

Gebrauchsinformation
BAGene DNA-SSP Kits



Testkits zur Bestimmung der/des
**ABO-Blutgruppen, RH-Eigenschaften, Kell-, Kidd- und Duffy-Systeme,
MNS-Systems, HPA- und HNA-Merkmale**
auf molekulargenetischer Basis

**10/20 Typisierungen
gebrauchsfertig vorgetropft**

REF 6640: BAGene ABO-TYPE	(rot)
REF 6641: BAGene ABO-TYPE variant	(rot)
REF 6645: BAGene RH-TYPE	(violett)
REF 6646: BAGene Partial D-TYPE	(gelb)
REF 6647: BAGene Weak D-TYPE	(weiß)
REF 6648: BAGene D Zygoty-TYPE	(blau)
REF 6650: BAGene KKD-TYPE	(grün)
REF 6652: BAGene MNS-TYPE	(gelb)
REF 6660: BAGene HPA-TYPE	(blau)
REF 6670: BAGene HNA-TYPE	(weiß)

Inhalt

1. Produktbeschreibung	2
2. Material	11
2.1 Inhalt der BAGene DNA-SSP Kits	11
2.2 Erforderliches bzw. zusätzliches Material	11
2.3 Lagerung und Haltbarkeit	12
3. Leistungsdaten	12
4. Testdurchführung	13
4.1 Vorsichtsmaßnahmen und besondere Hinweise	13
4.2 DNA-Isolierung	15
4.3 Amplifikation	15
4.4 Gelelektrophorese	18
4.5 Auswertung der Ergebnisse	19
4.6 Erläuterung der Worksheets und Auswertediagramme	20
5. Warn- und Entsorgungshinweise	23
6. Mögliche Fehlerquellen	24
7. Literatur	25
8. Erklärung der Symbole auf den Etiketten	31

1. Produktbeschreibung

Der Einsatz der Polymerasekettenreaktion (PCR) in der Blutgruppenserologie und Thrombozytendiagnostik ist geeignet zur Ergänzung, Abklärung und Bestätigung serologischer Befunde. Die Sequenzbestimmung von *ABO*-, [1-13] *RHD/RHCE*- [14-38], *Kell*-, *Kidd*- und *Duffy*- [39-56], *MNSs*- [57-60], *HPA*- [61-66] und *HNA*-Allelen [67-69] ermöglicht eine spezifische und eindeutige Typisierung von Spendern, Empfängern und Schwangeren auf DNA-Ebene mit einer hohen Auflösung und entscheidenden Vorteilen gegenüber den konventionellen serologischen Methoden.

Ausgangsmaterial für die Typisierung mit **BAGene DNA-SSP-Kits** ist gereinigte, leukozytäre DNA. Die Testdurchführung basiert auf der **Sequence Specific Primer**- (SSP)-PCR (siehe Abb. 1) [72, 73]. Diese Methode nutzt die Tatsache, daß für eine erfolgreiche Reaktion beide Primer am 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.

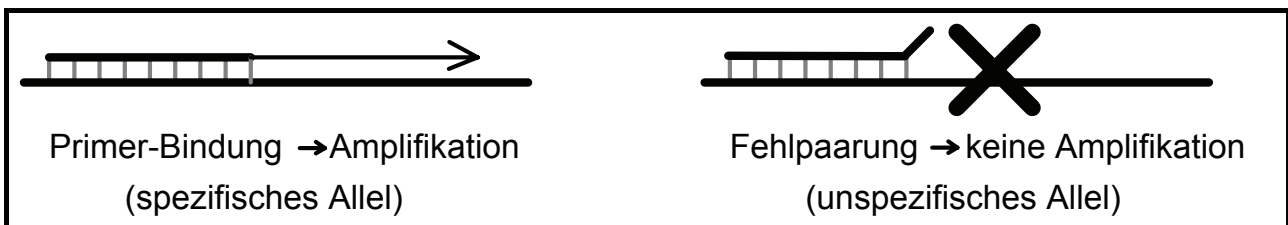


Abb. 1: Prinzip der SSP-PCR

Die Zusammensetzung der verschiedenen Primer-Mixe ermöglicht eine eindeutige Identifizierung der jeweils in den Auswertediagrammen angegebenen *ABO*-, *RH*-, *KEL*-, *JK*-, *FY*-, *MNSs*, *HPA*- und *HNA*-Genotypen. Je Typisierung wird eine bestimmte Anzahl **vorgetropfter** und **getrockneter** Reaktionsansätze inkl. interner Amplifikationskontrolle mit einem Endvolumen von 10 µl eingesetzt.

Molekulargenetische AB0-Blutgruppenbestimmung

Die molekulargenetische AB0-Blutgruppenbestimmung kommt zur Anwendung

- bei Neugeborenen, da bei ihnen die AB0-Antigenexpression unvollständig entwickelt ist und die Antikörper passiv von der Mutter erworben sein können
- bei Überlagerung des ursprünglichen Serotyps nach wiederholten oder massiven Transfusionen von Fremderythrozyten
- beim Monitoring nach AB0-differenter Knochenmarktransplantation [9] oder
- bei forensischen Fragestellungen

◆ **BAGene ABO-TYPE** und **BAGene ABO-TYPE variant**

Die Merkmale des AB0-Blutgruppensystems werden durch endständige Zuckerreste der Kohlenhydratketten von Glykoproteinen und Glykolipiden an der Oberfläche von Zellen definiert. Spezifische Glykosyltransferasen katalysieren diese Modifikationen. Die antigenen Eigenschaften werden also nicht direkt durch ein A-, B- oder 0-Gen, sondern durch die genetisch festgelegte Präsenz und Aktivität der Glykosyltransferasen bestimmt. Die Übertragung des Substrates N-Acetyl-Galactosamin durch die A-Transferase und D-Galactose durch die B-Transferase führt zu den Blutgruppenmerkmalen A bzw. B. Besitzt ein Individuum beide Transferasen, gehört es der Blutgruppe AB an, besitzt es weder eine A- noch B-Transferase, besitzt es die Blutgruppe 0. Die Gene für die A- und B-Transferasen liegen auf dem langen Arm von Chromosom 9 (9q34). Sie bestehen aus sieben Exons mit einer Länge von insgesamt 1065 Basenpaaren. Die bedeutendsten Mutationen (Basensubstitutionen, Deletionen, Insertionen) sind auf den Exonen 6 und 7 lokalisiert.

In der Literatur wurden fünf Hauptallele beschrieben: **ABO*A101**, **ABO*A201**, **ABO*B101**, **ABO*O01** und **ABO*O03**, ebenso existieren zahlreiche Varianten und Untergruppen [1-13].

BAGene ABO-TYPE und **BAGene ABO-TYPE variant** ermöglichen die molekulargenetische Bestimmung dieser 5 Hauptallele sowie des häufigen O-Alleles **ABO*O02** und varianter A- und B-Untergruppenallele (z.B. **A³**, **A^x**, **A^{el}**, **A^w**, **B³**, **B^x**, **B^w**).

Es ist anzumerken, daß es noch keine offizielle Nomenklatur der **ABO***-Allele gibt. Neben der hier gewählten Nomenklatur existieren derzeit noch weitere Nomenklaturen. Die Blood Group Antigen Gene Mutation Database http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gv/mhc/xslcgi.cgi?cmd=bgmutsystems_info&system=abo enthält eine ständig aktualisierte Aufstellung aller publizierter **ABO***-Allele und sollte daher bevorzugt verwendet werden.

Molekulargenetische Bestimmung der RH-Eigenschaften

Aufgrund der starken Immunogenität des Merkmals D und der hohen Immunisierungsrate D-negativer Individuen nach Übertragung D-positiver Erythrozyten kommt der Bestimmung der **RHD**-Allele besondere Bedeutung zu [34].

