

# HLA SSP

## Tamaño de kit

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

## Manual resumido

Antes de usar el equipo de HLA SSP, por favor, compruebe el manual disponible en <http://www.bio-rad.com>!

**[BLOCK]** Bloque PCR    **[NC]** Control Negativo    **[CK]** Cocktail de PCR

### Ámbito de aplicación

Los equipos HLA SSP (SSP, Sequenz Specific Primer) se aplican para determinar las características de los antígenos HLA Clase I y Clase II a nivel del ADN.

### Material

#### Contenido del equipos HLA SSP

El contenido del juego HLA SSP es el suficiente para realizar de 24 ensayos.

- 24 Bloques de PCR respectivamente **[BLOCK]**, que se componen de vasos de PCR que contienen los cebadores / mezclas de nucleótidos secos. Como orientación se incluye una marca negra en la posición 1 (=H1).
- El cocktail de PCR **[CK]** (listo para su uso)  
El cocktail de PCR contiene buffer de PCR (concentración final: 1,5 mM MgCl<sub>2</sub>, 50 mM KCl, 10 mM Tris-HCl, al 0,001% Gelatina), rojo de cresol y glicerina.
- Tiras de capuchones PCR o láminas de cubierta de PCR
- Esquemas de valoración, esquemas de reacción y posición de cebadores.

Se adjunta un control negativo **[NC]** icomo tubito adicional de PCR (incolores) en caso de que no esté incluido ya en el bloque de PCR **[BLOCK]**.

### Indicaciones generales de seguridad

Reactivos para su uso exclusivo para el diagnóstico in vitro **[IVD]**

- Cuidado:** El ensayo se debe llevar a cabo exclusivamente por personal especializado instruido y autorizado.
- Cuidado:** Emplee todos los reactivos respetando siempre las normas de seguridad y medidas de precaución habituales en laboratorios. No pipetee con la boca.
- Cuidado:** Todos los reactivos de ensayo se deben manejar como sustancias potencialmente infecciosas y, por lo tanto, se deben adoptar las medidas de precaución pertinentes.
- Cuidado:** Los bloques de PCR utilizados se deben manejar como elementos potencialmente infecciosos y, por lo tanto, se tienen que eliminar siguiendo las correspondientes normas nacionales vigentes.
- Cuidado:** No emplee ningún reactivo una vez pasada la fecha de caducidad señalada en la etiqueta.
- Cuidado:** No emplee ningún reactivo que sospeche que pueda estar contaminado con microbios.
- Cuidado:** Emplee pipetas separadas en la zona Post-PCR y en la zona Pre-PCR.
- Cuidado:** El bromuro de etidio que se emplea para colorear el ADN en la electroforesis de gel **es potencialmente cancerígeno**. Utilice siempre guantes de protección cuando trabaje con geles coloreados. Elimine los residuos quemándolos.
- Cuidado:** Emplee una protección ocular que bloquee los rayos UV cuando trabaje con luz ultravioleta.

Para más información puede solicitar a Biotest los pliegos de datos de seguridad de todos los reactivos.

### Almacenamiento y Conservación

Los reactivos SSP (**[BLOCK]**, **[CK]**, **[NC]**) se tienen que almacenar a una temperatura comprendida entre los 2°C y los 8°C. La fecha de caducidad aparece en los envases de los componentes del juego. Los bloques de PCR **[BLOCK]** están soldados a la bolsa.

### Material de ensayos

#### Cantidad del ADN

Vuelva a suspender el ADN aislado en agua destilada estéril y regule la concentración a 100 ± 50 ng/μl. El ADN **no se debe resuspender** en reactivos que contengan quelantes, como por ejemplo, EDTA, en una concentración > 0,5 mM.

### Calidad del ADN

Para obtener unos resultados de ensayo óptimos de PCR-SSP se precisa un ADN con un cociente A<sub>260</sub>/A<sub>280</sub> de ≥1,6.

- La pureza y concentración del ADN son fundamentales para la obtención de resultados óptimos en el ensayo.

### Realización de una tipificación HLA-SSP

En una tipificación del antígeno HLA de un ensayo de ADN se efectúan reacciones PCR con un volumen de reacción de 10 μl por tubito de PCR. La marca negra en el bloque de PCR **[BLOCK]** sirve de orientación (posición H1).

Por cada tipificación en un vaso Eppendorf aplique una **mezcla maestra (mastermix)** con los siguientes componentes:

**Cocktail PCR [CK]**  
**Taq ADN polimerasa (5 U/μl)**  
**dH<sub>2</sub>O**

Mezcle bien y añada 10 μl de esta mezcla a **[NC]**. Sólo después **ADN** (aprox. 100 ± 50 ng/μl) y mézclelo todo bien.

