

Gebrauchsinformation

KIR-TYPE / Epitop-TYPE

Low resolution

CE

Testkits zur Typisierung von KIR - Genotypen und deren HLA-Liganden
auf molekulargenetischer Basis

IVD

**10 Typisierungen
gebrauchsfertig vorgetropft**

REF 7105: KIR-TYPE

(22 Mixe, blau)

REF 7106: Epitop-Type

(6 Mixe, grün)

Inhalt

| | |
|---|----|
| 1. Produktbeschreibung | 2 |
| 2. Material | 4 |
| 2.1.1 Inhalt des KIR-TYPE Kits..... | 4 |
| 2.1.2 Inhalt des Epitop-TYPE Kits | 4 |
| 2.2 Erforderliches bzw. zusätzliches Material..... | 5 |
| 2.3 Lagerung und Haltbarkeit | 5 |
| 3. Leistungsdaten..... | 6 |
| 4. Testdurchführung..... | 7 |
| 4.1 Vorsichtsmaßnahmen und besondere Hinweise | 7 |
| 4.2 DNA-Isolierung | 7 |
| 4.3 Amplifikation | 8 |
| 4.4 Gelelektrophorese | 10 |
| 4.5 Dokumentation und Auswertung..... | 10 |
| 5. Warn- und Entsorgungshinweise..... | 11 |
| 6. Mögliche Fehlerquellen..... | 12 |
| 7. Literatur / Referenzen | 13 |
| 8. Erklärung der Symbole auf den Etiketten..... | 14 |

1. Produktbeschreibung

Natürliche Killerzellen (NK) und Subpopulationen von T-Lymphozyten mit einem CD8+ memory Phänotyp (1) oder $\gamma\delta$ T-Zellrezeptor (2) exprimieren inhibierende als auch aktivierende *killer-cell immunoglobulin-like* Rezeptoren (KIRs). Aufgrund von Unterschieden in der Genanzahl sowie eines ausgeprägten Polymorphismus einzelner Gene ist die Genregion der KIR Rezeptoren durch eine hohe Variabilität innerhalb einzelner Individuen gekennzeichnet (3,4). Als Liganden für einzelne KIR Rezeptoren konnten mittlerweile definierte HLA-Klasse I Moleküle identifiziert werden (5,6). So bindet der inhibierende KIR2DL1 Rezeptor an Allele der HLA-C Gruppe 2 Moleküle, welche die Aminosäuren Asn⁷⁷ and Lys⁸⁰ besitzen, die KIR2DL2 / KIR2DL3 Rezeptoren an Allele der HLA-C Gruppe 1 Moleküle, mit den Aminosäuren Ser⁷⁷ and Asn⁸⁰, und KIR3DL1 bindet an HLA-B Allele mit einem Bw4 Epitop an den Aminosäurepositionen 77-83 der α 1 Helix. Der Rezeptor KIR3DL2 bindet an HLA-A*03 und *11 Allele (7). Die Liganden für die aktivierenden KIR Rezeptoren sind nicht sehr gut dokumentiert – allerdings wird postuliert, dass sie die gleichen HLA-B oder HLA-C Moleküle binden wie ihre verwandten inhibitorischen Rezeptoren.

Das derzeit weitestgehend akzeptierte Modell für eine NK-Zellaktivierung ist die Annahme, dass die Reaktivität der NK Zellen durch eine Balance zwischen inhibierenden als auch aktivierenden Signalen kontrolliert wird. Folglich kann eine Aktivierung von NK Zellen anhand einer Abnahme von inhibierenden Signalen erfolgen oder die Konsequenz einer zunehmenden Ligandenbindung von aktivierenden Rezeptoren sein. Bei Transformationsprozessen (z.B. Tumorerkrankungen oder Virusinfektionen) mit einem einhergehenden Verlust der HLA Expression als Liganden, führen die fehlenden inhibierenden Signale zu einer Aktivierung der NK-Zelle und somit einer Lyse der Zielzelle. Diese Beobachtung bildet die Basis für die *missing-self* Hypothese, indem gesundes Gewebe mit stabiler HLA Expression von einer NK Zellaktivierung verschont wird (8).

