

KIR-TYPE Epitop-TYPE

Elektronische Gebrauchsinformation siehe www.bag-healthcare.com

Low resolution

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



**10 Typisierungen
gebrauchsfertig vorgetropft**

REF 7105	KIR-TYPE
REF 7106	Epitop-TYPE

Inhalt

1. Produktbeschreibung	2
2. Material	3
2.1.1 Inhalt des KIR-TYPE Kits	3
2.1.2 Inhalt des Epitop-TYPE Kits	3
2.2 Erforderliches bzw. zusätzliches Material	3
2.3 Lagerung und Haltbarkeit	3
3. Leistungsdaten	3
4. Testdurchführung	4
4.1 Vorsichtsmaßnahmen und besondere Hinweise	4
4.2 DNA-Isolierung	4
4.3 Amplifikation	4
4.4 Gelelektrophorese	6
4.5 Dokumentation und Auswertung	6
5. Warn- und Entsorgungshinweise	6
6. Mögliche Fehlerquellen	7
7. Literatur	8
8. Erklärung der Symbole auf den Etiketten	9

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 (*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 im Worksheet angegebenen KIR Genotypen / HLA Spezifitäten. Je Typisierung werden **vorgetropfte** und **getrocknete** Reaktionsansätze (inkl. interner Amplifikationskontrolle) mit einem Endvolumen von 10 μ l eingesetzt.

2. Material

2.1.1 Inhalt des KIR-TYPE Kits

- ◆ KIR-TYPE Platten für die KIR Typisierung. 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. In der letzten Position befindet sich die Positiv-Kontrolle (enthält nur die Kontroll-Primer). Die Lot-Nummer ist auf jede Platte gedruckt.
- ◆ 10x PCR-Puffer
- ◆ 8er-Streifen Deckel
- ◆ Gebrauchsinformation, Worksheet, Spezifitätstabelle

2.1.2 Inhalt des Epitop-TYPE Kits

- ◆ Epitop-TYPE Streifen für die Epitop Typisierung. 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.
- ◆ 10x PCR-Puffer
- ◆ 8er-Streifen Deckel
- ◆ Gebrauchsinformation, Worksheet

2.2 Erforderliches bzw. zusätzliches Material

- ◆ Taq-Polymerase (5 U/μl), Happy Taq (REF 70976) oder eine andere vom Anwender mit den KIR-TYPE / Epitop-TYPE Kits validierte Taq-Polymerase
Bitte keine Hot-start Taq Polymerase verwenden !
- ◆ **EXTRA-GENE I** Kit (REF 7059) (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 (Liste der validierten Cycler siehe Seite 5)
- ◆ 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)
- ◆ UV-Leuchtplatte (220 - 310 nm)
- ◆ Geldokumentationssystem

2.3 Lagerung und Haltbarkeit

Die Kits werden ungekühlt versandt. Nach Erhalt alle Kit-Reagenzien bei $\leq -20^{\circ}\text{C}$ oder $2\text{...}8^{\circ}\text{C}$ lichtgeschützt lagern (**Häufiges Wechseln der Lagertemperatur bitte vermeiden!**). Die Lagerung sollte in temperaturüberwachten Geräten erfolgen.

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.

3. Leistungsdaten

Die Zusammensetzung der Primermixe gewährleistet eine zuverlässige Identifizierung der im Worksheet 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 im Worksheet bzw. in der Spezifitätstabelle kenntlich gemacht.

Für den KIR-TYPE Kit und den Epitop-TYPE Kit wurden Leistungsstudien mit vortypisierten DNA Proben durchgeführt. Die Ergebnisse wurden mit den Resultaten der Vortypisierung, die mit SSP-Kits eines anderen Anbieters erzielt wurden, verglichen. Die Ergebnisse ergaben eine 100% Übereinstimmung zum Vortypisierungsergebnis.

Für die Validierung und die Qualitätskontrollen der Mixe werden DNA Proben verwendet, die mit EXTRA GENE I (Aussalzungsmethode) oder den QIAGEN QIAamp DNA Blood Mini und Maxi Kits (Säulenmethode) isoliert wurden. Bei Verwendung von anderen DNA-Extraktionskits muss vom Anwender validiert werden, ob die isolierte DNA für den Einsatz mit dem KIR-TYPE Kit / Epitop-TYPE Kit geeignet ist.

KIR-TYPE und Epitop-TYPE sind mit der Happy Taq (REF 70976) validiert. Bei Verwendung einer anderen Taq-Polymerase muss diese vom Anwender für den Einsatz mit dem KIR-TYPE Kit / Epitop-TYPE Kit validiert werden.

