

HU

HLA SSP Kits

Ready to use SSP reagent kit for DNA based HLA typing
SSP-Reagenzienkit für die HLA-Typisierung auf DNA-Basis
Használatra kész kész SSP reagens készlet DNS alapú HLA típus-
meghatározáshoz

Trousse de réactifs SSP pour le typage HLA, basé sur l'ADN
Kit di reagenti SSP per tipizzazione HLA basata sul DNA
Juego de reactivos SSP para la tipificación del antígeno

IVD

For In Vitro Diagnostic Use

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

BIO-RAD

189738/07 – 04/2016

Besondere Hinweise für den Anwender / Fontos felhasználói információk / Remarques importantes pour l'utilisateur / Avvertenze per l'utilizzatore / Indicaciones importantes para el usuario:

SSP TÍPUS-MEGHATÁROZÓ KÉSZLETEK TAQ-POLYMERÁZZAL - KORLÁTOZOTT FELHASZNÁLÁSI JOG:

A termék értékesítési ára tartalmazza a korlátozott, át nem ruházható felhasználási jogot az Egyesült Államok Szabadalmi - U.S. Patents - 4,683,202, 4,683,195 és 4,965,188 és külföldi megfelelőik értelmében, amelyek a Roche Molecular Systems, Inc. és az F. Hoffmann-La Roche Ltd ("Roche") tulajdonát képezik, a terméknek kizárólag erre a mennyiségére nézve, a polimeráz láncreakció ("PCR") folyamatának elvégzésére, amelynek a leírása a fent nevezett szabadalmakban található, kizárólag a vásárló HLA típus-meghatározási alkalmazásaihoz, kizárólag szervek vagy szövetek és csontok marrow transzplantációjához, és kifejezetten kizárva a törvénytörést orvostani bizonyítási eljárásokban vagy az apasági (szülői) vizsgálatokban történő felhasználást. A termék felhasználási jogát HLA típus-meghatározási vagy szerv- vagy szövet-transzplantációs kereskedelmi szolgáltatások céljára, azok nyújtásához PCR alkalmazásával szintén ezúton garantáljuk, ide értve az eredményeknek a vásárló tevékenysége eredményének díj ellenében vagy egyéb kereskedelmi megfontolás alapján kiadott jelentését is. A PCR felhasználási licenc vásárlására vonatkozó további információért lépjen kapcsolatba az Egyesült Államokban a Roche Molecular Systems, Inc. 1145 Atlantic Avenue, Alameda, Kalifornia 94501 Licenc Igazgatójával, az Egyesült Államokon kívül pedig a PCR Licenc Menedzserrel, F. Hoffmann-La Roche Ltd, Grenzacherstr. 124, CH-4070 Basel, Svájc.

SSP TÍPUS-MEGHATÁROZÓ KÉSZLETEK TAQ-POLYMERÁZ NÉLKÜL - LICENC JOGNYILATKOZAT:

Ez a termék polimeráz láncreakcióban („PCR”) történő felhasználásra optimalizált, amely folyamat szabadalmi jogi védelem alatt áll, amely szabadalmak tulajdonosa a Roche Molecular Systems, Inc. és az F. Hoffmann-La Roche Ltd ("Roche"). Az ezen szabadalmak körébe tartozó egyetlen, a PCR folyamat alkalmazására vonatkozó licenc sem kerül átadásra explicit vagy implicit módon a vásárlónak jelen termék megvásárlásával. A PCR felhasználási licenc vásárlására vonatkozó további információért lépjen kapcsolatba az Egyesült Államokban a Roche Molecular Systems, Inc. 1145 Atlantic Avenue, Alameda, Kalifornia 94501 Licenc Igazgatójával, az Egyesült Államokon kívül pedig a PCR Licenc Menedzserrel, F. Hoffmann-La Roche Ltd, Grenzacherstr. 124, CH-4070 Basel, Svájc.

