

KIR-TYPE

Epitop-TYPE

Niska rezolucija

Test kit za tipizaciju KIR-genotipova i njihovih HLA-liganda
na osnovu molekularne genetike



10 Tipizacija
spremno za upotrebu, već razliveno

| | | |
|------------|-------------|--------------------|
| REF | 7105 | KIR-TYPE |
| REF | 7106 | Epitop-TYPE |

Sadržaj

| | |
|---|---|
| 1. Opisi proizvoda | 2 |
| 2. Materijal | 3 |
| 2.1.1 Sadržaj KIR-TYPE kita..... | 3 |
| 2.1.2 Sadržaj Epitop-TYPE kita | 3 |
| 2.2 Potrebni uslovi i dodatni materijal | 3 |
| 2.3 Čuvanje i stabilnost..... | 3 |
| 3. Podaci o performansi..... | 3 |
| 4. Procedura testa | 4 |
| 4.1 Bezbednosni uslovi i posebne napomene | 4 |
| 4.2 DNK izolacija | 4 |
| 4.3 Amplifikacija..... | 4 |
| 4.4 Gel elektroforeza | 6 |
| 4.5 Dokumentacija i interpretacija..... | 6 |
| 5. Upozorenja i mere predostrožnosti | 6 |
| 6. Rešavanje mogućih poteškoća | 7 |
| 7. Reference | 7 |
| 8. Objašnjenje simbola korišćenih na nalepnicama..... | 8 |

1. Opis proizvoda

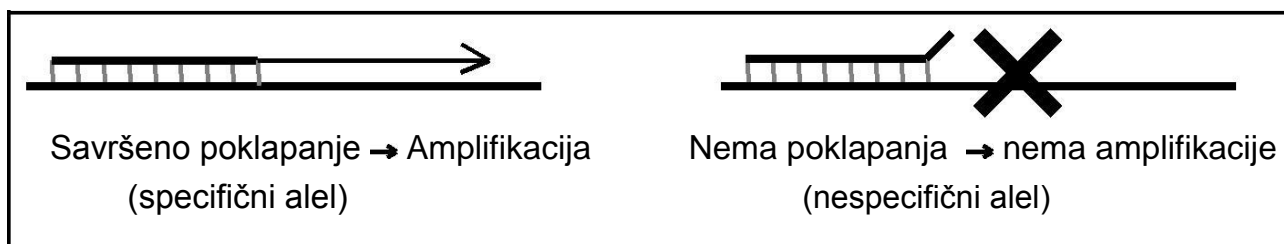
Ćelije prirodne ubice (Natural killer, NK) i subpopulacije T-limfocita sa CD8⁺ memorijskim fenotipom (1) ili $\gamma\delta$ T-ćelijski receptori ekspimiraju inhibitorne i aktivirajuće *Killer-cell Immunoglobulin-like Receptore* (KIRs). Usled razlika u količini gena kao i izrazitog polimorfizma pojedinačnih gena, genski region KIR receptora pokazuje veliku varijabilnost kod istih osoba (3, 4). U međuvremenu, definisani molekuli HLA klase I identifikovani su kao ligandi za pojedine KIR receptore (5, 6). Inhibitorni KIR2DL1 receptor vezuje se za alele molekula HLA-C grupe 2, koji sadrži amino kiseline Asn⁷⁷ i Lys⁸⁰, KIR2DL2 / KIR2DL3 receptori za alele molekula HLA-C grupe 1, sa amino kiselinama Ser⁷⁷ i Asn⁸⁰, a KIR3DL1 ima afinitet za HLA-B alele sa Bw4 epitopima na aminokiselinskoj poziciji 77-83 α 1 heliksa. Inhibitorni receptor KIR3DL2 vezuje se za alele HLA-A*03 i *11 grupa (7). Ligandi za aktivirajuće KIR receptore nisu dovoljno dokumentovani – iako se pretpostavlja da imaju afinitet za iste HLA-B i HLA-C molekule kao njihovi srodni inhibirajući receptori.

