

SE

HLA SSP Kits

Kit klart för användning med SSP reagens för DNA baserad HLA typning

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

Att observera för användaren:

SSP TYPING KITS WITH TAQ-POLYMERASE - LIMITED LICENSE:

The purchase price of this product includes limited, non-transferable rights under U.S. Patents 4,683,202, 4,683,195 and 4,965,188 and their foreign counterparts, owned by Roche Molecular Systems, Inc. and F. Hoffmann-La Roche Ltd ("Roche"), to use only this amount of the product to practice the Polymerase Chain Reaction ("PCR") Process described in said patents solely for the HLA Typing applications of the purchaser solely for organ or tissue or bone marrow transplantation, and explicitly excludes analysis of forensic evidence or parentage determination. The right to use this product to perform and to offer commercial services for HLA Typing for organ or tissue transplantation using PCR, including reporting the results of the purchaser's activities for a fee or other commercial consideration, is also hereby granted. Further information on purchasing licenses to practise PCR may be obtained by contacting, in the United States, the Director of Licensing at Roche Molecular Systems, Inc. 1145 Atlantic Avenue, Alameda, California 94501, and outside the United States, the PCR Licensing Manager, F. Hoffmann-La Roche Ltd, Grenzacherstr. 124, CH-4070 Basel, Switzerland.

SSP TYPING KITS WITHOUT TAQ-POLYMERASE - DISCLAIMER OF LICENSE:

This product is optimized for use in the Polymerase Chain Reaction ("PCR") Process which is covered by patents owned by Roche Molecular Systems, Inc. and F. Hoffmann-La Roche Ltd ("Roche"). No license under these patents to use the PCR Process is conveyed expressly or by implication to the purchaser by the purchase of this product. Further information on purchasing licenses to practise PCR may be obtained by contacting, in the United States, the Director of Licensing at Roche Molecular Systems, Inc. 1145 Atlantic Avenue, Alameda, California 94501, and outside the United States, the PCR Licensing Manager, F. Hoffmann-La Roche Ltd, Grenzacherstr. 124, CH-4070 Basel, Switzerland.

BLOCK	PCR-block	NC	Negativa kontrollen	CK	PCR-cocktailen
--------------	-----------	-----------	---------------------	-----------	----------------

INNEHÅLL

1.	Inledning	4
1.1	Avsedd användning.....	4
1.2	Teoretisk bakgrund.....	4
1.3	Metodbeskrivning.....	4
2.	Material	4
2.1	Innehållet i HLA SSP-kiten.....	4
2.2	Varningar och försiktighetsåtgärder.....	5
2.3	Förvaring och hållbarhet.....	5
3.	Nödvändig apparatur	5
3.1	Programmering av termocycel.....	5
3.2	Gelelektrofores.....	5
4.	Provmaterial	6
4.1	DNA-isolering.....	6
4.2	Provens förberedelse.....	6
5.	Testutförande	6
5.1	Nödvändigt material.....	6
5.2	Material som erfordras men inte medföljer.....	6
5.3	PCR.....	7
5.4	Gelelektrofores.....	8
6.	Resultat	9
6.1	Utvärdering.....	9
6.2	Metodens begränsningar.....	9
6.3	Kvalitetskontroll.....	9
6.4	Specifik karakterisering.....	10
7.	Felsökning	11
8.	Litteratur	12

1. Inledning

1.1 Avsedd användning

HLA SSP-kiten (SSP, sekvensspecifika primers) är avsedda för bestämning av HLA klass I- och klass II-egenskaper på DNA-nivå.

1.2 Teoretisk bakgrund

HLA-systemet är ett komplext, kodominant ärftligt antigensystem som spelar en viktig roll för immunsystemets förmåga att skilja mellan "eget" och "främmande". Ett av huvudkriterierna för att ett främmande organ skall överleva efter en organtransplantation är kompatibiliteten mellan donatorns och mottagarens HLA-antigener. Det är därför av avgörande betydelse att bestämma HLA-antigenerna vid val av mottagare och donator.

