

HLA SSP

Confezionamento

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

Breve Metodica

Al primo utilizzo dei kit HLA SSP, consultare il manuale d'istruzione dettagliato presente a <http://www.bio-rad.com>!

[BLOCK] PCR piastre [NC] Controllo negativo [CK] PCR cocktail

Applicazioni

I kit HLA SSP (SSP, Primer Sequenza Specifici) sono usati per la determinazione degli alleli HLA a livello di DNA.

Materiale

Contenuto dei kit HLA SSP

Il contenuto dei kit HLA SSP è sufficiente per 24 test.

- 24 piastre PCR [BLOCK], contenenti le miscele di primer liofilizzati e nucleotidi. Per evitare errori, la posizione 1 (=H1) è contrassegnata in nero.
- Cocktail PCR [CK] (pronto per l'uso)
Il cocktail PCR contiene tampone PCR, rosso cresolo e glicerolo.
- Tappini per PCR oppure fogli per chiusura PCR
- Schema di interpretazione, schema della reazione, posizioni dei primer
- Un controllo negativo [NC] è allegato come provetta PCR aggiuntiva (incolore), se non è già integrato nel blocco PCR [BLOCK].

Note generali di sicurezza

Reagenti solo per uso diagnostico in vitro [VD]

Attenzione: Il test deve essere eseguito solo da personale specializzato, addestrato ed autorizzato

Attenzione: Usare tutti i reagenti rispettando sempre le norme e le misure precauzionali in vigore nel laboratorio. I campioni dei pazienti devono essere considerati potenzialmente infetti. Non pipettare a bocca.

Attenzione: Tutti i reagenti del test devono essere maneggiati come potenzialmente infetti, applicando le relative misure precauzionali.

Attenzione: Le piastre PCR usate devono essere maneggiate come potenzialmente infette e devono essere eliminate osservando le vigenti direttive nazionali.

Attenzione: Non usare alcun reagente dopo la data di scadenza indicata sull'etichetta.

Attenzione: Non usare reagenti sospetti di contaminazione microbica.

Attenzione: Usare serie di pipette per la zona pre-PCR divise da quelle per la zona post-PCR.

Attenzione: L'etidio bromuro, usato nell'elettroforesi su gel per la colorazione del DNA, è potenzialmente cancerogeno. Usare sempre guanti di protezione quando si lavora con gel colorati. Eliminare mediante incenerimento.

Attenzione: Lavorando con luce UV proteggere sempre gli occhi dagli UV.

Le schede di sicurezza per tutti i reagenti, contenenti informazioni dettagliate, possono essere richieste alla Biotest.

Conservazione e validità

I reagenti SSP [BLOCK], [CK], [NC] devono essere conservati ad una temperatura compresa tra 2 e 8°C. La data di scadenza si trova sulle confezioni dei componenti del kit.

Le piastre PCR [BLOCK] sono sigillate nel sacchetto. Le piastre non usate e rimaste in un sacchetto aperto, devono restare nella confezione originale che verrà chiusa con Tesafilm per ridurre l'umidità. Le confezioni aperte devono essere usate entro 4 settimane.

Campioni

Quantità del DNA

Risospendere il DNA isolato in acqua distillata sterile e aggiustare la concentrazione a 100 ± 50 ng/µl. Il DNA **non deve essere risospeso** in reagenti che contengono agenti chelanti, come ad es. EDTA ad una concentrazione > 0,5 mM.

Qualità del DNA

Buoni risultati si ottengono con un rapporto $A_{260}/A_{280} \geq 1,6$.

☞ La purezza e la concentrazione del DNA hanno un'importanza fondamentale per un ottimale risultato del test.

Esecuzione di una tipizzazione HLA SSP

Per una tipizzazione HLA di un campione di DNA, si eseguono più reazioni di PCR con un volume di reazione di 10 µl. Il segno nero sulla piastra PCR [BLOCK] serve per l'orientamento (posizione H1).