Die Immunisierung D-negativer Personen tritt beispielsweise auf

- bei Transfusion D-positiver Erythrozyten
- bei Schwangerschaften D-negativer Mütter mit D-positivem Fötus

Eine sichere molekulargenetische Bestimmung des D-Merkmals trägt zur Vermeidung von D-Immunisierungen bei. Weiterhin können D-negative Erythrozytenkonzentrate gezielter eingesetzt werden. Nicht zuletzt trägt auch die Typisierung der **RHCE**-Allele zur Absicherung unklarer oder schwacher serologischer Befunde bei.

Die Unterscheidung von D+/D+ und D+/D- bei Partnern D-negativer Mütter durch den Nachweis der D-Zygotie ist klinisch relevant zur Einschätzung des Risikos von MHN (**M**orbus **h**aemolyticus **n**eonatorum) [38] und trägt dazu bei, daß Schwangerschaften besser betreut werden können.

◆ **BAGene RH-TYPE**

Die beiden *RH*-Gene *RHD* und *RHCE* liegen auf dem kurzen Arm von Chromosom 1 (p34.3 bis p36.1) [14]. Ihre 3'-Enden liegen zueinander orientiert und sind durch 30.000 Basenpaare getrennt. In diesem Abschnitt ist ein weiteres Gen (*SMP1*) lokalisiert, welches ebenfalls für ein Membranprotein kodiert [26].

Das *RHD*-Gen kodiert das Antigen D, das *RHCE*-Gen die Antigene C, c, E, e. *RHD*- und *RHCE*-Gen bestehen aus je 10 Exons mit einer gemeinsamen Größe von 69 Kilobasen.

Etwa 18 Prozent der Europäer sind serologisch D-negativ. Bei fast allen RhD-negativen Kaukasiern ist das *RHD*-Gen in der Regel auf beiden Chromosomen vollständig deletiert [28].

In anderen Bevölkerungsgruppen (Afrikaner, Asiaten), in geringer Frequenz auch bei Europäern, konnten phänotypisch RhD-negative Individuen mit vorhandenem, aber scheinbar funktionslosen *RHD*-Gen nachgewiesen werden (*Cde^s*, *RHD Ψ*) [14, 15, 20, 21, 26-28, 30, 32-34]. **BAGene RH-TYPE** ermöglicht die molekulargenetische Bestimmung von Standard- *RHD/RHCE*-Allelen sowie die Typisierung einiger *RHD*-Varianten wie z.B. *DVI*, *DIV type 3*, *Cde^s*, *RHD Ψ* , *RHD(W16X)*, *RHD-CE(8-9)-D*, *RHD-CE(3-7)-D* [33] und *DEL*-Typen z.B. *RHD(K409K)*, *RHD(M295I)*, *RHD(IVS3+1G>A)* [35]. Das Merkmal *C^w* wird ebenfalls erfasst. Ergibt das Bandenmuster Hinweise auf eine D-Kategorie, so sollte eine Abklärung dieses Befundes mit **BAGene Partial D-TYPE** durchgeführt werden, um Punktmutationen als Ursache dieser Befunde auszuschließen.

Abb. 2 A veranschaulicht die genomische Struktur und Anordnung des *RHD*- und *RHCE*-Genortes bei *RHD*-positivem Haplotyp

Abb. 2 B zeigt ein Modell der Genstruktur bei *RHD*-negativem Haplotyp

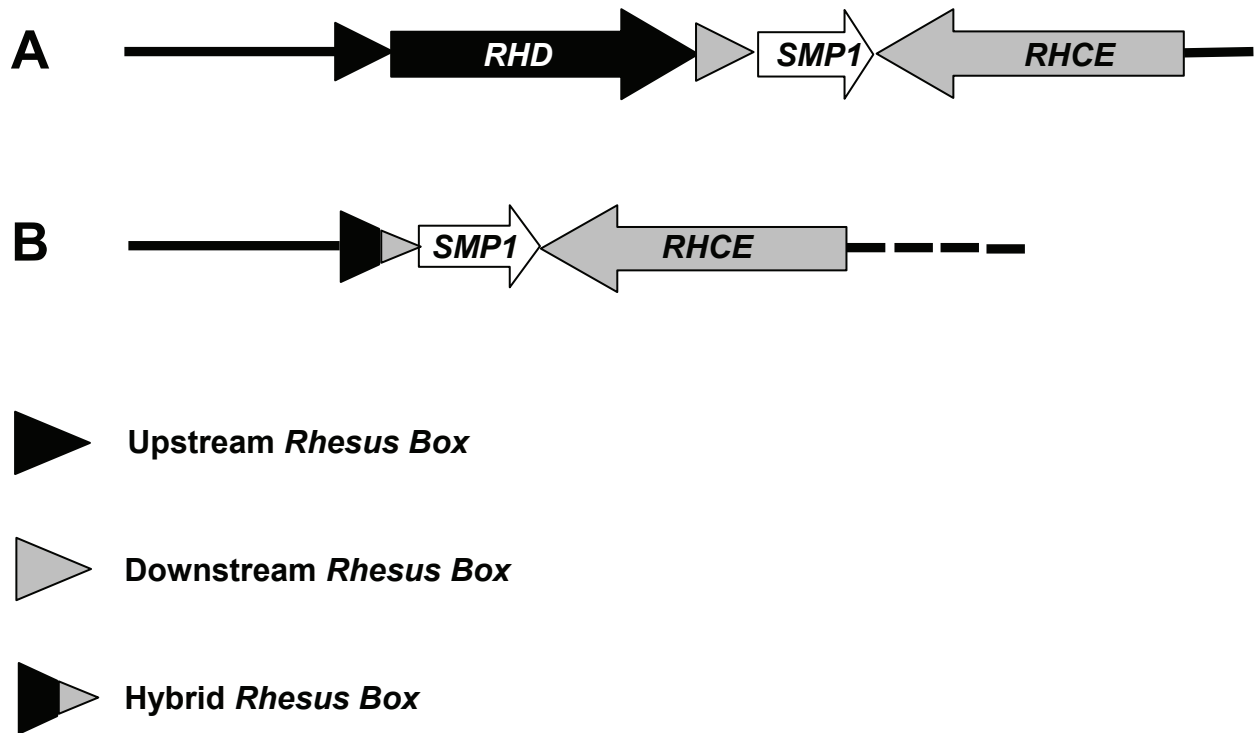


Abb.2: Modell der Struktur des *RHD*- und *RHCE*-Genortes [nach 26, 27]

◆ **BAGene Partial D-TYPE** und **BAGene Weak D-TYPE**

Veränderungen der Antigenstruktur des RhD-Merkmals führen entweder zu einem partiellen (Partial-D) oder zu einem schwachen D-Phänotyp (Weak-D).

Molekulargenetische Untersuchungen dieser D-Varianten haben gezeigt, dass sowohl weak-D-Phänotypen als auch einige Partial-D-Typen durch Punktmutationen verursacht werden. Bei anderen Partial-D-Typen sind ein oder mehrere Exons des *RHD*-Gens gegen die korrespondierenden Segmente eines *RHCE*-Gens ausgetauscht, sodass RhD-CE-D-Fusionsproteine gebildet werden.

In diesen Fusionsproteinen fehlen Epitope des kompletten RhD-Proteins. Deshalb können Individuen mit derartigen Partial-D-Typen (z.B. mit der klinisch bedeutsamsten D-Kategorie VI) durch Transfusion von Erythrozyten mit dem kompletten RhD-Protein immunisiert werden [16, 22, 34].

