

GR

# HLA SSP Kits

Έτοιμο για χρήση σετ αντιδραστηρίων Εκκινητών Ειδικής Αλληλουχίας (SSP) για την HLA τυποποίηση βασισμένη στο DNA

IVD

Για In Vitro Διαγνωστική Χρήση

HLA-A SSP	REF	826 201	€ 0197
HLA-B SSP	REF	826 206	€ 0197
HLA-C SSP	REF	826 212	€
DRB SSP	REF	826 215	€ 0197
DQB SSP	REF	826 220	€
ABDR SSPtray	REF	826 230	€ 0197
ABC SSPtray	REF	826 240	€ 0197

**Besondere Hinweise für den Anwender / Special remarks for the user /  
Remarques importantes pour l'utilisateur / Precauzioni particolari per  
l'utilizzo/ Ειδικές σημειώσεις για το χρήστη:**

**SSP ΣΕΤ ΔΟΚΙΜΑΣΙΩΝ ΜΕ ΤΑQ-ΠΟΛΥΜΕΡΑΣΗ: ΠΕΡΙΟΡΙΣΜΕΝΗ ΑΔΕΙΑ**

Η τιμή αγοράς του προϊόντος αυτού, περιλαμβάνει περιορισμένα, μη-μεταφερόμενα δικαιώματα σύμφωνα με τις U.S πατέντες 4,683,202, 4,683,195 και 4,965,188 και τις ξένες ισοδύναμες τους, που ανήκουν στην Roche Molecular Systems, Inc. και F. Hoffmann-La Roche Ltd. ("Roche"), για την χρήση μέρους του προϊόντος αυτού για την διεξαγωγή της Αλυσιδωτής Αντίδρασης Πολυμεράσης ("PCR"). Η διαδικασία που περιγράφεται στις κατονομασμένες πατέντες αφορά τις εφαρμογές της HLA τυποποίησης του αγοραστή αποκλειστικά για την μεταμόσχευση οργάνων ή ιστών ή μυελού των οστών, και σαφώς εξαιρεί την ανάλυση για ιατροδικαστικούς σκοπούς ή τον προσδιορισμό καταγωγής. Επίσης με το παρόν έχει χορηγηθεί το δικαίωμα χρήσης αυτού του προϊόντος για να διεξάγει και να προσφέρει εμπορικές υπηρεσίες για την τυποποίηση HLA για μεταμόσχευση οργάνων ή ιστών με την χρήση PCR, συμπεριλαμβανομένης της αναφοράς των αποτελεσμάτων των δραστηριοτήτων του αγοραστή για αμοιβή ή άλλη εμπορική εφαρμογή. Περισσότερες πληροφορίες για αγορά αδειών για την εφαρμογή της PCR μπορούν να ληφθούν με επαφή, στις Ηνωμένες Πολιτείες με τον Διευθυντή Παροχής αδειών της Roche Molecular Systems, Inc. 1145 Atlantic Avenue, Alameda, California 94501, και εκτός Ηνωμένων Πολιτειών με τον Διευθυντή Παροχής αδειών της PCR, F. Hoffmann-La Roche td, Grenzacherstr. 124, CH-4070 Basel, Switzerland.

**SSP ΣΕΤ ΔΟΚΙΜΑΣΙΩΝ ΧΩΡΙΣ ΤΑQ-ΠΟΛΥΜΕΡΑΣΗ- ΑΠΟΠΟΙΗΣΗ ΔΙΚΑΙΩΜΑΤΟΣ ΑΔΕΙΑΣ**

Το προϊόν αυτό είναι βελτιστοποιημένο για την χρήση στην Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης ("PCR"). Η διαδικασία καλύπτεται από τις πατέντες της Roche Molecular Systems, Inc. and F. Hoffmann-La Roche Ltd ("Roche"). Δεν παρέχεται άμεσα ούτε υπονοείται ότι παρέχεται άδεια στον αγοραστή με την αγορά αυτού του προϊόντος για την διαδικασία PCR σύμφωνα με αυτές τις πατέντες . Περισσότερες πληροφορίες ή άδειες αγοράς για την εφαρμογή της PCR μπορούν να ληφθούν με επαφή, στις Ηνωμένες Πολιτείες με τον Διευθυντή Παροχής αδειών της Roche Molecular Systems, Inc. 1145 Atlantic Avenue, Alameda, California 94501, και εκτός Ηνωμένων Πολιτειών με τον Διευθυντή Παροχής αδειών της PCR, F. Hoffmann-La Roche td, Grenzacherstr. 124, CH-4070 Basel, Switzerland.

<b>BLOCK</b>	Μπλοκ PCR	<b>NC</b>	Αρνητικός μάρτυρας	<b>CK</b>	PCR κοκτέιλ
--------------	-----------	-----------	--------------------	-----------	-------------



