

GEBRAUCHSFERTIG VORGETROPFT

Gebrauchsinformation

HISTO TYPE Null Kits

REF 70862: Null A*2409N

REF 70872: Null B*5111N

REF 70882: Null Cw*0409N

CE 0123

Testkits zur Typisierung von HLA-Klasse I Null Allelen
auf molekulargenetischer Basis



Inhalt:

1. Einführung	1
1.1 NMDP Richtlinie für hochauflösende HLA-Typisierungen	2
1.2 Testprinzip	2
2. Material	3
2.1 Inhalt der HISTO TYPE Null Kits	3
2.2 Erforderliches bzw. zusätzliches Material	3
2.2.1 Reagenzien.....	3
2.2.2 Geräte.....	3
2.3 Lagerung und Haltbarkeit	4
3. Leistungsdaten	4
4. Testdurchführung	4
4.1 Vorsichtsmaßnahmen und besondere Hinweise.....	4
4.2 DNA-Isolierung	5
4.3 Amplifikation	5
4.4 Testablauf	5
4.5 Gelelektrophorese	6
4.6 Dokumentation und Auswertung	7
5. Interpretation.....	7
6. Warn- und Entsorgungshinweise	7
7. Fehlermöglichkeiten.....	8
8. Literatur	9
9. Erklärung der Symbole auf den Etiketten	9

1. Einführung

1.1 NMDP Richtlinie für hochauflösende HLA-Typisierungen

Das NMDP (National Marrow Donor Program, USA) fordert für Stammzelltransplantationen eine hochauflösende HLA-A, B, C und DRB1 Typisierung des Empfängers und der potentiellen Spender. Eine Definition der akzeptablen Ergebnisse und der häufigen und gut dokumentierten Allele (Common and well documented = CWD alleles), die eindeutig identifiziert werden müssen, sind in einer Veröffentlichung von Cano et al. (2007)[1] beschrieben. In der Regel müssen Allele deren DNA-Sequenz in den für die Antigenbindungsstelle codierenden Exons identisch sind, nicht unterschieden werden. Das NMDP verlangt aber einen Test für die CWD Null-Allele A*2409N, B*5111N und Cw*0409N, wenn Hinweise auf assoziierte Allele oder Haplotypen vorliegen [2].

Null Allele	Alternatives häufiges Allel	Assoziierte Allele im Haplotype	Lokalisation des Polymorphismus
A*2409N	A*24020101	B*40 oder B*27	Exon 4
B*5111N	B*510101	A*02 oder DRB1*04 oder Cw*15 (A*0201, B*5111N, DRB1*0402, Cw*15BJ)	Exon 4
Cw*0409N	Cw*04010101	B*4403	Exon 7

1.2 Testprinzip

Der Einsatz der Polymerase Chain Reaction (PCR) in der HLA Typisierung ist inzwischen zur Routine geworden. Die Sequenzbestimmung von allen HLA-Allelen [3] ermöglicht eine spezifische und eindeutige Typisierung auf DNA-Ebene mit einer hohen Auflösung und entscheidenden Vorteilen gegenüber den konventionellen serologischen Methoden. Ausgangsmaterial für die Typisierung mit **HISTO TYPE SSP Kits** ist gereinigte, leukozytäre DNA. Die Testdurchführung basiert auf der **Sequence Specific Primer (SSP)[®]** PCR (siehe Abb. 1). Diese Methode nutzt die Tatsache, dass für eine erfolgreiche Reaktion beide Primer, speziell am 3'-Ende, keine Fehlpaarungen aufweisen dürfen [4]. Somit führt nur eine vollständige Übereinstimmung der Primer mit der Zielsequenz zu einem Amplifikat, welches durch eine anschließende Gelelektrophorese sichtbar gemacht wird.

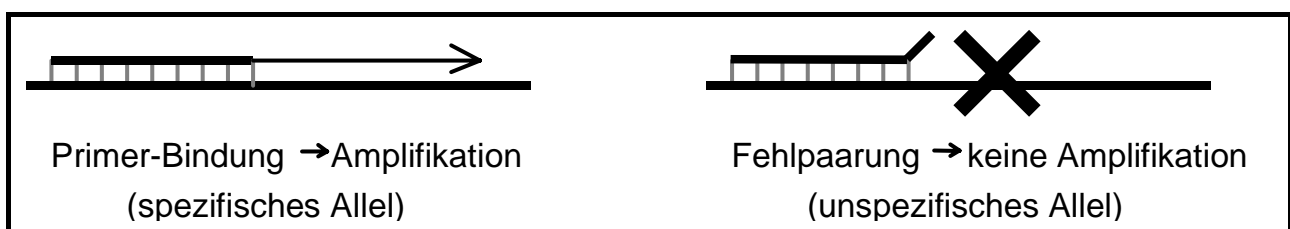


Abb. 1: Prinzip der SSP-PCR

Die verwendeten Primer wurden so gewählt, dass jeweils nur das zu testende Null-Allel erkannt wird. Zusätzlich ist in jedem Reaktionsmix ein Kontrollprimerpaar vorhanden, welches immer ein Amplifikat bilden muss. Bei Ausfall dieser Bande liegt entweder ein Pipettierfehler vor, oder die DNA enthielt inhibitorische Substanzen (siehe Fehlermöglichkeiten). In diesem Fall ist der Test nicht auswertbar! Je Test wird ein **vorgetropfter** und **getrockneter** Reaktionsansatz benötigt. Das Endvolumen beträgt 10 µl.