Insbesondere bei der Knochenmarktransplantation haben umfangreiche Untersuchungen gezeigt, dass eine gewisse KIR/HLA Disparität zu einer Donor versus Empfänger NK Zell-Alloreaktivität führt, welche in einer Reduktion der Graft versus Host Disease (GvHD) sowie in eine Minimierung von Rezidiven resultiert (9). Ferner können definierte KIR Genotypen mit Autoimmunerkrankungen (z.B. Psoriasis), mit einer verlangsamten Progression einer AIDS Erkrankung in HIV-infizierten Patienten, mit dem Risiko einer Präeklampsie sowie mit einer akuten Abstoßung nach allogener Nierentransplantation assoziiert werden (10-14).

Der **KIR-TYPE** Kit erlaubt die Genotypisierung von 14 KIR Genen plus 2 Pseudogenen.

Dagegen erkennt der **Epitop-TYPE** Kit die Allele der HLA-Spezifitäten HLA-Cw Asn⁸⁰, HLA-Cw Lys⁸⁰, HLA-B Bw4^{Threo}, HLA-B Bw4^{Iso} und HLA-A Bw4.

Die Detektion des Vorhandenseins der einzelnen KIR Rezeptoren / KIR HLA-Liganden erfolgt unter Verwendung der PCR-SSP^① (*PCR-sequence-specific primers*) Methode (siehe Abb. 1) [13,15].

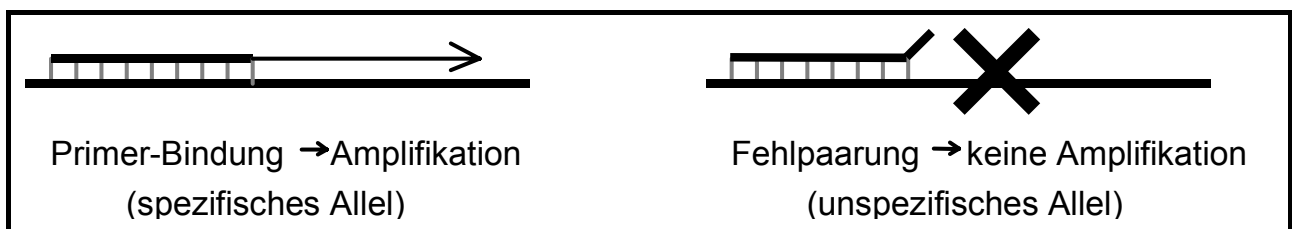


Abb. 1: Prinzip der SSP-PCR

Diese Methode nutzt die Tatsache, daß für eine erfolgreiche Reaktion beide Primer, speziell am sogenannten 3'-Ende, keine Fehlpaarungen aufweisen dürfen. Somit führt nur eine vollständige Übereinstimmung der Primer mit der Zielsequenz zu einem Amplifikat, welches durch eine anschließende Gelelektrophorese sichtbar gemacht wird.

Die Auswahl der sequenzspezifischen Amplifikationsprimer erlaubt die Detektion der einzelnen KIR- / HLA-Gene auf genomischer DNA Ebene.

Die Zusammensetzung der verschiedenen Primermixe ermöglicht eine eindeutige Identifizierung der in dem Auswertediagramm angegebenen KIR Genotypen / HLA Spezifitäten. Je Typisierung werden **vorgetropfte** und **getrocknete** Reaktionsansätze (inkl. interner Amplifikationskontrolle) mit einem Endvolumen von 10 µl eingesetzt.

2. Material

2.1.1 Inhalt des KIR-TYPE Kits

- ◆ 10 KIR-TYPE Platten ausreichend für 10 KIR Typisierungen. Die vorpipettierten und getrockneten Reaktionsansätze enthalten allelspezifische Primer, interne Kontroll-Primer (Chromosom 1 spezifische Sequenz) und Nukleotide.
Der Reaktionsmix Nr. 1 ist markiert und beinhaltet die Kontaminationskontrolle /
Negativ-Kontrolle. (siehe beiliegende lotspezifische Spezifitätstabelle und
Auswertediagramm). Die Lot-Nummer ist auf jede Platte gedruckt.
- ◆ In der letzten Position befindet sich die Positiv-Kontrolle (enthält nur die Kontroll-Primer)
(siehe beiliegende lotspezifische Spezifitätstabelle und Auswertediagramm).
- ◆ 10 x PCR-Puffer für jeweils 10 Typisierungen
- ◆ 8er-Streifen Deckel (à 12 Stück) für jeweils 10 Typisierungen
- ◆ Gebrauchsinformation, Worksheet mit Spezifitätstabelle und Auswertediagramm