189738/07 – 04/2016

## ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

<b>1. Εισαγωγή</b> .....	4
1.1 Συνιστώμενη χρήση .....	4
1.2 Περίληψη και Επεξήγηση .....	4
1.3 Αρχή της δοκιμής .....	4
<b>2. Αντιδραστήρια</b> .....	4
2.1 Περιεχόμενο του HLA SSP Kit .....	4
2.2 Προειδοποιήσεις και Προφυλάξεις .....	5
2.3 Αποθήκευση και Διάρκεια Ζωής.....	5
2.4 Ενδείξεις Αποσταθεροποίησης ή φθοράς.....	5
<b>3. Απαιτούμενα Όργανα</b> .....	5
3.1 Προγραμματισμός του Θερμοκυκλοποιητή.....	5
3.2 Ηλεκτροφόρηση Γέλης.....	6
<b>4. Συλλογή και προετοιμασία δείγματος</b> .....	6
4.1 Απομόνωση του DNA .....	6
4.2 Συλλογή και Προετοιμασία του Δείγματος .....	6
<b>5. Διαδικασία</b> .....	7
5.1 Παρεχόμενα Υλικά .....	7
5.2 Επιπρόσθετα Απαιτούμενα Υλικά .....	7
5.3 PCR .....	7
5.4 Ηλεκτροφόρηση Γέλης .....	8
<b>6. Αποτελέσματα</b> .....	9
6.1 Αξιολόγηση .....	9
6.2 Περιορισμοί της Διαδικασίας .....	9
6.3 Έλεγχος Ποιότητας .....	10
6.4 Ειδικά Χαρακτηριστικά Απόδοσης .....	10
<b>7. Εντοπισμός και Διόρθωση Σφαλμάτων</b> .....	11
<b>8. Βιβλιογραφικές Αναφορές</b> .....	12



## 1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

### 1.1 Συνιστώμενη Χρήση

Τα Ειδικά Ανιχνευτές Αλληλουχίας HLA (SSP) σετ προορίζονται για τον προσδιορισμό των HLA αλληλίων Τάξης I ή Τάξης II.

### 1.2 Περίληψη και Επεξήγηση

Το σύστημα HLA είναι ένα πολύπλοκο, κατά τον επικρατούντα τρόπο κληρονομούμενο σύστημα αντιγόνων, τα οποία παίζουν σημαντικό ρόλο στο ανοσιακό σύστημα καθιστώντας το ικανό να ξεχωρίζει το «ίδιο» από το «ξένο». Στη μεταμόσχευση οργάνων, η συμβατότητα HLA μεταξύ του δότη και του λήπτη είναι ένας από τους κύριους καθοριστικούς παράγοντες της έκβασης της μεταμόσχευσης. Για αυτό το λόγο, ο προσδιορισμός των ξεχωριστών συνδυασμών των HLA αντιγόνων, χρησιμοποιείται σαν βάση για την επιλογή των δοτών και των ληπτών.

Με την ανάπτυξη των δοκιμών που βασίζονται στις μεθόδους DNA, έχουν ανοίξει νέοι ορίζοντες στην μοντέρνα διαγνωστική. Τα HLA αντιγόνα διαφέρουν το ένα από το άλλο στις πολυπεπτιδικές τους αλυσίδες μόνο σε μεμονωμένα αμινοξέα. Η αναγνώριση αυτών των ταυτόσημων σε μεγάλο βαθμό δομών είναι σχεδόν αδύνατη ορολογικά για αυτό το λόγο, η ευκρίνεια της μεθόδου είναι περιορισμένη. Εφόσον οι DNA αλληλουχίες των πιο σημαντικών HLA αλληλίων είναι πλέον γνωστές, παραλλαγές στις αλληλουχίες μπορούν να αναγνωριστούν στο επίπεδο του DNA με την βοήθεια των συνθετικών ολιγονουκλεοτιδίων. Χρησιμοποιώντας την ενίσχυση του γενομικού DNA (PCR, Polymerase Chain Reaction, Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης) μαζί με ζεύγη ειδικών εκκινητών (SSP, Sequence Specific Primers Ειδικών για την αλληλουχία Εκκινητών), είναι δυνατό να ταυτοποιηθεί ένας μεγάλος αριθμός των HLA αλληλίων με τριτοβάθμιες μεθόδους δοκιμής.

### 1.3 Αρχή της Δοκιμής

Τα HLA SSP Kits είναι συστήματα δοκιμής για την τυποποίηση των χαρακτηριστικών του HLA με την χρήση της τεχνικής PCR. Για την τυποποίηση, η SSP μέθοδος χρησιμοποιεί εκκινητές ειδικούς για τα αλληλία στην αντίδραση ενίσχυσης. Η μέθοδος βασίζεται στην αρχή ότι μόνο εκκινητές των οποίων οι αλληλουχίες είναι απόλυτα συμπληρωματικές με αυτές της αλληλουχίας του στόχου του δείγματος DNA θα συνδεθούν με αυτό το DNA και θα παράγουν ένα ενισχυμένο προϊόν στην αντίδραση PCR. Από την άλλη πλευρά οι μη συμπληρωματικοί εκκινητές, δεν θα συνδεθούν με το DNA και δεν θα γίνει ενίσχυση.

Το ενισχυμένο DNA προσδιορίζεται με την χρήση ηλεκτροφόρησης γέλης αгарόζης. Η επιτυχημένη ενίσχυση θα παράγει ένα θραύσμα DNA συγκεκριμένου μήκους, το οποίο εμφανίζεται σαν ζώνη (band) στην γέλη. Αν δεν συμβεί ενίσχυση, τότε αυτή η ζώνη δεν υπάρχει.

Η σύνθεση των εκκινητών επιτρέπει την θετική αναγνώριση των χαρακτηριστικών του HLA. Το πεδίο εφαρμογής για αυτό το σύστημα ανίχνευσης είναι ο προσδιορισμός των ξεχωριστών HLA αλληλίων στους δότες οργάνων και στους λήπτες και στους ασθενείς που λαμβάνουν μεταγγίσεις αίματος ή υποβάλλονται σε θεραπεία με υποκατάστατα αίματος.