2. Material

2.1 Inhalt der HISTO TYPE Null Kits

- ◆ 3 HISTO TYPE Streifen (á 8 dünnwandige PCR GefäÙe) ausreichend für 24 Typisierungen. Die vorpipettierten und getrockneten Reaktionsansätze bestehen aus allelspezifischen Primern, internen Kontroll-Primern (spezifisch für das humane G3PDH Gen) und Nukleotiden.
- ◆ 1,1 ml 10 x PCR-Puffer
- ◆ Gebrauchsinformation

2.2 Erforderliches bzw. zusätzliches Material

2.2.1 Reagenzien

- ◆ **BAG EXTRA-GENE** Kit (optional) zur DNA-Extraktion aus Blut / Lymphozyten / Leukozyten oder Material für andere DNA-Extraktions-Methoden
- ◆ Taq-Polymerase (5 U/µl) , (z.B. Qiagen)
- ◆ DNA-Agarose
- ◆ 0,5 x TBE-Puffer (45 mM Tris, 45 mM Borsäure, 0,5 mM EDTA)
- ◆ DNA Längenstandard (Bestellnr.: 7097)
- ◆ Ethidiumbromid (EtBr)

2.2.2 Geräte

- ◆ DNA-Cycler (z. B. PTC 200-96V mit "Hot Bonnet"; Fa. BioRad)
- ◆ Flachgelkammer mit Kämmen und Spannungsgeber (200 - 300 V, 200 mA)
- ◆ UV-Leuchtplatte (220-310 nm)
- ◆ Photoeinrichtung (z.B. Polaroid-System) mit Filmen (Polaroid Typ 667)
- ◆ Kolbenhubpipetten (0,5-250 µl) undsterile Spitzen, ggf. mit Filter

2.3 Lagerung und Haltbarkeit

Der Kit wird ungekühlt versandt. Alle Kit-Reagenzien nach Erhalt bei -20...-80°C lichtgeschützt lagern. Die auf dem Außenetikett angegebene Haltbarkeit gilt für alle im Kit enthaltenen Reagenzien auch nach dessen erstem Gebrauch. Den 10x PCR-Puffer kurz vor Gebrauch auftauen.

3. Leistungsdaten

Analytische Sensitivität: Eine zuverlässige Typisierung ist bei einer Einsatzmenge von 40 – 80 ng DNA pro Reaktionsmix gewährleistet.

Diagnostische Spezifität: Die Zusammensetzung des Primermix gewährleistet eine zuverlässige Identifizierung der Allele A*2409N, B*5111N oder Cw*0409N basierend auf den zurzeit bekannten Sequenzdaten.

Die Richtigkeit und Reproduzierbarkeit der Reaktivität des Mixes wird für jedes Lot anhand von Kontrollproben mit bekannten HLA-Antigenen überprüft.

Für die HISTO TYPE Null Kits wurde eine Leistungsstudie mit mindestens 50 DNA Proben durchgeführt. Die erzielten Ergebnisse wurden mit denen einer anderen Typisierungsmethode verglichen. Bei den Typisierungsergebnissen konnten keine Diskrepanzen festgestellt werden.

4. Testdurchführung

4.1 Vorsichtsmaßnahmen und besondere Hinweise

Bei der PCR handelt es sich um eine äußerst sensitive Methode, die von geschultem, in Molekulartechnik und Histokompatibilitätstestung erfahrenem Personal durchgeführt werden sollte. Transplantationsrichtlinien und aktuelle EFI- / DGI-Standards sind zu beachten, um insbesondere bei diskrepanten Ergebnissen in serologischer und molekularbiologischer Testmethode, das Risiko von Fehlbestimmungen zu verringern. Besondere Vorsichtsmaßnahmen sind zu beachten, um Kontaminationen und damit falsche Reaktionen zu vermeiden:

- ◆ prinzipiell mit Handschuhen (puderfrei) arbeiten
- ◆ bei jedem Pipettierschritt neue Spitzen (mit Filtereinsatz oder integriertem Stempel) verwenden
- ◆ zwei getrennte Arbeitsbereiche für die **Prä-Amplifikation** (DNA-Isolierung, Ansetzen der Reaktionen) und die **Post-Amplifikation** (Amplifikation, Gel-Elektrophorese, Dokumentation) benutzen; möglichst zwei getrennte Räume
- ◆ Geräte und andere Materialien nur an den jeweiligen Arbeitsplätzen verwenden und nie austauschen

