

Primer di sequenziamento di HLA-DQB1:

SEQ Mix ID	Esone di HLA*DQB1 coperto	AMP mix coperte	Direzione
DQB2F	2	DQB01~06, L2	Forward
DQB2R		DQB01~06, L2	Reverse
DQB3F	3	DQB-L3	Forward
DQB3R		DQB-L3	Reverse

Primer di sequenziamento di HLA-DPB1:

SEQ Mix ID	Esone di HLA*DQB1 coperto	AMP mix coperte	Direzione
DPB2F	2	DPB-L2	Forward
DPB2R			Reverse
Codon8			Forward
Codon85			Reverse
DPB3F	3	DPB-L3/4	Forward
DPB3R			Reverse
DPB4F	4		Forward
DPB4R			Reverse



HLAssure™ SE SBT Typing Kit

Istruzioni per l'uso

REF	50110, 50145, 50185	CE
REF	50210, 50245, 50285	CE
REF	50350, 50345, 50385	CE
REF	50370	RUO
REF	50410, 50445, 50485	CE
REF	50510, 50545, 50585	CE
REF	50610	CE
	IVD	

INDICE

1. DESTINAZIONE D'USO	3
2. SOMMARIO E INTRODUZIONE	3
3. PRINCIPIO	4
4. REAGENTI	5
4.1 Contenuto dell'HLAssure™ SE SBT Typing Kit	
4.2 Avvertenze	
4.3 Conservazione	
4.4 Altre indicazioni	
5. STRUMENTAZIONI RICHIESTE	6
5.1 Programmazione del termociclatore	
5.2 Elettroforesi su gel	
6. RACCOLTA E PREPARAZIONE DEI CAMPIONI	7
6.1 Raccolta di campioni di sangue	
6.2 Estrazione del DNA	
6.3 Quantità di DNA	
6.4 Qualità del DNA	
7. ISTRUZIONI D'USO	8
7.1 Materiale fornito	
7.2 Altro materiale necessario	
7.3 Preparazione del campione	
7.4 Preparazione dei reagenti/strumenti	
7.5 Reazione di amplificazione	
7.6 Gel Elettroforesi	
7.7 Purificazione dei prodotti di PCR	
7.8 Reazioni di sequenziamento	
7.9 Precipitazione in etanolo del prodotto di reazione sequenziamento	
7.10 Preparazione dei campioni per l'elettroforesi capillare	
7.11 Raccolta dei dati	
8. RISULTATI	13
8.1 Interpretazione dei dati	
8.2 Analisi dei dati e impostazioni di AccuType™	
8.3 Limitazioni del metodo	
8.4 Controllo di qualità	
9. PRESTAZIONI	14
9.1 Prestazioni specifiche	
9.2 Controllo di qualità di produzione	
9.3 Riproducibilità	
10. PROBLEMI E SOLUZIONI	15
11. BIBLIOGRAFIA	16

Primer di sequenziamento di HLA-DRB1,3,4,5:

SEQ Mix ID	Esone di HLA*DRB1 coperto	AMP mix coperte	Direzione
DRB1F	1	DRB-L1	Forward
DRB1R			Reverse
DRB2F	2	DRB-01~12, DRB-L2	Forward
DRB2R			Reverse
DRB2R-86 (GTG)		DRB-01~12, DRB-L2	Reverse
DRB345-2F	2	DRB3-L2, DRB4-L2, DRB5-L2	Forward
DRB345-2R			Reverse
DRB345-3F	3	DRB3-L3, DRB4-L3, DRB5-L3	Forward
DRB345-3R			Reverse

Note:

Quando il campione risulta positivo per AMP Mix 04, 06 o 10 (in aggiunta all'AMP mix DRB-L), si raccomanda di sequenziare con DRB2R-86 il prodotto di PCR dell'AMP Mix 04, 06, o 10 per ridurre le possibili ambiguità.

Primer di sequenziamento di HLA-C:

SEQ Mix ID	Esone di HLA*C coperto	AMP mix coperte	Direzione
C1R	1	C-02~04, 06~12, L	Reverse
C2F	2	C-01- 12, L	Forward
C2R		C-01- 12, L	Reverse
C3F	3	C-01- 12, L	Forward
C3R		C-01- 12, L	Reverse
C4F	4	C-01- 12, L	Forward
C4R		C-01- 12, L	Reverse
C5R	5	C-01, 02, 04~12, L	Reverse
C6F	6	C-02, 04, 05, 06, 08, 10, 11, L	Forward
C7R	7	C-02, 04, 05, 06, 08, 10, 11, L	Reverse

Note:

- Per ogni AMP Mix C-01~12 i campioni dovrebbero essere sequenziati con almeno SEQ Mix C2F, C3R e C4F.
- Se il campione mostra una tipizzazione a bassa risoluzione C*03/17, si consiglia di sequenziare con SEQ mix C1R per ridurre le possibili ambiguità.
- Se il campione mostra una tipizzazione a bassa risoluzione C*04/07/18, si consiglia di sequenziare con SEQ mix C5R per ridurre le possibili ambiguità.
- Se il campione mostra una tipizzazione a bassa risoluzione C*07/08, si consiglia di sequenziare con SEQ mix C6F per ridurre le possibili ambiguità.
- Se il campione mostra una tipizzazione a bassa risoluzione C*04/07, si consiglia di sequenziare con SEQ mix C7R per ridurre le possibili ambiguità.