Tack vare introduktionen av DNA-baserade påvisningsmetoder har nya möjligheter öppnats för den moderna diagnostiken. Ibland skiljer sig HLA-antigener från varandra endast genom en enda aminosyra på polypeptidkedjan. Det är därför nästan omöjligt att skilja dessa till största delen identiska strukturer åt med hjälp av serologin. Den serologiska metodens upplösningsförmåga är således begränsad. Eftersom DNA-sekvenserna hos de flesta HLA-alleler nu är kända, är det möjligt att identifiera variationer i dessa sekvenser med hjälp av syntetiska oligonukleotider. Genom amplifiering av genomiskt DNA (PCR, Polymerase Chain Reaction) med specifika primerpar (SSP, Sequence Specific Primers) är det nu möjligt att identifiera ett stort antal av de hittills kända HLA-allelerna.

1.3 Metodbeskrivning

HLA SSP-kiten är testsystem för typning av HLA-egenskaper med hjälp av PCR-tekniken. För denna typning använder SSP-metoden allel-specifika primers i amplifieringsreaktionen. Metoden är baserad på principen att endast primers, vilkas sekvenser är fullständigt komplementära till målsekvensen hos ett föreliggande DNA-prov, binder till detta DNA och bildar ett amplifikat i PCR-reaktionen. Icke-komplementära primers däremot binder inte till DNA:et och ingen amplifiering äger rum.

Påvisning av det amplifierade DNA:et sker med hjälp av agaros-gelelektrofores. En framgångsrik amplifiering resulterar i ett DNA-fragment av definierad längd som framträder som ett band på gelen. Om ingen amplifiering ägt rum, saknas detta band.

Primermixarnas sammansättning tillåter en entydig identifiering av HLA-egenskaper. Användningsområden för påvisningssystemet är bestämning av individuella HLA-alleler hos organdonatorer och -mottagare liksom hos patienter som erhåller substitutionsbehandling med blodtransfusioner eller -komponenter.

2. Material

2.1 Innehållet i HLA SSP-kiten

Innehållet i HLA SSP-kiten räcker till 24 tester.

- 24 PCR-block **BLOCK**, vart och ett bestående av PCR-rör som innehåller de torkade primer-/nukleotidblandningarna. Som orienteringshjälp finns en svart markering vid position 1 (=H1).
- PCR-cocktail **CK** (bruksfärdig)
PCR-cocktailen innehåller PCR-buffert (slutgiltig koncentration: 1,5 mM MgCl₂, 50 mM KCl, 10 mM tris-HCl, 0,001 % gelatin), kresolrött och glycerin.
- PCR-lockremsor eller PCR-täckfolie
- Utvärderingsscheman, reaktionsschema, primerpositioner

Den negativa kontrollen **NC** medföljer som extra PCR-rör (färglöst), om den inte redan är integrerad i PCR-blocket **BLOCK**.

2.2 Varningar och försiktighetsåtgärder

Reagenserna är endast avsedda för in vitro-diagnostik [IVD].

Observera! Testen får endast utföras av skolad och auktoriserad laboratoriepersonal.

Observera! Var noga med att iaktta de föreskrifter som gäller för god labororiesed vid hantering av reagenserna. Patientmaterialet skall betraktas som potentiellt infektiöst. Pipettera inte med munnen.

Observera! Alla testreagenser skall hanteras som om de vore potentiellt infektiösa. Vidta nödvändiga försiktighetsåtgärder.

Observera! Använda PCR-block skall hanteras som om de vore potentiellt infektiösa. Avfallshantering skall ske i enlighet med gällande nationella bestämmelser.

Observera! Reagenserna får inte användas efter det bäst-före-datum som anges på etiketterna.

Observera! Reagenser som misstänks vara mikrobiellt kontaminerade får inte användas.

Observera! Använd skilda pipettuppsättningar för pre-PCR-området och post-PCR-området.

Observera! **Etidiumbromid** som används för infärgning av DNA:et vid gelelektrofores är **potentiellt cancerogen**. Använd alltid skyddshandskar vid arbeten med infärgade geler. Avfallshantering skall ske genom förbränning.

Observera! Använd alltid ett UV-blockerande ögonskydd vid arbeten med UV-ljus.

För ytterligare information tillhandahåller Biotest varuinformationsblad för alla reagenser.