REF	GB DE ES IT FR NL DK CZ HU	Article number Artikelnummer Artículo numero Codice prodotto Référéncé du produit Artikelnummer Artikelnummer Katalogové číslo Cikkszám	IVD	GB DE ES IT FR NL DK CZ HU	For in vitro diagnostic use Nur zur in-vitro Diagnostik Solo para el diagnóstico in vitro Solo per la diagnostica in vitro Pour le diagnostic in vitro Voor in vitro gebruik Til diagnostik brug i glas Použití pro in vitro diagnostiku In Vitro Diagnosztikai célra			
BLOCK	GB DE ES IT FR NL DK CZ HU	PCR block PCR-Block PCR bloque PCR blocco PCR bloc PCR blok PCR blok PCR blok PCR tömb	NC	GB DE ES IT FR NL DK CZ HU	negative control Negativkontrolle control negativo controllo negativo contrôle négatif negatieve controle negativ kontrol negativní kontrola negativ kontroll	CK	GB DE ES IT FR NL DK CZ HU	PCR cocktail PCR-Cocktail PCR coctel PCR koktél PCR koktél PCR koktél PCR blanding PCR koktejl PCR koktél

TARTALOM

1. Bevezetés	4
1.1 Felhasználási javaslat	4
1.2 Összefoglalás és magyarázat	4
1.3 A teszt alapelve	4
2. Reagensek	4
2.1 A HLA SSP Kit tartalma.....	4
2.2 Figyelmeztetés és betartandó óvintézkedések	5
2.3 Tárolás és eltarthatóság	5
2.4 Instabilitásra vagy minőségromlásra utaló jelek.....	5
3. Szükséges eszközök	5
3.1 A termikus keringető erősítő programozása	5
3.2 Gél elektroforézis	6
4. Mintavétel és előkészítés	6
4.1 DNS izoláció	6
4.2. Mintavétel és előkészítés	6
5. Eljárás	7
5.1 Biztosított anyagok	7
5.2 További szükséges anyagok	7
5.3 PCR	7
5.4 Gél-elektroforézis	8
6. Eredmények	9
6.1 Értékelés	9
6.2 A kivitelezés korlátai	9
6.3 Minőségkontroll	9
6.4 Specifikus teljesítmény-jellemzők	9
7. Problémamegoldás	10
8. Hivatkozások	11



1. BEVEZETÉS

1.1 Felhasználási javaslat

A HLA Szekvencia Specifikus Primer készletek (HLA SSP kits) a HLA I vagy II osztályba tartozó allélek meghatározására szolgálnak.

1.2 Összefoglalás és magyarázat

A HLA rendszer antigének komplex, kodomináns öröklési rendszere, amely fontos szerepet játszik az immunrendszerben azáltal, hogy lehetővé teszi a „saját” - „nem saját” megkülönböztetést. A szervtranszplantáció során a donor és a recipiens HLA kompatibilitása a transzplantáció kimenetelének egyik legfontosabb meghatározója. Ezért a HLA antigének egyedi kombinációinak meghatározását használjuk bázisként a donor és a recipiensek kiválasztásánál.

A DNS alapú tesztmódszerek kialakításával a modern diagnosztika új dimenzióit tártuk fel. A HLA antigének részben, egy a polipeptid láncban található aminosav szintjén különböznek csak egymástól. Ezeknek a jelentős részben azonos struktúráknak a szerológiai eszközökkel történő azonosítása szinte lehetetlen, ezért a módszer meghatározási kapacitása korlátos. Mivel a legfontosabb HLA allélek DNS szekvenciái ismertek, a szekvenciák variációi DNS szinten azonosíthatóak szintetikus oligonukleotidok segítségével. A genomikus DNS (PCR, Polimeráz Lánc Reakció) felerősítésének specifikus primer párokkal (SSP, Szekvencia Specifikus Primerek) együttes felhasználásával nagyszámú HLA allél azonosítható molekuláris tesztmódszerek segítségével.

1.3 A teszt alapelve

A HLA SSP Kits tesztelési rendszereket tartalmaz a HLA jellemzők PCR technikákkal történő tipizálásához. A tipizáláshoz az SSP módszer allél-specifikus primereket használ az amplifikációs reakcióban. A módszer alapelve, hogy csak azok a primerek, amelyek szekvenciái tökéletes komplementerei a DNS minta célszekvenciáinak, fognak kötődni ehhez a DNS-hez, és hoznak létre a PCR reakcióban amplifikációt. Nem komplementer primerek másrészt nem kötődnek a DNS-hez, és nem jön létre amplifikáció.