12. TRADEMARK UTILIZZATI NEL DOCUMENTO.....	16
13. BREVETTI UTILIZZATI NEL DOCUMENTO	16
14. APPENDICI.....	17
14.1 Tabella di specificità dei primer di amplificazione	
14.2 Tabella di specificità dei primer di sequenza	23

1. DESTINAZIONE D'USO

Questo kit fornisce un protocollo di biologia molecolare per ottenere risultati di tipizzazione ad alta risoluzione dei loci HLA-A, B, C, DRB1, DRB3, DRB4, DRB5, DQB1 e DPB1.

2. SOMMARIO E INTRODUZIONE

Le molecole antigeniche HLA del complesso maggiore umano di istocompatibilità (MHC) giocano un ruolo chiave nella specificità della risposta immune mediata da cellule T.¹ Poiché la compatibilità tra donatore e ricevente è uno dei fattori principali per la determinazione dell'esito di un trapianto di organo o midollo osseo, è necessaria una precisa determinazione del genotipo HLA prima di procedere al trapianto. Tradizionalmente, sono state utilizzate dapprima le metodiche sierologiche. Tuttavia, i limiti di questi approcci divengono sempre più evidenti con il crescere delle nostre conoscenze della genetica del superlocus HLA.

I geni HLA sono localizzati sul braccio corto del cromosoma 6 umano e sono altamente polimorfici. Man mano che vennero scoperte nuove sequenze alleliche HLA, diventò chiaro che molti degli antigeni HLA differiscono tra loro solo per una o poche sostituzioni aminoacidiche. A causa dei limiti del metodo serologico tradizionale, queste piccole differenze antigeniche non possono essere rilevate, se non attraverso l'uso di metodiche in biologia molecolare che forniscono una risoluzione di tipizzazione più alta. Texas BioGene è lieta di presentare il nuovo HLAssure™ SE SBT Typing Kit per la determinazione degli alleli HLA utilizzando un metodo basato sul sequenziamento (SBT – Sequence Based Typing).

Primer di sequenziamento di HLA-B:

SEQ Mix ID	Esone di HLA *B coperto	AMP mix coperte	Direzione
B1F	1	B-01, 03, 04, 07~12, 14, L	Forward
B2F	2	B-01 ~ 15, L	Forward
B2R		B-01 ~ 15, L	Reverse
B3F	3	B-01 ~ 15, L	Forward
B3R		B-01 ~ 15, L	Reverse
B4F	4	B-01 ~ 15, L	Forward
B4R		B-01 ~ 15, L	Reverse
B5R	5	B-01~08, 11~15, L	Reverse

Note:

- Per ogni AMP Mix B-01~15 i campioni dovrebbero essere sequenziati con almeno SEQ Mix B2F, B2R, B3R, e B4F.
- Se il campione mostra una tipizzazione a bassa risoluzione B*15/18/27/35/44/81, si consiglia di sequenziare con SEQ mix B1F per ridurre le possibili ambiguità.
- Se il campione mostra una tipizzazione a bassa risoluzione B*07, si consiglia di sequenziare con SEQ Mix B5R per ridurre le possibili ambiguità.

14.2 Tabella di specificità dei primer di sequenza

Primer di sequenziamento di HLA-A:

SEQ Mix ID	Esoni di HLA*A coperto	AMP mix coperte	Direzione
A1F	1	A-01, 04, 05, 07~12, L	Forward
A2F	2	A-01 ~ 12, L	Forward
A2R		A-01 ~ 12, L	Reverse
A3F	3	A-01 ~ 12, L	Forward
A3R		A-01 ~ 12, L	Reverse
A4F	4	A-01 ~ 12, L	Forward
A4R		A-01 ~ 12, L	Reverse
A5F	5	A-01, 02, 04, 07~10, 12, L	Forward

Note:

- Per ogni AMP Mix A-01~12 i campioni dovrebbero essere sequenziati con almeno SEQ Mix A2F, A3F, ed A4F.
- Se il campione mostra una tipizzazione a bassa risoluzione A*68 od A*74, si consiglia di sequenziare con SEQ mix A1F per ridurre le possibili ambiguità.
- Se il campione mostra una tipizzazione a bassa risoluzione A*23, si consiglia di sequenziare con SEQ Mix A5F per ridurre le possibili ambiguità.

3. PRINCIPIO

L'HLAssure™ SE SBT Typing Kit viene utilizzato per determinare gli alleli HLA mediante amplificazione PCR e metodica di tipizzazione basata su sequenziamento (PCR-SBT). In breve, sono state disegnate delle coppie di primer gruppo specifiche e locus specifiche per l'amplificazione selettiva di sequenze target specifiche per un singolo locus, o allele o gruppo di alleli. Questa strategia di amplificazione si basa sul principio che solo primer con sequenze completamente complementari alla sequenza target innescano un prodotto di amplificazione nelle condizioni controllate della reazione di PCR. La presenza di un frammento di DNA amplificato è una indicazione positiva dell'esistenza di una sequenza allele specifica all'interno del DNA genomico. In caso contrario, primer non complementari non generano ampliconi.