2.1.2 Inhalt des Epitop-TYPE Kits

- ◆ 10 Epitop-TYPE Streifen ausreichend für 10 Epitop Typisierungen. Die vorpipettierten und getrockneten Reaktionsansätze enthalten allelspezifische Primer, interne Kontroll-Primer (Chromosom 1 spezifische Sequenz) und Nukleotide.
Der Reaktionsmix Nr. 1 ist markiert (Druck der Lot-Nummer).
- ◆ In der letzten Position befindet sich die Kontaminationskontrolle / Negativ-Kontrolle.
(siehe beiliegende lotspezifische Spezifitätstabelle und Auswertediagramm).
- ◆ 10 x PCR-Puffer für jeweils 10 Typisierungen
- ◆ 8er-Streifen Deckel (à 12 Stück) für jeweils 10 Typisierungen
- ◆ Gebrauchsinformation, Worksheet mit Spezifitätstabelle und Auswertediagramm

2.2 Erforderliches bzw. zusätzliches Material

- ◆ Taq-Polymerase (5 U/μl) (z.B. Qiagen)
- ◆ **BAG EXTRA-GENE** Kit (optional) zur DNA-Extraktion aus Blut / Lymphozyten / Leukozyten oder Material für andere DNA-Extraktions-Methoden
- ◆ Kolbenhubpipetten (0,5-250 μl)
- ◆ sterile Spitzen, ggf. mit Filter
- ◆ DNA-Cycler (z. B. PTC 200 von MJ Research/Fa. BioRad mit beheiztem, justierbarem Deckel)

Geräte und Material für die Gelelektrophorese

- ◆ DNA-Agarose
- ◆ 0,5 x TBE-Puffer (45 mM Tris, 45 mM Borsäure, 0,5 mM EDTA)
- ◆ Ethidiumbromid (EtBr)
- ◆ Flachgelkammer mit Kämmen (mind. 25 Taschen)
- ◆ Spannungsgeber (200 - 300 V, 200 mA)
- ◆ DNA Längenstandard (REF 7097)

Geräte zur Auswertung und Dokumentation

- ◆ UV-Leuchtplatte (220-310 nm)
- ◆ Photoeinrichtung (z.B. Polaroid-System mit Filmen Polaroid Typ 667)

2.3 Lagerung und Haltbarkeit

Der Kit wird ungekühlt versandt. Nach Erhalt werden alle Kit-Reagenzien bei -20...-80°C lichtgeschützt gelagert. Die Haltbarkeitsdauer ist den Etiketten auf den jeweiligen Reagenzien zu entnehmen und gilt auch nach dem ersten Öffnen. Die auf dem Außenetikett angegebene Haltbarkeit entspricht dem Kitbestandteil mit der kürzesten Haltbarkeit. Den 10 x PCR-Puffer kurz vor Gebrauch auftauen.

3. Leistungsdaten

Analytische Sensitivität: Eine zuverlässige Typisierung ist bei einer Einsatzmenge von 50 – 80 ng DNA / pro Reaktionsmix gewährleistet.

Diagnostische Spezifität: Die Zusammensetzung der Primermixe gewährleistet eine zuverlässige Identifizierung der auf dem Auswertediagramm angegebenen KIR-Typen / HLA-Spezifitäten basierend auf den zur Zeit bekannten Sequenzdaten. Es werden regelmäßig Updates durchgeführt.

Die Richtigkeit und Reproduzierbarkeit der Reaktivität der einzelnen Mixe wird für jedes Lot anhand von Kontrollproben mit bekannten KIR-Genotypen / HLA-Spezifitäten überprüft. Nicht erfasste bzw. wegen ihrer Seltenheit nicht getestete Genotypen sind auf dem Auswertediagramm bzw. in der Spezifitätstabelle kenntlich gemacht.

Für den KIR-TYPE / Epitop-Type Kit wurde eine Leistungsstudie mit mindestens 50 DNA Proben durchgeführt. Die erzielten Ergebnisse wurden mit denen eines anderen Anbieters verglichen. Bei den Typisierungsergebnissen konnten keine Diskrepanzen festgestellt werden.

