



Návod k použití souprav

BAGene SSP soupravy

Elektronické Návod k použití naleznete na www.bag-diagnostics.com

Testovací soupravy pro typizaci AB0, RH, Kell, Kidd, Duffy, MNS, vzácných krevních skupin a pro specifikaci HPA a HNA molekulárně genetickými metodami

předředěno, připraveno k použití

kat.č.	REF	6640	AB0-TYPE	kat.č.	REF	6650	KKD-TYPE
kat.č.	REF	6641	AB0-TYPE variant	kat.č.	REF	6652	MNS-TYPE
kat.č.	REF	6645	RH-TYPE	kat.č.	REF	6653	Rare-TYPE
kat.č.	REF	6646	Partial D-TYPE	kat.č.	REF	6660	HPA-TYPE
kat.č.	REF	6647	Weak D-TYPE	kat.č.	REF	66701	HNA-TYPE

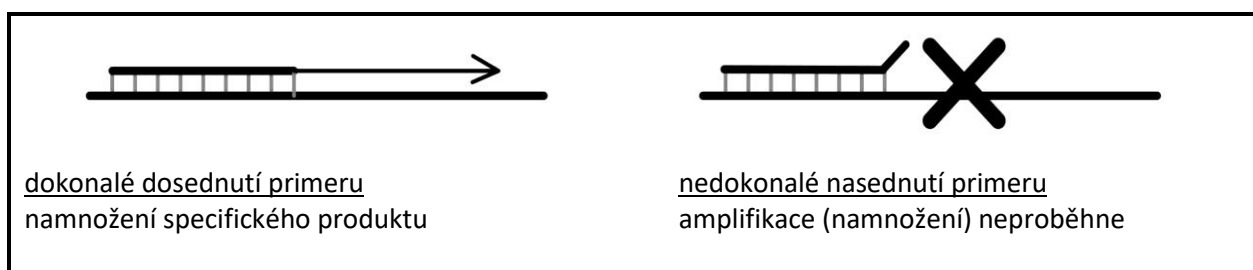
Obsah

1.	Popis výrobku	2
2.	Materiál	2
	2.1. Obsah BAGene DNA-SSP souprav	2
	2.2. Potřebné vybavení a materiál	2
	2.3. Skladování a trvanlivost	3
3.	Údaje o kvalitě testu	3
4.	Pracovní postup	3
	4.1. Bezpečnostní pokyny a speciální poznámky	3
	4.2. Izolace DNA	4
	4.3. Amplifikace	4
	4.4. Gelová elektroforéza	7
	4.5. Dokumentace	7
	4.6. Interpretace výsledků a omezení metody	7
	4.6.1. Obecné	7
	4.6.2. AB0-TYPE a AB0-TYPE variant	8
	4.6.3. RH-TYPE	8
	4.6.4. Partial D-TYPE	9
5.	Varování	9
6.	Problémy a jejich řešení	10
7.	Literatura	11
8.	Vysvětlení symbolů	11

1. Popis výrobku

Soupravy BAGene jsou in-vitro-diagnostika pro použití kvalifikovaným personálem. Tyto soupravy slouží k určování krevních skupin dárců, příjemců a těhotných žen pomocí molekulárně biologických metod. ABO-, ABO variant-, RH (včetně D Zygoty), Partial D-, Weak D- a KKD-TYPE slouží k doplnění, vyjasnění a potvrzení výsledků 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 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 tedy 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 pomocí gelové elektroforézy.



Obr. 1 Princip SSP-PCR

Složení jednotlivých směsí primerů umožňuje jasnou identifikaci skupin ABO, RH, KEL, JK, FY, MNSs, vzácných skupin a HPA i HNA genotypů tak, jak je zobrazeno v odpovídajícím pracovním listu. 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)
- BAGene Informační CD (obsahuje návod k použití, pracovní list, certifikát kontroly kvality)

2.2. Potřebné vybavení a materiál

- Happy Taq (REF 70976) (nebo jiná Taq polymeráza validovaná se soupravami BAGene uživatelem). Polymeráza Happy Taq je dodávána zdarma se soupravami BAGene.
Nepoužívejte Hot-start Taq Polymerázu (např. Ampli Taq Gold)!