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

4. Testdurchführung

4.1 Vorsichtsmaßnahmen und besondere Hinweise

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

Das Probenmaterial für die Isolation der genomischen DNA sollte in geeigneten Abnahmesystemen verschickt werden. Heparin kann unter Umständen die PCR-Reaktion hemmen [17], derartige Abnahmesysteme sind daher nicht geeignet. Es wird der Einsatz von EDTA- oder Citrat-Blut für die Typisierung empfohlen.

Validierte DNA Extraktionsmethoden:

- EXTRA GENE I Kit (BAG)
- QIAGEN QIAamp DNA Blood Mini und Maxi Kit

Soll die bereits im Labor etablierte Standardmethode zur Isolation von gDNA verwendet werden, ist diese vom Anwender zu validieren.

Für den Test wird eine DNA Konzentration von 25-40 ng/µl benötigt.

Die DNA sollte folgende Reinheitsindizes aufweisen:

- $OD_{260} / OD_{280} = >1,5$ und $<2,0$ (Indikator für Kontamination mit RNA / Proteinen)
- $OD_{260} / OD_{230} = >1,8$ (Indikator für Kontamination mit Salzen, Kohlenhydraten oder organischen Lösungsmitteln)

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.

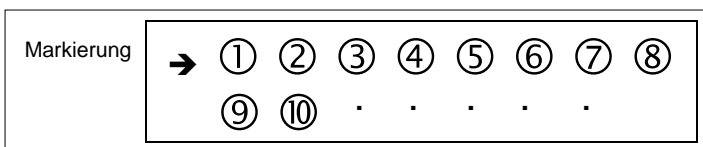
1. Die gewünschte Anzahl der KIR-TYPE-Platten / Epitop-TYPE-Streifen und den 10x PCR-Puffer aus dem Kit entnehmen.
2. Den Master-Mix bestehend aus 10x PCR-Puffer, DNA-Lösung, Taq-Polymerase und Aqua dest. zusammenpipettieren und gründlich vortexen. Der KIR-TYPE / Epitop-TYPE Kit wird mit dem gleichen 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 angegeben.
 Wenn eine **Kontaminationskontrolle** mitgeführt werden soll, den Master-Mix zunächst ohne DNA-Lösung ansetzen und 10 µl von diesem Mix in die Kontaminationskontrolle (blau angefärbt) pipettieren. Anschließend die DNA-Lösung zum restlichen Mastermix geben und gründlich vortexen.

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

Anzahl Mixe	Aqua dest.	10x PCR-Puffer	DNA-Lsg. (25 - 40 ng/µl)	Happy Taq (5 U/µl)	Gesamt-volumen
1	7	1	2	0,08	10 µl
6	55	8	16	0,64	80 µl
22	180	26	52	2,1	260 µl
28	221	32	64	2,6	320 µl

- ⇒ Die eingesetzte DNA-Menge **muss** 50 - 80 ng pro Mix betragen. Die Mengen von DNA sind abhängig von ihrer Konzentration zu berechnen und die Menge von Wasser entsprechend zu variieren (z.B. für 22 Mixe: 26 µl DNA (50 ng/µl) und 206 µl Aqua dest.)
- ⇒ Wenn eine andere Taq-Polymerase verwendet werden soll, so muss diese vom Anwender mit dem KIR-TYPE / Epitop-TYPE Kit validiert werden.

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 fest-drehbarem Deckel können auch wiederverwendbare PCR-Matten zum Verschließen verwendet werden. Durch leichtes Schütteln der Platte / des Streifens sollte das Pellet am Gefäßboden etwas angelöst werden, und es sollte darauf geachtet werden, dass sich die gesamte Reaktionslösung im Gefäßboden befindet. Gegebenenfalls sollte die Platte / der Streifen kurz an zentrifugiert werden.



4. Die Reaktionsgefäße in den Cycler 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	

Validierte Cycler-Typen

PTC 100 / 200 / C1000
(MJ Research/BioRad),

GeneAmp PCR-System 9700
(bitte Heizrate vom 9600
verwenden), Veriti (ABI),

Mastercycler epGradient S
(bitte Funktion „simulate
Mastercycler gradient“
verwenden) (Eppendorf),

Tprofessional (Biometra)

Keine Aluminiumheizblöcke verwenden (z.B. GeneAmp PCR-System 9700)!