Najprihvaćeniji model aktivacije NK ćelija u ovom trenutku je pretpostavka da je reaktivnost NK ćelija kontrolisana ravnotežom između inhibirajućih i aktivirajućih signala. Stoga aktivacija NK ćelija može nastati usled smanjenog broja inhibitornih signala ili usled povećanog vezivanja liganda za aktivirajuće receptore. U slučaju procesa transformacije (na primer tumorskih bolesti ili virusnih infekcija) praćenih gubitkom ekspresije HLA kao liganda, nedostatak inhibitornih signala rezultira aktivacijom NK ćelija i lizom target ćelija. Ovo opažanje predstavlja osnovu "missing-self" hipoteze, po kojoj je zdravo tkivo sa stabilnom HLA ekspresijom pošteđeno aktivacije NK ćelija (8).

Naročito velik broj studija je pokazao da HLA/KIR disparitet dovodi do reaktivnosti NK ćelija donora protiv recipijenta kod transplantacije kostne srži, što rezultira redukovanjem bolesti graft protiv domaćina (GvHD) i relapsa (9). Dalje, definisani KIR genotipovi mogu biti u vezi sa autoimunim bolestima (npr. psorijaza), usporenim progresom razvoja AIDS kod HIV pacijenata, rizikom od preeklampsije i akutnim odbacivanjem nakon alogene transplantacije bubrega (10-14).

KIR-TYPE kit omogućuje genotipizaciju 14 KIR gena i 2 pseudogena. Osim toga **Epitop-TYPE** kit detektuje alele HLA specifičnosti HLA-Cw Asn⁸⁰, HLA-Cw Lys⁸⁰, HLA-B Bw4^{Threo}, HLA-B Bw4^{Iso} i HLA-A Bw4.

Detekcija pojedinih KIR receptora / KIR HLA liganda izvodi se primenom PCR-SSP (*PCR-sekvencu-specifičnim prajmerima*) metode (videti Sliku 1) (13, 15).



Slika 1: SSP-PCR princip

Ovaj metod se zasniva na činjenici da ekstenzija prajmera, i time i uspešan PCR, zahteva postojanje savršene komplementarnosti (match) na 3'- kraju oba prajmera. Shodno tome, samo ako prajmeri u potpunosti odgovaraju target sekvenci može doći do amplifikacije koja se zatim vizualizuje elektroforezom na agaroznom gelu.

Odabirom prajmera specifičnih za sekvencu omogućuje se detekcija pojedinačnih KIR / HLA gena na osnovu genomske DNK.

Sastav pojedinačnih smeša prajmera omogućuje jasnu identifikaciju KIR genotipova / HLA specifičnosti navedenih u odgovarajućim dijagramima za evaluaciju. U svakoj tipizaciji koristi se određen broj **prealiquotiranih** i **osušenih** reakcionih smeša, uključujući internu kontrolu amplifikacije, sa konačnom zapreminom od 10 μ l.

2. Materijal

2.1.1 Sadržaj KIR-TYPE kita

- ◆ KIR-TYPE ploče za KIR tipizaciju. Već razlivene i osušene reakcione smeše sastoje se od alel specifičnih prajmera, prajmera interne kontrole (sekvenca specifična za hromozom 1) i nukleotida. Prvi reakcioni miks je označen i sadrži kontrolu kontaminacije / negativnu kontrolu sa prajmerima interne kontrole i prajmerima specifičnim za amplifikat. Poslednji miks sadrži pozitivnu kontrolu (samo prajmere interne kontrole). Na svakoj ploči je odštampan broj lota.
- ◆ 10 x PCR-pufer
- ◆ 8 strip-kapica
- ◆ Uputstvo za upotrebu, radna lista, tabela specifičnosti

2.1.2 Sadržaj Epitop-TYPE kita

- ◆ Epitop-TYPE stripovi za tipizaciju epitopa. Već razlivene i osušene reakcione smeše sastoje se od alel specifičnih prajmera, prajmera interne kontrole (sekvenca specifična za hromozom 1) i nukleotida. Prvi reakcioni miks je označen (odštampan lot broj). Poslednji miks sadrži kontrolu kontaminacije / negativnu kontrolu.
- ◆ 10 x PCR-pufer
- ◆ 8 strip-kapica
- ◆ Uputstvo za upotrebu, radna lista

