jednotlivé pracovní kroky - tj. předamplifikační (izolace DNA a příprava reakčních směsí) a postamplifikační (gelová elektroforéza a dokumentace), nejlépe ve dvou místnostech
- používejte pomůcky a přístroje jen pro daný krok a nevyměňujte je navzájem.

### 4.2. Izolace DNA

Souprava **BAG EXTRA-GENE** je pro izolaci DNA vhodným řešením, neboť čistá DNA může být získána z plné krve za krátkou dobu, a to bez použití toxických chemikálií a rozpouštědel. Ovšem i jiné komerční soupravy založené na kolonkové metodě či na využití magnetických částic, stejně jako jiné, v literatuře popsané, metody jsou použitelné k získání požadované DNA. Přítomnost heparinu v reakční směsi může inhibovat PCR, proto se doporučuje použití EDTA nebo citrátové krve.

DNA by měla mít následující indexy čistoty:

- $OD_{260} / OD_{280} = > 1,5$  a  $< 2,0$  (indikátor znečištění RNA a proteiny)
- $OD_{260} / OD_{230} = > 1,8$  (indikátor znečištění solemi, uhlovodíky a organickými rozpouštědly)

### 4.3. Amplifikace

Všechny předem zředěné a sušené reakční směsi již obsahují nukleotidy, alely a kontrolní specifické primery. Tato směs je usušená na dně reakčních komůrek. Parametry amplifikace jsou nastaveny pro celkový objem reakce 10 $\mu$ l.

1. Vyjměte odpovídající počet BAGene destiček z mrazícího boxu ( $\leq -20^{\circ}\text{C}$ ) a rozehrňte 10xPCR pufr na pokojovou teplotu.
2. Napipetujte MasterMix z 10xPCR pufru, roztoku DNA, Taq polymerázy a redestilované vody a dobře promíchejte. Všechny BAGene testovací soupravy pracují se stejným MasterMixem a lze tedy používat tentýž pro všechny BAGene soupravy kromě D-zygosity – TYPE, kde je doporučena jiná koncentrace DNA. Následující tabulka (Tab.1) udává složení MasterMixů.

**Tab. 1. Udává složení MasterMixů v závislosti na počtu prováděných testů:**

Počet mixů	H <sub>2</sub> O	10xPCR pufr	Roztok DNA (50-100 ng/ $\mu$ l) (**)	Happy Taq (5U/ $\mu$ l)	Celkový objem
1	8 $\mu$ l	1 $\mu$ l	1 $\mu$ l	0,08 $\mu$ l	10 $\mu$ l
2	16 $\mu$ l	2 $\mu$ l	2 $\mu$ l	0,02 $\mu$ l	20 $\mu$ l
6(*)	50 $\mu$ l	7 $\mu$ l	7 $\mu$ l	0,5 $\mu$ l	65 $\mu$ l
7	70 $\mu$ l	9 $\mu$ l	9 $\mu$ l	0,7 $\mu$ l	90 $\mu$ l
8	80 $\mu$ l	10 $\mu$ l	10 $\mu$ l	0,8 $\mu$ l	100 $\mu$ l
9	88 $\mu$ l	11 $\mu$ l	11 $\mu$ l	0,9 $\mu$ l	110 $\mu$ l
10	96 $\mu$ l	12 $\mu$ l	12 $\mu$ l	1,0 $\mu$ l	120 $\mu$ l
11	104 $\mu$ l	13 $\mu$ l	13 $\mu$ l	1,0 $\mu$ l	130 $\mu$ l
12	112 $\mu$ l	14 $\mu$ l	14 $\mu$ l	1,1 $\mu$ l	140 $\mu$ l
13	128 $\mu$ l	16 $\mu$ l	16 $\mu$ l	1,3 $\mu$ l	160 $\mu$ l
14	136 $\mu$ l	17 $\mu$ l	17 $\mu$ l	1,4 $\mu$ l	170 $\mu$ l
15	144 $\mu$ l	18 $\mu$ l	18 $\mu$ l	1,4 $\mu$ l	180 $\mu$ l
16	152 $\mu$ l	19 $\mu$ l	19 $\mu$ l	1,5 $\mu$ l	190 $\mu$ l

Při odlišných koncentracích DNA musí být změněno množství roztoku a k tomu odpovídajícím způsobem i množství H<sub>2</sub>O (např. pro 12 mixů a koncentraci DNA 120ng/  $\mu$ l použijte 5,8  $\mu$ l DNA a 119  $\mu$ l H<sub>2</sub>O).