A felerősített DNS-t agarosa gél elektroforézissel azonosítjuk. A sikeres amplifikáció meghatározott hosszúságú DNS fragmentumot hoz létre, amely egy sávként jelenik meg a gélben. Amennyiben nem jön létre amplifikáció, a sáv nem jelenik meg.

A primerek összetétele lehetővé teszi a HLA jellemzők pozitív azonosítását. Ennek a kimutatási rendszernek az alkalmazási területét a szervdonorok és recipiensek, valamint várátömlesztésben vagy vérkomponens kiegészítő terápiában részesülő betegek egyedi HLA alléljeinek meghatározása adja.

2. REAGENSEK

2.1 HLA SSP Kits tartalma

A HLA SSP Kits tartalma 24 teszthez elegendő.

- 24 PCR-tömb **BLOKK** mindegyike PCR csöveket tartalmaz tömbökben, amelyek a szárított primer/nukleotid keverékeket tartalmazzák. Az azonosításhoz segítségként egy fekete jelzést helyezünk az 1-es pozícióra (=H1).
- PCR cocktail **CK** (használatkész)
A koktél PCR-puffert tartalmaz (végső koncentráció: 1,5 mM MgCl₂, 50 mM KCl, 10 mM Tris-HCl, 0,001% zselatin), glicerol és krezol vörös.
- PCR fedőcsíkok vagy PCR zárófedelek.
- Munkaívek, reakcióminta tábla, primer pozíciós ív

A negatív kontroll **NC** külön csomagban található további PCR csövekben (színtelen), ha nincs benne a PCR blokkban **LOKK**.

2.2 Figyelmeztetések és betartandó óvintézkedések

In vitro diagnosztikai célra **IVD**

Figyelem: A tesztet csak a megfelelő szakképesítéssel rendelkező, betanított laborszemélyzet használhatja.

Figyelem: Minden reagenst a helyes laboratóriumi gyakorlatnak megfelelően kell kezelni a megfelelő óvintézkedések betartása mellett. Emellett minden betegmintát potenciálisan fertőzőként kell kezelni. Ne pipettázza szájjal.

Figyelem: Ne használja fel a reagenseket a címkén jelzett lejáratí idő után.

Figyelem: Ne használja fel a reagenseket, ha zavarosság vagy mikróbas fertőzöttség bármilyen jelét látja.

Figyelem: Azokat a pipettákat, amelyeket a **Post**-PCR manipulációkhoz használunk, **nem** használhatjuk a **Pre**-PCR manipulációkhoz.

Figyelem: Biokockázati figyelmeztetés: Az ethidium bromid, amelyet a DNS festésére használunk, karcinogén lehet. Mindig viseljen védőkesztyűt, amikor festett gélekkel dolgozik. A hulladék megsemmisítése égetéssel történik.

Figyelem: Biokockázati figyelmeztetés: Minden vérkészítményt fertőzésveszélyes anyagként kell kezelni.

Figyelem: Minden használt PCR tömböt fertőzésveszélyes anyagként kell kezelni, és meg kell semmisíteni az országban érvényes irányelveknek megfelelően.

Figyelem: Viseljen UV-szűrős védőszemüveget, és ne nézzen közvetlenül az UV fényforrásba, amikor a géleket nézi vagy fotózza.

Részletes információt az Anyagbiztonsági Adatlapok tartalmaznak.

2.3 Tárolás and Eltarthatóság

Az SSP reagenseket (**BLOCK**, **CK**, **NC**) 2...8 °C hőmérsékleten tároljuk. A lejáratí dátum a készlet komponenseinek csomagolásán található. A PCR tömbök leforrasztott tasakbak találhatók.

2.4 Instabilitásra vagy minőségromlásra utaló jelek

Amikor egy zacskót felnyitunk, a megmaradt, fel nem használt PCR tömböket ugyanebben az eredeti zacskóban tároljuk tovább. Zárjuk le ragasztószalaggal, vagy hegesszük vissza a zacskót, hogy a nedvességtő a tárolás során megvédjük az anyagot. A felnyitott PCR tömböket 4 héten belül fel kell használni.

3. Szükséges eszközök

3.1 A Thermal cycler erősítő pogramozása

HLA SSP program:

Alap denaturálás:	94 °C	2 min.		
Denaturálás:	94 °C	10 min.]	10 ciklus
Hőkezelés & extenzió:	65 °C	60 sec.		
Denaturálás:	94 °C	10 min.]	20 ciklus
Hőkezelés:	61 °C	50 min.		
Extenzió:	72 °C	30 sec.		

