

KURZANLEITUNG

FastQ[®] RHD fetal

Thermocycler: Bio-Rad CFX



PCR PROGRAMM

Schritt	Zeit	Temperatur [°C]	Heizrate [°C/S]	Zyklen
Initiale Aktivierung	10 min	95	2,5	1
Denaturierung	10 s	95	2,5	10
Annealing + Extension	1 min	60	2,2	
	15 s	72	-	
Denaturierung	10 s	95	2,5	35
Annealing + Extension	1 min	60	2,2	
	15 s + plate read	72	-	

FLUOROPHORE

Spezifität	Exon 5	Exon 7	Exon 10	Interne Amplifikationskontrolle (IAC)
Fluorophore	FAM	VIC	Texas Red	Cyanin 5

WORKFLOW

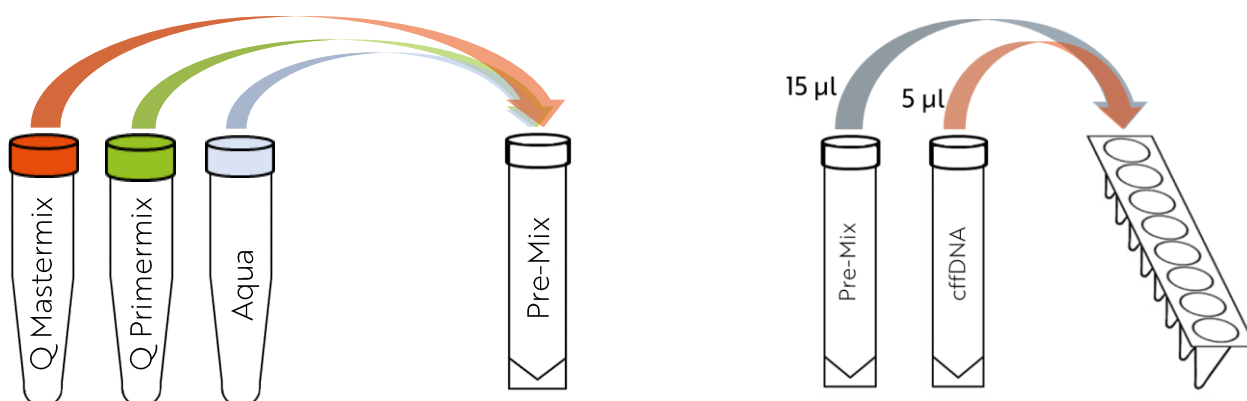
1. Schritt: Vorbereitung	
	Die 475 µl Q Mastermix fetal und die 380 µl Q Primermix RHD fetal bei Raumtemperatur auftauen.
	Die beiden Röhren vorsichtig vortexen.

2. Schritt: Test Setup

Testen Sie die *cell-free fetal DNA* (cffDNA) als Triplikat mit folgendem Testsetup.

Für einen Pre-Mix berechnen Sie entsprechend der Anzahl der Proben ein zusätzliches Volumen von 10%, um den Pipettierverlust zu berücksichtigen (s. Tabelle). Pipettieren Sie 15 μ l des Pre-Mixes in jede Vertiefung und fügen Sie 5 μ l der **cffDNA-Probe** hinzu.

Anzahl der Triplikat Tests (n)	Q Mastermix fetal [μ l]	Q Primermix RHD fetal [μ l]	Aqua dest. [μ l]	Pre-Mix Volumen [μ l]
1	40	16	4	60
2	70	28	7	105
3	100	40	10	150
4	130	52	13	195
5	160	64	16	240
6	190	76	19	285
7	220	88	22	330
8	250	100	25	375
9	280	112	28	420
10	310	124	31	465
15	470	188	47	705
20	630	252	63	945
25	780	312	78	1170
30	930	372	93	1395
32 (96 plate)	990	396	99	1485



3. Schritt: Vorbereitung

Reaktionsgefäße verschließen und zentrifugieren.

Legen Sie die Platte/den Streifen in den RT-Cycler, wählen Sie "All Channels" und starten Sie den Lauf. Bei Steuerung des Cyclers über die Bio-Rad Software, verwenden Sie das entsprechende PCR-Template.

4. Schritt: Auswertung

Alle Signale $C_q \leq 30$ liegen im korrekt positive Bereich.

Für die detaillierte Auswertung bitte die folgende Auswertetabelle beachten.

Cy5 (IAC)	VIC (Ex 7)	Texas Red (Ex 10)	FAM (Ex 5)	Interpretation
Positiv	Mind. 4 von 9 Replikaten positiv			● Positiv.
Positiv	1-3 von 9 Replikaten positiv			● Probe muss wiederholt werden.
Positiv	Sehr frühe C _q -Werte im Vergleich zu anderen Ergebnissen			● Nicht beurteilbar, eventuell Mutter mit RHD Variante - normal oder schwach exprimiertes D Antigen oder stumme Variante des RHD Gens*. Der fetale RHD Genotyp kann nicht bestimmt werden.
Positiv	Negativ	2-3 Replikate positiv	Negativ	● Partial Rhesus D Genotyp. Mutter* oder Kind tragen RHD-CE-D-Hybridgene wie zum Beispiel RHD-CE (2-9)-D, RHD-CE (3-9)-D, RHD-CE (3-7)-D, RHD-CE (4-7)-D. Abschnitt von RHD wird durch den entsprechenden Abschnitt von RHCE ersetzt. Im Falle von RHD-CE-D-Hybridgenen ist nur Exon 10 positiv.
Positiv	2-3 Replikate positiv	2-3 Replikate positiv	Negativ	● Es kann sich um eine PSI-positive Probe handeln. In diesem Fall werden weitere Untersuchungen empfohlen*.
Positiv	Negativ	Negativ	Negativ	● Negativ: Kein spezifisches Exon wurde nachgewiesen.
Negativ	Negativ	Negativ	Negativ	● Invalide: Ungültiges Ergebnis aufgrund von Echtzeit-PCR-Inhibition, Reagenzienversagen bzw. ungeeignetem Untersuchungsmaterial.

* Es wird empfohlen den Rhesus D Genotyp der Mutter zu bestätigen (BAG Diagnostics ERY Q® RH, REF 728405; ERY Q® Weak D, REF 728401; ERY Q® Partial D, REF 728403).