I prodotti di reazione PCR vengono esaminati mediante elettroforesi su gel d'agarosio che separa i frammenti di DNA in base alle dimensioni. I frammenti amplificati vengono visualizzati come bande a seguito di colorazione con etidio bromuro quando eccitate da esposizione alla luce ultravioletta.

Gli amplificati derivati da reazione di PCR vengono purificati e utilizzati in reazioni di sequenziamento locus specifiche che determinano l'esatta sequenza di basi del DNA di ogni allele.

L'HLAssure™ SE SBT Typing Kit consiste di un pannello di mix di primer appositamente disegnato per amplificare e sequenziare gli alleli HLA. Per la determinazione dell'esatto allele HLA viene utilizzato un software d'analisi che lavora sui risultati delle reazioni di sequenziamento (elettroferogrammi).

4. REAGENTI

4.1 Contenuto dell'HLAssure™ SE SBT Typing Kit

Ogni HLAssure™ SE SBT Typing Kit contiene i seguenti reagenti :

4.1.1 Mix di amplificazione

Ogni mix d'amplificazione (AMP mix) contiene i primer per amplificare specifici geni HLA, e contiene primer locus- o gruppo-specifici. L'ID di ogni AMP mix con le relative specificità è indicato nell'appendice 14.1.

4.1.2 Mix di sequenziamento

Ogni mix di sequenziamento (SEQ mix) contiene i primer per sequenziare specifici geni HLA, che sono primer locus- o gruppo-specifici. L'ID di ogni SEQ mix con le relative specificità è indicato nell'appendice 14.2.

4.1.3 EZ-Taq™ (5 Unità per µl)

Ogni provetta di EZ-Taq™ viene utilizzata per amplificare gli alleli HLA durante la PCR.

4.1.4 Tampone di amplificazione

Ogni provetta di tampone di amplificazione viene utilizzata per amplificare gli alleli HLA durante la PCR.

IMPORTANTE: utilizzare il buffer specifico per ogni locus.

4.2 Avvertenze

- 4.2.1 Non utilizzare i reagenti oltre la data di scadenza indicata.
- 4.2.2 Il test dev'essere eseguito da personale di laboratorio autorizzato e adeguatamente addestrato.
- 4.2.3 I reagenti devono essere manipolati seguendo le indicazioni GLP e adottando le dovute precauzioni.
- 4.2.4 Le pipette utilizzate per le fasi post-PCR non devono essere utilizzate nelle fasi pre-PCR.
- 4.2.5 Avvertenza per la salute: l'etidio bromuro utilizzato per la colorazione del DNA è un carcinogeno potenziale. Indossare sempre i guanti durante la manipolazione dei gel colorati.
- 4.2.6 Avvertenza per la salute: il sangue e i suoi derivati devono essere considerati e trattati come potenzialmente infettivi.
- 4.2.7 Attenzione: indossare occhiali di protezione da UV e non guardare direttamente la fonte di luce UV quando si osserva o si fotografa un gel.

Si veda la scheda di sicurezza per maggiori informazioni al riguardo.

Primer specifici HLA DQB1:

AMP mix gruppo specifiche (GSA)

AMP Mix ID	Gruppo allelico HLA DQB1*	Allele(i) escluso(i)	Dimensioni (kbp)
DQB01	02	-	~480 bp
DQB02	03	03:02/03 ?03:05-08/11*	~530 bp
DQB03	03	03:01/04/09/19 ?03:10/12/13*	~525 bp
DQB04	04	-	~525 bp
DQB05	05	-	~480 bp
DQB06	06	-	~540 bp

*Mancanza di dati di sequenza intronica

AMP mix locus specifiche (LSA)

AMP Mix ID	Gruppo allelico HLA DQB1*	Allele(i) escluso(i)	Dimensioni (kbp)
DQB-L2	Tutti gli alleli DQB1 (Esone 2)	-	~510 bp
DQB-L3	Tutti gli alleli DQB1 (Esone 3)	-	~400 bp

Primer specifici HLA DPB1:

AMP mix locus specifiche (LSA)

AMP Mix ID	Gruppo allelico HLA DQB1*	Allele(i) escluso(i)	Dimensioni (kbp)
DPB-L2	Tutti gli alleli DPB1 (Esone 2)	-	~300 bp
DPB-L3/4	Tutti gli alleli DPB1 (Esone 3)	-	~1300 bp

AMP mix locus specifiche (LSA)

AMP Mix ID	Gruppo allelico HLA DRB*	Allele(i) escluso(i)	Dimensioni (kbp)
DRB-L1	Tutti gli alleli DRB1	-	~260 bp
DRB-L2	Tutti gli alleli DRB1	03:42, 04:49, 11:30, 13:67, 11:01:06, 14:39/46, 201:07*	~460-740 bp
DRB-L3	Tutti gli alleli DRB1	01, 04, 07, 09, 10, 15, 16, 12:17	~1.0 kbp
DRB3-L2	Tutti gli alleli DRB3	-	~400 bp
DRB3-L3			
DRB4-L2	Tutti gli alleli DRB4	-	~400 bp
DRB4-L3			
DRB5-L2	Tutti gli alleli DRB5	-	~400 bp
DRB5-L3		-	~500 bp

4.3 Conservazione e stabilità

Le mix di amplificazione e le mix di sequenza dovrebbero essere conservate a 4°C mentre i buffer di amplificazione e la EZTaq™ devono essere conservati a -20 °C. Una volta aperto, ogni reagente non in uso dovrebbe essere tenuto su ghiaccio durante l'allestimento delle reazioni e quindi rimesso nelle precedenti condizioni di conservazione. E' possibile utilizzare i reagenti effettuando fino a 24 cicli di scongelamento e ricongelamento.