4. Testdurchführung

4.1 Vorsichtsmaßnahmen und besondere Hinweise

Bei der PCR handelt es sich um eine äußerst sensitive Methode, die von geschultem, in Molekulartechnik und Histokompatibilitätstestung erfahrenem Personal durchgeführt werden sollte. Transplantationsrichtlinien und aktuelle EFI- / DGI-Standards sind zu beachten, um insbesondere bei diskrepanten Ergebnissen in serologischer und molekularbiologischer Testmethode, das Risiko von Fehlbestimmungen zu verringern.

Besondere Vorsichtsmaßnahmen sind zu beachten, um Kontaminationen und damit falsche Reaktionen zu vermeiden:

- ◆ prinzipiell mit Handschuhen (möglichst puderfrei) arbeiten
- ◆ bei jedem Pipettierschritt neue Spitzen (mit Filtereinsatz oder integriertem Stempel) verwenden
- ◆ zwei getrennte Arbeitsbereiche für die Prä-Amplifikation (DNA-Isolierung, Ansetzen der Reaktionen) und die Post-Amplifikation (Amplifikation, Gel-Elektrophorese, Dokumentation); möglichst zwei getrennte Räume
- ◆ Geräte und andere Materialien nur an den jeweiligen Arbeitsplätzen verwenden und nicht austauschen

4.2 DNA-Isolierung

Für die Typisierung eines Patienten werden 1,5 - 3 µg Leukozyten-DNA (entspricht etwa 0,2 ml Blut) benötigt. Bestens geeignet für die Isolierung ist z.B. der **BAG EXTRA-GENE** Kit, welcher ohne Einsatz von giftigen Chemikalien oder Lösungsmitteln in kurzer Zeit reine DNA aus Vollblut liefert. Weiterhin sind andere in der Literatur beschriebene Methoden [16] wie die Chloroform-Triethylammoniumbromid (CTAB)-Methode oder Phenol-Chloroform Reinigung geeignet, DNA mit ausreichender Reinheit zu erhalten. Heparin kann unter Umständen die PCR-Reaktion hemmen [17]. Es wird daher der Einsatz von EDTA- oder Citrat-Blut für die Typisierung empfohlen. Die DNA sollte einen Reinheitsindex (Extinktionsverhältnis OD_{260}/OD_{280}) von >1.5 und <2.0 aufweisen.

4.3 Amplifikation

Alle vorpipettierten Reaktionsmische beinhalten bereits die allelspezifischen Primer, Nukleotide sowie die Primer der internen Amplifikationskontrolle und liegen in getrockneter Form vor. Die Amplifikationsparameter sind auf ein Endvolumen von 10 µl optimiert.

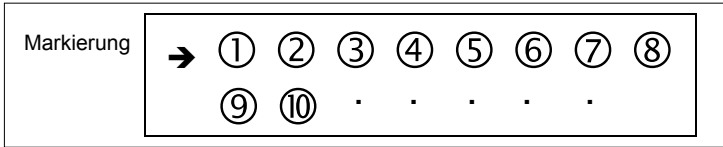
- 1.: Die gewünschte Anzahl der KIR-TYPE –Platten / Epitop-TYPE Streifen aus dem Gefrierschrank entnehmen und den 10 x PCR-Puffer auftauen.
- 2.: Den Master-Mix bestehend aus 10 x PCR-Puffer, DNA-Lösung, Taq-Polymerase und Aqua dest. zusammenpipettieren und gründlich vortexen. Der KIR-TYPE / Epitop-TYPE Kit wird mit dem gleichen Mastermix angesetzt, wie er auch in den HISTO-TYPE SSP Kits eingesetzt wird. Die Zusammensetzung des Master-Mixes in Abhängigkeit von der Anzahl der Reaktionsmische ist in Tabelle 1 (S.8) angegeben.
Wenn eine **Kontaminationskontrolle** mitgeführt werden soll, wird der Master-Mix zunächst ohne DNA-Lösung angesetzt und 10 µl von diesem Mix in die Kontaminationskontrolle pipettiert. Anschließend wird die DNA-Lösung zugegeben und der restliche Master-Mix auf die vorgetropften Reaktionsmische verteilt.

