

HLA SSP

Conditionnement

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

Fiche technique simplifiée

Avant la première utilisation des kits HLA SSP, veuillez consulter la fiche technique détaillée disponible à <http://www.bio-rad.com>!

[BLOCK] PCR bloc [NC] contrôle négatif [CK] PCR cocktail

Objectif du test

Les troupes HLA SSP (Sequence Spécific Primers) sont utilisées pour déterminer les allèles HLA.

Contenu des troupes HLA SSP

Le contenu des troupes HLA SSP est suffisant pour 24 tests.

- 24 blocs de PCR [BLOCK], composés de tubes de PCR qui contiennent les mélanges desséchés d'amorces/nucléotides. Afin d'aider à l'identification, un marquage de couleur noire apparaît sur la position 1 (=H1).
- Cocktail de PCR [CK] (prêt à l'emploi)
Le cocktail de PCR contient le tampon de PCR, du rouge de crésol et du glycérol.
- Bouchons pour tubes de PCR
- Feuilles de travail, schéma des profils de réactions, positions des amorces.
- Un témoin négatif [NC] est joint en supplément (tube de PCR incolore), s'il n'est pas déjà intégré au bloc de PCR [BLOCK].

Mises en garde et mesures de précaution

Réactifs uniquement appropriés pour le diagnostic *in vitro* [IVD]

Mise en garde: Le test ne devra être réalisé que par un personnel spécialisé formé et autorisé.

Mise en garde: Utiliser tous les réactifs uniquement en respectant les réglementations et les mesures de précaution en vigueur. Le matériel provenant des patients devra être considéré comme potentiellement infectieux. Ne pas pipeter à la bouche.

Mise en garde: Tous les réactifs pour le test devront être maniés comme étant potentiellement infectieux et les mesures de précaution correspondantes devront être mises en œuvre.

Mise en garde: Les blocs de PCR utilisés devront être maniés comme étant potentiellement infectieux et devront être éliminés en conformité avec les réglementations nationales en vigueur.

Mise en garde: Ne pas utiliser de réactifs après la date de péremption figurant sur les étiquettes.

Mise en garde: Ne pas utiliser de réactifs suspectés de contamination microbienne.

Mise en garde: Utiliser une série de pipettes distincte pour le domaine pré-PCR et le domaine post-PCR.

Mise en garde: Le bromure d'éthidium, utilisé pour la coloration de l'ADN lors de l'électrophorèse sur gel, est potentiellement **carcinogène**. Porter toujours des gants de protection lors du maniement des gels colorés. Élimination des déchets par incinération.

Mise en garde: Lors des étapes sous lumière UV, porter toujours des lunettes protectrices, bloquant les rayons UV.

Les formulaires des données de sécurité d'emploi pour tous les réactifs peuvent être demandés auprès de Biotest.

Stockage et durée de conservation

Les réactifs SSP ([BLOCK], [CK], [NC]) doivent être stockés à une température comprise entre 2 et 8°C. La date de péremption figure sur les emballages des composants de la troupe.

Les blocs de PCR [BLOCK] sont scellés dans des sachets. Une fois le sachet ouvert, les blocs non utilisés devront être maintenus dans l'emballage d'origine qui sera refermé hermétiquement afin d'empêcher la pénétration d'humidité. Les blocs de PCR entamés devront être utilisés dans un délai de 4 semaines.

Préparation des prélèvements

Quantité de l'ADN

Remettre en suspension l'ADN isolé dans de l'eau distillée stérile et ajuster à la concentration de 100 ± 50 ng/µl. L'ADN ne devra pas être remis en suspension dans des réactifs qui contiennent des chélateurs tels que l'EDTA à une concentration > 0,5 mM.

Qualité de l'ADN

Pour obtenir des bons résultats lors du test de PCR-SSP, il faut un ADN dont le quotient A_{260}/A_{280} est $\geq 1,6$.

- La pureté et la concentration de l'ADN utilisé ont une importance décisive pour un résultat optimal du test.

Réalisation d'un typage HLA SSP

Pour un typage HLA d'un échantillon d'ADN, les réactions de PCR sont réalisées avec un volume de 10 µl pour chaque tube de PCR. Le marquage en noir sur le bloc de PCR [BLOCK] sert d'orientation (Position H1).

Pour chaque typage, préparer un mélange-mère des composants suivants:

Cocktail de PCR [CK]

Taq ADN polymérase (5 U/µl)
dH₂O

Bien mélanger et placer 10 µl de ce mélange dans le [NC]. Seulement ensuite ajouter l'ADN (environ 100 ± 50 ng/µl) et bien mélanger.