4.4 Altre indicazioni

Non utilizzare provette o piastre che presentano segni di danneggiamento.

5. STRUMENTAZIONI RICHIESTE

5.1 Programmazione del termociclatore

L'HLAssure™ SE SBT Typing Kit si avvale dei seguenti programmi di reazione ed è stato standardizzato sui termociclatori modello Applied Biosystems GeneAmp® 9600 e 9700 e Veriti. Termociclatori di altre marche devono essere validati dall'utente.

Programma di amplificazione HLAssure SBT

Fase	Numero cicli	Temperatura	Tempo
1	1	95°C	5 min
2	36	93°C	30 sec
		63°C	40 sec
		72°C	2.5 min
		72°C	5 min
3	1	4°C	∞

Programma HLAssure SBT per enzima ExoSAP

Numero cicli	Temperatura	Tempo
1	37°C	15~30 min
	80°C	15 min
	4°C	∞

Programma di sequenziamento HLAssure SBT

Fase	Numero cicli	Temperatura	Tempo
1	1	96°C	1 min
2	25	98°C	25 sec
		60°C	2 min 30 sec

3	1	4°C	∞
---	---	-----	---

Riferirsi al manuale del termociclatore per la sua programmazione.

Elettroforesi su gel

Fare riferimento al paragrafo 7.6.

6. RACCOLTA E PREPARAZIONE DEI CAMPIONI

6.1 Raccolta del campione di sangue

Il sangue periferico può essere raccolto utilizzando apposite provette contenenti sodio citrato ed EDTA come anticoagulanti. Si raccomanda di non utilizzare provette eparinate, poiché l'eparina può interferire con la reazione di PCR. Non utilizzare quindi sangue eparinato come materiale base per l'estrazione del DNA. Fare riferimento alle istruzioni d'uso del produttore per la conservazione e la stabilità dei campioni di sangue.

6.2 Estrazione del DNA

Il DNA genomico può essere ricavato da qualsiasi cellula nucleata. Fonti di cellule nucleate includono, ma non sono limitate a, sangue intero, buffy coat e colture cellulari. L'estrazione del DNA può essere eseguita tramite qualsiasi protocollo validato che renda una sufficiente quantità e qualità di prodotto.

6.3 Quantità di DNA

Il campione di DNA deve essere risospeso in acqua distillata sterile o in una soluzione tampone appropriata ad una concentrazione di 10-40 ng/μl. Non risospingere il DNA in soluzioni che contengono agenti chelanti, come soluzioni con EDTA, a concentrazioni superiori a 0,5 mM.

6.4 Qualità del DNA

Il campione di DNA deve avere un rapporto di assorbanze A^{260}/A^{280} compreso tra 1.65 ed 1.8. I campioni di DNA possono essere utilizzati immediatamente dopo l'estrazione o conservati a -20 °C (o temperature inferiori) per un periodo di tempo anche superiore ad un anno.

HLA DRB1,3,4,5 AMP Mix Primers:

AMP mix gruppo specifiche (GSA)

AMP Mix ID	Gruppo allelico HLA DRB*	Allele(i) escluso(i)	Dimensioni (kbp)
DRB-01	01	-	~430 bp
DRB-02	15, 16	-	~730 bp
DRB-03	03, 14:02/03/06 <u>?13:15, 14:13/19/20*</u>	03:07, <u>?03:17, 14:17*</u>	~760 bp
DRB-04	04	-	~550 bp
DRB-05	07	-	~400 bp
DRB-06	08 <u>?13:17*</u>	<u>?08:06*</u>	~860 bp
DRB-07	09	-	~440 bp
DRB-08	10	-	~460 bp
DRB-09	12	12:01**	~590 bp
DRB-10	03, 11, 13, 14 08:06, 12:01**, 12:17	<u>?13:17*</u>	~470 bp
DRB-11	03:07, 13:01/02/04/36 <u>?13:34, 14:17/21/33*</u>	13:03/04/05/12/13	~460 bp
DRB-12	14:01/04/05/07/10/18/54/84 <u>?11:01*, 11:01:08, 12:17, 11:03/17, 13:08/83*</u>	14:02/03/06/13/17/ 19/22/33	~470 bp
DRB-L3	03,08,11-14	12:17	~300 bp

*Mancanza di dati di sequenza intronica

** Nuovo allele non pubblicato identificato in specifiche popolazioni

Primer locus specifici HLA C:

AMP Mix ID	Gruppo allelico HLA C*	Allele(i) escluso(i)	Dimensioni (kbp)
C01	01	-	~2.3 kbp
C02	02, 15	-	~3.2 kbp
C03	15	-	~2.3 kbp
C04	03	-	~2.9 kbp
C05	04	-	~2.9 kbp
C06	05, 08	15:43	~3.2 kbp
C07	05, 06, 08, 12, 15	-	~2.1 kbp
C08	07	-	~2.9 kbp
C09	14	-	~2.6 kbp
C10	16	-	~3.1 kbp
C11	17	-	~3.1 kbp
C12	18	-	~2.5 kbp

AMP mix locus specifica (LSA)

AMP Mix ID	Gruppo allelico HLA C*	Allele(i) escluso(i)	Dimensioni (kbp)
C-L	Tutti gli alleli del locus C	-	~3.1 kbp

7. ISTRUZIONI D'USO**7.1 Materiale fornito**

Fare riferimento al paragrafo 4. REAGENTI

7.2 Altro materiale necessario e non fornito nel kit**7.2.1 Amplificazione, pulizia prodotti di PCR e reazioni di sequenziamento**

7.2.1.1 Terminatore Big Dye (v1.1 o v3.1) - BDT

7.2.1.2 NaOAc/EDTA (1.5 M / 250 mM, pH>8)

7.2.1.3 Etanolo assoluto (> 99,5%)

7.2.1.4 ExoSAP

7.2.1.5 Acqua distillata o tampone di eluizione DNA

7.2.1.6 Pipette a volume variabile

7.2.1.7 Puntali monouso

7.2.1.8 Vortex mixer

7.2.1.9 Microcentrifuga

7.2.1.10 Centrifuga da banco per piastre a 96 pozzetti

7.2.1.11 Termociclatore con coperchio riscaldato (es. Applied Biosystems GeneAmp 9600 e 9700 e Veriti)

7.2.1.12 Piastra da PCR a 96 pozzetti

7.2.1.13 Tappetino di gomma

7.2.2 Gel elettroforesi

7.2.2.1 Agarosio (grado per Biologia Molecolare)

7.2.2.2 Tampone 0.5x TAE o TBE

7.2.2.3 Soluzione di etidio bromuro (10 mg/ml)

7.2.2.4 Piastra scaldante o microonde per preparare gel di agarosio

7.2.2.5 Sistema di corsa elettroforetica e alimentatore

7.2.2.6 Transilluminatore UV

7.2.2.7 Sistema di fotodocumentazione.

7.3 Preparazione del campione

Fare riferimento al paragrafo 6. RACCOLTA E PREPARAZIONE DEI CAMPIONI

7.4 Preparazione dei reagenti/strumenti

Fare riferimento al paragrafo 5. STRUMENTAZIONI RICHIESTE

7.5 Reazione di amplificazione

- 7.5.1 Calcolare il numero totale di reazioni di amplificazioni richieste sulla base della tabella in appendice 14.1. Se si conoscono i risultati di tipizzazione in bassa risoluzione, scegliere l'AMP mix corrispondente al gruppo allelico specifico (GSA). In caso contrario, scegliere l'AMP mix corrispondente allo specifico locus (LSA).
- 7.5.2 Togliere l'AMP Mix e l'EZ-Taq dal congelatore e lasciare sciogliere su ghiaccio. Preparare una miscela di Buffer/Taq in base al numero totale di reazioni richieste e la tabella sottostante.
IMPORTANTE: utilizzare il buffer specifico per ogni locus.

Reazioni totali	AMP Buffer	EZ-Taq™
1	6 µL	0.14 µL
10	60 µL	1.4 µL
20	120 µL	2.8 µL
30	180 µL	4.2 µL

- 7.5.3 Aggiungere 6 µL di Buffer/Taq mix sul fondo di ogni provetta di una micropiastra a 96 per PCR vuota.
- 7.5.4 Aggiungere 3 µL di DNA genomico (10~40 ng/µL) sul fondo di ogni provetta di reazione.
- 7.5.5 Aggiungere 3 µL di ogni AMP mix sul bordo superiore di ogni provetta di reazione. Riferirsi alla tabella di specificità dei primer di amplificazione nella sezione 14.1 per avere più informazioni.
- 7.5.6 Opzionale: aggiungere olio minerale per evitare evaporazione.
- 7.5.7 Coprire la micropiastra allestita con un foil adesivo. Assicurarsi della perfetta adesione del foil a tutti i pozzetti per evitare perdite dovute ad evaporazione durante la termociclazione. Assicurarsi che per ogni campione vengano dispensate le soluzioni corrette.
- 7.5.8 Aggiungere eventualmente un tappetino di gomma sopra la micropiastra di PCR e chiudere il coperchio del termociclatore. Avviare il programma di amplificazione mostrato nel paragrafo 5.1.
- 7.5.9 Una volta terminato il programma di amplificazione, è possibile procedere direttamente all'elettroforesi su gel o conservare la micropiastra a -20 °C e riprendere il protocollo successivamente.