Tabelle 1: Zusammensetzung des Master-Mixes in Abhängigkeit von der Anzahl der Reaktionsmische:

| Anzahl Mixe | Aqua dest. | 10 x PCR-Puffer | DNA-Lsg. (mind. 50-80 ng/µl) | Taq-Polymerase (5 U/µl) | Gesamtvolumen | |
|-------------|------------|-----------------|------------------------------|-------------------------|---------------|-----------|
| 1 | 8 | 1 | 1 | 0,08 | 10 | µl |
| 6 | 63 | 8 | 8 | 0,64 | 80 | µl |
| 22 | 206 | 26 | 26 | 2,1 | 260 | µl |
| 28 | 253 | 32 | 32 | 2,6 | 320 | µl |
| 30 | 269 | 34 | 34 | 2.7 | 340 | µl |
| 46 | 396 | 50 | 50 | 4.0 | 500 | µl |
| 54 | 459 | 58 | 58 | 4.6 | 580 | µl |
| 70 | 602 | 76 | 76 | 6.1 | 760 | µl |
| 118 | 982 | 124 | 124 | 9.9 | 1240 | µl |

⇒ Bei abweichenden DNA-Konzentrationen sind die Mengen von DNA und Wasser entsprechend zu variieren. (z.B. für 22 Mixe: 10,8 µl DNA (120 ng/µl) und 195 µl Aqua dest.)

3.: Nach dem Vortexen werden von diesem Gemisch umgehend je **10 µl** zu den bereits in den Reaktionsgefäßen vorgelegten Reaktionsmischen pipettiert. Nach jedem Pipettierschritt muss die Spitze gewechselt werden. Die Gefäße werden mit den dafür



vorgesehenen Deckeln **dicht** verschlossen. Es ist darauf zu achten, dass die Deckelinnenseiten und die oberen Ränder nicht mit den Fingern berührt werden, um Verunreinigungen zu vermeiden. Bei Cyclern mit festdrehbarem Deckel können auch wiederverwendbare PCR-Matten zum Verschließen verwendet werden.

Durch leichtes nach unten Schütteln der Platte sollte das blaue Pellet am Gefäßboden etwas angelöst werden, und es sollte darauf geachtet werden, dass sich die gesamte Reaktionslösung im Gefäßboden befindet.

4.: Die Reaktionsgefäße in den Cyler stellen (auf festen Sitz achten!) und das PCR-Programm starten.

Ein Überschichten der Ansätze mit Mineralöl ist bei Verwendung eines beheizten und justierbaren Deckels **nicht** nötig !

Amplifikationsprotokoll

| Programm-Schritt | Temp. | Zeit | Anzahl Zyklen |
|---------------------|-------|--------------|---------------|
| Erste Denaturierung | 94°C | 2 Min | 1 Zyklus |
| Denaturierung | 94°C | 15 Sek | 10 Zyklen |
| Annealing | 65°C | 50 Sek | |
| Extension | 72°C | 45 Sek | |
| Denaturierung | 94°C | 15 Sek | 20 Zyklen |
| Annealing | 61°C | 50 Sek | |
| Extension | 72°C | 30 Sek | |

Cycler-Typen:

PTC 100 / 200 (MJ Research / Fa. BioRad) und GeneAmp PCR-System 9600 / 9700 (Heizrata vom 9600 verwenden!!!) / (Fa. ABI)

Da Cyler verschiedener Hersteller sich in ihrem Verhalten unterscheiden und sogar verschiedene Cycler eines Typs unterschiedlich kalibriert sein können, muss ggf. das Amplifikationsprotokoll optimiert werden.

Prinzipiell kann folgendermaßen vorgegangen werden:

Bei **falsch positiven** Reaktionen (unspezifische Banden, zusätzliche Typen):

Erhöhung der Annealing-Temperatur in 1°C-Schritten.

Bei **falsch negativen** Reaktionen (fehlende Banden und/oder Amplifikationskontrollen):

Erniedrigung der Annealing-Temperatur in 1°C-Schritten und / oder Erhöhung der Annealing-Zeiten in 5 Sekunden-Schritten und / oder Erhöhung der Denaturierungs-Zeiten in 5 Sekunden-Schritten.