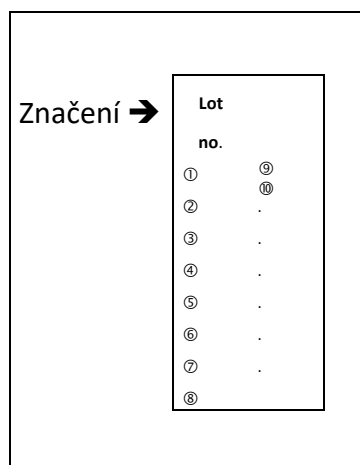
Pokud je použita jiná Taq Polymeráza, musí být tato validována pro použití s BAGene soupravami uživatelem.

(\*) Doporučujeme připravovat MasterMix pro minimálně 6 reakcí, neboť u menších objemů je množství Taq-Polymerázy velmi nízké a hrozí značná chyba při pipetování směsi.

(\*\*) Při práci se soupravou BAGene **D Zygosity-TYPE** je doporučené množství DNA **30-50 ng/ $\mu$ l**.

3. Po promíchání na Vortexu přeneste **10  $\mu$ l** této reakční směsi (MasterMixu) do předkapaných jamek. Vyměňte špičku po každém pipetování. Pevně uzavřete reakční komůrky odpovídajícím víčkem. Dávejte pozor, abyste se nedotkli vnitřní části víčka ani horního okraje reakčních komůrek prsty z důvodu nebezpečí kontaminace. Při použití cykléru s těsně uzavíratelným víkem je možné použít opakovaně použitelné PCR krycí podložky. Lehce hýbejte destičkou tak, aby se modrý pelet na dně reakční komůrky rozpustil. Veškerá reakční směs by měla být na dně reakční komůrky.

4. Vložte reakční zkumavky do termocykléru a pevně uzavřete víko tak, aby se reakční komůrky při zahřívání nezdeformovaly. Zahajte PCR program. Překrývání minerálním olejem není u cyklérů s nastavitelným a vyhříváním víkem potřeba.



## Nastavení PCR cykléru pro soupravy BAGene (vyjma BAGene D Zygosity-TYPE)

Krok	Doba	Teplota	Počet cyklů
První denaturace	5 minut	96 °C	1 cyklus
Denaturace	10 sekund	96 °C	5 cyklů
Annealing a prodlužování	60 sekund	70 °C	
Denaturace	10 sekund	96 °C	10 cyklů
Annealing	50 sekund	65 °C	
Prodlužování	45 sekund	72 °C	
Denaturace	10 sekund	96 °C	15 cyklů
Annealing	50 sekund	61 °C	
Prodlužování	45 sekund	72 °C	
Závěrečné prodlužování	5 minut	72 °C	1 cyklus

### Validované typy cyklérů:

PTC 200/C1000 (MJ Research/BioRad),

GeneAmp PCR-System 9700 (použijte ramp rate 9600) **Verti** (ABI)

Mastercycler epGradient S (použijte funkci „simulate Mastercycler gradient“) (Eppendorf)

Tprofessional (Biometra)

### **POZOR! Odlišný PCR program!**

#### **Amplifikační parametry pro D Zygosity-TYPE**

Krok	Doba	Teplota	Počet cyklů
První denaturace	10 minut	95 °C	1 cyklus
Denaturace	20 sekund	92 °C	35 cyklů
Annealing	30 sekund	64 °C	
Prodlužování	5 minut	68 °C	
Závěrečné prodlužování	5 minut	72 °C	1 cyklus

### Validované typy cyklérů:

Viz typy pro ostatní soupravy

**Prosíme, nepoužívejte hliníkové bloky (např. u GeneAmp PCR-System 9700)!**

Při použití cyklérů s velkou rychlostí ohřevu a chlazení (vysoký ramp rate), je doporučeno nastavit nižší hodnotu (~2,5 °C/sec).

Jelikož cykléry od různých výrobců někdy pracují poněkud odlišně a někdy se dokonce liší jednotlivé přístroje stejného typu, může vzniknout potřeba optimalizovat reakční parametry pro váš konkrétní cyklér.

#### **Pro optimalizaci postupujte následovně:**

Při **falešně pozitivních** reakcích (nespecifické proužky (bandy), další alely atd.) zvyšujte teplotu annealingu v krocích po 1°C.