2.3 Förvaring och hållbarhet

SSP-reagenserna måste förvaras vid 2-8 °C. Bäst-före-datumet är angivet på kitkomponenternas förpackningar.

PCR-blocken [BLOCK] är insvetsade i påsar. Återstående, oanvända block skall förvaras i originalförpackningen, vilken försluts med tejp för att utestänga fuktighet. Block i brutna förpackningar skall förbrukas inom 4 veckor.

3. Nödvändig apparatur

3.1 Programmering av termocykel

Program HLA SSP				
Initial denaturering:	94 °C	2 min		
Denaturering:	94 °C	10 sek]	10 cykler
Annealing & Extension:	65 °C	60 sek		
Denaturering:	94 °C	10 sek]	20 cykler
Annealing:	61 °C	50 sek		
Extension:	72 °C	30 sek		

PCR-programmet är adapterat till termocyklar från Perkin Elmer. Uppvärmnings-/nedkylningshastigheten för PE 9700 uppgår i genomsnitt till 1 °C/sekund för proven. Den genomsnittliga temperaturnoggrannheten uppges till ± 0,25 °C inom temperaturområdet 35-100 °C. Användaren måste själv validera andra termocyklar om sådana används. För termocyklar som inte har någon justerbar tryckplatta krävs en adaptermatta för att säkerställa bästa möjliga värmeöverföring mellan värmelocket och PCR-rören.

3.2 Gelelektrofores

Utförande av gelelektroforesen, se kapitel 5.

4. Provmaterial

4.1 DNA-isolering

Genomiskt DNA kan utvinnas ur alla kärnhaltiga celler. Den enklaste metoden är att isolera DNA från cellsuspensioner (blod, buffy coat, odlade celler). Det finns en hel rad protokoll för isolering av DNA ur celler. När det gäller PCR-SSP-testning kommer endast sådana metoder i fråga som ger DNA i tillräcklig kvalitet och kvantitet för PCR-reaktionen, som t ex utsaltningsmetoden (2).

Bland de kommersiella DNA-extraktionskits som är lämpade kan nämnas "Puregene" från Gentra Systems och "Super Quick Gene" från Analytical Genetic Testing Center.

4.2. Provens förberedelse

4.2.1 Prov

För typningen krävs antikoagulerat, perifert blod (t ex natriumcitrat, EDTA). Information om blodprovns förvaring och stabilitet skall inhämtas hos återförsäljaren/tillverkaren av DNA-extraktionskitet och måste valideras av användaren.

4.2.2 Kontaminering

Föroreningar av DNA:et genom PCR-inhibitorer som hemoglobin, heparin, etanol m fl kan leda till avsevärda störningar i PCR-reaktionen. Av denna anledning skall t ex **inte** heparinblod användas som utgångsmaterial vid DNA-isoleringen, utan citrat- eller EDTA-blod. Om patienten heparinbehandlas måste eventuellt en annan DNA-isoleringsmetod tillämpas eller ett annat utgångsmaterial användas för DNA-isoleringen.

4.2.3 Hemolyserat provmaterial

Undvik användning av lipemiska eller hemolyserade prov. Det rekommenderas att inte heller använda prov utan antikoagulan eller prov som frusits in/tinats upp upprepade gånger. Under sådana betingelser är det inte garanterat att DNA:et som skall isoleras ur proven föreligger i tillräcklig kvalitet och kvantitet.

4.2.4 DNA-kvantitet

Det isolerade DNA-provet skall resuspenderas i sterilt, destillerat vatten och koncentrationen ställas in på 100 ± 50 ng/ μ l. DNA:et **får inte resuspenderas** i lösningar som innehåller chelatbildare som t ex **EDTA** i en koncentration $> 0,5$ mM.

4.2.5 DNA-kvalitet

Bestämning av DNA-koncentrationen sker genom mätning av den optiska densiteten (OD) vid 260 nm (A_{260}). Värdet $A_{260} = 1$ (= 1 OD) motsvarar ca 50 μ g/ml dubbelsträngat DNA. För att bestämma föroreningsgraden av DNA:et med protein mäts absorbansen dessutom vid 280 nm och kvoten A_{260}/A_{280} beräknas. Rent DNA uppvisar ett förhållande A_{260}/A_{280} på 1,8 eller högre. Värdet för A_{260}/A_{280} som ligger under 1,8 är ett tecken på föroreningar genom protein.