Az alábbi PCR program a Perkin-Elmer thermocycler erősítőkhoz alkalmas. A PE 9700 fűtési/hűtési szint átlagosan 1 °C/másodperc a minta esetén, és a hőmérséklet pontossága ± 0,25 °C a 35-100 °C szinten túl. Az ajánlott Thermocycler-től eltérő erősítőket validálást követően lehet felhasználni.

Azoknak a Thermal cycler erősítőkhöz, amelyeknek nincs állítható nyomástáblájuk, adapter alátétre van szükség az optimális hőátadás garantálására a hőburkolattól a PCR csövekhez.

3.2 Gél elektroforézis

Az 5. Eljárás fejezetben olvassa el az elektroforézis leírását.

4. Mintavétel és előkészítés

4.1 DNS izoláció

Genomikus DNS minden sejtmagjal rendelkező sejtől nyerhető. A legegyszerűbb módszer, ha a sejtszuszpenziókból izoláljuk a DNS-t (vér, vérelvadék határreteg vagy sejt kultúra). Számos különféle eljárás létezik a DNS sejtekből történő izolációjára. A PCR-SSP tesztelésnél csak azokat a módszereket lehet alkalmazni, amelyek a PCR-hez megfelelő mennyiségű és minőségű DNS-t biztosítanak, pl. kristályosítási módszer (2. hiv.).

A kereskedelmi forgalomban kapható DNS kivonó készletek közül megfelelő termék többek között a "Puregene" a Gentra Systems-től és a "Super Quick Gene" az The Analytical Genetic Testing Center-től.

4.2. Mintavétel és előkészítés

4.2.1 Minta

A tipizálást antikoagulált perifériás vérral végezzük (pl. szódium citrát, EDTA). A vérminta tárolására és stabilitására vonatkozó információ az extrakciós tesztkészlet gyártója által biztosított technikai információban található, és ezt a felhasználónak kell validálni.

4.2.2 Szennyezettség

A DNS-nek PCR gátlókkal, mint a hemoglobin, heparin, etanol, stb. történő szennyeződése súlyos összeütkezést okozhat a PCR reakcióban. Ezért a heparinos vért nem lehet a DNS izoláció kiindulási anyagaként felhasználni. Használjon ehelyett citrát vagy EDTA vért. Amennyiben a beteg heparin-kezelést kap, használjon alternatív DNS-forrást.

4.2.3 Hemolizált minta

Ne használjon lipémiás vagy hemolizált mintákat. Az antikoaguláns-mentes levett minták vagy többször fagyasztott/kiolvasztott minták használata nem javasolt, mivel ezek a DNS-teszteléshez nem biztosítanak megfelelő mennyiségi és minőségi feltételeket.

4.2.4 DNS mennyiség

A felhasználandó DNS mintát reszuszpendálni kell steril desztillált vízzel kb.

100 ± 50 ng/μl koncentrációban. A DNS-t **ne reszuszpendáljuk** kelátképzőket, **például EDTA-t** tartalmazó oldatokkal 0,5 mM koncentráció felett.

4.2.5 DNS minőség

A DNS koncentrációjának meghatározása az optikai denzitás (OD) 260 nm-nél (A_{260}) történő mérésével történik. Az $A_{260} = 1$ (= OD 1.0) érték körülbelül 50 μg/ml kettős DNS fonalra vonatkozik.

A DNS proteinnel való szennyezettsége mértékének meghatározására egy további mérést végzünk 280 nm-nél, és az A_{260}/A_{280} arányt kiszámoljuk. A tiszta DNS A_{260}/A_{280} hányados értéke 1,8 vagy magasabb lesz. A A_{260}/A_{280} hányados 1,8 alatti értékei a DNS protein-szennyezettségére utalnak. Amennyiben az A_{260}/A_{280} hányados 1,5, a protein százalékos aránya a DNS-preparátumban körülbelül 50 %.

A jó PCR-SSP eredményekhez a DNS elvárt A_{260}/A_{280} aránya $\geq 1,6$.

☞ A DNS tisztasága és koncentrációja döntő fontosságú az optimális teszteredmények szempontjából.