Při **falešně negativních** výsledcích (tj. chybějící proužky (bandy)) snižujte v krocích po 1 °C teplotu annealingu a/nebo prodlužujte dobu trvání annealingu v 5ti vteřinových krocích, a/nebo prodlužujte dobu trvání denaturace v opět 5ti vteřinových krocích.

**Doporučujeme používat jen pravidelně kalibrované cykléry.**

**Pro provedení kalibrace vašeho cykléru lze použít např. soupravu BAG-Cycler Check kit (katalogové číslo 7104, **71044**).**

## **4.4. Gelová elektroforéza**

Separace (oddělení) produktů amplifikace je prováděna pomocí horizontální gelové elektroforézy na agarózovém gelu. Jako pufr by měl být pro elektroforézu použit 0,5 x TBE (45 mM Tris, 45mM kyselina boritá, 0,5 mM EDTA). Koncentrace gelu by měla být 2,0-2,5 % agarózy. Nechte gel polymerizovat alespoň 30 minut před nanesením vzorků.

Po provedení amplifikace vyjměte vzorky z cykléru a přeneste celkový objem pečlivě do jamek v gelu. Neopomeňte dát do samostatné jamky též 10 µl DNA délkového standardu pro měření délky fragmentů. Elektroforetická separace se provádí při 10-12 V/cm, (tj. při cca 20 cm vzdálenosti mezi elektrodami při 200-240

V), po dobu 20-40 minut. Pro BAGene D Zygosity-TYPE doporučujeme běh elektroforézy 40 minut, neboť se takto jasněji oddělí jednotlivé proužky. Po proběhnutí elektroforézy je gel nabarven v roztoku Ethidium bromidu (EtBr), (přibližně 0,5 µg EtBr na 1ml H<sub>2</sub>O nebo TBE pufru). Alternativním postupem barvení je přidání EtBr (0,5 µg/ml) do elektroforetického pufru či přímo do gelu. Pokud je to nutné, lze odstranit přebytečný EtBr namočením gelu na dobu 20-30 minut do vody.

#### 4.5. Dokumentace

Pro zviditelnění a zdokumentování vašich výsledků prosvíte gel po provedení elektroforézy UV světlem (transiluminátor, λ=220-310 nm) a vyfotografujte odpovídajícím dokumentačním zařízením. Nastavte čas i clonu tak, aby jednotlivé proužky jasně vystupovaly proti tmavému pozadí (přibližně clona 11, čas 1 sekunda). Výsledky dokumentujte v přiloženém pracovním listu (Kapitola 4.6).

### 4.6 Interpretace výsledků a omezení metody

#### 4.6.1 Obecné

Výsledky molekulárně genetické typizace krevních skupin pomocí souprav BAGene je nutné zapsat do pracovních listů, které slouží k dokumentaci. Přehled charakteristik, specifit, fenotypů, genotypů a vyobrazení reakčních vzorů ve smyslu příkladů v evaluačních diagramech slouží jako pomoc při interpretaci vašich výsledků. PCR reakce mají svoje čísla (např. u soupravy ABO-TYPE jsou to reakce 1-8). Délka fragmentu specifického produktu PCR (specifický proužek) je uváděna v bp (base pairs – v párech bazí). V řádcích níže jsou uváděny možné vzory proužků na gelu. Specifické PCR produkty (pozitivní reakce) jsou znázorněny + a odpovídající políčka v tabulce jsou barevně vyplněna. ABO-TYPE, ABO-TYPE variant, Partial D-TYPE, Weak D-TYPE, D Zygosity-TYPE, KKD-TYPE, MNS-TYPE, Rare-TYPE, HPA –TYPE, HNA-TYPE jsou podbarveny **šedě**, u soupravy RH-TYPE pak navíc **červenou, zelenou a modrou**. Vyhodnocení výsledků reakcí se provádí v řádcích zleva doprava.

Pro interpretaci výsledků vyhodnoťte pouze proužky s odpovídající délkou odečtenou podle DNA délkového standardu jako pozitivní. Správnou velikost jednotlivých proužků lze nalézt v pracovních listech a vyhodnocovacích diagramech. Ve všech drahách bez specifických produktů jednotlivých alel musí být patrná vnitřní kontrola o délce **434 bp**. Výjimkou je **D-Zygosity-TYPE** a druhá PCR reakce u **RH-TYPE**, kde je délka fragmentu vnitřní kontroly **659 bp**. V drahách s pozitivními výsledky pro dané alely je produkt vnitřní kontroly slabší, nebo může zcela chybět z důvodu kompetice o chemikálie v dané PCR reakci! V případě nejasných výsledků nalistujte kapitulu 6. – Řešení problémů.