En la tabla siguiente figuran los volúmenes que se deben pipetear por ensayo:

Número de las reacciones de PCR	Composición de la mezcla maestra a:				
	8	18	24	48	96
Cocktail PCR <b>[CK]</b>	44 μl	100 μl	120 μl	228 μl	440 μl
Taq ADN polimerasa	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
ADN (aprox. 100 ± 50 ng/μl)	11 μl	25 μl	30 μl	57 μl	110 μl

De esta mezcla maestra se deben pipetear 10 μl en la mezcla seca de cebadores específica respectivamente. Este procedimiento se efectúa mejor con una multipipeta pero hay que tener cuidado de que la punta de la pipeta no entre en contacto con los cebadores. Para evitar que los cebadores se contaminen se debe pipetear la mezcla maestra en la pared del tubo.

Cierre bien las tiras de PCR que incluyen tiras de capuchones/láminas. Coloque la placa en el termostato e inicie el proceso de PCR con el programa de HLA SSP.

#### Programa HLA SSP:

Desnaturalización inicial:	<b>94°C</b>	<b>2 minutos</b>	
Desnaturalización:	<b>94°C</b>	<b>10 segundos</b>	} <b>10 ciclos</b>
Annealing y Extensión:	<b>65°C</b>	<b>60 segundos</b>	
Desnaturalización:	<b>94°C</b>	<b>10 segundos</b>	} <b>20 ciclos</b>
Annealing:	<b>61°C</b>	<b>50 segundos</b>	
Extensión:	<b>72°C</b>	<b>30 segundos</b>	

### Electroforesis de gel

El análisis de los productos PCR se realiza mediante la electroforesis de gel de agarosa y la subsiguiente detección de las bandas de ADN en luz ultravioleta.

Se ha de elaborar un gel de agarosa al 2 %. Para ello hervir 5 g de agarosa en 250 ml TBE 1x hasta que se disuelva completamente. Agitar la solución para enfriarla a < 60°C y añadir 4 μl de solución de bromuro de etidio usando una pipeta. Seguidamente verter la solución de agarosa (exenta de burbujas) en el portagel preparado y sellado. Utilizar peines (pocillos de 10 μl) y dejar reposar a temperatura ambiente durante 10 minutos como mínimo.

Tras la gelificación de la agarosa, colocar el gel en la cámara para geles, quitar los peines y cubrir el gel con TBE 1x. Los pocillos del gel deben estar cubiertos totalmente con tampón. A continuación pipetear la totalidad del preparado de RCP (10 μl) en los pocillos del gel.

Para el control del tamaño de los productos RCP se recomienda utilizar un estándar de peso molecular adecuado (marcador de 50-1000 bp) para la electroforesis.

La electroforesis se realiza en 15 a 25 minutos a 8 V/cm (distancia entre electrodos). La distancia de migración del rojo cresol debe ser de 1-1,5 cm.

Una vez finalizada la electroforesis, colocar el gel sobre un transiluminador ultravioleta y fotografiarlo para que los resultados puedan ser documentados e interpretados.

**Atención: Utilizar una protección adecuada para la cara contra los rayos ultravioletas.**

### Evaluation

Las mezclas de cebadores Biotest HLA contienen cebadores de control que amplifican un fragmento de 1.069 bp de longitud de la hormona de crecimiento humano (human growth hormone, HGH). Estos cebadores no presentan una concentración tan alta como los pares de cebadores alelo- específicos y sirven para controlar que el proceso de PCR se desarrolle con éxito. Por regla general, la amplificación se efectúa siempre, es decir, tanto en presencia como en ausencia de un fragmento de PCR de alelo o grupo específico. Por lo general, la banda de control se puede observar, por lo tanto, en todos los precipitados de PCR. En presencia de un producto de PCR específico de HLA, la banda de control puede aparecer débilmente o incluso desaparecer por completo. Este fenómeno no supone ninguna limitación, ya que en estos casos el control del desarrollo de PCR viene reflejado por bandas específicas.

Para interpretar el ensayo se parte de la presencia o ausencia de una banda de ADN específica en el gel. El tamaño del fragmento de ADN amplificado no constituye un factor determinante pero se puede tener en cuenta como ayuda en la valoración del ensayo.

El patrón de bandas específicas se valora según el esquema de evaluación adjunto y se interpreta el resultado de la tipificación con ayuda del esquema de reacción o con ayuda del Bio-Rad HLA SSP Typing Software (**[REF]** 847 075) y la información de lote disponible en la página de web [www.bio-rad.com](http://www.bio-rad.com).