A DNS mintát azonnal az izolálást követően használjuk, vagy tárolhatjuk – 20 °C-on vagy ez alatt hosszabb ideig (1 éven át) anélkül, hogy az eredményeket ez rontaná.

Az izolált DNS tárolására és stabilitására vonatkozó információ a DNS extrakciós tesztkészlet gyártója által biztosított információban található.

5. A teszt kivitelezése

5.1 Biztosított anyagok

Lásd: 2.1 HLA SSP Kits tartalma

5.2 További szükséges anyagok

5.2.1 Minta (DNS)

- UV spektrofotométer

5.2.2 PCR

- Taq DNS polymeráz (5 U/μl, pl. PE Applied Biosystems)
- Thermal cycler erősítő fűtött burkolattal (pl. PE 9600, PE 9700 PE Applied Biosystems)
- Állítható pipetták
- Eppendorf Multipette kombi hegyekkel (10 μl)
- Szűrős pipettavégek (50μl)
- desztillált víz (dH₂O)

5.3.2 Gél-elektroforézis

- Agaróz (molekuláris biológiához)
- Gélkamra (gél számára legalább 25 üreggel)
- 5x TBE puffer
 - Tris(hidroximetil)-aminometán (bázis)
 - Bórkősav (H₃BO₃)
 - Diszódium EDTA
- Etidium bromid oldat (10 mg/ml)
- DNS létra (50 – 1000 bp marker)
- Mágneses keverő főzőlappal vagy mikrohullámmal
- Állítható pipetták
- Polaroid fényképezőgép UV szűrővel és Polaroid 67-es típusú filmmel
- UV transzilluminátor (kb. 200 – 300 nm)
- Tápáram-ellátás
- desztillált víz (dH₂O)

5.3 PCR (Polymeráz lánreakció)

5.3.1 Óvintézkedések

A PCR rendkívül érzékeny eljárás, amellyel hatékonyan felerősíthető a legkisebb DNS mennyiség is. Ebből következően, ha szennyező DNS kerül egy mintába, akár csak nyomokban is, ez felerősödhet a PCR reakcióban, és hamis teszteredményt okozhat. A szennyeződés egyik forrása, ha felerősített DNS kerül kapcsolatba olyan mintákkal, amelyeket még fel kell erősíteni. A felerősített anyaggal való szennyeződés elkerülése érdekében ajánlatos a munkaterületet a következők szerint szigorúan elzárni:

1. Pre-PCR terület:
Minden feladatot végezzünk el a PCR előtt (DNS izoláció és tárolás, előkészületek a PCR-re, a DNS kivonásához és a PCR-hez szükséges reagensek és oldatok előkészítése és eltárolása).
2. Post-PCR terület:
Thermal cycler erősítő berendezés, gél elektroforézis, értékelés, felerősített DNS tárolása.
A felszerelést és a felhasználandókat a post-PCR területről nem vihetjük át a pre-PCR területre.
3. Amikor a pre-PCR területen dolgozunk, aeroszolos védelemmel ellátott pipettákat használjunk (szűrőfejes). A tesztelésbe javasolt negatív kontrollvizsgálatot beiktatni az idegen DNS-el való szennyeződés kiszűrése érdekében.

5.3.2 A HLA SSP típus-meghatározó teszt kivitelezése

- (1) Egy DNS minta HLA típus-meghatározásához PCR reakciókat végzünk PCR csövenként 10 μl rakciótérfogattal. A fekete jelzés segít a PCR tömb megfelelő beállításban **BLOCK** (H1 pozíció).
- (2) Eppendorf reakciócsőben készítsünk **minden típus-meghatározó teszthez mester mixet** a következő komponensekből:

PCR koktél **CK**
 Taq DNS polymeráz (5 U/μl)
 dH₂O
 (lásd a különféle konfigurációkat a következő táblázatban)

Jól keverjük el és pipettázzunk 10 µl keveréket a negatív kontrollhoz **NC**. Ezt követően adjuk hozzá a DNS-t (kb. 100 ± 50 ng/µl) és keverjük el jól.