Pokud není pomocí soupravy BAGene nalezen jasný výsledek (například v důsledku neznámých alel, které nemohou být detekovány se stávajícími primery), měli byste postupovat podle pokynů národní transfuzní legislativy v souladu se sérologickou typizací. Doporučuje se sekvenční analýza těchto vzorků. Výsledky typizace by měly být interpretovány s přihlédnutím ke genetické variabilitě různých etnických skupin. V případě pochybností je platný fenotyp.

#### 4.6.2 ABO-TYPE a ABO-TYPE variant

Homozygotní exprese alel *ABO\*O01*, *ABO\*O03*, *ABO\*B101*, *ABO\*A201* se projeví specifickými proužky v odpovídajících PCR reakcích (dráha 1, 3, 5 a 7). V případě heterozygocity musí být navíc proužky ve všech 4 "nereakčních" drahách (tj. 2, 4, 6 a 8) ke stávajícím dvěma PCR specifickým reakcím (1, 3, 5, 7). Homozygocita alely *ABO\*A101* se projeví pouze proužky pro „non-reakce“ (2, 4, 6, 8) neboť zde není specifická reakce pro alelu *ABO\*A101*. Heterozygocitu alely *ABO\*A101* lze rozpoznat podle další proužků v reakčních drahách pro dané alely specifických reakcí (1, 3, 5, 7, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15 nebo 16).

Jelikož pomocí soupravy ABO-TYPE variant lze detekovat pouze výběr variantních A alel, mohou být další varianty skryty za PCR výsledkem *ABO\*A101*. Jelikož pomocí soupravy ABO-TYPE variant lze detekovat pouze výběr variantních B alel, nebo variantních A<sup>2</sup>, mohou být další varianty skryty za PCR výsledkem *ABO\*B101* a *ABO\*A201*. Většina B<sup>(A)</sup> a cis AB se zobrazí jako pozitivní v reakci pro *ABO\*B101*.

Proužek specifický pro HGH fragment o délce 434 bp slouží jako vnitřní kontrola.

Podrobný popis a vysvětlení naleznete na příbalovém letáku v každé soupravě BAGene ABO-TYPE variant. Prosíme, prostudujte speciální poznámky na pracovních protokolech a evaluačních digramech pro ABO-TYPE i ABO-TYPE variant.

#### 4.6.3 RH-TYPE

Specifikované PCR reakce slouží k molekulárně genetické typizaci standardních *RHD* stejně jako některých *RHD*-variant (*RHD* pozitivní haplotypy u sérologicky D negativních pacientů (částečné D)).

Reakce 1 a 2 jsou multiplex PCR reakce pro vyšetřování pěti parametrů *RHD* polymorfizmu (*RHD* introny 4 a 7, exon 7 stejně jako *RHD* (W16X) a *RHD*Ψ). To znamená, že narozdíl od ostatních BAGene testů (nepočítaje v to proužky vnitřní kontroly), se může objevit v dané dráze více než jeden proužek. K usnadnění vyhodnocení jsou odpovídající políčka v rozdělena na více částí a mají vícebarevné pozadí. Délka daného fragmentu je vysána barvou odpovídající barvě pozadí daného políčka.

##### Příklad *RHD*Ψ:

Reakční směs číslo 1: dva specifické proužky na gelu

- PCR produkt **224 bp-zeleně** označení délky, do reakčního vzoru v rámečku se **zeleným** pozadím
- PCR produkt **123 bp-modře** označení délky, do reakčního vzoru v rámečku se **modrým** pozadím

Reakční směs číslo 2: dva specifické proužky na gelu

- PCR produkt **154 bp-červeně** označení délky, do reakčního vzoru v rámečku se **červeným** pozadím
- PCR produkt **390 bp-zeleně** označení délky, do reakčního vzoru v rámečku se **zeleným** pozadím

PCR Reakce slouží k molekulárně genetické typizaci *RHCE* genového lokusu. Proužek specifický pro HGH (fragment o délce 434 bp) slouží jako vnitřní kontrola. Výjimkou je PCR reakce č. 2, kde má kontrolní proužek délku 659 (specifický pro genomickou sekvenci chromozomu I, 90 000 bp 5' *Rhesus boxu*)

#### 4.6.4 Partial D-TYPE

Chybějící proužek v reakci č. 4 může indikovat DFR (sérologicky slabě pozitivní s anti-D) nebo *RHD*Ψ (hemi-nebo homozygot D sérologicky negativní). Pokud chybí sérologická informace, lze potvrdit nebo vyloučit *RHD*Ψ pomocí RH-TYPE. Při slabých D typech 41 a 45 se může objevit chybějící reakce číslo 9. Mutace v intronu mohou vést k tomu, že chybí proužek v reakci 8 nebo 9. U slabého D typu 20 reakce číslo 10 normálně nevykazuje žádný proužek, ale někdy se může objevit proužek slabý.