2.2 Potrebni uslovi i dodatni materijal

- ◆ Taq polimeraza (5 U/μl), (npr. HISTO TAQ, [REF](#) 70975)
Molimo da NE koristite Hot Start polimerazu!
- ◆ **EXTRA-GENE I** Kit ([REF](#) 7059) (opciono) za ekstrakciju DNK iz krvi /limfocita / leukocita ili materijala pogodnog za druge metode DNK ekstrakcije
- ◆ automatske pipete (0.5-250 μl)
- ◆ steilne nastavke za pipete sa filtrima
- ◆ DNK termosajkler (za spisak validiranih sajklera videti stranu 9)
- ◆ DNK agarozna
- ◆ 0.5 x TBE pufer (45 mM Tris, 45 mM borne kiseline, 0.5 mM EDTA)
- ◆ Etidijum bromid (EtBr)
- ◆ Kadica za elektroforezu
- ◆ DNK standard dužine fragmenata ([REF](#) 7097)
- ◆ napajanje strujom (200 - 300 V, 200 mA)
- ◆ UV lampa (220 - 310 nm)
- ◆ Sistem za dokumentovanje gela

2.3. Čuvanje i stabilnost

Kit se isporučuje bez hlađenja. Nakon prispeća čuvajte na $\leq -20^{\circ}\text{C}$ ili $2...8^{\circ}\text{C}$ u mraku u uređajima sa praćenjem temperature (**Važno je da se izbegne često menjanje temperature čuvanja!**). Rok trajanja je naznačen na nalepnici na svakom reagensu i važi i za otvorene reagense. Rok trajanja naveden na spoljašnjoj nalepnici pakovanja odnosi se na reagens sa najkraćim rokom trajanja od onih koji su sadržani u pakovanju.

3. Podaci o performansi

Sastav mešavine prajmera osigurava pouzdanu identifikaciju KIR genotipova / HLA specifičnosti (na osnovu najskorijih podataka o sekvencama) navedenih u radnoj listi. Ažuriranje se vrši redovno.

Tačnost i reproducibilnost specifičnosti svakog miksa prajmera potvrđene su pomoću DNK iz kontrolnih uzoraka, sa poznatim KIR- / Epitop-specifičnostima. Aleli koji nisu uključeni i zbog svoje retkosti nisu adekvatno testirani naznačeni su u radnoj listi / tabeli specifičnosti.

Performanse kitova KIR-TYPE i Epitop-TYPE ispitane su u studiji koja je obuhvatila najmanje 50 DNK uzoraka. Poređenje rezultata testova sa rezultatima drugih testova tipizacije, urađenih SSP kitovima drugog proizvođača, nije pokazalo neusaglašenosti.

Evaluacija i kontrola kvaliteta reakcionih smeša urađena je pomoću DNK uzoraka ekstrahovanih kitovima EXTRA GENE I (metod izoliranja) ili Qiagen kitovima (metod separacije na kolonicama). KIR-TYPE i Epitop-TYPE validirani su sa HISTO TAQ (REF 70975) resp. Taq polimerazom od Qiagen-a. Ako se koristi druga Taq polimeraza, korisnik treba da uradi validaciju enzima sa KIR-TYPE / Epitop-TYPE kitom.

Pouzdanost tipiziranja je garantovano za 50 - 80 ng DNK po reakcionom miksu.

4. Test procedura

4.1 Bezbednosni uslovi i posebne napomene

PCR je naročito osetljiv metod koji treba da primenjuju dobro obučene osobe, iskusne u tehnikama molekularne genetike i testovima histokompatibilnosti. Da bi se rizik od pogrešnog tipiziranja smanjio na minimum, naročito u slučaju diskrapanci između serološkog metoda i metoda molekularne genetike, treba pratiti propise za transplantaciju, kao i EFI- / DGI-standarde za transplantaciju.