Bei Partial-D-Phänotypen wurden Aminosäureaustausche vorwiegend im extrazellulären Teil des RhD Polypeptids beschrieben. Die Aminosäuresubstitutionen bei weak-D-Typen sind in der Regel auf intrazelluläre bzw. transmembranäre Abschnitte des RhD-Proteins beschränkt [22, 23, 25, 26, 28-31, 35].

BAGene Partial D-TYPE ermöglicht die molekulargenetische Bestimmung von Partial-D z.B. *DII, DIII, DIV, DV, DVI, DVII, DAU, DBT, DFR, DHMi, DHMii, DNB* und *DHAR (Rh33)* [16, 17, 19, 20, 22, 24, 25, 28, 36, 37]. Eine molekulargenetische Differenzierung der D-Varianten *DCS, DFW, DIM, DNU* zum Standard-*RHD* ist zur Zeit nicht möglich. Die Berücksichtigung der Haplotypen zur Unterscheidung dieser Varianten ist hilfreich.

BAGene Weak D-TYPE ermöglicht die molekulargenetische Bestimmung der weak D-Typen *1, 2, 3, 4.0/4.1, 4.2, 5, 11, 15* und *17*.

◆ **BAGene D Zygoty-TYPE**

Bei RhD positivem Haplotyp wird das *RHD*-Gen flankiert von zwei hoch homologen DNA-Segmenten, den so genannten *Rhesus Boxen*, die 5' (Upstream *Rhesus Box*) und 3' (Downstream *Rhesus Box*) des *RHD*-Gens lokalisiert sind (siehe Abb. 2 A).

Bei RhD negativen Kaukasiern ist das *RHD*-Gen in der Regel auf beiden Chromosomen vollständig deletiert.

Dies führt zu einer Hybrid *Rhesus Box* welche das 5'-Ende der Upstream *Rhesus Box* und das 3'-Ende der Downstream *Rhesus Box* umfasst (siehe Abb. 2 B) [26, 27, 38].

BAGene D Zygoty-TYPE ermöglicht die Bestimmung der D-Zygotie (Homozygotie bzw. Hemizygotie des Merkmals D) mit Hilfe des positiven Nachweises der **Downstream *Rhesus Box* (DD)** oder der **Hybrid *Rhesus Box* (dd)**, bzw. der **Downstream und der Hybrid *Rhesus Box* (Dd)**.

Beim Fehlen der Hybrid *Rhesus Box* in der Schwarzen Bevölkerung sollten die Ergebnisse der Untersuchungen auf *RHD Ψ* und *Cde^s* mit **BAGene RH-TYPE** berücksichtigt werden. Weitere Antigen-D negative *RHD*-Allele können mit den vorhandenen Testkits derzeit nicht ausgeschlossen werden. Dies ist bei der

Befundinterpretation zu berücksichtigen. Diese Allele treten in der Weißen Bevölkerung jedoch recht selten auf [33, 38].

Molekulargenetische Bestimmung von Merkmalen des Kell-, Kidd- und Duffy-Systems (KKD)

Die wichtigsten Antigene des **Kell-Systems** sind *KEL1* (serologisch K) und *KEL2* (serologisch k – Cellano), wobei *KEL1* aufgrund seiner starken Immunogenität die größte Bedeutung zukommt.

Die beiden antithetischen Allele des **Kidd-Systems** werden als *JK*A* und *JK*B* (serologisch Jk^a , Jk^b) bezeichnet.

Die bedeutsamsten Merkmale des **Duffy-Systems** sind *FY*A* und *FY*B* (serologisch Fy^a , Fy^b).

Antikörper, die gegen Merkmale des KKD-Systems gerichtet sind, verursachen entweder hämolytische Transfusionsreaktionen und/oder schwere Fälle von MHN.

Eine sichere Bestimmung dieser Antigene bei Blutspendern und Patienten ist daher von großer Bedeutung.

◆ **BAGene KKD-TYPE** [39-56]

Der immunologisch bedeutsame Unterschied zwischen *KEL*1* und *KEL*2* (serologische Nomenklatur K und k - Cellano), ist auf einen Basenaustausch im Exon 6 des Gens zurückzuführen.

Das Kidd-System ist auf Chromosom 18 lokalisiert und besteht aus den drei unterschiedlichen Merkmalen Jk^a , Jk^b , Jk^- . Die Allele *JK*A*, *JK*B* des Kidd-Systems unterscheiden sich durch einen Aminosäureaustausch an Position 280 des Antigens.

Das FY-Gen ist auf Chromosom 1 lokalisiert. Es beinhaltet die durch die molekulare Typisierung zu bestimmenden Allele *FY*A*, *FY*B*, *FY*X* und *FY*null01* die sich am Genort wechselseitig vertreten können. Übertragen auf die serologische Nomenklatur entspricht das *FY*A* Allel dem Fy^a Antigen und das *FY*B* Allel dem Fy^b Antigen. Das nur schwach exprimierte Allel *FY*X* (Fy^X) wird serologisch als Fy^b^{weak} detektiert. Bei

Afrikanern wird der in Mitteleuropa sehr seltene (< 0,1%) Phänotyp Fy(a-b-) häufiger beobachtet (68%). Personen mit diesem stummen Allel *FY*null01* sind gegenüber dem Erreger der Malaria tertiana (*Plasmodium vivax*) aufgrund des Fehlens antigener Determinanten (Fya-b-) resistent.

Im Gegensatz zu serologischen Methoden ermöglicht **BAGene KKD-TYPE** eine eindeutige Detektion des immunologisch relevanten Merkmals Fy^{b weak} (*Fy*X*) sowie des Allels *FY*null01*.

Der **KKD-TYPE** SSP-Kit besteht aus acht unterschiedlichen PCR-Reaktionen und ermöglicht eine Bestimmung der Merkmale:

Kell (K, k) - *KEL*1* und *KEL*2*; Kidd (Jk^a, Jk^b) – *JK*A* und *JK*B*;
Duffy (Fy^a, Fy^b, Fy^{null}, Fy^X) – *FY*A*, *FY*B*, *FY*null01* und *FY*X*

Molekulargenetische Bestimmung von Merkmalen des MNS-Blutgruppensystems

Die Antigene **M** und **N** wurden 1927 von Landsteiner und Levine [57], **S** und **s** 1947 von Walsh und Montgomery [58] entdeckt. Bei menschlichen Glykophorinen handelt es sich um Haupt-Sialoglykoproteine, die auf der Zelloberfläche von Erythrozyten exprimiert werden und die Antigene des MNS-Blutgruppensystems tragen [59]. Glykophorin A (GPA) besitzt zwei allelische Ausprägungen der Antigene M oder N. Auch Glykophorin B (GPB) tritt in zwei Allelformen für die Antigene S und s auf. GPA und GPB werden kodiert von **GYP A** beziehungsweise **GYP B**, die zu einem Genkomplex auf Chromosom 4 gehören [60].

◆ **BAGene MNS-TYPE** [57-60]

Das Testsystem ermöglicht die Bestimmung der vier Hauptallele des MNS-Systems (**M, N, S und s**) auf molekulargenetischer Basis.

Molekulargenetische Bestimmung der HPA-Merkmale

Alloimmunthrombozytopenien wie z.B. neonatale Alloimmunthrombozytopenie, posttransfusionelle Purpura oder Refraktärzustand nach Thrombozytentransfusionen werden hervorgerufen durch Antikörper, die gegen humane Plättchenantigene gerichtet sind und im Rahmen von Transfusionen oder Schwangerschaften gebildet werden können. Die sichere Bestimmung der HPA-Merkmale ist notwendig für die Diagnose und Bereitstellung geeigneter Blutkomponenten für Patienten mit diesen Krankheitsbildern [61-66].