## 2. ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ

### 2.1 Περιεχόμενα των HLA SSP Kits

Τα περιεχόμενα των HLA SSP Kits είναι επαρκή για 24 δοκιμές.

- 24 μπλοκ-PCR [BLOCK] αντίστοιχα, καθένα αποτελείται από PCR σωληνάρια σε μπλοκ που περιέχουν ένα μίγμα ανιχνευτή/νουκλεοτιδίου σε ξηρή μορφή. Για βοήθεια στην αναγνώριση, έχει τοποθετηθεί στην θέση 1 (=H1) ένα μαύρο σημάδι.
- Κοκτέιλ PCR [CK] (έτοιμο για χρήση)  
Το κοκτέιλ περιέχει ρυθμιστικό διάλυμα- PCR (τελική συγκέντρωση: 1.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 50 mM KCl, 10 mM Tris-HCl, 0.001% ζελατίνη), γλυκερόλη και ερυθρό της κρεσόλης.
- καλύμματα των λωρίδων (strips) PCR ή PCR αεροστεγή καλύμματα.
- Φύλλα εργασίας, χάρτης σχήματος αντιδράσεων, φύλλο της θέσης των εκκινητών

Ο αρνητικός μάρτυρας [NC] είναι συσκευασμένος χωριστά όπως και επιπρόσθετα σωληνάρια PCR (άχρωμα), αν δεν περιλαμβάνονται στο μπλοκ PCR [BLOCK].

## 2.2 Προειδοποιήσεις και Προφυλάξεις

Για In Vitro Διαγνωστική Χρήση **IVD**

**Προσοχή:** Η δοκιμή θα πρέπει να διεξάγεται από καλά εκπαιδευμένους και εξουσιοδοτημένους τεχνολόγους εργαστηρίων.

**Προσοχή:** Θα πρέπει να γίνεται χειρισμός όλων των αντιδραστηρίων σύμφωνα με τους κανόνες της ορθής εργαστηριακής πρακτικής. Επιπρόσθετα χειριστείτε όλα τα δείγματα ασθενών σαν δυνητικά μολυσματικά. Μην πιπετάρτε με το στόμα..

**Προσοχή:** Μην χρησιμοποιείτε αντιδραστήρια μετά την ημερομηνία λήξης που φαίνεται στην ετικέτα.

**Προσοχή:** Μην χρησιμοποιείτε αντιδραστήρια με οποιαδήποτε ένδειξη θολερότητας ή μικροβιακής επιμόλυνσης.

**Προσοχή:** Πιπέττες που χρησιμοποιήθηκαν στους **Μετά**-PCR χειρισμούς **δεν** πρέπει να χρησιμοποιούνται στους **Προ**-PCR χειρισμούς.

**Προσοχή:** Προειδοποίηση Βιοκινδύνου: Το βρωμίδιο του αιθιδίου που χρησιμοποιείται για τη βαφή του DNA είναι δυνητικά καρκινογόνο. Φοράτε πάντα προστατευτικά γάντια όταν χειρίζεστε τα βαμμένα τζελ. Διαχείριση απορριμάτων με καύση.

**Προσοχή:** Προειδοποίηση Βιοκινδύνου: Όλα τα προϊόντα αίματος θα πρέπει να τα μεταχειρίζονται σαν δυνητικά μολυσματικά.

**Προσοχή:** Όλα τα PCR μπλοκ θα πρέπει να μεταχειρίζονται σαν δυνητικά μολυσματικά και πρέπει να καταστρέφονται σύμφωνα με τις ισχύουσες εθνικές οδηγίες.

**Προσοχή:** Φοράτε προστατευτικά των ματιών από την UV- ακτινοβολία , και μην κοιτάτε την πηγή της UV- ακτινοβολίας απευθείας όταν βλέπετε ή φωτογραφίζετε τα τζελ.

Για λεπτομερή ενημέρωση βλέπε τα Φύλλα Δεδομένων Ασφάλειας Υλικών.

## 2.3 Αποθήκευση και Διάρκεια Ζωής

Τα αντιδραστήρια SSP πρέπει να αποθηκεύονται στους 2...8 °C. Η ημερομηνία λήξης είναι τυπωμένη στην συσκευασία των συστατικών του κιτ. Τα μπλοκ PCR είναι κλεισμένα αεροστεγώς σε θήκες.

## 2.4 Ενδείξεις Αποσταθεροποίησης και Φθοράς

Όταν οι θήκες ανοιχτούν, τα εναπομείναντα μη χρησιμοποιημένα μπλοκ PCR θα πρέπει να φυλάγονται στις αυθεντικές τους θήκες, και να σφραγίζονται πάλι με κολλητική ταινία, για να προστατευθούν από την υγρασία. Τα ανοιγμένα μπλοκ PCR θα πρέπει να χρησιμοποιούνται μέσα σε 4 εβδομάδες.