Da bi se izbegla kontaminacija, a time i lažne reakcije, treba voditi računa o posebnim uslovima bezbednosti:

- ◆ Koristite rukavice tokom rada (ako je moguće bez talka).
- ◆ Za svaki korak pipetiranja uzmite nov nastavak (sa ugrađenim filterom).
- ◆ Koristite odvojene radne prostore za pre-amplifikaciju (DNK izolaciju i pripremanje reagenasa) i post-amplifikaciju (gel elektroforezu, dokumentaciju). Poželjno je koristiti dve odvojene prostorije.
- ◆ Koristite sredstva za rad i druge materijale samo na za to predviđenim mestima i nemojte ih razmenjivati.

4.2 DNK izolacija

EXTRA-GENE I kit je najpogodniji za izolaciju DNK jer se u kratkom roku njime dobija čista DNK iz pune krvi, bez upotrebe toksičnih hemikalija i rastvarača. Za dobijanje DNK zadovoljavajuće čistoće pogodni su i komercijalni metodi koji koriste kolonice ili partikule, kao i drugi metodi opisani u literaturi. Prisustvo heparina može da inhibira PCR [5]. Stoga se za tipizaciju preporučuje korišćenje krvi sa EDTA ili citratom.

DNK treba da ima sledeće indekse čistoće:

- $OD_{260}/OD_{280} = >1.5$ i <2.0 (indikator za kontaminaciju RNK/proteinima)
- $OD_{260}/OD_{230} = >1.8$ (indikator za kontaminaciju solima, ugljenim hidratima ili organskim rastvaračima)

4.3 Amplifikacija

Sve već razlivenne reakcione smeše već sadrže prajmere specifične za alele i kontrole, i nukleotide. Oni se nalaze osušeni u reakcionim posudicama. Parametri amplifikacije su optimizovani za konačnu zapreminu od 10 μ l.

1. Izvadite potrebnu količinu KIR-TYPE ploča / Epitop-TYPE stripova i 10 x PCR-pufera iz pakovanja.
2. Koristeći pipetu, napravite Master-Mix koji se sadrži od 10 x PCR-pufera, DNK rastvora, Taq-polimeraze i destilovane vode i dobro promešajte. KIR-TYPE / Epitop-TYPE kit radi sa istim Master-Miksom kao drugi HISTO TYPE SSP kitovi pa se stoga može kombinovati. Sastav Master Miksa je dat u Tabeli 1.

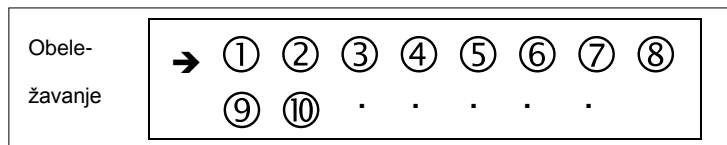
Ako treba da se radi **kontrola kontaminacije**, prvo napravite Master-Mix bez rastvora DNK i pipetirajte 10 µl ovog miksa u kontrolu kontaminacije. Zatim dodajte rastvor DNK i razlijte Master Miks u već razlivenne reakcione smeše.

Tabela 1: Sastav Master-Miksa zavisno od broja reakcionih smeša:

| Broj mikseva | Dest. voda | 10 x PCR pufer | DNK-rastvor (25 - 40 ng/µl) | Taq-polimeraza (5 U/µl) | ukupna zapremina |
|--------------|------------|----------------|-----------------------------|-------------------------|------------------|
| 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 |

- ⇒ Količina DNK treba da je 50 – 80 ng po miksu. Stoga količina DNK i vode treba da varira zavisno od koncentracije DNK. (npr. za 22 miksa: 26 µl DNK rastvora (50 ng/µl) i 206 µl destilovane vode.).
- ⇒ Ako će se koristiti neka druga taq polimeraza, korisnik treba da validira primenu ovog enzima sa KIR-TYPE / EpiTop-TYPE kitom.