- Souprava BAG **EXTRA GENE I** (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, 45 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 Happy Taq 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 etiketě obalu soupravy se vztahuje na reagentii s nejkratší dobou životnosti. Rozpouštějte 10xPCR pufr těsně před použitím.

3. Údaje o kvalitě testu

Složení směsí primerů zaručuje přesnou identifikaci alel zobrazených na pracovním listu 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 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 listu. Výsledky byly porovnávány s jinými SSP testy krevních skupin, výsledky sekvenování a sérologických testů. Výsledky testů ukázaly 100% shodu s výsledky předchozích typizací.

Vyhodnocení a kontrola kvality byly provedeny se vzorky DNA extrahovanými pomocí soupravy EXTRA GENE I (vysolovací metoda) a pomocí soupravy Qiagen QIAamp Blood Mini a Maxi kit (kolonkové metody). Pokud použijete pro práci se soupravami BAGene jiné metody extrakce DNA, je nutné tuto metodu validovat.

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.

4. Pracovní postup

4.1. Bezpečnostní pokyny a speciální poznámky

PCR je vysoce citlivá metoda, která musí být prováděna osobou se zkušenostmi 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 případě, kdy molekulárně biologicky a sérologicky získané výsledky nejsou ve shodě. Genotypizace ABO, RHD/RHCE, Kell, Kidd a Duffy by měly být prováděny po vyhodnocení sérologických testů.

Práce vyžaduje zvýšenou opatrnost, je nutné vyloučit kontaminaci vzorků a současně také falešné výsledky:

- 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 dvě oddělené místnosti
- používejte pomůcky a přístroje jen pro daný krok a nevyměňujte je navzájem

4.2. Izolace DNA

Materiál vzorku pro izolaci DNA by měl být dodán ve vhodném sběrném médiu. Přítomnost heparinu v reakční směsi může inhibovat PCR, proto není použití heparinové krve možné [2]. Doporučuje se použití EDTA nebo citrátové krve.

Validované extrakční metody:

- Souprava EXTRA-GENE I (BAG)
- Soupravy QIAGEN QIAamp DNA Blood Mini a Maxi

Jiné, v laboratoři standardizované, metody extrakce DNA musí být validovány uživatelem.

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 alely, kontrolní specifické primery a nukleotidy. Tato směs je usušena na dně reakčních komůrek. Parametry amplifikace jsou nastaveny pro celkový objem reakce 10 μ l.

1. Vyjměte odpovídající počet BAGene destiček/stripů z mrazícího boxu ($\leq -20^{\circ}\text{C}$) a rozehrějte 10x PCR pufr na pokojovou teplotu.
2. Napipetujte Mastermix vytvořený z 10x PCR pufru, roztoku DNA, Taq polymerázy a destilované vody a dobře promíchejte. Všechny BAGene testovací soupravy pracují se stejným Mastermixem a lze tedy používat tentýž pro všechny BAGene soupravy. Následující tabulka (Tab. 1) udává složení Mastermixů.

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

Počet mixů	Destil. H ₂ O	10x PCR pufr	Roztok DNA (50-100 ng/μl)	Happy Taq (5U/μl)	Celkový objem	
1	8	1	1	0,08	10	μl
2	16	2	2	0,02	20	μl
6(*)	50	7	7	0,5	65	μl
7	70	9	9	0,7	90	μl
8	80	10	10	0,8	100	μl
9	88	11	11	0,9	110	μl
10	96	12	12	1,0	120	μl
11	104	13	13	1,0	130	μl
12	112	14	14	1,1	140	μl
13	128	16	16	1,3	160	μl
14	136	17	17	1,4	170	μl
15	144	18	18	1,4	180	μl
16	152	19	19	1,5	190	μl
18	166	21	21	1,7	210	μl

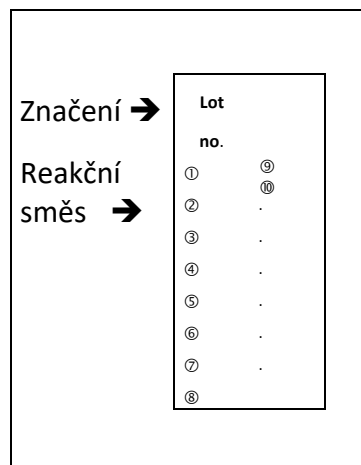
Při odlišných koncentracích DNA musí být změněno množství roztoku a k tomu odpovídajícím způsobem i množství destilované vody (např. pro 12 mixů a koncentraci DNA 120ng/μl použijte 5,8 μl DNA a 119 μl destil. H₂O).