## 3. Απαιτήσεις Οργάνων

### 3.1 Προγραμματισμός του Θερμοκυκλοποιητή

HLA SSP πρόγραμμα:

Αρχική Αποδιάταξη:	<b>94°C</b>	<b>2 λεπτά.</b>		
Αποδιάταξη :	<b>94°C</b>	<b>10 δευτερόλεπτα.</b>	]	<b>10 κύκλοι</b>
Πρόσδεση και Επέκταση:	<b>65°C</b>	<b>60 δευτερόλεπτα.</b>		
Αποδιάταξη:	<b>94°C</b>	<b>10 δευτερόλεπτα.</b>	]	<b>20 κύκλοι</b>
Πρόσδεση:	<b>61°C</b>	<b>50 δευτερόλεπτα.</b>		
Επέκταση:	<b>72°C</b>	<b>30 δευτερόλεπτα.</b>		

Το πρόγραμμα PCR που φαίνεται παρακάτω είναι προσαρμοσμένο στους θερμοκυκλοποιητές της Perkin-Elmer. Ο ρυθμός θέρμανσης/ψύξης του PE 9700 είναι 1°C/δευτερόλεπτο κατά μέσο όρο για το δείγμα και η

ακρίβεια της θερμοκρασίας είναι  $\pm 0.25^{\circ}\text{C}$  για το εύρος  $35-100^{\circ}\text{C}$ . Άλλοι θερμοκυκλοποιητές εκτός του προτεινόμενου πρέπει να είναι πιστοποιημένοι από τον χρήστη.

Οι θερμοκυκλοποιητές που δεν έχουν εφαρμόσιμη πλάκα πίεσης χρειάζονται ένα adaptor mat για εγγυημένη βέλτιστη μεταφορά της θερμότητας από το θερμαντικό κάλυμμα στα σωληνάρια PCR.

### 3.2 Ηλεκτροφόρηση Γέλης

Αναφέρεται στην ηλεκτροφόρηση της Διαδικασίας του τμήματος 5.

## 4. Συλλογή Δειγμάτων και Κατεργασία

### 4.1 Απομόνωση DNA

Το γενωμικό DNA μπορεί να ανακτηθεί από όλα τα εμπύρνηνα κύτταρα. Η απλούστερη μέθοδος είναι να απομονωθεί DNA από εναιωρήματα κυττάρων (αίμα, αδρή σπινθήρα αίματος ή κύτταρα καλλιέργειας). Υπάρχει τεράστια ποικιλία διαφόρων πρωτοκόλλων για την απόμόνωση DNA από κύτταρα. Για την δοκιμή PCR SSP, θα πρέπει να υιοθετηθούν μόνο εκείνες οι μέθοδοι που παρέχουν DNA επαρκούς ποιότητας και ποσότητας για την PCR, π.χ. Μέθοδος εξαλάτωσης (Αναφ.2)

Ανάμεσα στους προμηθευτές εμπορικών σετ για την απομόνωση DNA, στα κατάλληλα προϊόντα περιλαμβάνονται το "Puregene" από την Gentra Systems και το «Super Quick Gene» από την «Analytical Genetic Testing Center».

### 4.2 Συλλογή Δείγματος και Προετοιμασία

#### 4.2.1 Δείγμα

Η τυποποίηση εκτελείται χρησιμοποιώντας περιφερικό αίμα με αντιπηκτικό (π.χ. Κιτρικό νάτριο, EDTA). Για πληροφορίες φύλαξης και σταθερότητας του δείγματος αίματος, παρακαλείστε να έχετε σαν αναφορά τις τεχνικές πληροφορίες που παρέχονται από τον κατασκευαστή του σετ απομόνωσης και θα πρέπει να είναι πιστοποιημένο από τον χρήστη.

#### 4.2.2 Επιμόλυνση

Η επιμόλυνση του DNA από αναστολείς της PCR όπως η αιμογλοβίνη, η ηπαρίνη, η αιθανόλη, κλπ. μπορεί να προκαλέσουν σοβαρή επίδραση στην αντίδραση PCR. Για το λόγο αυτό δεν θα πρέπει να χρησιμοποιείται ηπαρινισμένο αίμα σαν αρχικό υλικό για την απομόνωση DNA. Αντ' αυτού χρησιμοποιήστε αίμα με κιτρικά ή EDTA. Αν ο ασθενής κάνει θεραπεία με ηπαρίνη, χρησιμοποιήστε εναλλακτική πηγή DNA.

#### 4.2.3 Αιμολυμένο Δείγμα

Αποφύγετε την χρήση λιπαιμικών ή αιμολυμένων δειγμάτων. Η χρήση δειγμάτων που έχουν συλλεχθεί χωρίς αντιπηκτικό ή έχουν ψυχθεί/αποψυχθεί πολλές φορές δεν συνιστάται εφόσον αυτές οι συνθήκες δεν παρέχουν επαρκή ποσότητα και ποιότητα DNA για την δοκιμή.

#### 4.2.4 Πόσότητα DNA

Θα πρέπει να επαναδιασπείρετε σε αποστειρωμένο απεσταγμένο νερό το δείγμα DNA που θα χρησιμοποιηθεί μέχρι την συγκέντρωση περίπου των  $100 \pm 50 \text{ ng}/\mu\text{l}$ . Δεν θα πρέπει να επαναδιασπείρετε το DNA σε διαλύματα που περιέχουν χηλικούς παράγοντες, όπως το EDTA, με συγκέντρωση πάνω από  $0.5 \text{ mM}$ .

#### 4.2.5 Ποιότητα DNA

Ο προσδιορισμός της συγκέντρωσης του DNA εκτελείται με μέτρηση της οπτικής πυκνότητας (OD) στα  $260 \text{ nm}$  ( $A_{260}$ ). Η τιμή  $A_{260} = 1$  (= OD 1.0) αντιστοιχεί περίπου στα  $50 \mu\text{g}/\text{ml}$  του δίκλωνου DNA.