◆ **BAGene HPA-TYPE**

Die Thrombozytenantigene HPA (**h**uman **p**latelet **a**ntigens) repräsentieren eine Gruppe polymorpher allelischer Marker, lokalisiert auf den humanen thrombozytären Glykoproteinen GPIIb/IIIa, GPIa, GPIb α und GPIb β . Die Polymorphismen beruhen auf Punktmutationen, die zum Austausch einzelner Aminosäuren führen [65].

BAGene HPA-TYPE ermöglicht die molekulargenetische Bestimmung der *HPA*-Merkmale *HPA-1a/b*, *HPA-2a/b*, *HPA-3a/b*, *HPA-4a/b*, *HPA-5a/b*, *HPA-15a/b*.

Molekulargenetische Bestimmung der HNA-Merkmale

Neonatale Alloimmunneutropenie (NIN) oder Transfusions-abhängige akute Lungeninsuffizienz (TRALI) werden hervorgerufen durch Antikörper, die gegen humane Granulozytenantigene gerichtet sind und im Rahmen von Transfusionen oder Schwangerschaften gebildet werden können. Die sichere Bestimmung der HNA-Merkmale ist notwendig für die Diagnose und Bereitstellung geeigneter Blutkomponenten für Patienten mit diesen Krankheitsbildern [67-69].

◆ **BAGene HNA-TYPE**

Die Granulozytenantigene HNA (**h**uman **n**eutrophil **a**ntigens) repräsentieren eine Gruppe polymorpher allelischer Marker, lokalisiert auf den humanen neutrophilen

Granulozyten. Klinisch wichtige Alloantigene sind die Merkmale **HNA-1a** (NA1), **HNA-1b** (NA2) und **HNA-1c** (SH) des Fc γ RIIIb Glykoproteins [67]. Weitere klinisch relevante Antigene sind **HNA-4a** (Mart) und **HNA-5a** (Ond) die zur Familie der β_2 -Integrine gehören [68, 69].

BAGene HNA-TYPE ermöglicht die molekulargenetische Bestimmung der **HNA**-Merkmale **HNA-1a/b/c**, **HNA-4a/b**, **HNA-5a/b**.

2. Material

2.1 Inhalt der **BAGene DNA-SSP Kits**

- ◆ 10/20 **BAGene**-Platten/-Streifen ausreichend für 10/20 Typisierungen. Die vorpipettierten und getrockneten Reaktionsansätze enthalten allelspezifische Primer, interne Kontroll-Primer (spezifisch für das HGH-Gen (**human growth hormone**) [74], bzw. einer genomischen Sequenz von Chromosom I, 90.000 bp 5' der *Rhesus Box*) und Nukleotide. Der Reaktionsmix Nr. 1 ist markiert (PCR-Streifen: Aufdruck der Lot-Nr. um das erste Reaktionsgefäß, PCR-Platten: Aufdruck der Lot-Nr. oberhalb des 1. Reaktionsgefäßes)
- ◆ 10 x PCR-Puffer für jeweils 10/20 Typisierungen
- ◆ 8er-Streifen Deckel (à 12 Stück) für jeweils 10/20 Typisierungen
- ◆ Gebrauchsinformation, Worksheet und Auswertediagramm

2.2 Erforderliches bzw. zusätzliches Material

- ◆ Taq-Polymerase (5 U/ μ l, z.B. Fa. Qiagen), **keine Hot-Start Taq-Polymerase verwenden (z.B. Ampli Taq Gold)**
- ◆ **BAG EXTRA-GENE** Kit (optional) zur DNA-Extraktion aus Blut / Lymphozyten / Leukozyten oder Material für andere DNA-Extraktions-Methoden
- ◆ DNA-Längenstandard
- ◆ Kolbenhubpipetten (0,5-250 μ l)
- ◆ Sterile Spitzen, ggf. mit Filter
- ◆ DNA-Cycler (z. B. PTC 200 von MJ Research/Fa. Bio-Rad 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)

Geräte zur Auswertung und Dokumentation

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

2.3 Lagerung und Haltbarkeit

Der Kit wird ungekühlt versandt. Nach Erhalt müssen alle Kit-Reagenzien bei -20...-80°C lichtgeschützt gelagert werden. Die Haltbarkeitsdauer ist den Etiketten auf den jeweiligen Reagenzien zu entnehmen und bezieht sich auch auf die Zeitdauer nach dem 1. Gebrauch. 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 – 100 ng DNA pro Reaktionsmix gewährleistet. Bedingt durch das längere PCR-Programm, wird bei Verwendung von **BAGene D Zygosity-TYPE** eine niedrigere DNA-Konzentration von 30 - 50 ng pro Reaktionsmix empfohlen.

Diagnostische Spezifität: Die Zusammensetzung der Primer-Mixe gewährleistet eine zuverlässige Identifizierung der auf dem Worksheet und Auswertediagramm angegebenen Allele.

Die diagnostische Sensitivität und Spezifität der einzelnen Primer-Mixe wurde anhand von DNA-Kontrollproben überprüft. Nicht verfügbare Allele oder solche, die aufgrund Ihrer

Seltenheit gegenwärtig nicht getestet wurden, sind auf dem Worksheet und der Auswertetabelle kenntlich gemacht (*n.t.* = *not tested currently*).

Für alle **BAGene DNA-SSP Kits** wurden Leistungsstudien mit vortypisierten Referenzproben durchgeführt. Die Untersuchungen zeigten eindeutige Ergebnisse entsprechend der serologischen und/oder genomischen Vortypisierungen. Es traten keine Diskrepanzen während der Studien auf.

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 in Blutgruppenserologie erfahrenem Personal durchgeführt werden sollte. Aktuelle Richtlinien zur Transfusionsmedizin und Blutgruppenbestimmung sowie die Transfusionsanamnese sind zu beachten, um insbesondere bei diskrepanten Ergebnissen in serologischer und molekularbiologischer Testmethode, das Risiko von Fehlbestimmungen zu verringern. Die Genotypisierung der *ABO*-, *RHD/RHCE*-, *Kell*-, *Kidd*-, *Duffy*-, *MNSs*, *HPA*- und *HNA*-Merkmale ist nach erfolgter serologischer Bestimmung durchzuführen.

Generelle Einschränkungen bei der molekularen Typisierung mit **BAGene** DNA SSP Kits:

Sollte mit den **BAGene** DNA-SSP Kits kein eindeutiges Ergebnis erzielt werden (z.B. durch unbekannte Allele, die mit den vorhandenen Primern nicht erfasst werden), sind Transfusionsrichtlinien (z.B. Richtlinien der Bundesärztekammer) entsprechend den serologischen Befunden zu beachten. Eine Sequenzierung solcher Proben zur Abklärung des Genotyps ist zu empfehlen. Die Testergebnisse sind mit Berücksichtigung der genetischen Varianz unterschiedlicher ethnischer Gruppen zu bewerten. Im Zweifelsfalle gilt der Phänotyp.

Einschränkungen bei der Bestimmung der ABO-Blutgruppe:

Da mit **BAGene ABO-TYPE variant** nur eine Auswahl an varianten A-Allelen erfasst wird, können sich hinter dem PCR-Ergebnis **ABO*A101** andere variante A-Allele

verbergen. Da mit **BAGene ABO-TYPE variant** nur eine Auswahl an varianten *B*-Allelen und keine varianten *A*²-Allele erfasst werden, können sich hinter dem PCR-Ergebnissen ***ABO*B101*** und ***ABO*A201*** andere variante *B*-Allele bzw. variante *A*²-Allele verbergen. Die meisten *B*^(A) und *cis AB*-Allele zeigen in der *ABO*B101*-Reaktion ebenfalls ein positives Ergebnis.