HLA B AMP Mix Primers:

AMP mix gruppo specifiche (GSA)

AMP Mix ID	Gruppo allelico HLA B*	Allele(i) escluso(i)	Dimensioni (kbp)
B-01	07, 48, 81	48:02	~2.4 kbp
B-02	08, 42, <u>235:87*</u>		~2.3 kbp
B-03	13, 57	-	~2.4 kbp
B-04	14, 38, 39, 67	<u>267:02*</u>	~2.3 kbp
B-05	14	-	~2.2 kbp
B-06	15, 46	15:42	~2.3 kbp
B-07	18, 37	-	~2.7 kbp
B-08	27, 40, 47, <u>235:42*</u>	40:01/48/55 <u>227:05:04*</u>	~2.7 kbp
B-09	15:42, 35, 51, 52, 53, 58, 78 <u>256:06*</u>	51:42, <u>235:87*</u>	~2.2 kbp
B-10	35, 53, 57	-	~3.3 kbp
B-11	40	40:02/03/04/06 /08/40/55	~2.4 kbp
B-12	41	-	~2.4 kbp
B-13	44 <u>251:42, 83:01*</u>	44:27 <u>244:15/18*</u>	~2.6 kbp
B-14	45, 49, 50	-	~2.7 kbp
B-15	54, 55, 56, 59, 82	<u>256:06</u> <u>59:02/03/04*</u>	~2.3 kbp

*Mancanza di dati di sequenza intronica

AMP mix locus specifica (LSA)

AMP Mix ID	Gruppo allelico HLA B*	Allele(i) escluso(i)	Dimensioni (kbp)
B-L	Tutti gli alleli del locus B	-	~3.0 kbp

14. APPENDICI

14.1 Tabella di specificità dei primer di amplificazione

HLA A AMP Mix Primers:

AMP mix gruppo specifiche (GSA)

AMP Mix ID	Gruppo allelico HLA A*	Allele(i) escluso(i)	Dimensioni (kbp)
A-01	01, 11, 36	-	~2.4 kbp
A-02	11	-	~2.3 kbp
A-03	02	-	~2.0 kbp
A-04	03	-	~2.5 kbp
A-05	23	23:17	~2.3 kbp
A-06	23, 24	24:33	~2.0 kbp
A-07	29, 32, 74	<u>-232:04*</u>	~2.3 kbp
A-08	30	-	~2.8 kbp
A-09	31, 33	-	~2.6 kbp
A-10	25, 26, 34, 43, 66	-	~2.4 kbp
A-11	68, 69, 34:01, 66:02/03	<u>?34:05*</u>	~2.4 kbp
A-12	80:01	-	~2.8 kbp

*Mancanza di dati di sequenza intronica

AMP mix locus specifica (LSA)

AMP Mix ID	Gruppo allelico HLA A*	Allele(i) escluso(i)	Dimensioni (kbp)
A-L	Tutti gli alleli del locus A	-	~ 3.0 kbp

7.6 Gel elettroforesi

7.6.1 Preparazione del gel

- 7.6.1.1 Preparare una quantità sufficiente di gel d'agarosio al 2% per risolvere il numero totale di reazioni di PCR. Seguire le istruzioni d'uso del produttore del sistema di casting.
- 7.6.1.2 Aggiungere una quantità di etidio bromuro di modo che la concentrazione finale dell'intercalante sia pari a 0.5 µg/ml.
- 7.6.1.3 Assicurarsi che ogni pozzetto del gel abbia un volume minimo di 15 µL.
- 7.6.1.4 Assicurarsi che il tampone di corsa per l'elettroforesi corrisponda a quello utilizzato per la preparazione del gel.

7.6.2 Esecuzione della migrazione su gel

- 7.6.2.1 Caricare 2 µl di ogni reazione di PCR all'interno dei pozzetti nella sequenza adeguata.
- 7.6.2.2 Far avvenire la migrazione a 10V/cm fino a che il rosso cresolo sia migrato per 1.4-2.0 cm all'interno del gel.
- 7.6.2.3 Al termine della migrazione, posizionare il gel di agarosio su un transilluminatore UV. Catturare l'immagine del gel per determinare l'avvenuta amplificazione e il suo livello quantitativo.

7.7 Purificazione dei prodotti di PCR (ExoSAP) :

- 7.7.1 Aggiungere 4 µL di ExoSAP ad ogni provetta di reazione contenente un amplificato da PCR allo scopo di eliminare qualsiasi residuo di primer e di dNTPs.
- 7.7.2 Centrifugare brevemente, sigillare con un foil adesivo, coprire con un tappetino.
- 7.7.3 Chiudere il coperchio riscaldato ed avviare il programma HLAssure™ SBT Exo-SAP mostrato nel paragrafo 5.1 del presente manuale.

7.8 Reazioni di sequenziamento:

- 7.8.1 Stimare la quantità di prodotto di PCR in ogni provetta sulla base dell'immagine catturata su gel. **Fare riferimento alla tabella sottostante per decidere la quantità appropriata di prodotto di PCR da utilizzare nel sequenziamento.**

Dimensioni degli ampliconi (bp)	Quantità (ng)
200~500	5-10
500~1000	10~20
1000~3000	15~50

- 7.8.2 Calcolare il numero totale di reazioni di sequenza richieste sulla base della Tabella di specificità dei primer di sequenza nella sezione 14.2.
- 7.8.3 Utilizzare la tabella sottostante per preparare la mix di sequenziamento BDT.