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.

3. Po promíchání na Vortexu přeneste **10 μl** 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

Krok	Doba	Teplota	Počet cyklů
První denaturace	5 minut	96 °C	1 cyklus
Denaturace	10 sekund	96 °C	5 cyklů
Annealing+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)

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

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

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) a/nebo amplifikační kontroly) snižujte v krocích po 1 °C teplotu annealingu a/nebo prodlužujte dobu trvání annealingu v 5-ti vteřinových krocích, a/nebo prodlužujte dobu trvání denaturace v opět 5-ti 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, 45 mM 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. Po proběhnutí elektroforézy je gel barven

v roztoku Ethidium bromidu (EtBr) po dobu 30-45 minut, (přibližně 0,5 µg EtBr na 1ml H₂O nebo TBE pufri). Alternativním postupem barvení je přidání EtBr (0,5 µg/ml) do elektroforetického pufri či přímo do gelu. Pokud je to nutné, lze odstranit přebytečný EtBr ponořením 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 vyfotografujete 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 pracovních listech slouží jako pomoc při interpretaci vašich výsledků. PCR reakce mají svá 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, 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 jako pozitivní pouze ty proužky, které mají odpovídající délku odečtenou podle DNA délkového standardu. Správnou velikost jednotlivých proužků lze nalézt v pracovních listech. Ve všech drahách bez specifických produktů jednotlivých alel musí být patrná vnitřní kontrola o délce **434 bp**. Výjimkou je 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! Pokud není přítomen ani specifický ani kontrolní proužek nelze daný mix použít pro interpretaci testu.

V případě nejasných výsledků nalistujte kapitolu 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 A², mohou být další varianty skryty za PCR výsledkem **ABO*B101** a **ABO*A201**. Většina B^(A) 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.

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, parciální D, D_{el}) a D Zygosity a jsou prováděny v určených reakcích.

Reakce 1 a 2 jsou multiplex PCR reakce pro vyšetřování pěti parametrů *RHD* polymorfizmu (*RHD* introny 4 a 7, exon 7 stejně jako vyšetření *RHD*01N.08* (W16X) a *RHD*08N.01* (Ψ)). To znamená, že na rozdíl 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 dvě části a mají dvoubarevné pozadí. Délka daného fragmentu je vypsána barvou odpovídající barvě pozadí daného políčka. Doporučuje se také použití délkového standardu.

Příklad *RHD*01N.08* (Ψ):

Reakční směs číslo 1: dva specifické proužky na gelu

- PCR produkt **224 bp-šedě** označení délky, do reakčního vzoru

+

 v rámečku se **šedým** pozadím
- PCR produkt **123 bp-modře** označení délky, do reakčního vzoru

+

 v rámečku s **modrým** pozadím

Reakční směs číslo 2: dva specifické proužky na gelu

- PCR produkt **154 bp-zeleně** označení délky, do reakčního vzoru

+

 v rámečku se **zeleným** pozadím
- PCR produkt **390 bp-šedě** označení délky, do reakčního vzoru

+

 v rámečku se **šedým** 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 bp.

Pokud reakční schéma indikuje variantu *RHD*, mělo by být provedeno další vyšetření s použitím **Partial D-TYPE**, aby byly vyloučeny bodové mutace jako příčina těchto výsledků.

D Zygosity

V sadě RH-TYPE je navíc možné určit RHD-Zygocitu DD, Dd nebo dd. Proto je v reakci č. 10 požadována přítomnost nebo absence Upstream Rhesus-Boxu (U_{Box}) a v reakci č. 11 Rhesus Hybrid-Boxu (H_{Box}).