Vid ett värde för $A_{260}/A_{280} = 1,5$ ligger proteinandelen i DNA-preparationen vid ca 50 %.

För att uppnå goda PCR-SSP-testresultat krävs DNA med en A_{260}/A_{280} -kvot på $\geq 1,6$.

☞ DNA:ets renhet och koncentration är av avgörande betydelse för optimala testresultat.

Isolerat DNA kan lagras vid -20 °C under en längre tid (över ett år).

Detaljer beträffande DNA:ets lagring och stabilitet framgår av den tekniska information som ges av tillverkaren för det använda DNA-extraktionskitet.

5. Testutförande

5.1 Nödvändigt material

Se punkt 2.1 "Innehållet i HLA SSP-kiten".

5.2 Material som erfordras men inte medföljer

5.2.1 Provmaterial (DNA)

- UV-spektrofotometer

5.2.2 PCR

- Taq DNA polymeras (5 U/μl, t ex Perkin Elmer)
- termocykel med uppvärmbart lock (t ex PE 9600, PE 9700 från Perkin Elmer)
- inställbara pipetter
- Eppendorf Multipette med Combitips (10 μl)
- pipettspetsar med filter
- destillerat vatten (dH₂O)

5.2.3 Gelelektrofores

- Agaros (för molekylärbiologin)
- elektroforeskammare (passande för gel med minst 25 brunnar)
- 5 x TBE-buffert
 - tris(hydroxymetyl)-aminometan (base)
 - borsyra (H₃BO₃)
 - Na₂EDTA
- etidiumbromidlösning (10 mg/ml)
- DNA-stoleksstandard (50-1000 bp markör) (inte tvingande)
- magnetomrörare med värmeplatta eller mikrovåg
- inställbara pipetter
- polaroid-kamera med UV-filter, polaroidfilm typ 667
- UV-transilluminator (~ 200 - 300 nm)
- nätenhet
- destillerat vatten (dH₂O)

5.3 PCR (Polymerase Chain Reaction)

5.3.1 Försiktighetsåtgärder

PCR är en ytterst känslig metod som på ett effektivt sätt kan amplifiera minimala mängder DNA. Det betyder emellertid även att t o m spår av kontaminerande DNA i ett prov kan amplifieras i PCR-reaktionen och förfälska testresultatet. En speciell kontamineringskälla är amplifierat DNA som kommer i kontakt med prov som ännu inte har amplifierats. För att undvika kontaminering med amplifierat material rekommenderas det att skilja arbetsområdena åt enligt följande:

1. Pre-PCR-område
Alla arbeten som utförs före PCR (DNA-isolering och lagring, beredning av PCR, framställning och lagring av reagenser och lösningar för DNA-extraktion och PCR).
2. Post-PCR-område
Termocykel, gelelektrofores, utvärdering, lagring av amplifierat DNA.
Apparatur och förbrukningsmaterial från post-PCR-området får inte komma inom pre-PCR-området.
3. Använd pipetter med aerosolskydd inom pre-PCR-området (pipettspetsar med filter). Det rekommenderas att inkludera en negativ kontroll vid varje amplifiering för att på så sätt indikera kontaminering med främmande DNA.

5.3.2 Utförande av HLA-SSP-typningstesten

- (1) För HLA-typning av ett DNA-prov utförs PCR-reaktioner med en reaktionsvolym på 10 μl per PCR-rör. Den svarta markeringen på PCR-blocket **BLOCK** tjänar som orienteringshjälp (position H1).
- (2) Bered för **varje typning** en **mastermix** med följande komponenter i ett Eppendorf-kärl:
 - PCR-cocktail **CK**
 - Taq DNA polymeras (5 U/μl)
 - dH₂O

Blanda noggrant och tillsätt 10 μl av blandningen till **NC**. Tillsätt först därefter DNA:et (ca 100 ± 50 ng/μl) och blanda noggrant.