Bei Cyclern mit sehr schnellen Heiz- und Kühlraten wird empfohlen, eine etwas langsamere Heiz- und Kühlrate (~2,5°C/sec) zu wählen.

Da Cyler verschiedener Hersteller sich in ihrem Verhalten unterscheiden und sogar verschiedene Cyler eines Typs unterschiedlich kalibriert sein können, muss bei Verwendung von anderen Cyclern ggf. das Amplifikationsprotokoll optimiert bzw. diese Geräte vom Anwender validiert 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 CYCLER CHECK (REF 7104, 71044).

Die Qualitätskontrollen wurde mit Cyclern des Typs PTC 200 bzw. C1000 (MJ Research/BioRad), 9700 (ABI), Mastercycler epGradient S (Eppendorf) und Tprofessional (Biometra) 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 Proben-auftrag sollte das Gel mindestens 30 Minuten polymerisieren. Nach Beendigung der Amplifikation werden die Proben dem Cyler 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 elektro-phoretische Auftrennung erfolgt bei 10 - 12 V/cm (bei 20 cm Elektrodenabstand ca. 200 - 240 V) für 20 - 40 Minuten. 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 dem Agarose-Gel zugesetzt werden. Im Bedarfsfall kann das Gel für ca. 20 - 30 Minuten 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 oder Video-System, Typ KP65HM-CE) fotografiert. Belichtungszeit und Blende sind so zu wählen, dass die Banden scharf gezeichnet sind und sich gegen den dunklen Hintergrund abheben.

Es werden nur solche Banden als positiv gewertet, die bezüglich des DNA-Längenstandards die richtige Größe besitzen. Die korrekten Größen sind dem Worksheet 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!

Wenn weder eine spezifische Bande noch eine Kontrollbande auftritt, ist das Ergebnis mit dem betroffenen Mix nicht auswertbar.

Mögliche Fehlerquellen bei nicht auswertbaren Ergebnissen siehe Punkt 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 176 bp und/oder 282 bp und/oder 580 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).

Die Entsorgung aller Proben, ungebrauchter Reagenzien und Abfälle sollte entsprechend der Gesetzgebung des jeweiligen Landes und der lokalen Behörden erfolgen.

Eine Erklärung zum Sicherheitsdatenblatt (SDS) kann unter www.bag-healthcare.com heruntergeladen werden.

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
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/sehr schwache Banden sichtbar Längenstandard kaum sichtbar	Färbung zu schwach	Färbung wiederholen
Gel-Hintergrund leuchtet zu stark	Färbung zu lange, Farbstoff-Konzentration zu hoch	mit H ₂ O entfärben, Farbstoff niedriger konzentrieren
Verschmierte Banden im Gel	Laufpuffer zu heiß oder ver- braucht, falscher Laufpuffer, Gel nicht auspolymerisiert	geringere Voltzahl wählen, 0,5x TBE Puffer verwenden, Gel auspolymerisieren lassen








☆ 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

- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- Williams AP, Bateman AR, Khakoo SI. Hanging in the balance: KIR and their role in disease. *Mol Interv* 2005; 5: 226-40.
- 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.
- Ljunggren HG, Karre K. In search of the 'missing self': MHC molecules and NK cell recognition. *Immunol Today* 1990; 11:237-44.
- 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.
- 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. Green and Sambrook, 2012. *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

	Lagertemperatur / Temperaturbegrenzung
	Lagertemperatur / Unterer Temperaturgrenzwert
	Verwendbar bis
	Gebrauchsinformation beachten
	Achtung
	Ausreichend für n Tests
	Hersteller
CONT	Inhalt, enthält
CONTROL CC	Kontaminationskontrolle
IFU	Gebrauchsinformation
IVD	In-vitro-Diagnostikum
KIR HLA-LIGAND TYPING	Zweckbestimmung: Bestimmung der KIR (Killer-cell Immunoglobulin-like Receptors)-Genotypen
KIR TYPING	Zweckbestimmung: Bestimmung der KIR (Killer-cell Immunoglobulin-like Receptors)-HLA-Liganden
LOT	Lot-Nr.
OR	Oder
PCRBUFF 10x	PCR-Puffer, 10x konzentriert
PCRCAP	PCR-Deckel
PCRPLATE	PCR-Platten
PCRSTRIP	PCR-Streifen
REACTIONMIX	Reaktionsmische
REF	Bestell-Nr.
RTU	Gebrauchsfertig
WORKSHEET	Auswertungsunterlagen