Για να προσδιοριστεί ο βαθμός επιμόλυνσης του DNA με πρωτεΐνη, γίνεται μια επιπλέον μέτρηση στα  $280 \text{ nm}$  και υπολογίζεται ο λόγος  $A_{260}/A_{280}$ . Το καθαρό DNA δίνει λόγο  $A_{260}/A_{280}$  1.8 ή ψηλότερο. Τιμές του  $A_{260}/A_{280}$  μικρότερες του 1.8 δείχνουν επιμόλυνση του DNA με πρωτεΐνη. Για λόγο  $A_{260}/A_{280}$  1.5, το ποσοστό πρωτεΐνης στο DNA είναι περίπου 50%.

Για καλά PCR-SSP αποτελέσματα, απαιτείται ο λόγος του  $A_{260}/A_{280}$  να είναι  $\geq 1.6$ .

- ☉ Η καθαρότητα και η συγκέντρωση του DNA είναι αποφασιστικής σημασίας για τη βελτιστοποίηση των αποτελεσμάτων της δοκιμής.

Τα δείγματα DNA θα πρέπει να χρησιμοποιούνται αμέσως μετά την απομόνωση ή να φυλάσσονται στους  $-20^{\circ}\text{C}$  ή σε χαμηλότερη θερμοκρασία για μεγάλες χρονικές περιόδους (πάνω από 1 χρόνο) για να μην υπάρχουν δυσμενείς επιδράσεις στα αποτελέσματα.

Για πληροφορίες σχετικές με τη φύλαξη και σταθερότητα του απομονωμένου DNA, παρακαλείστε να αναφερθείτε στις τεχνικές πληροφορίες που παρέχονται από τον κατασκευαστή του kit απομόνωσης DNA.

## 5. Διαδικασία

## 5.1 Παρεχόμενα Υλικά

Βλέπε 2.1 περιεχόμενα του σετ HLA SSP

## 5.2 Επιπρόσθετα Απαιτούμενα Υλικά

### 5.2.1 Υλικό Δείγματος (DNA)

- Φασματοφωτόμετρο UV

### 5.2.2 PCR

- Ταq DNA Πολυμεράση (5 U/μl, π.χ. Perkin Elmer)
- Θερμοκυκλοποιητής με θερμαινόμενο κάλυμμα (π.χ. PE 9600, PE 9700 Perkin Elmer)
- Ρυθμιζόμενες πιπέτες
- Πολυπιπέτες Eppendorf με combitips (10 μl)
- Ρύγχη πιπέτας με φίλτρο
- Απεσταγμένο νερό (dH<sub>2</sub>O)

### 5.2.3 Ηλεκτροφόρηση Γέλης

- Αγαρόζη ( για μοριακή βιολογία)
- Δοχείο για γέλη ( κατάλληλο για γέλη με τουλάχιστον 25 θήκες)
- Ρυθμιστικό TBE 5x
  - Tris(υδροξυλο μέθυλο)-αμινομεθάνιο (βάση)
  - Βορικό οξύ (H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>)
  - Δινάτριο EDTA
- Διάλυμα Βρωμιούχου Αιθιδίου (10 mg/ml)
- DNA κλίμακα (δείκτης 50 – 1000 bp)
- Μαγνητικός Αναδευτήρας με θερμαινόμενη πλάκα ή φούρνος μικροκυμάτων
- Ρυθμιζόμενες πιπέτες
- Φωτογραφική μηχανή με UV φίλτρο τύπου 667
- UV φωτιστικό στοιχείο (περίπου 200 – 300 nm)
- Παροχή Ηλεκτρικού ρεύματος
- Απεσταγμένο νερό (dH<sub>2</sub>O)

## 5.3 PCR ( ΑΛΥΣΙΔΩΤΗ ΑΝΤΙΔΡΑΣΗ ΠΟΛΥΜΕΡΑΣΗΣ)

### 5.3.1 Προληπτικά μέτρα

Η PCR είναι μια εξαιρετικά ευαίσθητη μέθοδος η οποία μπορεί αποτελεσματικά να πολλαπλασιάσει και την παραμικρή ποσότητα DNA. Επακόλουθο αυτού είναι ότι ακόμα και ίχνη DNA που επιμολύνει ένα δείγμα μπορεί να πολλαπλασιαστεί με την αντίδραση PCR και να διαστρεβλώσει τα αποτελέσματα. Μία ιδιαίτερη πηγή επιμόλυνσης είναι ενισχυμένο DNA το οποίο έρχεται σε επαφή με δείγματα τα οποία είναι για να πολλαπλασιαστούν. Για να αποφευχθεί η επιμόλυνση με ενισχυμένο υλικό, συνιστάται ο χώρος εργασίας να είναι αυστηρά χωρισμένος όπως παρακάτω:

#### 1. Χώρος Προ-PCR :

Όλη η εργασία που διεξάγεται πριν την PCR (Απομόνωση DNA και φύλαξη, προετοιμασία για την PCR, παραγωγή και φύλαξη των αντιδραστηρίων και των διαλυμάτων για την απομόνωση του DNA και την PCR ) .

#### 2. Χώρος Μετά –PCR:

Θερμοκυκλοποιητής, ηλεκτροφόρηση γέλης, αξιολόγηση, φύλαξη του πολλαπλασιασμένου DNA. Εξοπλισμός και Αναλώσιμα από τον χώρο Μετά-PCR δεν πρέπει να μεταφέρονται στον χώρο προ-PCR.

