

HLA SSP

Handelsform

HLA-A SSP	REF 826 201	€ 0197	24 PCR-Reaktionen
HLA-B SSP	REF 826 206	€ 0197	48 PCR-Reaktionen
HLA-C SSP	REF 826 212	€	18 PCR-Reaktionen
DRB SSP	REF 826 215	€ 0197	24 PCR-Reaktionen
DQB SSP	REF 826 220	€	8 PCR-Reaktionen
ABDR SSPtray	REF 826 230	€ 0197	96 PCR-Reaktionen
ABC SSPtray	REF 826 240	€ 0197	93 PCR-Reaktionen

Kurzanleitung

Vor Erstanwendung eines HLA SSP Kits ist die ausführliche Gebrauchsanweisung auf <http://www.bio-rad.com> einzusehen!

[BLOCK] PCR-Block **[NC]** Negativkontrolle **[CK]** PCR-Cocktail

Verwendungshinweis

HLA SSP Kit (SSP, Sequenz Spezifische Primer) wird zur Bestimmung der HLA Merkmale auf DNA Ebene eingesetzt.

Material

Inhalt des HLA SSP Kits

Der Inhalt der HLA SSP Kits ist ausreichend für 24 Tests.

- 24 PCR-Blöcke **[BLOCK]**, bestehend aus PCR-Gefäßen, die die getrockneten Primer/ Nukleotidgemische enthalten. Als Orientierungshilfe ist an der Position 1 (=H1) eine schwarze Markierung angebracht.
- PCR-Cocktail **[CK]** (gebrauchsfertig)
- Der PCR-Cocktail beinhaltet PCR-Puffer, Kresolrot und Glycerin.
- PCR-Deckelstreifen oder Abdeckfolien
- Auswerteschemata, Reaktionsschema, Primerpositionen
- Eine Negativkontrolle **[NC]** ist als zusätzliches PCR-Röhrchen (farblos) beigelegt, wenn sie nicht bereits im PCR-Block **[BLOCK]** integriert ist.

Allgemeine Sicherheitshinweise

Reagenzien nur zur in-vitro Diagnostik **[IVD]**

Achtung: Der Test ist nur von geschultem und autorisiertem Fachpersonal durchzuführen.

Achtung: Verwendung aller Reagenzien nur unter Beachtung der im Labor gültigen Vorschriften und Vorsichtsmaßnahmen. Patientmaterial als potentiell infektiös betrachten. Nicht mit dem Mund pipettieren.

Achtung: Alle Testreagenzien sollten als potentiell infektiös gehandhabt werden und die entsprechenden Vorsichtsmaßnahmen getroffen werden.

Achtung: Benutzte PCR Blöcke sollten als potentiell infektiös gehandhabt werden und entsprechend der gültigen nationalen Richtlinien entsorgt werden.

Achtung: Keine Reagenzien nach Ablauf der auf den Etiketten vermerkten Verfallsdaten verwenden.

Achtung: Keine Reagenzien mit Verdacht auf mikrobielle Kontamination verwenden.

Achtung: Getrennte Pipettensätze für den Prä-PCR-Bereich und den Post-PCR-Bereich verwenden.

Achtung: **Ethidiumbromid**, das zum Anfärben der DNA in der Gelelektrophorese verwendet wird, **ist potentiell kanzerogen**. Beim Arbeiten mit gefärbten Gelen immer Schutzhandschuhe benutzen. Entsorgung durch Verbrennung.

Achtung: Beim Arbeiten mit UV-Licht immer einen UV-blockierenden Augenschutz verwenden.

Für detaillierte Informationen können Sicherheitsdatenblätter für alle Reagenzien von Biotest angefordert werden.

Lagerung und Haltbarkeit

Die SSP-Reagenzien (**[BLOCK]**, **[CK]**, **[NC]**) müssen bei 2...8°C gelagert werden. Das Verfalldatum befindet sich auf den Verpackungen der Kitkomponenten. Angebrochene Verpackungen sollten innerhalb von 4 Wochen aufgebraucht werden.

Probenmaterial

DNA Quantität

Die isolierte DNA in sterilem, destilliertem Wasser resuspendieren und die Konzentration auf 100 ± 50 ng/µl einstellen. DNA **sollte nicht** in Reagenzien **resuspendiert werden**, die Chelatbildner enthalten, wie z.B. **EDTA** in einer Konzentration > 0,5 mM.

DNA Qualität

Gute PCR-SSP Testergebnisse erfordern DNA mit einem Quotienten A_{260}/A_{280} von ≥ 1,6.

- ➔ Die Reinheit und Konzentration der DNA ist von entscheidender Bedeutung für optimale Testergebnisse.