Es wird empfohlen nur regelmäßig kalibrierte Cycler zu verwenden. Hierfür eignet sich gut der BAG-Cycler Check Kit (REF 7104).

Die Qualitätskontrollen wurde mit Cyclern des Typs PTC 200 bzw. 100 (MJ Research) und 9700 (ABI) durchgeführt.

4.4 Gelelektrophorese

Die Auftrennung und Auswertung der Amplifikationsprodukte erfolgt durch Elektrophorese über ein (Horizontal-) Agarose-Gel. Als Laufpuffer wird 0,5 x TBE (45 mM Tris, 45 mM Borsäure, 0,5 mM EDTA) - Puffer empfohlen. Die Gelstärke sollte 2,0 - 2,5% Agarose betragen. Vor dem Probenauftrag sollte das Gel mindestens 30 Min. polymerisieren. Nach Beendigung der Amplifikation werden die Proben dem Cycler entnommen und die kompletten Ansätze vorsichtig in jeweils eine Tasche des Gels pipettiert. Die Zugabe von Probenpuffer ist nicht mehr nötig. Zusätzlich sollte eine Tasche mit einem DNA-Längenstandard für den Größenvergleich beladen werden. Die elektrophoretische Auftrennung erfolgt bei 10-12 V/cm (bei 20 cm Elektrodenabstand ca. 200-240 V) für 20-40 Min.. Nach abgeschlossenem Lauf wird das komplette Gel für 30-45 Min. in einer Ethidiumbromid(EtBr)-Lösung (ca. 0,5 µg/ml EtBr in H₂O oder TBE-Puffer) gefärbt. Alternativ kann auch EtBr (0,5 µg/ml) dem Elektrophorese-Puffer oder dem Agarose-Gel zugesetzt werden. Im Bedarfsfall kann das Gel für ca. 20-30 Min. in H₂O entfärbt werden.

4.5 Dokumentation und Auswertung

Zur Dokumentation wird das Gel auf einen UV-Transilluminator (220-310 nm) gelegt und mit einer geeigneten Kamera (z.B. Polaroid, Film Typ 667) fotografiert. Belichtungszeit und Blende sind so zu wählen, daß die Banden scharf gezeichnet sind und sich gegen den dunklen Hintergrund abheben (Näherungswerte: Blende 11, Belichtungszeit 1 Sekunde).

Unter Einbeziehung der Spezifitätstabelle und des Auswertediagramms auf dem Worksheet werden nur solche Banden als positiv gewertet, die bezüglich des DNA -

Längenstandards die richtige Größe besitzen. Die korrekten Größen sind der Tabelle bzw. dem Diagramm zu entnehmen. In allen Spuren ohne spezifische Amplifikation muß in jedem Fall die interne Kontrolle bei **659 bp** erscheinen. In den Ansätzen mit spezifischer (und unspezifischer) Reaktion fällt die interne Kontrolle meist schwächer aus oder kann gänzlich verschwinden! Bei nicht auswertbaren Ergebnissen siehe Fehlerbeseitigung (6.).

In der **Kontaminationskontrolle** darf keine Bande erscheinen. Beim Vorliegen einer Kontamination mit genomischer DNA erscheint eine Bande bei 282 bp. Zusätzlich können Banden bei 78 bp, 104 bp, 176 bp und ca. 580 bp zu sehen sein. Liegt eine Kontamination mit Amplifikaten (HLA-Klasse I und II) vor, erscheint eine Bande bei 78 bp und/oder 104 bp und/oder 282 bp.

5. Warn- und Entsorgungshinweise

Ethidiumbromid ist ein stark mutagenes Reagenz. Hautkontakt und Kontaminationen vermeiden !

Die Gebrauchsinformation sowie die Warn- und Entsorgungshinweise des entsprechenden Herstellers sind zu beachten !

Der Transilluminator sendet sehr kurzwelliges UV-Licht aus, das Verbrennungen der Haut und der Netzhaut hervorrufen kann. UV-Gesichtsschutz tragen!

Sämtliche für den Test verwendete Materialien biologischen Ursprungs, die zur Gewinnung von DNA verwendet werden (z.B. Blut, sonstige Körperflüssigkeiten) sollten als potentiell infektiös betrachtet werden. Beim Umgang mit biologischen Materialien werden deshalb angemessene Sicherheitsvorkehrungen empfohlen (nicht mit dem Mund pipettieren; Schutzhandschuhe bei der Testdurchführung tragen; Händedesinfektion nach der Testdurchführung).