Per ogni tipizzazione preparare una mastermix costituita da:

Cocktail PCR [CK]
Taq DNA polimerasi (5 U/µl)
dH₂O

Miscelare bene e mettere 10 µl di questa miscela nel [NC]. Aggiungere quindi DNA (circa 100 ± 50 ng/µl) e miscelare bene.

I volumi da pipettare per ogni test sono riportati nella seguente tabella:

Numero delle reazioni PCR	Composizione della mastermix:				
	8	18	24	48	96
PCR cocktail [CK]	44 µl	100 µl	120 µl	228 µl	440 µl
Taq DNA polimerasi	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 (circa 100 ± 50 ng/µl)	11 µl	25 µl	30 µl	57 µl	110 µl

Pipettare 10 µl di mastermix in ogni primer. Sarebbe meglio usare una multipipetta, facendo attenzione che la punta non venga a contatto con i primer. Per evitare un trasporto del primer, pipettare sulla parete della provetta.

Chiudere bene le strip PCR con gli allegati fogli o tappi PCR. Mettere la piastra nel thermal cycler ed iniziare la PCR con il programma HLA SSP.

Programma HLA SSP:

Denaturazione iniziale: **94°C 2 min.**

Denaturazione: **94°C 10 s** }
Annealing & estensione: **65°C 60 s** } **10 cicli**

Denaturazione: **94°C 10 s** }
Annealing: **61°C 50 s** }
Estensione: **72°C 30 s** } **20 cicli**

Elettroforesi su gel

La rilevazione del prodotto di PCR ha luogo mediante elettroforesi su gel di agarosio e successiva visualizzazione delle bande di DNA a luce UV.

Si prepara un gel di agarosio al 2%. Allo scopo, è necessario far bollire 5 g di agarosio in 250 ml 1 x TBE. Raffreddare la soluzione mescolando fino a < 60°C ed aggiungere 4 µl di soluzione di etidio bromuro. Versare la soluzione di agarosio priva di bolle d'aria nei vassoi portagel precedentemente preparati e sigillati. Usare i pettini (pozzetti da 10 µl) e lasciare riposare la soluzione a temperatura ambiente per almeno 10 minuti.

Dopo che l'agarosio si è solidificato, il gel va collocato nell'apposita camera. Estrarre i pettini e coprire il gel con 1 x TBE. I pozzetti di gel vanno completamente ricoperti con tampone. Dispensare tutti i preparati PCR (10 µl) nei pozzetti del gel.

Per il controllo delle dimensioni dei prodotti PCR si raccomanda l'utilizzo di uno standard di peso molecolare appropriato (marker da 50-1000 bp) per l'elettroforesi.

L'elettroforesi avviene in 15-25 minuti a 8 V/cm (distanza tra gli elettrodi). La distanza di migrazione del rosso cresolo dovrebbe essere 1-1,5 cm.

Al termine dell'elettroforesi, il gel viene collocato su un transilluminatore UV e fotografato per l'interpretazione e documentazione dei risultati.

Attenzione: Indossare una protezione adeguata per il viso contro i raggi UV.

Interpretazione

Le miscele di primer contengono un primer di controllo che amplificano un frammento lungo 1069 bp dell'ormone umano della crescita (human growth hormone, HGH). Questi primer sono meno concentrati delle coppie di primer allele specifici e servono per controllare l'efficienza della PCR. Essi producono sempre un amplificato, in presenza e in assenza di una banda allele-specifica. In alcuni casi, però, in presenza di uno specifico prodotto di PCR, la banda di controllo può apparire di più debole intensità o essere totalmente assente. La presenza della banda specifica garantisce il risultato della corsa elettroforetica.

L'interpretazione del test si basa pertanto sulla presenza o meno nel gel di una banda specifica di DNA.

Per l'interpretazione riportare il campione delle bande specifiche sull'allegato schema di interpretazione e leggere il risultato della tipizzazione mediante gli schemi delle reazioni oppure con l'aiuto del Bio-Rad HLA-SSP Typing Software (REF 847 075) e le informazioni lotto specifiche scaricabili da Biotest homepage www.bio-rad.com.