3. Nakon vorteksovanja, odmah dodati po **10 µl** ove smeše u unapred razlivenne i osušene reakcione smeše. Nakon svakog koraka pipetiranja promenite nastavak. Čvrsto zatvorite tubice odgovarajućim kapicama. Pazite da ne dotaknete prstima unutrašnju stranu kapica i gornje ivice tubica kako biste izbegli kontaminaciju. Ako koristite sajklere sa poklopcem koji se čvrsto zatvara, moguće je koristiti i PCR pokrivače za višekratnu upotrebu. Lagano protresite ploču na dole da bi se peleti sa dna ploče rastvorili. Svi PCR rastvori treba da padnu na dno ploče.



4. Stavite reakcione tubice u PCR sajklere i zatvorite čvrsto poklopac da se reakcione posudice ne izobliče prilikom zagrevanja. Pokrenite PCR program. **Nije** potrebno pokrivati reakcione smeše mineralnim uljem ako se koristi podešen poklopac koji se greje!

Parametri amplifikacije:

| Programski korak | Temp. | Vreme | Broj ciklusa |
|------------------------|-------|--------------|--------------|
| Prva denaturacija | 94°C | 2 Min | 1 Ciklus |
| Denaturacija | 94°C | 15 Sek | 10 Ciklusa |
| Hibridizacija prajmera | 65°C | 50 Sek | |
| Ekstenzija | 72°C | 45 Sek | |
| Denaturacija | 94°C | 15 Sek | 20 Ciklusa |
| Hibridizacija prajmera | 61°C | 50 Sek | |
| Ekstenzija | 72°C | 30 Sek | |

Validirani tipovi sajklera

PTC 200 / C1000
(MJ Research/ BioRad),

GeneAmp PCR-System 9700 (molimo da koristite brzinu zagrevanja 9600) (ABI),

Mastercycler epGradient S (molimo da koristite funkciju "simulate Mastercycler gradient") (Eppendorf)

Tprofessional (Biometra)

Molimo da ne koristite aluminijumski grejni blok (npr. GeneAmp PCR-System 9700).

Kada koristite termosajklere sa jako velikom brzinom hlađenja i zagrevanja, preporučujemo da koristite opciju sporijeg hlađenja i zagrevanja (~2.5°C/sek).

Budući da sajklari različitih proizvođača imaju različite performanse, pa čak i pojedine mašine istog tipa mogu biti različito kalibrirane, možda će biti neophodno da se parametri amplifikacije optimizuju.

Da biste optimizovali svoju mašinu, koristite sledeće preporuke:

U slučaju **lažno pozitivnih** reakcija (nespecifičnih traka, dodatnih tipova): Povećavati temperaturu hibridizacije prajmera postepeno za po 1°C.

U slučaju **lažno negativnih** reakcija (trake nedostaju): Smanjivati temperaturu hibridizacije prajmera postepeno za po 1°C i/ili povećavati periode hibridizacije postepeno za po 5 sekundi i/ili povećavati vreme denaturacije za po 5 sekundi.

Preporučuje se upotreba samo redovno kalibriranih sajklara. Za ovo je veoma pogodan CYCLER CHECK kit (REF 7104).

Testovi kontrole kvaliteta rađeni su na PTC-200 i C1000 (MJ Research / BioRad), 9700 (ABI), Mastercycler epGradient S (Eppendorf) i Tprofessional (Biometra).

4.4 Gel elektroforeza

Razdvajanje produkata amplifikacije radi se gel elektroforezom na (horizontalnom) agaroznom gelu. Kao pufer za elektroforezu preporučuje se 0.5 x TBE (45 mM tris, 45 mM borne kiseline, 0.5 mM EDTA) pufer. Koncentracija agaroze u gelu treba da je 2.0 - 2.5%. Pustite da gel polimerizuje bar 30 sekundi pre nanošenja uzoraka. Nakon što se amplifikacija završi, izvadite uzorke iz termosajklara i pažljivo unesite kompletne reakcione smeše u svaku rupicu u gelu. Dodatno nanesite 10 µl standarda DNK dužine da bi bilo moguće uporediti veličinu fragmenata. Elektroforetska separacija se radi na 10 - 12 V/cm (sa 20 cm udaljenosti između elektroda približno 200 - 240 V), tokom 20 - 40 minuta. Nakon što je razdvajanje završeno, ceo gel se boji 30 - 40 minuta u rastvoru etidijum bromida (EtBr) (približno 0.5 µg/ml EtBr u H₂O ili TBE puferu). Kao alternativa, EtBr (0.5 µg/ml) se može dodati i u pufer za elektroforezu ili u agarozni gel. Ako je potrebno, višak EtBr može se ukloniti potapanjem gela u H₂O ili 0.5 x TBE puferu 20 - 30 minuta.