Biologische Materialien müssen vor der Entsorgung inaktiviert werden (z.B. durch Autoklavieren). Einwegmaterialien sind nach Gebrauch zu autoklavieren oder zu verbrennen.

Verschüttetes potentiell infektiöses Material sollte unverzüglich mit einem saugfähigen Papiertuch entfernt werden und der kontaminierte Bereich mit einem geeigneten Desinfektionsmittel oder 70%igem Ethanol desinfiziert werden. Material, das für die Entfernung von Verschüttetem benutzt wurde, muss vor der Entsorgung inaktiviert werden (z.B. durch Autoklavieren).

6. Mögliche Fehlerquellen

| Fehler | mögliche Ursache | Beseitigung |
|---|---|--|
| keine Amplifikation, Längenstandard sichtbar | DNA verunreinigt DNA degradiert | DNA-Isolierung wiederholen, evtl. andere Methode |
| | DNA-Konzentration zu hoch / zu niedrig | DNA-Konzentration ändern, DNA-Isolierung wiederholen |
| | Enzym fehlt oder Konzentration zu niedrig | Typisierung wiederholen, Enzym-Konzentration ändern |
| | DNA aus Heparin-Blut | Typisierung mit EDTA-Blut wiederholen |
| | falsche Amplifikationsparameter | Optimierung der Parameter (siehe 4.3)☆ |
| Wiederholte Ausfälle (keine Kontroll- Bande) in einzelnen Spuren | Deckel der Reaktionsgefäße schließen nicht dicht; dadurch Wasserverlust und Konzentra- tionsänderung während PCR | Deckel fest verschließen; evtl. Reaktionsgefäße von anderen Herstellern verwenden |
| unspezifische Amplifikation, Zusatzbanden (zusätzliche Banden falscher Größe sind zu vernachlässigen) | Kontamination mit Amplifikaten | Typisierung wiederholen auf sauberes Arbeiten achten |
| | DNA mit Salzen verunreinigt | DNA-Isolierung wiederholen, evtl. andere Methode |
| | DNA-Konzentration zu hoch | weniger DNA einsetzen |
| | Enzym-Konzentration zu hoch | weniger Enzym einsetzen |
| | falsche Amplifikationsparameter | Optimierung der Parameter (siehe 4.3)☆ |
| Auswertung ergibt mehr als 2 Spezifitäten | Kontamination mit Fremd-DNA (Amplifikat !) Neues Allel | Reaktionsmixe testen (ohne Zugabe von DNA) auf sauberes Arbeiten achten |
| keine oder sehr schwache Banden sichtbar, Längenstandard kaum sichtbar | EtBr-Färbung zu schwach | Färbung wiederholen |
| Gel-Hintergrund leuchtet zu stark | Färbung zu lange, EtBr- Konzentration zu hoch | mit H ₂ O entfärben, EtBr niedriger konzentrieren |
| Verschmierte Banden im Gel | Laufpuffer zu heiß Falscher Laufpuffer | Geringere Voltzahl wählen 0,5x TBE Puffer verwenden |







☆ Bei Verwendung der angegebenen Geräte und Materialien ist eine Optimierung der Amplifikationsparameter als letztes Hilfsmittel einzusetzen. In den meisten Fällen ist eine Auswertung durch die Eliminierung der Zusatzbanden aufgrund der Größenabweichung möglich.