Molekulárně genetické rozlišení D variant **DCS**, **DFW**, **DIM**, **DNU** od standardních *RHD* není v současnosti možná. Je užitečné zvážení haplotypů.

#### 4.6.5 D Zygosity-TYPE

U *RHD* alel, které nemohou být rozlišeny sérologicky (tj. u RhD neg.), může dojít k rozporu mezi výsledky molekulárně biologickými a sérologickými. Pozitivní identifikace Downstream *Rhesus Boxu* znamená přítomnost alely RHD tj. (RHD pozitivní) s výjimkou *RHD*Ψ hemizygotů i homozygotů. Zde je reakce negativní, ač je alela *RHD* přítomna.

Navíc v případech geneticky pozmeněného Downstream *Rhesus Boxu* je možné, že výsledky budou také falešně negativní, ačkoliv je pacient sérologicky D-pozitivní. Čili u sérologicky D-pozitivních pacientů a pozitivní PCR pro hybridní *Rhesus Box* je interpretací "Dd". Výsledek "DD" je pro vzorky s negativní PCR pro hybridní *Rhesus Box*. V důsledku velkého polymorfizmu hybridního *Rhesus Boxu* u Afričanů se mohou vyskytovat falešně pozitivní výsledky u *RHD*Ψ i dalších RHD alel.

V případě chybějícího hybridního Rhesus Boxu je nutné zvážit u černé populace výsledky *RHD*Ψ a Cde<sup>s</sup> získané pomocí **RH-TYPE**. Pomocí současných testovacích souprav nelze vyloučit další D antigen negativní RHD alely. Toto je nutno brát v potaz při interpretaci výsledků. Na druhou stranu četnost těchto alel v bílé populaci je poměrně nízká.

Degradovaná DNA může vést k falešně negativním výsledkům. V důsledku toho jsou patrné pouze proužky vnitřní kontroly, nebo chybí proužky zcela.



## 5. Varování a bezpečnostní pokyny

Ethidium bromid je silný mutagen. Zabraňte kontaktu s kůží a jakýmkoli kontaminacím. Prostudujte pečlivě varování a bezpečnostní pokyny výrobce. Velmi krátké vlny používané při prosvěcování gelu UV zářením mohou způsobit popáleniny na kůži a především na sítnici. Používejte ochranné pomůcky jako je ochranný obličejový štít apod.

Veškerý biologický materiál použitý pro extrakci DNA, tj. krev a lidské tkáně, je nutno považovat za potenciálně infekční a jako s takovými s nimi musí být zacházeno. Při práci s biologickým materiálem by tedy měly být dodržovány odpovídající pracovní postupy (např. nepipetovat ústy, používat jednorázové rukavice, desinfikovat ruce po ukončení práce). Biologický materiál by měl být deaktivován před likvidací např. sterilizací v autoklávu. Jednorázové pomůcky, špičky atd., by měly být před likvidací také deaktivovány v autoklávu nebo spáleny. Pokud dojde k rozlití potenciálně infekčního materiálu, měl by být tento okamžitě odstraněn papírovými utěrkami a místo ošetřeno standardními desinfekčními prostředky nebo 70 % alkoholem. Veškerý materiál použitý k čištění by měl být před likvidací deaktivován (např. v autoklávu).

Likvidujte veškeré vzorky, nepoužité reagenty a odpad podle národních, federálních či lokálních směrnic.

Bezpečnostní listy (MSDS) jsou dostupné ke stažení na adrese [www.bag-healthcare.com](http://www.bag-healthcare.com).