Vilka volymer som skall pipetteras för respektive testkonfigurering framgår av nedanstående tabell:

Antal PCR-reaktioner	Sammansättning av mastermixen				
	8	18	24	48	96
PCR-cocktail CK	44 µl	100 µl	120 µl	228 µl	440 µl
Taq DNA polymeras	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
DNA (ca 100 ± 50 ng/µl)	11 µl	25 µl	30 µl	57 µl	110 µl

- (3) Pipettera 10 µl av denna mastermix till var och en av de torkade, specifika primermixarna. Detta görs bäst med hjälp av en Multipette. Se till att pipettspetsen inte kommer i beröring med primrarna. För att undvika överföring av primers skall mastermixen pipetteras mot rörets innervägg.

Förslut PCR-stripsen med hjälp av bifogade PCR-lockremsor/folie. Överför plattan till termocykeln och starta PCR-reaktionen med programmet HLA SSP.

5.4 Gelelektrofores

Påvisning av PCR-produkterna sker genom agaros-gelelektrofores och efterföljande detektion av DNA-banden i UV-ljus.

5.4.1 Reagensernas förberedelse

- **5 x TBE-buffert** (0,445 M tris-borat, 0,0125 M EDTA):
54 g tris(hydroxymetyl)-aminometan (base)
27,5 g borsyra (H₃BO₃)
4,65 g Na₂EDTA
ad 1000 ml med aqua dest., lagring vid rumstemperatur
- **Etidiumbromidlösning** (10 mg/ml)
Lös upp 100 mg etidiumbromid i 10 ml dH₂O och lagra vid 2-8 °C skyddat mot ljus.
Observera! Etidiumbromid är mutagen och toxisk. Använd alltid skyddshandskar vid hantering av etidiumbromid (även i utspädd form). Vid kontakt med huden, tvätta omedelbart med rikligt med vatten.
- **1 x TBE-buffert**
1:5 slutgiltig spädning av 5 x TBE-bufferten i demineraliserat vatten.

5.4.2 Utförande

Bered en 2-procentig agarosgel. För detta ändamål skall 5 g agaros kokas upp i 250 ml 1 x TBE, tills lösningen är klar. Låt lösningen kallna till < 60 °C. Pipettera ner 4 µl etidiumbromidlösning. Fyll agaroslösningen i de förberedda och tätade gelträgen. Se till att inga blåsor bildas. Sätt ner kammar för bildning av 10 µl-brunnar.

Efter polymerisationen (ca 30 min vid rumstemperatur) skall gelen sättas in i den med 1 x TBE fyllda elektroforeskammaren. Ta bort kammarna. Gelbrunnarna skall vara komplett täckta med bufferten. Ta bort locken/folien och pipettera den kompletta PCR-beredningen (10 µl) i gelbrunnarna.

För att kontrollera storleken på PCR-produkterna rekommenderas det att inkludera en lämplig molekylärviktsstandard (50-1000 bp markör) vid elektroforesen.

Elektroforesen körs under 15-25 minuter vid 8 V/cm (elektrodavstånd).

5.4.3 Dokumentation

Efter avslutad elektrofores läggs gelen på en UV-transilluminator (med lämpligt ansiktsskydd mot UV-strålar). En polaroidbild kan tas för tolkning och dokumentering av resultatet.

6. Resultat












6.1 Utvärdering

Biotest HLA-primermixarna innehåller kontrollprimers som amplifierar ett 1069 bp långt fragment av det humana tillväxthormonet (human growth hormone, HGH). Dessa primers har en lägre koncentration än de allel-specifika primerparen och tjänar som kontroll för att PCR-reaktionen har förlöpt framgångsrikt. Amplifiering äger principiellt alltid rum, dvs både i närvaro och i frånvaro av ett allel- eller grupp-specifikt PCR-fragment. Kontrollbandet kan därför i allmänhet alltid visualiseras i alla PCR-reaktioner. Ibland kan kontrollbandet synas svagt eller t o m fullständigt utebli i närvaron av en HLA-specifik PCR-produkt. Detta innebär ingen begränsning av metoden, eftersom det specifika bandet gör det möjligt att kontrollera att PCR-reaktionen har varit framgångsrik.