7. Literatur / Referenzen

1. Moretta A, Bottino C, Pende D, Tripodi G, Tambussi G, Viale O, et al. Identification of four subsets of human CD3-CD16+ natural killer (NK) cells by the expression of clonally distributed functional surface molecules: correlation between subset assignment of NK clones and ability to mediate specific alloantigen recognition. *J Exp Med* 1990; 172(6):1589-98.
2. Phillips JH, Gumperz JE, Parham P, Lanier LL. Superantigen-dependent, cell-mediated cytotoxicity inhibited by MHC class I receptors on T lymphocytes. *Science* 1995;268(5209):403-5.
3. Hsu KC, Chida S, Geraghty DE, Dupont B. The killer cell immunoglobulin-like receptor (KIR) genomic region: gene-order, haplotypes and allelic polymorphism. *Immunol Rev* 2002;190:40-52.
4. Hsu KC, Liu XR, Selvakumar A, Mickelson E, O'Reilly RJ, Dupont B. Killer Ig-like receptor haplotype analysis by gene content: evidence for genomic diversity with a minimum of six basic framework haplotypes, each with multiple subsets. *J Immunol* 2002;169:5118-5129.
5. Carrington M, Norman P. The KIR gene cluster. National Library of Medicine (US), National Center for Biotechnology Information; 2003. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/bookres.fcgi/mono_003/ch1d1.pdf.
6. Williams AP, Bateman AR, Khakoo SI. Hanging in the balance: KIR and their role in disease. *Mol Interv* 2005; 5: 226-40.
7. Dohring C, Scheidegger D, Samaridis J, Cella M, Colonna M. A human killer inhibitory receptor specific for HLA-A1,2. *J Immunol* 1996; 156: 3098-101.
8. Ljunggren HG, Karre K. In search of the 'missing self': MHC molecules and NK cell recognition. *Immunol Today* 1990; 11:237-44.
9. Ruggeri L, Capanni M, Urbani E, Perruccio K, Shlomchik WD, Tosti A, et al. Effectiveness of donor natural killer cell alloreactivity in mismatched hematopoietic transplants. *Science* 2002; 295:2097–2100.
10. Nelson GW, Martin MP, Gladman D, Wade J, Trowsdale J, Carrington M. Cutting edge: heterozygote advantage in autoimmune disease: hierarchy of protection/susceptibility conferred by HLA and killer Ig-like receptor combinations in psoriatic arthritis. *J Immunol*. 2004 Oct 1;173(7):4273-6

11. Martin MP, Gao X, Lee JH, Nelson GW, Detels R, Goedert JJ, Buchbinder S, Hoots K, Vlahov D, Trowsdale J, Wilson M, O'Brien SJ, Carrington M. Epistatic interaction between KIR3DS1 and HLA-B delays the progression to AIDS. Nat Genet. 2002 Aug;31(4):429-34.
12. Hiby SE, Walker JJ, O'shaughnessy KM, Redman CW, Carrington M, Trowsdale J, Moffett A. Combinations of maternal KIR and fetal HLA-C genes influence the risk of preeclampsia and reproductive success. J Exp Med. 2004 Oct 18;200(8):957-65.
13. Olerup, O., Zetterquist H., 1992. Tissue Antigens 39:225-235
14. Kunert K, Seiler M, Mashreghi MF, Klippert K, Schönemann C, Neumann K, Pratschke J, Reinke P, Volk HD, Kotsch K. KIR/HLA ligand incompatibility in kidney transplantation. Transplantation. 2007 Dec 15;84(11):1527-33
15. Olerup, O., Zetterquist H., 1993. Tissue Antigens 41:55-56
16. Maniatis et al., 1989. Molecular Cloning: A Laboratory Manual. New York: Cold Spring Harbour Laboratory
17. Beutler, E. et al., 1990. BioTechniques 9:166

8. Erklärung der Symbole auf den Etiketten

| | |
|---|-------------------------------|
|  | In-vitro-Diagnostikum |
|  | Lagertemperatur |
|  | Lot-Nr. |
|  | Verwendbar bis |
|  | Bestell-Nr. |
|  | Gebrauchsinformation beachten |

① Die SSP-Methode entspricht der geschützten Bezeichnung ARMS™ der Firma ZENECA, Manchester. Die Methode ist geschützt unter der europäischen Patentnummer 0 332 435 B1 und wird mit Einverständnis der Firma ZENECA benutzt.



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

Tel.: +49 (0) 6404 / 925-0 www.bag-healthcare.com
 Fax: +49 (0) 6404 / 925-250 info@bag-healthcare.com

Auftragsannahme/Ordering:
 Tel.: +49 (0) 6404 / 925-450
 Fax: +49 (0) 6404 / 925-460
 verkauf@bag-healthcare.com

Customer Service:
 Tel.: +49 (0) 6404 / 925-125
 Fax: +49 (0) 6404 / 925-421
 service@bag-healthcare.com