## 6. Problémy a jejich řešení

Problém	Možný důvod	Řešení
žádné produkty amplifikace nejsou na gelu patrné, délkový DNA standard je viditelný	DNA kontaminována blokátory PCR reakce	opakujte izolaci DNA, použijte jinou extrakční metodu
	degradovaná DNA	opakujte izolaci DNA, použijte jinou extrakční metodu
	koncentrace DNA je příliš vysoká / nízká	změňte koncentraci DNA, opakujte izolaci DNA
	koncentrace enzymu je příliš nízká, nebo enzym chybí	opakujte PCR a změňte koncentraci enzymu
	DNA z heparinové krve	opakujte PCR s EDTA krví
	špatné parametry amplifikace	optimalizujte amplifikační parametry (viz 4.3.) (*)
opakované chyby v jednotlivých reakcích, (reakční kontrola není patrná)	netěsnosti v reakčních zkumavkách, změna koncentrace v průběhu PCR v důsledku ztráty vody	uzavírejte pečlivě reakční zkumavky
nespecifické amplifikační produkty, (jakékoliv další proužky odlišných délek jsou vyloučeny)	kontaminace dalšími amplifikačními produkty	opakujte typizaci, provádějte práci pečlivě a bezchybně
	DNA kontaminována solemi	zopakujte izolaci DNA, použijte jiné metody izolace
	příliš vysoká koncentrace DNA	použijte méně DNA
	koncentrace enzymu je příliš vysoká	použijte méně enzymu
špatné parametry amplifikace	optimalizujte amplifikační parametry (viz 4.3.) (*)	
při vyhodnocení gelu jsou viditelné více než 2 alely v jedné dráze	zanesena kontaminace, (kontaminace amplifikačními produkty!) nová alela	zkontrolujte chemikálie, nebyla přidána DNA, zajistěte přenos práci
žádné nebo velmi slabé proužky, délkový DNA standard není patrný	barvení EtBr je slabé	opakujte barvení
pozadí na gelu svítí příliš silně	barvení bylo příliš dlouhé, koncentrace EtBr je příliš vysoká	ponořte gel do vody nebo TBE, čímž docílíte snížení koncentrace EtBr
rozmazané, nezřetelné proužky	příliš horký pufr při elektroforéze, příliš vysoké napětí, špatný pufr	snížte napětí použijte 0,5 x TBE pufr





(\*) I pokud používáte vybavení a chemikálie doporučené v návodu, měla by být optimalizace cyklu a PCR reakce až poslední možností. Ve většině případů lze vyhodnotit testy odstraněním dodatečných proužků způsobených rozdíly ve velikosti.

## 7. Literatura

Green and Sambrook, 2012. Molecular Cloning: A Laboratory Manual. New York: Cold Spring Harbour Laboratory

Další literaturu naleznete na [www.bag-healthcare.com](http://www.bag-healthcare.com).

## 8. Vysvětlení symbolů

	Použijte do
	Teplota skladování
	Viz návod k použití
	Použitelné pro n testů
<b>BLOOD TYPING</b>	Zamýšlené použití: typizace krevních skupin
<b>CONT</b>	Obsah, obsahuje
<b>HNA TYPING</b>	Zamýšlené použití: typizace HNA
<b>HPA TYPING</b>	Zamýšlené použití: typizace HPA
<b>IFU</b>	Návod k použití
<b>IVD</b>	Pro in vitro diagnostiku
<b>LOT</b>	Číslo šarže
<b>PCRBUF   10x</b>	PCR pufr, 10x koncentrovaný
<b>PCRCAP</b>	Víčka pro PCR
<b>PCRPLATE</b>	Destičky pro PCR
<b>PCRSTRIP</b>	Stripy pro PCR
<b>REACTIONMIX</b>	Reakční směsi/mixy
<b>REF</b>	Katalogové číslo
<b>RTU</b>	Připraveno k použití
<b>TAQ POLYMERASE</b>	Taq-polymeráza
<b>WORKSHEET</b>	Pracovní list

Návody k použití v jiných jazycích naleznete na:

<http://www.bag-healthcare.com>

<http://service.bag-healthcare.com>

nebo telefon: +49 (0)6404-925-125



BAG Health Care GmbH  
Amtsgerichtsstraße 1-5  
35423 Lich/Germany

Tel.: +49 (0) 6404 / 925-0

Fax: +49 (0) 6404 / 925-250

[www.bag-healthcare.com](http://www.bag-healthcare.com)

[info@bag-healthcare.com](mailto:info@bag-healthcare.com)

Auftragsannahme/Ordering:

Tel.: +49 (0) 6404 / 925-450

Fax: +49 (0) 6404 / 925-460

[verkauf@bag-healthcare.com](mailto:verkauf@bag-healthcare.com)

Customer Service:

Tel.: +49 (0) 6404 / 925-125

Fax: +49 (0) 6404 / 925-421

[service@bag-healthcare.com](mailto:service@bag-healthcare.com)