

## Kratki protokol kompleta za tipizaciju LinkSēq™ HLA-B\*57:01

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

### Komponente kompleta (pohranjene na $-35$ do $-15$ °C)

- 12 traka koje sadrže suhe reagense – PLAVI poklopci/ **PLAVA** indikatorska linija
- 2 bočice s LS puferom
- 1 bočica s DNA polimerazom

ID jažice	Oznaka uzorka
A	Uzorak 1
B	Uzorak 1
C	Uzorak 2
D	Uzorak 2
E	Uzorak 3
F	Uzorak 3
G	Prazno
H	NTC
—	Linija indikatora

#### NAPOMENE:

1. **Svedite na minimum vrijeme između dodavanja uzorka i početka termalnog cikliranja.**
2. **Pazite da vršak pipete ne dođe u dodir s dnom jažice.**
3. **Svaki višak mješavine uzorka iz vrška pipete vratite u epruvetu kako bi se sačuvao (neki pipetori imaju veliki volumen mrtvog prostora).**
4. **Provjerite je li traka potpuno zapečaćena folijom. Svaki otvor na trakama može prouzročiti evaporaciju tijekom procesa amplifikacije**
5. **Koristite vodu molekularnobiološkog stupnja čistoće.**

### Protokol pripreme uzroka

1. Iz zamrzivača izvadite sljedeće reagense:
  - a. LS pufer, DNA polimeraza i epruvete u trakama LinkSēq.
  - b. Nakon što se otope LS pufer i DNA polimerazu držite na hladnom.
  - c. Prije nego otvorite epruvete provjerite da im se sadržaj nalazi na njihovom dnu.

- d. Nakon što su trake dostigle sobnu temperaturu, zavrtite ih na 500-2000 G tijekom 30-60 sekundi.
2. Zabilježiti oznaku uzorka i traka na za to priloženi Referentni list traka radi unosa u SureTyper™.
  - a. Ako radite s više od jedne vrste testa na epruvetama u trakama napišite naziv testa na gornjoj kartici trake nakon što se poklopci za pohranu (označeni bojom ili indikatorskom linijom u boji) uklone.
  - b. Napišite broj stupca u koji će se trake postaviti u stroj u realnom vremenu na donjoj kartici trake nakon uklanjanja poklopaca za pohranu.

**Napomena:** plava linija indikatora pokazuje položaj jažice za NTC.

3. Pripremite uzorak u bočici LS pufera:
  - a. Dodajte **12 µl** DNA polimeraze u bočicu s LS puferom.
  - b. Zatvorite poklopac bočice i promiješajte reagense okretanjem epruvete 10 puta ili pulsnim vrtloženjem u trajanju od 5 sekundi.

**Napomena:** Količina reagensa dovoljna je za 6 traka. Čuvajte bočicu LS pufera s DNA polimerazom pri 2-8°C. Koristite reagense unutar 3 mjeseca.

4. Uklonite poklopce za pohranu i označite trake na odgovarajući način.
5. Dodajte 5 µl LS pufera (koji sadrži DNA polimerazu) svakoj jažici u uporabi.
6. Dodajte 5 µl vode molekularnobiološkog stupnja čistoće kontrolnoj probi No Template Control (NTC) u jažici H.
7. Dodajte 5 µl DNA i vode molekularnobiološkog stupnja čistoće u svaku jažicu testa u uporabi koja nije jažica za kontrolnu probu NTC.

(Ukupno između 8 ng i 100 ng DNA u svaku jažicu testa)

  - a. Ako je koncentracija DNA između 1,6 ng/µl i 20 ng/µl, dodajte 5 µl otopine DNA u svaku jažicu.
  - b. Ako je koncentracija DNA između 4 ng/µl i 50 ng/µl, dodajte 2 µl uzorka i 3 µl vode molekularnobiološkog stupnja čistoće u svaku jažicu.
  - c. Ako je koncentracija DNA manja od 1,6 ng/µl, povećajte koncentraciju DNA prije obavljanja testa.

8. Trake zapečatite s dostavljenim poklopcima za PCR optičke trake.
9. Zavrtite jažice traka tako da svi reagensi budu na dnu jažica i odmah započnite korak 10.
10. Postavite traku(e) u uređaj za termalnu ciklaciju ili PCR u realnom vremenu. Koristite li termalni ciklator slijedite upute dobivene od proizvođača. Započnite s postupkom amplifikacije.

**Oprez:** Prilikom stavljanja traka u uređaj za PCR u realnom vremenu, obavezno ih postavite u stupac(e) naznačen(e) na referentnom listu ploče u gore navedenom koraku 2. Informacije stupca bit će važne za kasnije analize podataka.

11. Ako se amplifikacija provodi u termalnom ciklatoru, uklonite pliticu bilo kada tijekom zaustavljanja na temperaturi od 4°C i provedite postupak disocijacije u uređaju za PCR u realnom vremenu.
12. Nakon dovršetka postupka amplifikacije i disocijacije, eksportirajte podatke iz uređaja za PCR u realnom vremenu prema uputama navedenima u priručniku za SureTyper™.