Lásd a különféle mester mix konfigurációkat a következő táblázatban:

	Mester mix konfiguráció				
PCR reakciók száma	8	18	24	48	96
PCR koktél CK	44 µl	100 µl	120 µl	228 µl	440 µl
Taq DNS polimeráz	0,7 µl	1,5 µl	1,8 µl	3,5 µl	7 µl
dH ₂ O	55 µl	125 µl	150 µl	288 µl	550 µl
DNS (kb. 100 ± 50 ng/µl)	11 µl	25 µl	30 µl	57 µl	110 µl

- (3) Ebből a master mixből, pipettázzunk 10 µl minden szárított primer mixbe. A legjobb, ha multipette segítségével végezzük a műveletet. Vigyázzunk, hogy a pipetták vége ne érintkezzen a primerrel, hogy elkerüljük a primer átvitelét. Ezért pitettázuk a master mixet a lyukak falára is.
- (4) Jól zárjuk le a PCR csíkokat a PCR fedőcsíkok vagy lezárók segítségével. Helyezzük a tálcát a thermal cycler erősítőbe és indítsuk el a PCR-t a HLA SSP programmal.

5.4 Gél elektroforézis

A PCR eredményeit agaróz gél-elektroforézissel azonosítjuk, amelyet a DNS spirálok kimutatása követ UV fény segítségével.

5.4.1 Reagensek előkészítése

- **5x TBE puffer** (0.445 M tris-borát, 0.0125 M EDTA):
54 g Tris(hydroximetil)-aminometán (lúg)
27,5 g Bórsav (H₃BO₃)
4,65 g Diszódium EDTA
adjunk hozzá 1000 ml desztillált vizet, és tároljuk szobahőmérsékleten.
- **Etidium bromid oldat** (10 mg/ml)
Oldjunk fel 100 mg etidium bromidot 10 ml desztillált vízben, és tároljuk fénytől védve 2...8 °C-on.
Figyelem: Az etidium-bromid mutagén és toxikus. Mindig viseljen védőkesztyűt, amikor etidium-bromiddal dolgozik (hígított forma esetében is). Bőrrel való érintkezés esetén mossa le azonnal bőséges vízzel.
- **1x TBE puffer**
1:5 végleges hígítású 5x TBE puffer oldat demineralizált vízben.

5.4.2 A gél elektroforézis elvégzése

2 %-os agaróz oldatot készítünk 5 g agaróz 250 ml 1x TBE -ben történő forralásával, amíg az oldatban teljesen feloldódik. Az oldatot keverés mellett hűtse le 60°C alá, és adjon hozzá 4µl etidium bromidot. Ezt követően öntse az agaróz oldatot - buborékmentesen - egy előkészített, lezárt géltálcába Helyezze be a fésűt (10µl-es zsebek), és tartsa szobahőmérsékleten legalább 10 percig.

Amikor az agaróz megszilárdult, helyezzük a gél a gélkamrába. A fésűt eltávolítjuk, és a gél lefedjük 1 x TBE-vel. A gélzsebeket teljesen el kell lepnie a puffernek. Pipettázza a teljes PCR keveréket (10µl) a gélzsebekbe. Hogy ellenőrizni tudjuk a PCR termékeinek méretét, ajánlatos megfelelő molekulásúly standardot (50-1000bp marker) alkalmazni az elektroforézishez.

Az elektroforézis 15 - 25 perc alatt zajlik le 8V/cm-nél (az elektródák távolsága). A krezolvörös vándorlási távolsága 1-1,5cm lehet.

5.4.3 Dokumentáció

Az elektroforézis lezajlását követően a gélt UV transzilluminátorra helyezzük, és dokumentációs és értelmezési célból lefotózzuk.

Figyelem: Viseljen UV-szűrős védőszemüveget, és ne nézzen közvetlenül az UV fényforrásba, amikor a géleket nézi vagy fotózza.

6. Eredmények

6.1 Értékelés












A HLA primer keverék kontroll primereket tartalmaz, amelyek felerősítik a humán növekedési hormon (HGH) 1069 bp fragmentumát. Ezeknek a primereknek a koncentrációja alacsonyabb, mint az allél-specifikus primer pároké, és céljuk, hogy belső kontrollt biztosítsanak a sikeres PCR erősítéshez. Ez az amplifikáció lényegében mindig létrejön, vagyis az allél- vagy csoport-specifikus PCR fragmentum jelenlétében és hiányában egyaránt. A kontroll-sávot ezért lényegében mindig látni lehet minden PCR reakciónál. Időről időre gyengén jelenhet meg, vagy teljesen hiányozhat a kontrollcsík valamely allél-specifikus HLA PCR termék jelenlétében. Ez nem korlátozza a módszert, mivel a specifikus csík kontrollt biztosít a futó PCR sikerességére vonatkozóan.