Einschränkungen und Anmerkungen zur Bestimmung der D-Zygotie:

- Bei *RHD*-Allelen, die serologisch nicht nachweisbar sind (RhD neg.), kann es zur Diskrepanz zwischen serologischem Testergebnis und Genotypisierung kommen. Der positive Nachweis der Downstream *Rhesus Box* zeigt das Vorhandensein eines *RHD*-Allels an (*RHD* pos.), mit Ausnahme des Allels *RHD*Ψ in homo-, bzw.hemizygoter Form. Hier kann das Ergebnis negativ ausfallen, obwohl ein *RHD*-Allel vorhanden ist.
- Weiterhin kann bei genetisch veränderter Downstream *Rhesus Box* das Ergebnis derselben ebenfalls falsch negativ ausfallen, obwohl die Probe serologisch D-positiv ist. Bei serologisch D-positivem Ergebnis und positiver PCR für die Hybrid *Rhesus Box* lautet daher der Befund „Dd“ und bei negativer PCR für die Hybrid *Rhesus Box* „DD“.
- Bei Proben aus afrikanischen Bevölkerungsgruppen kann es, bedingt durch den ausgeprägten Polymorphismus in der Hybrid *Rhesus Box*, zu einem falsch positiven Ergebnis bei Vorhandensein von *RHD*Ψ und einem weiteren *RHD*-Allel kommen.
- Degradierete DNA kann zu falsch negativen Ergebnissen führen. Hier ist entweder nur die Bande der internen Kontrolle zu sehen, oder es ist keine Bande erkennbar.

Einschränkungen und Anmerkungen zur Bestimmung von partial D:

Der Ausfall der Bande in der Reaktion Nr. 4 weist auf Vorhandensein von DFR (serologisch schwach D-positiv) oder *RHD*Ψ (hemi- bzw. homozygot, serologisch D-negativ) hin. Bei fehlender Information zur Serologie kann *RHD*Ψ mit **BAGene RH-TYPE** bestätigt oder ausgeschlossen werden.

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 5-10 µg Leukozyten-DNA (entspricht etwa 0,5 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 [70] 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 [71]. 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 **BAGene**-Platten/-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. Die verschiedenen **BAGene** DNA-SSP Kits werden mit dem gleichen Master-Mix angesetzt und sind daher miteinander kombinierbar. Die Zusammensetzung des Mastermixes in Abhängigkeit von der Anzahl der Reaktionsmixe ist in Tabelle 1 angegeben.

Tabelle 1: Zusammensetzung des Mastermixes in Abhängigkeit von der Anzahl der Reaktionsmixe:

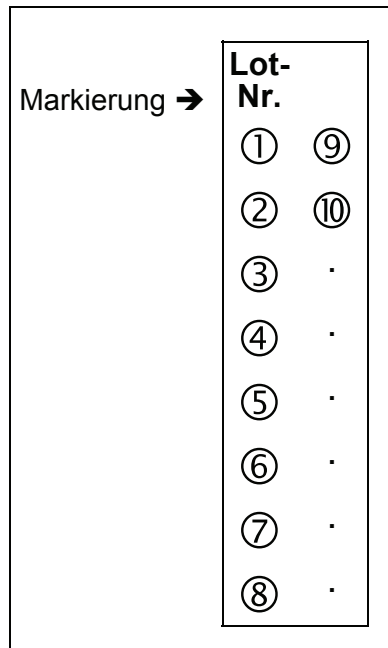
Anzahl Mixe	Aqua dest.	10 x PCR-Puffer	DNA-Lsg. (mind. 50-100 ng/µl) ♣	Taq-Polymerase (5 U/µl)	Gesamt- volumen ca.	
1	8	1	1	0,08	10	µl
2	16	2	2	0,2	20	µl
6☆	50	7	7	0,5	65	µl
7	70	9	9	0,7	90	µl
8	80	10	10	0,8	100	µl
9	88	11	11	0,9	110	µl
10	96	12	12	1,0	120	µl
11	104	13	13	1,0	130	µl
12	112	14	14	1,1	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

⇒ Bei abweichenden DNA-Konzentrationen sind die Mengen von DNA und Wasser entsprechend zu variieren (z.B. für 12 Mixe: DNA (120 ng/µl): verwende 5,8 µl DNA und 119 µl Aqua dest.).

☆ Mastermix für 6 Reaktionsmixe wird wegen des geringen Volumens Taq-Polymerase als Mindestansatz empfohlen.

♣ Bei **BAGene D Zygoty-TYPE** wird eine DNA-Konzentration von 30 – 50 ng/µl empfohlen

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 Bewegen 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 Cyclus 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 für alle BAGene DNA-SSP Kits außer D Zygoty-TYPE

Programm-Schritt	Zeit	Temp.	Anzahl Zyklen
Erste Denaturierung	5 Min	96°C	1 Zyklus
Denaturierung	10 Sek	96°C	5 Zyklen
Annealing+Extension	60 Sek	70°C	
Denaturierung	10 Sek	96°C	10 Zyklen
Annealing	50 Sek	65°C	
Extension	45 Sek	72°C	
Denaturierung	10 Sek	96°C	15 Zyklen
Annealing	50 Sek	61°C	
Extension	45 Sek	72°C	
Letzte Extension	5 Min	72°C	1 Zyklus

Cycler-Typen:

z.B. PTC 100 / 200 (MJ Research/Fa. Bio-Rad) und GeneAmp PCR-System 9600 / 9700 (Fa. ABI)

ACHTUNG: Anderes PCR-Programm !

Amplifikationsprotokoll D Zygosity-TYPE

Programm-Schritt	Zeit	Temp.	Anzahl Zyklen
Erste Denaturierung	10 Min	95°C	1 Zyklus
Denaturierung	20 Sek	92°C	35 Zyklen
Annealing	30 Sek	64°C	
Extension	5 Min	68°C	
Letzte Extension	5 Min	72°C	1 Zyklus

Cycler-Typen:

z.B. PTC 100 / 200 (MJ

Research/Fa. Bio-Rad)

und GeneAmp PCR-System

9600 / 9700 (Fa. ABI)

Da sich Cycler verschiedener Hersteller 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 z.B. der BAG-Cycler Check Kit (Bestell-Nr.: 7104).

Die Qualitätskontrollen wurden mit Cyclern des Typs PTC 200 bzw. PTC 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 Minuten polymerisieren. Nach Beendigung der Amplifikation werden die Proben dem Cycler entnommen. Die Streifendeckel sind vorsichtig zu öffnen. Anschließend werden 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 Minuten. Bei Verwendung von **BAGene D Zygoty-TYPE** wird eine Laufzeit von 40 Minuten empfohlen um eine bessere Auflösung der Banden zu erreichen. Nach abgeschlossenem Lauf wird das komplette Gel für 30-45 Minuten 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 Gel zugesetzt werden. Im Bedarfsfall kann das Gel für ca. 20-30 Min. in H₂O entfärbt werden.

4.5 Auswertung der Ergebnisse

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 des Auswertediagramms werden nur solche Banden als positiv gewertet, die bezüglich eines DNA – Längenstandards die richtige Größe besitzen. Die korrekten Fragmentlängen der Amplifikate in bp sind der Tabelle bzw. dem Diagramm zu entnehmen. In allen Spuren ohne spezifische Amplifikation muß in jedem Fall die interne Kontrolle bei **434 bp** erscheinen (eine Ausnahme bilden **D Zygoty-TYPE** sowie die 2. PCR-Reaktion von **RH-TYPE**: hier ist die Fragmentlänge der internen Kontrolle **659 bp** lang). In den Ansätzen mit spezifisch positiver Reaktion fällt die interne Kontrolle meist schwächer aus oder kann, bedingt durch kompetitive PCR-Bedingungen, gänzlich verschwinden! Bei nicht auswertbaren Ergebnissen siehe Fehlerbeseitigung (6.).