4.5 Dokumentacija i interpretacija

Za dokumentovanje, vizualizujte PCR amplifikaciju koristeći UV transiluminator (220 - 310 nm) i adekvatan gel-dokumentacioni sistem. Birajte vreme ekspozicije i otvor blende tako da se trake oštro vide i ističu naspram tamne pozadine (približan otvor blende 11, vreme ekspozicije 1 sekund).

Pozitivnima treba smatrati samo trake sa ispravnom veličinom u poređenju sa standardom DNK dužine. Ispravne dužine su date u radnim listama. U svim putanjama u kojima nema alel-specifične amplifikacije, trebalo bi da je jasno vidljiva **659 bp** interna kontrola. U većini slučajeva gde postoji alel specifična amplifikacija, interna kontrola je slabija ili sasvim nestaje! Za pogrešne rezultate videti rešavanje poteškoća (6.).

U **kontroli kontaminacije** ne treba da bude vidljivih traka. Ako je prisutna kontaminacija genomskom DNK pojaviće se traka na 282 bp. Dodatno se mogu pojaviti trake na 78 bp, 104 bp, 176 bp i oko 580 bp. Ako je prisutna kontaminacija amplikonom, pojaviće se traka na 78 bp i/ili 104 bp i/ili 176 bp i/ili 282 bp i/ili 580 bp.

5. Upozorenja i mere predostrožnosti

Etidijum bromid je moćan mutagen. Kada radite sa gelom ili rastvorima koji sadrže EtBr koristite rukavice! Sledite uputstva za upotrebu i upozorenja i mere predostrožnosti proizvođača!

Transiluminator emituje UV zrake veoma kratke talasne dužine koji mogu dovesti do opekotina na koži i oštećenja retine. Koristite masku za lice za zaštitu od UV!

Sav biološki materijal, npr. krv ili ljudsko tkivo, korišćen za izolaciju DNK, treba da se smatra potencijalno infektivnim. U radu sa biološkim materijalom preporučuju se adekvatne mere predostrožnosti (ne pipetirati ustima; nositi rukavice za jednokratnu upotrebu u toku rada sa biološkim materijalom i izvođenja testa; dezinfikovati ruke nakon završetka testa). Pre uklanjanja biološki materijal treba inaktivirati (npr. u autoklavu). Materijal za jednokratnu upotrebu treba autoklavirati ili spaliti. Prosut potencijalno infektivan materijal treba odmah obrisati papirnim ubrusom i kontaminiranu površinu prebrisati pogodnim standardnim dezinficijensom ili 70%

alkoholom. Materijal korišćen za uklanjanje prosutog sadržaja, uključujući i rukavice, treba inaktivirati pre bacanja (npr. u autoklavu).

Uklanjanje svih uzoraka, nekorišćenih reagenasa i otpada treba obavljati u skladu sa državnim i lokalnim propisima.

Podaci o bezbednosti materijala - Material Safety Data Sheets (MSDS) mogu se videti na www.bag-healthcare.com.