A primerek összetétele lehetővé teszi a HLA jellemzők pozitív azonosítását. A magyarázat azon alapul, hogy adott specifikus csík megjelenik-e a gélben vagy nem.

A felerősített DNS fragmentumok méretét nem kell figyelembe venni a teszt kiértékelésekor, ugyanakkor segítséget jelenthetnek a teszt értelmezésénél.

Értékelésnél a specifikus sávok mintázatát átvisszük a rendelkezésre bocsátott eredményívrre, és a típus-meghatározás eredményét a reakcióminta segítségével olvassuk le.

Gél-interpretáció

	Pozitív reakció	negatív reakció	nincs erősítés	
Gélzseb				
Kontroll csík	semmi	-----		semmi
Specifikus csík			semmi	semmi
Primer dimer				

6.2. A kivitelezés korlátai

1. A használt DNS minőségétől és mennyiségétől függően a csíkok intenzitása változhat. A PCR termék mennyisége megfelel a csíkok intenzitásának, amelyek az UV fénynél láthatóvá válnak.
2. Amennyiben 1 vagy 2 PCR erősítés sikertelen, meg kell állapítanunk, hogy pozitív értékelésük ad-e típus-meghatározási eredményt. Ebben az esetben a tesztet meg kell ismételni. Amennyiben a hiányzó erősítések pozitív értékelése nem ad típus-meghatározási eredményt, és amennyiben határozottan bizonyítható a két allél megléte, nincs szükség további intézkedésekre. Azonban abban az esetben, ha csak egy allél látható, a tesztet meg kell ismételni.
3. Más Taq DNA polimeráz használata, mint amelyet a PE Applied Biosystems ajánl, hibákat okozhat, és nem-specifikus hamis pozitív PCR amplifikációkat eredményezhet.
4. A DNS mintát azonnal az izolálást követően használjuk, vagy tárolhatjuk – 20 °C-on vagy ez alatt hosszabb ideig (1 éven át) anélkül, hogy az eredményeket ez rontaná.
5. A teszt eredményességét csak akkor lehet garantálni, ha a csatolt információkat szigorúan betartjuk.
6. Ezt a tesztet csak iniciális HLA típus-meghatározáshoz lehet használni. Egyéb klinikai és diagnosztikai eredményeket is fel kell használni a transzplantációra való alkalmasság meghatározásához.
7. A Bio-Rad HLA SSP típus-meghatározó készlet nem alkalmas az összes kombináció felderítésére.

6.3 Minőségkontroll

Minden előállított szériát egy DNS minta panellel ellenőrzünk, amely a primerek által kimutatott specifikumokra reprezentatív, és kérésre rendelhető.

Az új szériaszámok minőségellenőrzését ismert heterozigóta allél-kombinációk típus-meghatározásával lehet végezni, amelyek reakcióba lépnek a legtöbb primer keverékkel a készletben.

6.4 Specifikus teljesítmény-jellemzők

A Bio-Rad SSP tipizáló készletét összehasonlítottuk egy SSP tipizáló készlettel és egy SSO tipizáló rendszerrel 167 minta tesztelése során (véletlenszerűen kiválasztott transzplantációs jelöltek és potenciális donorok) két földrajzilag eltérő helyszínen. 100% konkordanciát (167/167) tapasztaltunk a Bio-Rad SSP tipizáló készlet eredményei és az SSP és SSO tesztek eredményei között.