Durchführung einer HLA SSP-Typisierung

Für eine HLA Typisierung einer DNA-Probe werden PCR-Reaktionen mit einem Reaktionsvolumen von 10 µl je PCR-Röhrchen durchgeführt. Die schwarze Markierung auf dem PCR-Block **[BLOCK]** dient als Orientierungshilfe (Position H1).

Für **jede HLA Typisierung** einen **Mastermix** mit folgenden Komponenten ansetzen:

PCR-Cocktail **[CK]**
Taq DNA Polymerase (5U/µl)
dH₂O

Gut mischen und von diesem Gemisch 10 µl in die **[NC]** geben. Erst danach **Probanden-DNA** (ca. 100 ± 50 ng/µl) zugeben und gut mischen.

Die je nach Test zu pipettierenden Volumina sind der folgenden Tabelle zu entnehmen:

Anzahl der PCR Reaktionen	Zusammensetzung des Mastermixes bei:				
	8	18	24	48	96
PCR Cocktail [CK]	44 µl	100 µl	120 µl	228 µl	440 µl
Taq DNA Polymerase	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

Von diesem Mastermix sind jeweils 10 µl zu den getrockneten, spezifischen Primermixen im PCR-Block zu pipettieren. Dies erfolgt am besten mit einer Multipette. Es ist dabei zu beachten, dass die Pipettenspitze nicht mit den Primern in Berührung kommt. Um ein Verschleppen der Primer zu vermeiden ist der Mastermix an die Gefäßwand zu pipettieren.

Die PCR-Streifen fest verschließen. Die Platte in den Thermocycler überführen und die PCR mit dem Programm HLA SSP starten.

Programm HLA SSP:

Initiale Denaturierung:	94°C	2 Min.	
Denaturierung:	94°C	10 Sek.	} 10 Zyklen
Annealing & Extension:	65°C	60 Sek.	
Denaturierung:	94°C	10 Sek.	} 20 Zyklen
Annealing:	61°C	50 Sek.	
Extension:	72°C	30 Sek.	

Gelelektrophorese

Der Nachweis der PCR-Produkte erfolgt durch die Agarose-Gelelektrophorese und anschließender Detektion der DNA-Banden im UV-Licht.

Es wird ein 2 % Agarosegel hergestellt. Dazu 5 g Agarose in 250 ml 1 x TBE durch Aufkochen vollständig zur Lösung bringen. Die Lösung unter Rühren auf < 60° C abkühlen lassen und 4 µl Ethidiumbromidlösung zupipettieren. Die Agaroselösung blasenfrei in die vorbereiteten und abgedichteten Gelträger gießen. Kämme einsetzen (10 µl Taschen) und bei RT mindestens 10 Minuten stehen lassen.

Nach dem Erstarren der Agarose das Gel in die Gelkammer einsetzen. Die Kämme herausnehmen und das Gel mit 1 x TBE überschichten. Die Gelkammern sollten komplett mit Puffer bedeckt sein. Den gesamten PCR-Ansatz (10 µl) in die Gelkammern pipettieren.

Die Elektrophorese erfolgt für 15 -25 Minuten bei 8 V/cm (Elektrodenabstand). Die Laufstrecke des Kresolrots sollte ca. 1-1,5 cm betragen.

Nach Beendigung der Elektrophorese wird das Gel auf einen UV-Transilluminator gelegt und zur Interpretation und Dokumentation der Ergebnisse fotografiert.

Achtung: Gegen die UV-Strahlen einen geeigneten Gesichtsschutz tragen.

Auswertung

Die Biotest HLA-Primermixe enthalten Kontrollprimer, die ein 1069 bp langes Fragment des humanen Wachstumshormons (human growth hormone, HGH) amplifizieren. Diese Primer sind niedriger konzentriert als die allelspezifischen Primerpaare und dienen der Kontrolle über den erfolgreichen Verlauf der PCR. Die Amplifikation erfolgt in der Regel immer, d.h. sowohl in Gegenwart als auch Abwesenheit eines allel- oder gruppenspezifischen PCR-Fragmentes. Die Kontrollbande ist daher i.a. in allen PCR-Ansätzen sichtbar. In Gegenwart eines HLA-spezifischen PCR-Produkts kann die Kontrollbande schwach oder sogar völlig ausfallen. Dies stellt keine Einschränkung dar, denn in solchen Fällen ist die Kontrolle über den Verlauf der PCR durch die spezifische Bande gegeben.

Die Testinterpretation beruht darauf, ob eine spezifische DNA-Bande im Gel vorhanden ist oder nicht. Die Größe der amplifizierten DNA-Fragmente muss nicht, kann aber als Hilfestellung bei der Testauswertung berücksichtigt werden.

Eine Auswertung erfolgt mit Hilfe der beigelegten Auswerte- und Reaktionsschemata oder mit Hilfe der Bio-Rad HLA-SSP Typing Software (**[REF]** 847 075) und dem auf der Homepage hinterlegten Chargenupdate.