4.6 Erläuterung der Worksheets und Auswertediagramme


◆ Allgemein

Die Ergebnisse der mit **BAGene DNA-SSP Kits** durchgeführten molekulargenetischen Bestimmungen werden auf den mitgelieferten Worksheets dokumentiert.

Die tabellarische Auflistung von Merkmalen, Spezifitäten, Phänotyp, Genotyp und die Darstellung der Reaktionsmuster, z.T. anhand von Beispielen in den Auswertediagrammen, dienen als Interpretationshilfe. Die PCR-Ansätze sind mit Reaktionsnummern versehen (z.B. **ABO-TYPE** Reaktions-Nr. 1 - 8).

Die Fragmentlänge der PCR-Produkte (spezifische Banden) wird in bp angegeben. In den Zeilen darunter sind mögliche Bandenmuster im Gel dargestellt.

Spezifische PCR-Produkte (positive Reaktion) werden mit  bezeichnet und die betreffenden Felder des Diagramms sind farblich (ABO-TYPE, ABO-TYPE variant, Partial D-TYPE, Weak D-TYPE, D Zygosity-TYPE, KKD-TYPE, MNS-TYPE, HPA-TYPE, HNA-TYPE – grün, RH-TYPE zusätzlich rot, pink und blau) unterlegt.

Das Fehlen spezifischer Amplifikate wird in weißen Feldern mit  bezeichnet.

Die Auswertung der Reaktionsmuster erfolgt in den Zeilen von links nach rechts (im Worksheet mit roten Pfeilen markiert) und wird zusammen mit Probanddaten und Gelbild in die dafür vorgesehenen Felder eingefügt.

◆ **BAGene ABO-TYPE** [8] und **BAGene ABO-TYPE variant** [6, 7, 10, 13]

Die homozygote Ausprägung der Allele *ABO*O01*, *ABO*O03*, *ABO*B101*, *ABO*A201* wird durch Banden in der dazu gehörenden PCR-Reaktion (1, 3, 5 und 7) angezeigt. Bei Heterozygotie müssen außer zwei spezifischen PCR-Ansätzen (1, 3, 5, 7) zusätzlich auch alle vier „non-Reaktionen“ eine Bande im Gel zeigen (2, 4, 6 und 8). Homozygotie des Allels *ABO*A101* wird lediglich angezeigt durch Banden bei allen vier „non-Reaktionen“ (2, 4, 6, 8), da es keinen spezifischen Ansatz für *ABO*A101* gibt. Die heterozygote Merkmalskonstellation *ABO*A101* ist an einer zusätzlichen Bande der allelspezifischen Reaktionen (1, 3, 5, 7, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15 oder 16) zu erkennen.

Ausführlichere Erklärungen sind in der Extra-Anweisung zur Auswertung von **BAGene ABO-TYPE variant** zu finden, die jedem Kit beigelegt ist. Bitte beachten Sie auch die speziellen Hinweise auf dem Worksheet **BAGene ABO-TYPE** sowie dem Ergebnisprotokoll **BAGene ABO-TYPE variant**. Die Einschränkungen der molekulargenetischen *ABO**-Bestimmung (siehe Seite 13) sind zu beachten. Als interne Kontrolle erscheint eine Bande, spezifisch für HGH, mit der Fragmentlänge von 434 bp.

◆ **BAGene RH-TYPE** [18, 20, 32, 33, 35]



Die molekulargenetische Bestimmung des Standard-*RHD* sowie einiger *RHD*-Varianten (*RHD*-positive Haplotypen in serologisch D-negativen Proben, Partial-D, *D_{el}*) werden in den entsprechend gekennzeichneten PCR-Reaktionen durchgeführt.

Bei den Ansätzen 1 und 2 handelt es sich um Multiplex-PCR-Reaktionen zur Untersuchung von fünf *RHD*-Polymorphismen (*RHD* Intron 4 und 7, Exon 7 sowie spezifischer Nachweis von *RHD*(W16X) und *RHD*Ψ).



Dies bedeutet, dass im Gegensatz zu allen anderen **BAGene** DNA-SSP Kits (außer der internen Kontrollbande) nicht nur ein, sondern auch zwei spezifische Amplifikate in einer PCR-Reaktion auftreten können. Zur Erleichterung der Auswertung sind die entsprechenden Felder bei zwei möglichen Banden unterteilt und mit zwei unterschiedlichen Farben unterlegt. Die Fragmentlängen der PCR-Produkte und die Polymorphismen sind passend zu den Reaktionsmuster-Feldern ebenfalls farblich gekennzeichnet.

Beispiel *RHD*Ψ:

Ansatz Nr.1: Zwei spezifische Banden müssen im Gel erscheinen.

- PCR-Produkt 224 bp – grün gekennzeichnet, Reaktionsmuster 
in grün unterlegtem Feld
- PCR-Produkt 123 bp – blau gekennzeichnet, Reaktionsmuster 
in blau unterlegtem Feld.

Ansatz Nr.2: Zwei spezifische Banden müssen im Gel erscheinen.

- PCR-Produkt 154 bp – rot gekennzeichnet, Reaktionsmuster 
in rot unterlegtem Feld
- PCR-Produkt 390 bp – grün gekennzeichnet, Reaktionsmuster 
grün unterlegtem Feld.

Für die molekulargenetische Bestimmung der Merkmale des *RHCE*-Genortes sind ebenfalls entsprechend gekennzeichnete PCR-Reaktionen vorgesehen. Als interne Kontrolle erscheint eine Bande, spezifisch für HGH, mit der Fragmentlänge von 434 bp.

Eine Ausnahme bildet PCR-Reaktion Nr. 2: hier erscheint eine Kontrollbande bei 659 bp (spezifisch für eine genomische Sequenz von Chromosom I, 90.000 bp 5' der *Rhesus Box*).

- ◆ **BAGene Partial D-TYPE** [20, 22, 24, 25, 28, 35-37], **Weak D-TYPE** [23, 25, 31], **D Zygoty-TYPE** [38], **KKD-TYPE** [56], **MNS-TYPE** [59], **HPA-TYPE** [66], **HNA-TYPE** [67]

Siehe Seite 20 Abschnitt „Allgemein“.

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 (PCR-Inhibitoren) 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
Unspezifische Amplifikation, Zusatzbanden (zusätzliche Banden falscher Größe sind zu vernachlässigen)	Kontamination mit Amplifikaten	Typisierung wiederholen Auf sauberes Arbeiten achten Dekontamination
	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 Dekontamination
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 - zu wenig 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