No. di reazioni	1	10	30
	*BDT Ready Reaction Premix	1 µL	10 µL
5X BDT buffer	0.5 µL	5 µL	15 µL
Totale	1.5 µL	15 µL	45 µL

*BDT: Big Dye Terminator (v1.1 o v3.1)

- 7.8.4 Aggiungere 1.5 µL di mix di sequenziamento BDT ad ogni provetta di reazione.
- 7.8.5 Aggiungere 2.5 µL di ogni SEQ mix ad ogni provetta di reazione.
- 7.8.6 Aggiungere 1 µL di prodotto di PCR purificato ad ogni provetta di reazione.
- 7.8.7 Centrifugare brevemente, sigillare con foil adesivo.
- 7.8.8 Avviare il programma Sequencing HLAssure™ SBT mostrato nel paragrafo 5.1.

11. BIBLIOGRAFIA

1. Cruse JM and Lewis RE, 1998, Atlas of Immunology. CRC Press: 77-97
2. Terasaki, P.I., Bernoco, F., Park, M.S., Ozturk, G., and Iwaki, Y. Microdroplet testing for HLA-A, -B, -C and -D antigens. American Journal of Clinical Pathology 69:103-120, 1978.
3. Newton, C.R., Graham, A., Heptinstall, E., Powell, S.J., Summers, C., Kalsheker, N., Smith, J.C., and Markham, A.F. Analysis of any point mutation in DNA. The amplification refractory mutation system (ARMS). Nucleic Acids Research 17:2503-2516, 1989.

12. TRADEMARK UTILIZZATI NEL DOCUMENTO

HLAssure™
AccuType™
Applied Biosystems
GeneAmp®
Texas BioGene, Inc.

13. BREVETTI UTILIZZATI NEL DOCUMENTO

Il presente prodotto è ottimizzato per l'uso nella reazione a catena della polimerasi ("PCR") che è coperto da brevetti di Roche Molecular Systems, Inc. ed F. Hoffmann-La Roche Ltd ("Roche"). Non viene fornita esplicitamente o implicitamente alcuna licenza nell'uso del processo di PCR all'acquirente del presente prodotto. Informazioni ulteriori sull'acquisto delle licenze per l'esecuzione della PCR possono essere ottenute contattando, negli Stati Uniti d'America, il Direttore delle licenze presso la Roche Molecular Systems, Inc. 1145 Atlantic Avenue, Alameda, California 94501, o al di fuori degli Stati Uniti d'America il PCR Licensing Manager, F. Hoffmann-La Roche Ltd, Grenzacherstr. 124, CH-4070 Basilea, Svizzera.



Texas BioGene Inc., Room A, 14F., Bldg. F, No. 3, Yuancyu St.,
Nangang District, Taipei City 115, Taiwan

Da 10 a 24 campioni di DNA standard provenienti dall'International Histocompatibility Working Group (IHWG) sono stati tipizzati utilizzando HLAAssure™ SE SBT Kit per 5 volte nell'ambito di studi di riproducibilità intra- ed inter-lotto. I dati mostrano una riproducibilità del 100% per tutti i loci HLA.

10. PROBLEMI E SOLUZIONI

Problema	Possibile causa	Soluzione
Bande deboli o assenza di banda(e) dopo amplificazione	Qualità scarsa del DNA	Ripetere la purificazione del DNA e assicurarsi che il rapporto A260/A280 sia 1.65-1.80.
	Quantità insufficiente di DNA	Assicurarsi che la concentrazione di DNA sia nel range suggerito di 10~40 ng/μl.
	Attività di Taq polimerasi insufficiente	Assicurarsi di aver aggiunto una quantità sufficiente di Taq polimerasi e che l'enzima non sia degradato.
	Termociclatore non calibrato uniformemente	Calibrare il termociclatore.
	Colorazione con etidio bromuro insufficiente	Ricolorare il gel di agarosio in tampone fresco 0.5X TBE con 0.5 μg/ml di etidio bromuro.
Presenza di banda(e) falsa positiva dopo amplificazione	Concentrazione di DNA eccessiva	Assicurarsi che la concentrazione di DNA sia nel range suggerito di 10~40 ng/μl.
	Attività eccessiva della Taq polimerasi	Assicurarsi di aver aggiunto la corretta quantità di EZTaq come indicato a pag. 9.
	Termociclatore non calibrato uniformemente	Calibrare il termociclatore.

7.9 Precipitazione in etanolo del prodotto di reazione di sequenziamento:

- 7.9.1 Eseguire la precipitazione in etanolo per togliere l'eccesso di BDTA.
- 7.9.2 Aggiungere 5 μl di acqua deionizzata e centrifugare brevemente.
- 7.9.3 Aggiungere 2 μl di NaOAc/EDTA (1.5M/250mM) ad ogni provetta di reazione contenente prodotto di reazione di sequenziamento.
- 7.9.4 Centrifugare brevemente.
- 7.9.5 Aggiungere 25 μl di etanolo 100% ad ogni provetta, coprire la micropiastra PCR con foil adesivo.
- 7.9.6 Vortexare la miscela brevemente ma in modo vigoroso.
- 7.9.7 Centrifugare a 2000 g per 30 minutes.
- 7.9.8 Togliere il foil adesivo, centrifugare la micropiastra al di sopra di un panno di carta a 50~100X g per 10 secondi.
- 7.9.9 Aggiungere 100 μl di etanolo 70~80% ad ogni provetta di reazione.
- 7.9.10 Centrifugare a 2000X g per 5 minuti.
- 7.9.11 Rimuovere il surnatante mediante spin inverso come al punto 7.9.8.