#### 3. Όταν δουλεύετε στον Προ-PCR χώρο, θα πρέπει να χρησιμοποιούνται πιπέτες με προστασία αερολυμάτων ( ρύγχη με φίλτρα). Συνιστάται να περιλαμβάνεται αρνητικός μάρτυρας κατά την διαδικασία της δοκιμής σαν ένας δείκτης επιμόλυνσης με ξένο DNA.

### 5.3.2 Διεξαγωγή της SSP δοκιμής για την τυποποίηση του HLA

(1) Για την τυποποίηση HLA ενός δείγματος DNA εκτελούνται αντιδράσεις PCR με ένα όγκο αντίδρασης 10μl σε κάθε σωληνάριο PCR. Το μαύρο σημάδι είναι μια βοήθεια για τον σωστό προσανατολισμό του μπλοκ PCR **BLOCK**. (θέση H1).

(2) Σε ένα σωληνάριο Eppendorf, προετοιμάζετε ένα κύριο μείγμα για κάθε δοκιμή τυποποίησης που περιέχει τα παρακάτω συστατικά:

Κοκτέιλ PCR **CK**

Τaq DNA Πολυμεράση (5 U/μl)

Απ. H<sub>2</sub>O



(βλέπε τον παρακάτω πίνακα για τις διαφορετικές διαμορφώσεις)

Ανακατέψτε καλά και πιπετάρτε 10 µl αυτού του μίγματος στον αρνητικό μάρτυρα [NC]. Μετά από αυτό προσθέστε το DNA (περίπου 100 ± 50 ng/µl) και ανακινήστε καλά.

Για τις διαφορετικές διαμορφώσεις του κυρίου μίγματος βλέπε τον παρακάτω πίνακα:

Αριθμός των αντιδράσεων PCR	Κύριο μίγμα για διαμόρφωση με				
	8	18	24	48	96
Κοκτέιλ PCR [CK]	44 µl	100 µl	120 µl	228 µl	440 µl
Taq DNA Πολυμεράση	0.7 µl	1.5 µl	1.8 µl	3.5 µl	7 µl
dH <sub>2</sub> O	55 µl	125 µl	150 µl	288 µl	550 µl
DNA (περίπου 100 ± 50 ng/µl)	11 µl	25 µl	30 µl	57 µl	110 µl

- (3) Από αυτό το Κύριο μίγμα, πιπετάρτε 10 µl σε κάθε ένα από τα αποξηραμένα μίγματα των εκκινητών.. Αυτό γίνεται καλύτερα με μία πολυπιπέττα. Θα πρέπει να δοθεί προσοχή να μην έρθουν σε επαφή τα ρύγχη της πιπέττας με τον εκκινητή ώστε να αποφευχθεί μεταφορά του σε άλλη θέση. Για αυτό το λόγο, πιπετάρτε το Κύριο μίγμα στα τοιχώματα των πηγαδιών.

Σφραγίστε καλά τις λωρίδες PCR χρησιμοποιώντας καλύμματα των λωρίδων PCR ή τα καλύμματα που παρέχονται. Μεταφέρετε τον δίσκο στον θερμοκυκλοποιητή και ξεκινήστε την PCR με το πρόγραμμα HLA SSP.

#### 5.4 Ηλεκτροφόρηση Γέλης

Τα προϊόντα PCR αναγνωρίζονται με την χρήση ηλεκτροφόρησης γέλης αгарόζης που ακολουθείται από τον προσδιορισμό των ζωνών DNA με υπεριώδη ακτινοβολία.

##### 5.4.1 Προετοιμασία των Αντιδραστηρίων

- Ρυθμιστικό TBE 5x** (0.445 M βορικού-tris, 0.0125 M EDTA):  
 54 g Τρις(υδροξυμεθύλο)-αμινομεθάνιο (βάση)  
 27.5 g Βορικό οξύ (H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>)  
 4.65 g Δινάτριο EDTA  
 προσθέστε 1000 ml απεσταγμένου νερού, και φυλάξτε σε θερμοκρασία δωματίου.
- Διάλυμα Βρωμιούχου Αιθιδίου** (10 mg/ml)  
 Διαλύστε 100 mg του βρωμιούχου αιθιδίου σε 10 ml απεσταγμένου νερού και φυλάξτε στους 2...8 °C μακριά από το φως  
**Προσοχή: Το Βρωμιούχο Αιθίδιο είναι μεταλλαξιογόνο και τοξικό. Φοράτε πάντα γάντια όταν δουλεύετε με βρωμιούχο αιθίδιο (ακόμα και σε αραιωμένη μορφή). Σε περίπτωση που έρθει σε επαφή με το δέρμα, εκπλύνετε αμέσως με άφθονο νερό.**
- Ρυθμιστικό TBE 1x**  
 Τελική αραιώση 1:5 του ρυθμιστικού TBE 5x με απιονισμένο νερό.



### 5.4.2 Εκτέλεση της Ηλεκτροφόρησης Γέλης

Προετοιμάζεται 2 % διάλυμα αγαρόζης με βράσιμο 5 g αγαρόζης σε 250 ml του ρυθμιστικού 1x TBE μέχρι το διάλυμα να διαυγασθεί. Αφήστε το διάλυμα να κρυώσει μέχρι κάτω από τους 60°C μετά προσθέστε 4 μl διαλύματος βρωμιούχου αιθιδίου.

Μετά τον πολυμερισμό (περίπου 30 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου), χύστε την γέλη στο δοχείο το οποίο είναι γεμάτο με ρυθμιστικό 1X TBE. Αφαιρέστε τα χτένια. Οι θήκες της γέλης θα πρέπει να καλύπτονται πλήρως με ρυθμιστικό.