6. Uklanjanje poteškoća u radu

| Problem | Moguć uzrok | Rešenje |
|--|---|---|
| nema amplifikacije, standard dužine fragmenta vidljiv | DNK kontaminirana PCR inhibitorima | ponovite izolaciju DNK, probajte drugi metod |
| | DNK koncentracija previše visoka ili niska | promenite koncentraciju DNK, ponovite izolaciju |
| | enzim nije dodat ili je koncentracija preniska | ponovite tipizaciju, promenite koncentraciju enzima |
| | DNK iz krvi sa heparinom | ponovite tipizaciju koristeći krv sa EDTA |
| | pogrešni parametri amplifikacije | optimizujte parametre amplifikacije (videti 4.3) ☆ |
| višestruka neuspešna amplifikacija u istoj putanji (nema kontrole amplifikacije) | curenje reakcionih tubica, gubitak vode i promenjena koncentracija u toku PCR | čvrsto zatvorite tubice kapicama, koristite druge tubice |
| nespecifična amplifikacija, dodatne trake (dodatne trake neodgovarajuće veličine treba zanemariti) | kontaminacija amplikonom | ponoviti tipizaciju, paziti da se precizno radi |
| | DNK kontaminirana solima | ponovite izolaciju DNK, probajte drugi metod |
| | DNK koncentracija previsoka | koristite manje DNK |
| | previsoka koncentracija enzima | koristite manje enzima |
| | pogrešni parametri amplifikacije | optimizujte parametre amplifikacije (videti 4.3) ☆ |
| evaluacija pokazuje više od 2 specifičnosti | kontaminacija prenosom (proizvodi amplifikacije!), nov alel | proverite smeše za tipizaciju (bez dodate DNK), pazite da se radi precizno |
| nema vidljivih traka ili su jako slabe, nevidljiv standard dužine | EtBr bojenje previše slabo | ponoviti bojenje |
| pozadina na gelu isuviše svetla | predugo bojenje, previsoka koncentracija EtBr | potopite gel u H ₂ O ili TBE, smanjite koncentraciju EtBr |
| zamagljene trake | pufer za elektroforezu previše vruć ili previše korišćen, pogrešan pufer za elektroforezu, ili polimerizacija gela nije dobra | smanjite voltažu, koristite 0.5x TBE pufer, koristite gel koji je potpuno polimerizovao |





☆ Kada se koriste navedena oprema i materijal, optimizaciji parametara amplifikacije treba pribeći samo u krajnjem slučaju. U većini slučajeva moguće je evaluirati test jednostavno eliminisanjem dodatnih traka prouzrokovanih neslaganjem veličine.

7. Reference

- 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 klase 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.

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.
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. Objašnjenja simbola na nalepnicama

| | |
|---|--|
|  | Temperatura čuvanja |
|  | Koristiti do |
|  | Videti uputstvo za upotrebu |
|  | Dovoljno za n testova |
| CONT | Sadrži, sadržaj |
| CONTROL CC | Kontrola kontaminacije |
| KIR TYPING | Namenjena primena: Određivanje KIR (Killer-cell Immunoglobulin-like Receptors)-Genotipova |
| KIR HLA-LIGAND TYPING | Namenjena primena: Određivanje KIR (Killer-cell Immunoglobulin-like Receptors)-HLA-Liganda |
| IFU | Uputstvo za upotrebu |
| IVD | Za primenu u in vitro dijagnostici |
| LOT | Lot broj |
| OR | Ili |
| PCRBUF 10x | PCR pufer, 10x koncentrovan |
| PCRCAP | PCR kapice |
| PCRPLATE | PCR ploče |
| PCRSTRIP | PCR stripovi |
| REACTIONMIX | Reakcione smeše |
| REF | Kataloški broj |
| RTU | Spremno za upotrebu |
| WORKSHEET | Radna lista |

Uputstva za upotrebu na drugim jezicima možete videti na:

<http://www.bag-healthcare.com>

<http://service.bag-healthcare.com>

ili telefonom: +49 (0)6404-925-125



BAG Health Care GmbH

Amtsgerichtsstraße 1-5
35423 Lich/Germany

Tel.: +49 (0) 6404 / 925-0

Fax: +49 (0) 6404 / 925-250

www.bag-healthcare.com

info@bag-healthcare.com

Distributer za Srbiju: Yunycom d.o.o.

Resavska 78b, 11000 Beograd

Tel/Fax: 011/3606-987

office@yunycom.rs

Korisnička podrška:

Tel.: +49 (0) 6404 / 925-125

Fax: +49 (0) 6404 / 925-421

service@bag-healthcare.com