U RHD alel, které nelze rozlišit sérologicky (tj. u RhD neg.), může dojít k rozporu mezi výsledky molekulárně biologickými a sérologickými. Pozitivní identifikace Upstream Rhesus Boxu znamená přítomnost alely RHD (tj. RHD poz.) s výjimkou RHD*08N.01 (Ψ) homozygotů a hemizygotů. Reakce směsi č. 10 může být negativní, ačkoliv je alela RHD přítomna.

Navíc v případech geneticky pozmeněného Upstream Rhesus Boxu (např. slabý D 4.2 (DAR1)) je možné, že výsledky směsi č. 10 budou také falešně negativní, ačkoliv je pacient sérologicky D-positivní. Pro kontrolu tohoto typu nesrovnalostí obsahuje RH-TYPE reakce k detekci RHD*08N.01 (Ψ) a slabý D 4.2 (DAR1). Čili u sérologicky D-positivních pacientů a pozitivní PCR pro hybridní Rhesus Box je výsledek "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*08N.01 (Ψ) i dalších RHD alel.

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.

4.6.4. Partial D-TYPE

Chybějící proužek v reakci č. 4 může indikovat DFR (sérologicky slabě pozitivní s anti-D) nebo RHD*08N.01 (Ψ) (hemi- nebo homozygotní D sérologicky negativní). Pokud chybí sérologická informace, lze potvrdit nebo vyloučit RHD*08N.01 (Ψ) pomocí RH-TYPE. Za přítomnosti RHD*slabých D typů 41 (RHD*01W.41) a RHD*slabých D typů 45 (RHD*01W.45) se může objevit chybějící reakce číslo 9. Mutace v intronu mohou vést k tomu, že chybí proužek v reakci 8 nebo 9. U RHD*slabého D typu 20 (RHD*01W.20) reakce číslo 10 normálně nevykazuje žádný proužek, ale někdy se může objevit proužek slabý.

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

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 takovým s ním 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 rozliti 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 národních směrnic.

Bezpečnostní listy (MSDS) jsou dostupné ke stažení na adrese www.bag-diagnostics.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, 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	provedte dekontaminaci, 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, provedte dekontaminaci, zajistěte přesnou 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, nedostatečná polymerizace gelu	snižte napětí použijte 0,5 x TBE pufr, použijte dostatečně polymerizovaný gel






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

7. Literatura

1. Green and Sambrook, 2012. Molecular Cloning: A Laboratory Manual. New York: Cold Spring Harbour Laboratory
2. Beutler, E. et al., 1990. BioTechniques 9:166

Další literaturu naleznete na www.bag-diagnostics.com.

8. Vysvětlení symbolů

	Použitelné do
	Teplota skladování / Nejnižší povolená teplota
	Viz návod k použití
	Použitelné pro n testů
	Výrobce
BLOOD TYPING	Zamýšlené použití: typizace krevních skupin
CONT	Obsah, obsahuje
HNA TYPING	Zamýšlené použití: typizace HNA
HPA TYPING	Zamýšlené použití: typizace HPA
BAGene INFORMATION CD	CD (obsahuje návod k použití, pracovní list, certifikát kontroly kvality)
eIFU VXX/XXXX	Elektronický návod k použití Verze aktuálního návodu k použití
IVD	Pro in vitro diagnostiku
LOT	Číslo šarže
PCRBUF 10x	PCR pufr, 10x koncentrovaný
PCRCAP	Víčka pro PCR
PCRPLATE	Destičky pro PCR
PCRSTRIP	Stripy pro PCR
REACTIONMIX	Reakční směsi
REF	Katalogové číslo
RTU	Připraveno k použití
TAQ POLYMERASE	Taq-polymeráza

Další informace a návody k použití v jiných jazycích naleznete na: [http:// www.bag-diagnostics.com](http://www.bag-diagnostics.com).
Kontaktujte nás na emailu: info@bag-diagnostics.com nebo na tel.: +49 (0)6404-925-125

Pro ČR a SR: info@bag-diagnostics.cz, tel.: +420 286840508, +420 777 227 437