

## LinkSēq™ HLA-B\*57:01 Typisierungskit Kurzprotokoll

**REF** 8020C-SL, 8020C-SR

### Kit-Komponenten (gelagert bei $-35$ bis $-15$ °C)

- 12 Streifen mit getrockneten Reagenzien – BLAUE-Kappen/ **BLAUE-Indikatorlinie**
- 2 Fläschchen mit LS-Puffer
- 1 Fläschchen mit DNA-Polymerase

Well-ID	Probenbezeichnung
A	Probe 1
B	Probe 1
C	Probe 2
D	Probe 2
E	Probe 3
F	Probe 3
G	Leer
H	NTC
—	Anzeigelinie

#### Hinweise:

1. **Minimieren Sie die Zeit zwischen Probenzugabe und Beginn des Thermocycling.**
2. **Die Pipettenspitze darf nicht mit dem Boden des Wells in Berührung kommen.**
3. **Übertragen Sie jede zusätzliche Probenmischung von der Spitze zurück in das Röhrchen, um den Vorrat zu schonen (einige Wiederholungspipetten haben große Totvolumina).**
4. **Stellen Sie sicher, dass der Streifen vollständig versiegelt ist. Jegliche Undichtigkeiten können während der Amplifizierung eine Verdampfung verursachen.**
5. **Verwenden Sie Wasser in Molekularbiologie-Qualität.**

### Probenzubereitungsprotokoll

1. Entnehmen Sie die folgenden Reagenzien aus dem Gefrierschrank:
  - a. LS-Puffer, DNA-Polymerase und LinkSēq Streifenröhrchen.
  - b. Nach dem Auftauen LS-Puffer und DNA-Polymerase gekühlt halten.
  - c. Stellen Sie sicher, dass sich der Inhalt vor dem Öffnen am Boden der Röhrchen befindet.

- d. Nachdem die Streifen auf Raumtemperatur äquilibriert wurden, zentrifugieren Sie sie 30–60 Sekunden lang bei 500–2.000 G.
2. Verfolgen Sie die Proben- und Streifenidentifikation auf dem mitgelieferten Streifen-Referenzbogen zur Eingabe in SureTyper™.
  - a. Wenn Sie mit mehr als einem Testtyp auf Streifenröhrchen arbeiten, schreiben Sie den Testnamen auf die obere Lasche des Streifens, nachdem die Aufbewahrungskappen (durch Farbe oder farbige Indikatorlinie angezeigt) entfernt wurden.
  - b. Schreiben Sie die Spaltennummer, in der die Streifen in die Real-Time-Maschine eingelegt werden, auf die untere Lasche des Streifens, nachdem die Aufbewahrungskappen entfernt wurden.

**Hinweis:** Die blaue Anzeigelinie gibt die Position des NTC-Wells an.

3. Bereiten Sie die Probe im LS-Pufferfläschchen vor:
  - a. Geben Sie **12 µl** DNA-Polymerase in das LS-Pufferfläschchen.
  - b. Verschließen Sie das Fläschchen und mischen Sie die Reagenzien, indem Sie das Fläschchen 10 Mal umdrehen oder durch 5-sekündiges Impulsmischen im Vortexmischer.

**Hinweis:** Die Menge des Reagenzes ist ausreichend für 6 Streifen. Lagern Sie das LS-Pufferröhrchen mit DNA-Polymerase bei 2-8 °C. Verwenden Sie die Reagenzien innerhalb von 3 Monaten.

4. Entfernen Sie die Aufbewahrungskappen und Beschriftungsstreifen ordnungsgemäß.
5. Geben Sie 5 µl des LS-Puffers (mit DNA-Polymerase) in jeden verwendeten Well.
6. Geben Sie 5 µl molekularbiologisches Wasser in die No Template Control (NTC) in Well H.
7. Geben Sie 5 µl DNA und Wasser molekularbiologischer Qualität in jeden verwendeten Test-Well, außer dem NTC-Well.

(Gesamt-DNA zwischen 8 ng und 100 ng in jedem Test-Well)

- a. Wenn die DNA-Konzentration zwischen 1,6 ng/µl und 20 ng/µl liegt, 5µl DNA-Lösung in jeden Well geben.
- b. Wenn die DNA-Konzentration zwischen 4 ng/µl und 50 ng/µl liegt, geben Sie 2 µl Probe und 3 µl Wasser molekularbiologischer Qualität in jeden Well.
- c. Wenn die DNA-Konzentration weniger als 1,6 ng/µl beträgt, ist die DNA-Konzentration vor der Durchführung des Tests zu erhöhen.
8. Versiegeln Sie die Streifen mit den mitgelieferten Kappen für PCR Optical Streifen.
9. Die Streifen-Wells so drehen, dass sich alle Reagenzien am Boden der Wells befinden, und sofort mit Schritt 10 beginnen.

10. Setzen Sie den/die Streifen in den Thermocycler oder das Real-Time-PCR-Instrument. Wenn Sie einen Thermocycler verwenden, befolgen Sie die vom Hersteller bereitgestellten Anweisungen. Beginnen Sie mit der Amplifikation.

**Vorsicht:** Wenn Sie die Streifen in das Real-Time-PCR-Instrument einsetzen, achten Sie darauf, dass sie an den auf dem Platten-Plan angegebenen Spalten-Loci in Schritt 2 oben platziert werden. Die Spalteninformationen sind für die spätere Datenanalyse von Bedeutung.

11. Wenn die Amplifikation auf einem Thermocycler durchgeführt wird, entfernen Sie das Tray zu einem beliebigen Zeitpunkt während des 4 °C-Halteschritts und dissoziieren Sie es auf dem Real-Time-PCR-Instrument.
12. Nachdem die Amplifikation und Dissoziation abgeschlossen sind, exportieren Sie die Daten aus dem Real-Time-PCR-Instrument entsprechend den Anweisungen im SureTyper™ Handbuch.