7.10 Preparazione dei campioni per l'elettroforesi capillare:

- 7.10.1 Preparare le reazioni di sequenziamento da caricare sul sequenziatore a capillari, aggiungendo 15 μl di HiDi Formamide o 0.3 mM EDTA ad ogni provetta di reazione.
- 7.10.2 Centrifugare brevemente per raccogliere la soluzione sul fondo delle provette.
- 7.10.3 In caso di aggiunta di formamide-HiDi, denaturare le reazioni di sequenziamento in un termociclatore per 2 minuti a 95 °C.
- 7.10.4 In caso di aggiunta di 0.3 mM EDTA, NON DENATURARE AL CALORE, caricare direttamente le reazioni sul sequenziatore.

7.11 Raccolta dei dati:

Procedere alla raccolta dei dati sulla base dei parametri specifici per lo strumento.

8. RISULTATI

8.1 Interpretazione dei dati

8.1.1 I dati di sequenza vengono processati con un programma software per identificare i diversi alleli HLA. Il software dev'essere in grado di importare i file di sequenza ed eseguire l'allineamento con il database allelico. Un software compatibile con questi reagenti è AccuType™ (Texas BioGene Inc., Texas, USA).

8.2 Analisi dei dati e impostazioni di AccuType™ SBT

8.2.1 Si noti che le sequenze gruppo specifiche si intendono da analizzare simultaneamente con le sequenze locus specifiche al fine di fornire risultati di tipizzazione non ambigui. Per ottenere risultati di tipizzazione accurati, le librerie di sequenza devono essere compatibili con le impostazioni in AccuType™.

8.2.1 Per consentire ad AccuType™ di identificare le sequenze specifiche è necessario includere la seguente nomenclatura come parte del nome del file del campione.

SampleName_SEQ Mix_AMP Mix.ab1

8.2.2 Per esempio, se un campione è sequenziato con la SEQ Mix A2F ed amplificato con la AMP Mix A02, la convenzione di nomenclatura corretta sarebbe SampleName_A2F_A02.ab1.

8.2.3 Per analisi con il software AccuType™ si prega di fare riferimento al manuale delle istruzioni d'uso del produttore.

8.3 Limitazioni del metodo

8.3.1 La buona qualità dei risultati di tipizzazione può essere garantita solo se vengono seguite scrupolosamente le istruzioni d'uso incluse.

8.3.2 Tutta la strumentazione, inclusi termociclatore e pipettatori, devono essere calibrati attentamente secondo le istruzioni del fornitore.

8.3.3 HLAssure™ SE SBT Kit è standardizzato con l'enzima EZ-Taq polimerasi della TBG. L'utilizzo di altre Taq polimerasi potrebbe determinare reazioni di PCR aspecifiche false positive.

8.3.4 Qualità e quantità di DNA devono essere nei range di limiti specificate nel manuale d'istruzione.

8.3.5 HLAssure™ SE SBT Kit non può risolvere tutte le combinazioni alleliche possibili. Quando si ottiene un risultato ambiguo utilizzando HLAssure™ SE SBT Kit, fare riferimento al

paragrafo 10, TROUBLESHOOTING, per identificarne le possibili cause e soluzioni. Se i risultati ambigui persistono, utilizzare un kit di tipizzazione con lo stesso livello di risoluzione di altra ditta o contattare il fabbricante o il vostro distributore locale per assistenza.

8.4 Controllo di qualità

Ogni lotto prodotto viene controllato con un pannello di campioni standard di DNA. Gli alleli contenuti in questi campioni di DNA reagiscono con i corrispondenti primer del kit. Il referto di questo controllo di qualità è disponibile su richiesta.

9. PRESTAZIONI

9.1 Prestazioni specifiche

HLAssure™ SE SBT Kit è stato confrontato con altri sistemi di tipizzazione SBT, testando 152 campioni casuali di sangue intero in tre località geografiche distinte. La concordanza è stata del 100% (152/152) per ogni locus A, B, DRB1, come mostrato nella tabella seguente:

Allele	Numero di test concordanti	Numero di test	Concordanza	95 %	
				Limiti confidenza Inferiore	Superiore
HLA-A	152	152	100%	100%	100%
HLA-B	152	152	100%	100%	100%
HLA-C	152	152	100%	100%	100%
HLA-DRB1	152	152	100%	100%	100%
HLA-DRB345	152	152	100%	100%	100%
HLA-DQB1	152	152	100%	100%	100%
HLA-DPB1	152	152	100%	100%	100%

9.2 Controllo di qualità di produzione

Ogni lotto prodotto viene controllato con un pannello di campioni standard di DNA. Gli alleli contenuti in questi campioni di DNA reagiscono con i corrispondenti primer del kit. Il referto di questo controllo di qualità è disponibile su richiesta.

9.3 Riproducibilità