• **BAGene ABO-TYPE**

1. **Ferguson-Smith MA**, Aitken DA, Turleau C, de Grouchy J: Localisation of the human ABO: Np-1: AK-1 linkage group by regional assignment of AK-1 to 9q34. *Hum Genet* 1976;34:35-43.
2. **Yamamoto F**, Clausen H, White T, Marken J, Hakamori S: Molecular genetic basis of the histo-blood group ABO system. *Nature* 1990; 345:229-33.
3. **Yamamoto F**, Hakamori S: Sugar-nucleotide donor specificity of histo-blood group A and B transferases is based on amino acid substitutions. *J Biol Chem* 1990;265: 19257-62.
4. **Yamamoto F**, McNeill PD, Yamamoto M, Hakomori S, Harris T, Judd WJ, Davenport RD: Molecular genetic analysis of the ABO blood group system: 1. Weak subgroups: A³ and B³ alleles. *Vox Sang* 1993;64:116-9.
5. **Yamamoto F**, McNeill PD, Yamamoto M, Hakomori S, Harris T: Molecular genetic analysis of the ABO blood group system: 3. A^x and B^(A) alleles. *Vox Sang* 1993;64:171-4.
6. **Chester MA**, Olsson ML. The ABO blood group gene: A locus of considerable genetic diversity. *Transfus Med Rev* 2001;15:177-200.
7. **Yip SP**. Sequence variation at the human ABO locus. *Ann Hum Genet* 2002;66:1-27.
8. **Gassner C**, Schmarda A, Nussbaumer W, Schönitzer D: ABO Glycosyltransferase Genotyping by polymerase chain reaction using sequence-specific primers. *Blood* 1996;88:1852-6.
9. **Müller TH**, Hallensleben M, Schunter F, Blasczyk R: Molekulargenetische Blutgruppendiagnostik. *Dt Ärztebl* 2001;98:A 317-322 [Heft 6].
10. **Seltsam A**, Hallensleben A, Kollmann A, Burkhart J, Blasczyk R. Systematic analysis of the ABO gene diversity within exons 6 and 7 by PCR-screening revealed new ABO alleles. *Transfusion* 2003;43:428-39.
11. **Olsson ML**, Irshaid NM, Hosseini-Maaf B, et al. Genomic analysis of clinical samples with serologic ABO blood grouping discrepancies: Identification of 15 novel A and B subgroup alleles. *Blood* 2001;98:1585-93.
12. **Seltsam A**, Hallensleben M, Kollmann A, Blasczyk R: The nature of diversity and diversification at the ABO locus. *Blood* 2003;102:3035-42.
13. **Seltsam A**, Das Gupta C, Wagner FF, Blasczyk R. Non-deletional ABO*O alleles express weak blood group A phenotypes. *Transfusion* 2005;45:359-65.

- **BAGene RH-TYPE, Partial D-TYPE, Weak D-TYPE, D Zygosity-TYPE**

14. **Chérif-Zahar B**, Localization of the human Rh blood group gene structure to chromosome region 1p34.3 – 1p36.1 by in situ hybridisation. *Hum Genet* 1991;86: 398-400.
15. **Blunt T**, Daniels G, Carritt B: Serotype switching in a partially deleted *RHD* gene. *Vox Sang* 1994;67:397-401.
16. **Rouillac C**, Colin Y, Hughes-Jones NC, et al.: Transcript analysis of D category phenotypes predicts hybrid Rh D-CE-D proteins associated with alteration of D epitopes. *Blood* 1995;85:2937-44.
17. **Rouillac C**, Le Van Kim C, Beolet M, Cartron J-P, Colin Y: Leu110Pro substitution in the RhD polypeptide is responsible for the DVII category blood group phenotype. *Am J Hematol* 1995;49:87-8.
18. **Mouro I**, Colin Y, Sistonen P, Le Pennec PY, Cartron J-P, Le Van Kim C: Molecular basis of the RhC^w (Rh8) and RhC^x (Rh9) blood group specificities. *Blood* 1995;86:1196-201.
19. **Beckers EAM**, Faas BHW, Simsek S, et al.: The genetic basis of a new partial D antigen: D^{DBT}. *Br J Haematol* 1996;93:720-7.
20. **Gassner C**, et al.: RHD/CE typing by polymerase chain reaction using sequence-specific primers *Transfusion* 1997;37:1020-6.
21. **Okada H**, Kawano M, Iwamoto S, Tanaka M, Seno T, Okubo Y, Kajii E: The *RHD* gene is highly detectable in RhD-negative Japanese donors. *J Clin Invest* 1997;100:373-379
22. **Wagner FF**, Gassner C, Müller TH, Schönitzer D, Schunter F, Flegel WA: Three molecular structures cause Rhesus D category VI phenotypes with distinct immunohematologic features. *Blood* 1998;91:2157-68.
23. **Legler TJ**, Maas JH, Blaschke M, Malekan H, Ohto R, Lynen R, Bustami N, Schwartz DWM, Mayr WR, Köhler M, Panzer S: *RHD* genotyping in weak D phenotypes by multiple polymerase chain reactions. *Transfusion* 1998;38:434-40.
24. **Omi T**, Takahashi J, Tsudo N, et al.: The genomic organization of the partial D category DVa : the presence of a new partial D associated with the DVa phenotype. *Biochem Biophys Res Commun* 1999;254:786-94.
25. **Wagner FF**, Gassner C, Müller TH, Schönitzer D, Schunter F, Flegel WA: Molecular basis of weak D phenotypes. *Blood* 1999;93:385-93.
26. **Flegel WA**, Wagner FF: Molecular genetics of *RH*. *Vox Sang* 2000;78(suppl 2): 109-15.
27. **Wagner FF**, Flegel WA: *RHD* gene deletion occurred in the *Rhesus box*. *Blood* 2000;95:3662-8.
28. **Avent ND**, Reid ME: The Rh blood group system: a review. *Blood* 2000;95:375-87.

29. **Legler TJ**, Wiemann V, Ohto H, Matuda I, Obara T, Uchikawa M, Köhler M: D^{Va} Category Phenotype and Genotype in Japanese Families. *Vox Sang* 2000;78:194-7.
30. **Wagner T**, Resch B, Legler TJ, Mossier C, Helmberg W, Köhler, M, Lanzer G: Severe HDN due to anti-Ce that required exchange transfusion. *Transfusion* 2000;40:571-4.
31. **Wagner FF**, Frohmajer A, Ladewig B, Eicher Ni, Lonicer CB, Muller TH, Siegel MH, Flegel WA: Weak D alleles express distinct phenotypes. *Blood* 2000;95:2699-708.
32. **Singleton BK**, Green CA, Avent ND, Martin PG, Smart E, Daka A, Narter-Olaga EG, Hawthorne LM, Daniels G: The presence of an *RHD* pseudogene containing a 37 base pair duplication and a nonsense mutation in Africans with the RhD-negative blood group phenotype. *Blood* 2000;95:12-18.
33. **Wagner FF**, Fromajer A, Flegel WA: *RHD* positive haplotypes in D negative Europeans. *BMC Genetics* 2001;2:10.
34. **Müller TH**, Hallensleben M, Schunter F, Blasczyk R: Molekulargenetische Blutgruppendiagnostik. *Dt Arztebl* 2001;98:A 317-322 [Heft 6].
35. **Shao CP**, Maas JH, Su YQ, Köhler M, Legler TJ: Molecular background of RhD-positive, D-negative, Del and weak D phenotypes in Chinese. *Vox Sang* 2002;83:156-61.
36. **Wagner FF**, Eicher NI, Jørgensen JR, Lonicer CB, Flegel WA: DNB: a partial D with anti-D frequent in Central Europe. *Blood* 2002;100:2253-6.
37. **Wagner FF**, Ladewig B, Angert KS, Heymann GA, Eicher NI, Flegel WA: The *DAU* allele cluster of the *RHD* gene. *Blood* 2002;100:306-11.
38. **Perco P**, Shao CP, Mayr WR, Panzer S, Legler TJ: Testing for the D zygosity with three different methods revealed altered Rhesus boxes and a new weak D type. *Transfusion* 2003;43:335-9.

- **BAGene KKD-TYPE**

39. **Lee S**, Naime DS, Reid ME, Redman CM: Molecular basis for the high-incidence antigens of the Kell blood group system. *Transfusion* 1997;37:1117-22.
40. **Lee S**, Wu X, Reid M, Zelinski T, Redman C: Molecular basis of the Kell (K1) phenotype. *Blood* 1995;85:912-6.
41. **Olives B**, Neau P, Bailly P, Hediger MA, Rousselet G, Cartron JP, Ripoche P: Cloning and functional expression of a urea transporter from human bone marrow cells. *J Biol Chem* 1994;269:31649.
42. **Lucien N**, Sidoux-Walter F, Olives B, Moulds J, Le Pennec PY, Cartron JP, Bailly P: Characterization of the gene encoding the human Kidd blood group/urea transporter protein. Evidence for splice site mutations in Jknull individuals. *J Biol Chem* 1998;273:12973-80.