Το μέγεθος των προϊόντων PCR μετρείται με την εισαγωγή ενός δείκτη κατάλληλου μοριακού βάρους κατά την ηλεκτροφόρηση (50-1000 bp marker).

Κατόπιν η ηλεκτροφόρηση εκτελείται για 15-25 λεπτά στα 8 V/cm (απόσταση ηλεκτροδίων).

### 5.4.3 Τεκμηρίωση

Όταν ολοκληρωθεί η ηλεκτροφόρηση, η γέλη τοποθετείται σε ένα φωτιστικό στοιχείο υπεριώδους (θα πρέπει να φοριέται κατάλληλη προστασία του προσώπου για την υπεριώδη ακτινοβολία). Λαμβάνεται μια φωτογραφία Polaroid για την αξιολόγηση και την τεκμηρίωση των αποτελεσμάτων.

## 6. Αποτελέσματα

### 6.1 Αξιολόγηση












Το μίγμα των HLA εκκινητών περιέχει εκκινητές οι οποίοι πολλαπλασιάζουν ένα θραύσμα 1069 ζευγών βάσεων (bp) της ανθρώπινης αυξητικής ορμόνης (HGH). Η συγκέντρωση αυτών των εκκινητών είναι χαμηλότερη από αυτή των ζευγών εκκινητών των ειδικών για τα αλληλία και σκοπός τους είναι να παρέχουν ένα εσωτερικό μάρτυρα επιτυχούς πολλαπλασιασμού της PCR. Αυτή η ενίσχυση γενικά πάντα συμβαίνει, δηλ. και με την απουσία και με την παρουσία PCR θραύσματος ειδικού ενός αλληλίου ή ομάδας. Η ζώνη του μάρτυρα μπορεί έτσι γενικά να εμφανιστεί σε όλες τις PCR αντιδράσεις. Μερικές φορές, η ζώνη του μάρτυρα μπορεί να εμφανιστεί ασθενής ή να χαθεί εντελώς με την παρουσία ενός ειδικού προϊόντος PCR αλληλίου. HLA. Αυτός δεν είναι ένας περιορισμός της μεθόδου, εφόσον η ειδική ζώνη λειτουργεί σαν ένας έλεγχος της επιτυχίας της πορείας της PCR.

Η σύσταση των εκκινητών επιτρέπει την θετική αναγνώριση των HLA χαρακτηριστικών. Η ερμηνεία βασίζεται στο αν μια ειδική ζώνη είναι παρούσα στην γέλη ή όχι.

Το μέγεθος του ενισχυμένου θραύσματος DNA μπορεί να μην ληφθεί υπόψη όταν αξιολογείται η δοκιμή, παρ' όλα αυτά είναι βοηθητικό κατά την ερμηνεία της δοκιμής.

Για την αξιολόγηση, το pattern των ειδικών ζωνών μεταφέρεται στο φύλλο των αποτελεσμάτων που παρέχεται και τα αποτελέσματα της τυποποίησης διαβάζονται με την βοήθεια του pattern των αντιδράσεων.

### Ερμηνεία της Γέλης

	Θετική αντίδραση	θετική αντίδραση	αρνητική αντίδραση	μη ενίσχυση
Θήκη της γέλης				
Ζώνη ελέγχου	καμία	-----		καμία
Εδική ζώνη			καμία	καμία
Ζώνη του εκκινητή				

### 6.2. Περιορισμοί της Διαδικασίας

1. Η ένταση των θετικών ζωνών θα ποικίλλει λόγω της ποιότητας και της ποσότητας του προϊόντος PCR. Η ποιότητα του προϊόντος PCR επηρεάζει άμεσα την ένταση των ζωνών που γίνεται ορατή με ένα φωτιστικό στοιχείο υπεριώδους. Στην περίπτωση που χαθούν ζώνες των μαρτύρων και δεν υπάρχουν αλληλία τότε η δοκιμή θα πρέπει να επαναληφθεί.
2. Τα δείγματα DNA θα πρέπει να χρησιμοποιούνται αμέσως μετά την απομόνωσή τους ή να φυλάσσονται στους -20°C ή σε χαμηλότερη θερμοκρασία για μεγάλα χρονικά διαστήματα χωρίς δυσμενή επίδραση στα αποτελέσματα
3. Η απόδοση της δοκιμής μπορεί να είναι εγγυημένη αν υιοθετηθούν αυστηρά οι εσωκλειστες οδηγίες.

- 4. Αυτή η δοκιμή θα πρέπει να χρησιμοποιείται για αρχική τυποποίηση HLA. Άλλα κλινικά και διαγνωστικά ευρήματα θα πρέπει να χρησιμοποιούνται επιπροσθέτως, για τον προσδιορισμό καταλληλότητας για μόσχευμα.
- 5. Με την χρήση του Bio-Rad HLA SSP typing kit δεν μπορούν να διευκρινιστούν όλοι οι συνδυασμοί.

### 6.3 Έλεγχος Ποιότητας

Κάθε παραγόμενη παρτίδα ελέγχεται με ένα σύνολο αντιπροσωπευτικών δειγμάτων DNA που ανιχνεύονται ειδικά από τους εκκινητές και είναι διαθέσιμο κατόπιν σχετικής αιτήσεως.

Ο Έλεγχος Ποιότητας των νέων αριθμών παρτίδας μπορεί να διεξαχθεί με τυποποίηση ενός συνδυασμού γνωστών συνδυασμών αλληλίων ετεροζυγωτών οι οποίοι αντιδρούν με τα περισσότερα μίγματα των εκκινητών του σετ.