	Egyező	Nem egyező	Összes	%
N	167	0	167	100
%	100%	0%		

N= Minták száma

7. Problémamegoldás

PROBLÉMA	OK	MEGOLDÁS
Nincsenek látható csíkok	Az etidium bromid hiányzik a gélből.	A gél újrafestése a festékfürdőben (1xTBE puffer 0,5 µg/ml etidium bromiddal).
MW standard látható PCR termékek nem láthatók	Helytelen PCR előkészítés: Elfelejtett hozzáadni DNS-t vagy Taq-polimerázt	Ismételje meg a PCR előkészítését
	Rossz hőkezelő erősítési feltételek	Ellenőrizze a PCR programot a thermal cycler erősítőben. A bemutatott program az ajánlott PE 9600, PE 9700 thermal cycler erősítőkhöz alkalmazható. Az ajánlott thermal cycler erősítőktől eltérő eszközöket a felhasználónak validálnia kell. Az ajánlott termikus keringető erősítőktől eltérő eszközöknek eltérő fűtő és hűtő sebességük lehet. <u>A PCR program lehetséges variációi:</u> Amennyiben nem specifikus erősítések történnék, szigorúbb feltételeket lehet teremteni azzal, ha 1 °C-al megemeljük a hőkezelési hőmérsékletet. Másrészt, hamis negatív erősítést okozhatnak a túlságosan szigorú PCR feltételek. Ilyen esetben javasolt járulékosan csökkenteni az 1 °C-al történő járulékos hőmérsékletemelést. Növelje meg a denaturációs időt 10-ről 20 másodpercre. Növelje meg az extenziós időt 30-ről 60 másodpercre.
Egy vagy több PCR erősítés sikertelen (kontroll csíkok és specifikus amplifikációk).		Amennyiben 1 vagy 2 PCR erősítés sikertelen, meg kell állapítanunk, hogy pozitív értékelésük ad-e típus-meghatározási eredményt. Ebben az esetben a tesztet meg kell ismételni. Amennyiben a hiányzó erősítések pozitív értékelése nem ad típus-meghatározási eredményt, és amennyiben határozottan bizonyítható a két allél megléte, nincs szükség további intézkedésekre. Azonban abban az esetben, ha csak egy allél látható, a tesztet meg kell ismételni. Azonban abban az esetben, ha több mint 2 PCR erősítés sikertelen, a tesztet meg kell ismételni.
Gyenge specifikus csíkok láthatók a gélből, nincs vagy nagyon gyenge kontroll csíkok vannak.	Nem elegendő a felhasznált DNS mennyisége.	Duplázzuk meg a DNS mennyiséget (csökkentsük a dH ₂ O az előkészítésnél); használjunk kb. 100 ng DNS-t PCR készítményenként.
	PCR gátlók, mit az etanol, hemoglobin, heparin, mikrogyöngyök vannak a készítményben.	Használjunk EDTA vagy citrát vért alapanyagként; (a DNS pellet etanolban történő mosása után ellenőrizzük, hogy elég száraz-e).
	A DNS oldat pH-ja túlságosan savas (A PCR koktél színe megváltozik a DNS hozzáadását követően)	Csapassuk ki újra a DNS-t és oldjuk desztillált vízben.
	Nem megfelelő hőmérsékletű keringető feltételek.	Lásd fent.
Gyenge specifikus csíkok láthatók a gélből	A DNS koncentrációk túl magasak	Hígítsuk a DNS-t; a túl magas DNS koncentrációk, vagy a nem megfelelően oldódott DNS miatt egyes esetekben a specifikus csíkok nem adnak eredményt.
	A DNS-t olyan pufferben oldottuk fel, amely PCR reakció gátlószert tartalmaz.	Csapassuk ki újra a DNS-t és oldjuk desztillált vízben.
	Rossz hőkezelő erősítési feltételek	Lásd fent.
Kontroll csíkok vannak, specifikus csíkok vannak de ezeken kívül egy vagy több gyenge, nem specifikus csík is megjelenik (hamis pozitív reakciók)	A DNS koncentrációk túl magasak	Hígítsuk a DNS-t.
	Keresztreakciók más allélekkel	Ellenőrizzük a reakciómintát.
	Nem megfelelő a DNS minősége , vagy szennyezett a DNS.	Izoláljunk új DNS-t
Csíkok láthatók a negatív kontroll PCR keverékében	Véletlenül DNS-t pipettáztunk a negatív kontroll keverékbe	Lehetőség szerint ismételjük meg az előkészítést, vagy készítsünk feljegyzést a kiértékelő dokumentumokban.
	A reagensek kontaminációja	Cseréljük le a reagenseket

8. Literatur/ Referenciák/ Références bibliographiques/ Bibliografia/ Bibliografía

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 M, 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.