43. **Cartron JP**, Ripoche P: Urea transport and Kidd blood groups. *Transfus Clin Biol* 1995;2:309.
44. **Olives B**, Merriman M, Bailly P, Bain S, Barnett A, Todd J, Cartron JP, Merriman T: The molecular basis of the Kidd blood group polymorphism and its lack of association with type 1 diabetes susceptibility. *Hum Mol Genet* 1997;6:1017.
45. **Neote K**, Mak JY, Kolakowski LFJ, Schall TJ: Functional and biochemical analysis of the cloned Duffy antigen: identity with the red blood cell chemokine receptor. *Blood* 1994;84:44-52.
46. **Chitnis CE**, Chaudhuri A, Horuk R, Pogo AO, Miller LH: The domain on the Duffy blood group antigen for binding *Plasmodium vivax* and *P. knowlesi* malarial parasites to erythrocytes. *J Exp Med* 1996;184:1531-6.
47. **Chaudhuri A**, Zbrzezna V, Polyakova J, Pogo AO, Hesselgesser J, Horuk R: Expression of the Duffy antigen in K562 cells. Evidence that it is the human erythrocyte chemokine receptor. *J Biol Chem* 1994;269:7835.
48. **Chaudhuri A**, Polyakova J, Zbrzezna V, Williams K, Gulati S, Pogo AO: Cloning of glycoprotein D cDNA, which encodes the major subunit of the Duffy blood group system and the receptor for the *Plasmodium vivax* malaria parasite. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993;90:10793.
49. **Tournamille C**, Le van Kim C, Gane P, Cartron JP, Colin Y: Molecular basis and PCR-DNA typing of the Fya/fyb blood group polymorphism. *Hum Genet* 1995;95:407-10.
50. **Iwamoto S**, Omi T, Kajii E, Ikemoto S: Genomic organization of the glycoprotein D gene: Duffy blood group Fya/Fyb alloantigen system is associated with a polymorphism at the 44- amino acid residue. *Blood* 1995;85:622.
51. **Chaudhuri A**, Polyakova J, Zbrzezna V, Pogo AO: The coding sequence of Duffy blood group gene in humans and simians: restriction fragment length polymorphism, antibody and malarial parasite specificities, and expression in nonerythroid tissues in Duffy- negative individuals. *Blood* 1995;85:615.
52. **Mallinson G**, Soo KS, Schall TJ, Pisacka M, Anstee DJ: Mutations in the erythrocyte chemokine receptor (Duffy) gene: the molecular basis of the Fya/Fyb antigens and identification of a deletion in the Duffy gene of an apparently healthy individual with the Fy(a-b-) phenotype. *Br J Haematol* 1995;90:823-9.
53. **Tournamille C**, Colin Y, Cartron JP, Le van Kim C: Disruption of a GATA motif in the Duffy gene promoter abolishes erythroid gene expression in Duffy-negative individuals. *Nat Genet* 1995;10:224-8.
54. **Tournamille C**, Le van Kim C, Gane P, Le Pennec PY, Roubinet F, Babinet J, Cartron JP, Colin Y: Arg89Cys substitution results in very low membrane expression of the Duffy antigen/receptor for chemokines in Fy(x) individuals. *Blood* 1998;92:2147-56.
55. **Miller SA**, Dykes DD, Polesky HF: A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Res* 1988;16:1215.

56. **Rožman P**, Dovč T, Gassner C: Differentiation of autologous ABO, RHD, RHCE, KEL, JK, and FY blood group genotypes by analysis of peripheral blood samples of patients who have recently received multiple transfusions. *Transfusion* 2000;40:936-42.

• **BAGene MNS-TYPE**

57. **Landsteiner K**, Levine P: A new agglutinable factor differentiating individual human bloods. *Proc Soc exp Biol* 1927;24:600.)

58. **Walsh RJ**, Montgomery C: A new human isoagglutinin subdividing the MN blood groups. *Nature* 1947;160:504.

59. **Shih MC**, Yang LH, Wang NM, Chang JG: genomic typing of human red cell Miltenberger glycoporphins in a Taiwanese population. *Transfusion* 2000;40:54-61.

60. **Storry JR**, Reid ME, Fetcs S, Huang CH: Mutations in *GYPB* exon 5 drive the S-s-U+^{var} phenotype in persons of African descent: implications for transfusion. *Transfusion* 2003;43:1738-47.

• **BAGene HPA-TYPE**

61. **Ballem PJ**, Buskard NA, Decary F, et al.: Post-transfusion purpura secondary to passive transfer of anti-PI^{A1} by blood transfusion. *Br J Hematol* 1987;66:113-4.

62. **Mueller-Eckhardt C**, Kiefel V, Grubert A, et al.: 348 cases of suspected neonatal alloimmune thrombocytopenia. *Lancet* 1989;1:363-6.

63. **Panzer S**, Kiefel V, Bartram CR, et al.: Immune thrombocytopenia more than a year after allogeneic marrow transplantation due to antibodies against donor platelets with anti-PI^{A1} specificity: evidence for a host derived immune reaction. *Br J Hematol* 1989;71:259-64.

64. **Mueller-Eckhardt C**, Kiefel V, Santoso S: Review and update of platelet alloantigen systems. *Transfus Med Rev* 1990;4:98-109.

65. **Santoso S**, Kiefel V: Human platelet specific alloantigens: update. *Vox Sang* 1998;74 (Suppl):249-53.

66. **Jau-Yi L**, Ying-Ju C, Hui-Yu H, Jeong-Shi L, Cheng-Hwai T: PCR with sequence-specific primer-based simultaneous genotyping of human platelet antigen-1 to -13w. *Transfusion* 2002;42:1089-95.

• **BAGene HNA-TYPE**







67. **Carl B**, Kroll H, Bux J, Bein G, Santoso S: B-lymphoblastoid cell lines as a source of reference DNA for human platelet and neutrophil antigen genotyping. *Transfusion* 2000;40:62-68.

68. **Sachs UJH**, Chavakis T, Fung L, Lohrenz A, Bux J, Reil A, Ruf A, Santoso S: Human alloantibody anti-Mart interferes with Mac-1-dependent leukocyte adhesion. *Blood* 2004;104,3:727-34.
69. **Sachs UJH**, Reil A, Bauer C, Bux J, Bein G, Santoso S: Genotyping of human neutrophil antigen-5a (Ond). *Transfus Med* 2005;15:115-117.

- **Allgemein**

70. **Maniatis et al.**, 1989. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*.
New York: Cold Spring Harbour Laboratory
71. **Beutler E et al.**, 1990. *BioTechniques* 9:166
72. **Olerup O**, Zetterquist H. HLA-DR typing by PCR amplification with sequence-specific primers (PCR-SSP) in 2 hours: an alternative to serological DR typing in clinical practice including donor-recipient matching in cadaveric transplantation. *Tissue Antigens* 1992;39:225-35.
73. **Olerup O**, Zetterquist H. DR "low-resolution" PCR-SSP typing - a correlation and an update. *Tissue Antigens* 1993;1:55-6.
74. **Chen EY**, Liao YC, Smith DH, Barrera-Saldana HA, Gelinis RE, Seeburg PH. The human growth hormone locus: nucleotide sequence, biology, and evolution. *Genomics* 1989;4:479.

8. Erklärung der Symbole auf den Etiketten

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

Version 05/2009



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