Les volumes à préparer en fonction du nombre des tubes PCR figurent dans le tableau suivant:

Nombre de réactions de PCR	Composition du mélange-mère pour:				
	8	18	24	48	96
Cocktail de PCR [CK]	44 µl	100 µl	120 µl	228 µl	440 µl
Taq ADN polymérase	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
ADN (environ 100 ± 50 ng/µl)	11 µl	25 µl	30 µl	57 µl	110 µl

Distribuer chaque fois 10 µl de ce mélange-mère dans les mélanges d'amorces spécifiques séchées. De préférence utiliser une multipipette. Afin d'éviter une contamination des amorces, faire attention à ce que l'extrémité de la pipette n'entre pas en contact avec les amorces. Pour cela déposer le mélange-mère sur la paroi du tube.

Fermer hermétiquement les barrettes de PCR. Placer la plaque dans le thermocycler et débiter la PCR avec le programme HLA SSP.

Programme pour HLA SSP:

Dénaturation initiale:	94°C	2 min.	
Dénaturation:	94°C	10 s] 10 cycles
Hybridation et Elongation:	65°C	60 s	
Dénaturation:	94°C	10 s] 20 cycles
Hybridation:	61°C	50 s	
Elongation:	72°C	30 s	

Electrophorèse sur gel

Les produits de PCR sont mis en évidence grâce à une électrophorèse sur gel d'agarose, suivie d'une détection des bandes d'ADN en lumière UV.

Préparer un gel d'agarose à 2 % : porter à ébullition 5 g d'agarose dans 250 ml de TBE 1x jusqu'à dissolution complète. Laisser refroidir la solution à une température < à 60° C en agitant et ajouter 4 µl de solution de bromure d'éthidium. Verser ensuite la solution d'agarose sans faire de bulles d'air dans le support de gel préparé et étanche. Mettre en place des peignes pour créer des puits de 10 µl et laisser reposer pendant au moins 10 minutes à température ambiante. Après polymérisation de l'agarose, placer le gel dans la chambre à gel. Retirer les peignes et recouvrir le gel de TBE 1x. Les puits du gel doivent être complètement recouverts de tampon. Distribuer la totalité de la préparation PCR (10 µl) dans les puits du gel. Afin de contrôler la taille des produits de PCR, il est recommandé d'utiliser un standard approprié de poids moléculaire (marqueur 50-1000 bp) lors de l'électrophorèse.

L'électrophorèse se fait pendant 15 à 25 minutes à 8 V/cm (écart entre les électrodes). La distance de migration du rouge crésol devrait être de l'ordre de 1 à 1,5 cm.

Au terme de l'électrophorèse le gel est placé sur un transilluminateur UV et photographié afin d'interpréter et documenter les résultats.

Attention: Il est conseillé de porter un dispositif adéquat de protection du visage contre les rayons UV.

Interprétation

Les mélanges d'amorces HLA Biotest contiennent des amorces témoins qui amplifient un fragment de l'hormone de croissance de l'homme (human growth hormone, HGH), long de 1069 pb.

Ces amorces présentent une concentration plus faible que les paires d'amorces spécifiques des allèles et servent de contrôle interne de l'amplification.

Cette amplification témoin a généralement toujours lieu, c'est-à-dire aussi bien en présence qu'en l'absence d'un fragment de PCR spécifique d'un allèle ou d'un groupe. La bande témoin est donc visible dans toutes les prises d'essai d'amplification génique.

En présence d'un produit de PCR spécifique d'un groupe HLA, la bande témoin peut être faible ou totalement absente. Ceci ne constitue pas une limite du test, car la bande spécifique retrouvée témoigne dans de tels cas du déroulement correct de l'amplification.

L'interprétation du test repose sur le fait de savoir si une bande d'ADN spécifique est présente dans le gel ou non. La taille des fragments amplifiés d'ADN ne devra pas nécessairement être prise en compte, mais pourra l'être à titre d'aide lors de l'interprétation du test.

Pour l'interprétation, le profil des bandes spécifiques est transposé sur les feuilles de travail jointes et le résultat du typage est lu à l'aide des schémas des profils de réactions ou à l'aide de la logiciel Bio-Rad HLA-SSP Typing Software ([REF] 847 075) et de l'information du lot (confer www.bio-rad.com).