Tolkningen av testen är baserad på huruvida ett specifikt DNA-band förekommer på gelen eller inte. När testen utvärderas behöver ingen hänsyn tas till storleken på de amplifierade DNA-fragmenten, men den kan vara till hjälp när testen tolkas.

För utvärdering överförs mönstret för de specifika banden till det bifogade utvärderingsschemat och typningsresultatet avläses med hjälp av reaktionsschemat.

Tolkning av gel

	positiv reaktion	positiv reaktion	negativ reaktion	ingen amplifiering
Gelbrunn				
Kontrollband	saknas	-----		saknas
Specifikt band			saknas	saknas
Primerband				

6.2 Metodens begränsningar

1. Det positiva bandets intensitet kan variera beroende på det använda DNA:ets kvalitet och mängd. PCR-produktens kvalitet motsvarar intensiteten hos banden som visualiseras med UV-ljuset. Om kontrollbanden uteblir och inga alleler kan identifieras på ett entydigt sätt skall testen upprepas.
2. DNA-prov skall användas omedelbart efter isolering. Längre tids lagring (över 1 år) är möjlig vid -20°C .
3. Resultatens riktighet kan endast garanteras om alla instruktioner som ges här följs strikt.
4. Denna test får endast användas för initial HLA-typning. Ytterligare kliniska och diagnostiska resultat skall beaktas vid bedömning av lämplighet för transplantation.
5. Bio-Rad HLA SSP-typningskiten kan inte identifiera alla allelkombinationer.

6.3 Kvalitetskontroll

Varje enskilt primerpar i produktloterna kontrolleras mot en DNA-panel. En kvalitetskontroll för nya loter skall utföras med heterozygota allelkombinationer som reagerar med de flesta primermixar som ingår i kitet.

6.4 Specifik karakterisering

167 probander (slumpartat utvalda transplantationsmottagare och potentiella donatorer från 2 geografiskt skilda områden) testades i jämförande syfte med Bio-Rad SSP-kits och andra kommersiella SSP- och SSO-kits. En 100-procentig överensstämmelse (167/167) förelåg mellan resultaten i Bio-Rad SSP-testerna och de andra SSP- och SSO-resultaten.

	Överens- stämmelse	Ej överensstämmelse	Totalt	%
N	167	0	167	100
%	100 %	0 %		

N = antal prov

7. Felsökning

PROBLEM	ORSAK	ÅTGÄRD
Agarogel-elektrofores		
Inga band synliga.	Ingen etidiumbromid i gelen.	Färga om gelen i färgbadet (1xTBE buffert med 0,5 µg/ml etidiumbromid).
Svagt specifika band på gelen, inga kontrollband.	DNA från heparin-blod.	Använd EDTA- eller citratblod som utgångsmaterial.
	Etanolrester i DNA:et.	Torka DNA-pelleten noggrant efter tvättning med etanol.
	För litet DNA har använts.	Använd ca 100 ng DNA per PCR-reaktion.
PCR-produkter ej synliga, MW-standard synlig.	Termocykelprogram	Kontrollera PCR-programmet i termocykeln. Det beskrivna programmet gäller för de rekommenderade termocyklarna från Perkin Elmer. Andra termocyklar måste valideras av användaren.
		Förläng denatureringstiden från 10 till 20 sekunder.
		Förläng extensionstiden från 30 till 60 sekunder.
		Andra termocyklar än de som rekommenderas kan ha andra uppvärmnings- och nedkylningshastigheter. I sådana fall är det lämpligt att variera PCR-protokollet. Om ospecifika amplifieringar uppträder, kan stringentare reaktionsbetingelser skapas genom att stegvis höja annealingtemperaturen med 1 °C.
		Å andra sidan kan falskt negativa amplifieringar bero på alltför stringenta PCR-betingelser. I sådana fall är det lämpligt att stegvis sänka annealingtemperaturen med 1 °C.
Kontrollband saknas sporadiskt.		Om entydig påvisning av två alleler är möjlig, behöver inga åtgärder vidtas. Om så inte är fallet, rekommenderas det att upprepa testen. Om två alleler inte kan bestämmas positivt, rekommenderas det att upprepa testen.

8. Litteratur

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.