### 6.4 Ειδικά Χαρακτηριστικά Απόδοσης

Το Bio-Rad SSP Typing kit συγκρίθηκε με ένα σετ τυποποίησης SSP και ένα SSO σύστημα τυποποίησης με την δοκιμή 167 δειγμάτων (τυχαίοι υπομήφιοι προς μεταμόσχευση και δυνητικοί δότες) από δύο ξεχωριστές γεωγραφικές περιοχές. Υπάρχει 100% συμφωνία (167/167) μεταξύ των αποτελεσμάτων του Bio-Rad SSP Typing kit και των αποτελεσμάτων που λαμβάνονται από την SSP και την SSO δοκιμή.

	Συμφωνία	Ασυμφωνία	Σύνολο	%
N	167	0	167	100
%	100%	0%		

N = Αριθμός δειγμάτων

## 7. Διαδικασία Επίλυσης Προβλημάτων

ΠΡΟΒΛΗΜΑ	ΑΙΤΙΑ	ΛΥΣΗ
<b>Ηλεκτροφόρηση Αγαρόζης</b>		
Δεν υπάρχουν ορατές ζώνες.	Δεν υπάρχει βρωμιούχο αιθίδιο στην γέλη.	Χρώση της γέλης σε ένα λουτρό με χρωστική (ρυθμιστικό 1XTBE με 0.5 µg/ml βρωμιούχο αιθίδιο).
Ασθενείς ειδικές ζώνες στην γέλη, δεν υπάρχουν ζώνες των μαρτύρων.	DNA από ηπαρινισμένο αίμα.	Χρησιμοποιείστε αίμα με EDTA ή κιτρικά σαν αρχικό υλικό.
	Υπολείμματα αιθανόλης στο DNA.	Μετά από έκπλυση του pellet του DNA με αιθανόλη, αφήστε το να στεγνώσει επαρκώς.
	Χρησιμοποιήθηκε λίγο DNA .	Χρησιμοποιήστε περίπου 100 ng DNA ανά αντίδραση PCR.
Τα προϊόντα PCR δεν είναι ορατά, το στανταρ του μοριακού βάρους ορατό.	Λανθασμένες συνθήκες για τον κύκλο θερμοκρασιών.	Ελέγξτε το πρόγραμμα του θερμοκυκλοποιητή PCR. Το περιγραφόμενο πρόγραμμα εφαρμόζεται στους θερμοκυκλοποιητές της Perkin Elmer. Άλλοι θερμοκυκλοποιητές εκτός του συνιστώμενου θα πρέπει να είναι πιστοποιημένοι από τον χρήστη.
		Παρατείνετε την αποδιάταξη από 10 δευτ. σε 20 δευτ.
		Παρατείνετε τον χρόνο επέκτασης από 30 δευτ. σε 60 δευτ.
		Άλλοι θερμοκυκλοποιητές από τους προτεινόμενους μπορούν να έχουν διαφορετικούς ρυθμούς θέρμανσης και ψύξης. Σε αυτές τις περιπτώσεις συνιστάται να τροποποιείται το πρωτόκολλο PCR: Αν λαμβάνονται μη ειδικές αντιδράσεις με αύξηση της θερμοκρασίας πρόσδεσης με βήματα του 1°C θα δημιουργηθούν πιο αυστηρές συνθήκες αντίδρασης.
		Ψευδώς αρνητικοί πολλαπλασιασμοί μπορούν να οφείλονται στις πολύ αυστηρές συνθήκες αντίδρασης. Σε αυτή την περίπτωση συνιστάται μια μείωση της θερμοκρασίας πρόσδεσης με βήματα του 1°C.
Απουσιάζουν περιστασιακά οι ζώνες των μαρτύρων.		Αν δύο αλληλία μπορούν να αναγνωριστούν θετικά, δεν χρειάζεται να ληφθεί κανένα μέτρο. Αν αυτό δεν συμβαίνει, συνιστάται να επαναληφθεί η δοκιμή. Αν <u>δεν μπορούν</u> να αναγνωριστούν θετικά δύο αλληλία, συνιστάται να επαναληφθεί η δοκιμή.

## 8. Βιβλιογραφικές Αναφορές

1. Graham DE (1978)  
The isolation of high molecular weight DNA from whole organisms or large tissue masses.  
Anal Biochem 85: 609-613
2. Miller SA, Dykes DD, Polesky HF (1988)  
A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells.  
Nucl Ac Res 16: 1215
3. Olerup O, Zetterquist H (1992)  
HLA-DR typing by PCR amplification with sequence-specific primers (PCR-SSP) in two hours: An alternative to serological DR typing in clinical practice including donor recipient matching in cadaveric transplantation.  
Tissue Antigens 39: 225-335.
4. Bunce M, O'Neill CM, Barnado MCNM, Krausa P, Browning MJ, Morris PJ, Welsh KI (1995)  
Phototyping: comprehensive DNA typing for HLA-A, B, C, DRB1, DRB3, DRB4, DRB5 & DQB1 by PCR with 144 primer mixes utilizing sequence-specific primers ( PCR-SSP)  
Tissue Antigens 46:355-367.
5. Blasczyk R, Hahn U, Wehling J, Huhn D, Salama A (1995)  
Complete subtyping of the HLA-A locus by sequence-specific amplification followed by direct sequencing or single-strand conformation polymorphism analysis.  
Tissue Antigens 46:86-95.