V. PCR - Programm starten

Amplifikationsprotokoll

Programm Schritt	Temp.	Zeit	Anzahl Zyklen
Erste Denaturierung	96°C	5 Min	1 Zyklus
Denaturierung	96°C	20 Sek	5 Zyklen
Annealing+Extension	68°C	60 Sek	
Denaturierung	96°C	20 Sek	10 Zyklen
Annealing	64°C	50 Sek	
Extension	72°C	45 Sek	
Denaturierung	96°C	20 Sek	15 Zyklen
Annealing	61°C	50 Sek	
Extension	72°C	45 Sek	
Letzte Extension	72°C	5 Min	1 Zyklus

Cycler-Typen:

PTC100 / 200-96V

mit "Hot Bonnet";

(Fa. BioRad)

und

GeneAmp PCR-System

9600 / 9700 (bitte Heizrate

vom 9600 verwenden) (ABI)

Da Cycler verschiedener Hersteller sich in ihrem Verhalten unterscheiden und sogar verschiedene Cycler eines Typs unterschiedlich kalibriert sein können, muss ggf. das Amplifikationsprotokoll optimiert werden.

Prinzipiell kann folgendermaßen vorgegangen werden:

Bei **falsch positiven** Reaktionen (unspezifische Banden, zusätzliche Typen):

Erhöhung der Annealing-Temperatur in 1°C-Schritten.

Bei **falsch negativen Reaktionen** (fehlende Banden und/oder Amplifikationskontrollen):

Erniedrigung der Annealing-Temperatur in 1°C-Schritten und / oder Erhöhung der Annealing-Zeiten in 5-Sekunden-Schritten und / oder Erhöhung der Denaturierungs-Zeiten in 5-Sekunden Schritten.

Es wird empfohlen nur regelmäßig kalibrierte Cycler zu verwenden. Hierfür eignet sich gut der BAG-Cycler Check Kit (Bestellnr.: 7104).

Die Qualitätskontrollen wurde mit Cyclern des Typs PTC 200 bzw. 100 (MJ Research) und 9700 (ABI) durchgeführt.

4.5 Gelelektrophorese

Die Auftrennung und Auswertung der Amplifikationsprodukte erfolgt durch Elektrophorese über ein (Horizontal-) Agarose-Gel. Als Laufpuffer wird 0,5 x TBE (45 mM Tris, 45 mM Borsäure, 0,5 mM EDTA) - Puffer empfohlen. Die Gelstärke sollte 2,0 - 2,5% Agarose betragen. Vor dem Probenauftrag sollte das Gel mindestens 30 Min. polymerisieren. Nach Beendigung der Amplifikation werden die jeweiligen Proben dem Cycler entnommen und die kompletten Ansätze vorsichtig in jeweils eine Tasche des Gels pipettiert. Die Zugabe von Probenpuffer ist nicht mehr nötig. Zusätzlich sollte eine Tasche mit einem DNA-Längenstandard für den Größenvergleich beladen werden.

Die elektrophoretische Auftrennung erfolgt bei 10-12 V/cm (bei 20 cm Gel-Länge ca. 200-240 V) für 20-40 Min.. Nach abgeschlossenem Lauf wird das komplette Gel für 30-45 Min. in einer Ethidiumbromid(EtBr)-Lösung (ca. 0,5 µg/ml EtBr in H₂O oder TBE-Puffer) gefärbt. Alternativ kann auch EtBr (0,5 µg/ml) dem Elektrophorese-Puffer oder dem Agarose-Gel zugesetzt werden. Im Bedarfsfall kann das Gel für ca. 20-30 Min. in H₂O entfärbt werden.

4.6 Dokumentation und Auswertung

Zur Dokumentation wird das Gel auf einen UV-Transilluminator (220-310 nm) gelegt und mit einer geeigneten Kamera (z.B. Polaroid, Film Typ 667) fotografiert. Belichtungszeit und Blende sind so zu wählen, dass die Banden scharf gezeichnet sind und sich gegen den dunklen Hintergrund abheben (Näherungswerte: Blende 11, Belichtungszeit 1 Sekunde).

5. Interpretation

Es werden nur solche Banden als positiv gewertet, die bezüglich des DNA - Längenstandards die richtige Größe besitzen (s. Tab. 1). In allen Spuren ohne spezifische Amplifikation muss in jedem Fall die interne Kontrolle erscheinen. In den Ansätzen mit spezifischer (und unspezifischer) Reaktion fällt die interne Kontrolle meist schwächer aus oder kann gänzlich verschwinden! Bei nicht auswertbaren Ergebnissen siehe Fehlermöglichkeiten (7).

Tabelle 1: Größe der Amplifikate

HISTO TYPE Null Kit	Größe der spezifischen Bande	Größe der Kontrollbande
A*2409N	315 bp	1070 bp
B*5111N	670 bp	410 bp
Cw*0409N	700 bp	410 bp

6. Warn- und Entsorgungshinweise

Ethidiumbromid ist ein stark mutagenes Reagenz. Hautkontakt und Kontaminationen vermeiden! Die Gebrauchsinformation sowie die Warn- und Entsorgungshinweise des entsprechenden Herstellers sind zu beachten!

Der Transilluminator sendet sehr kurzwelliges UV-Licht aus, das Verbrennungen der Haut und der Netzhaut hervorrufen kann. UV-Gesichtsschutz tragen!

Sämtliche für den Test verwendete Materialien biologischen Ursprungs, die zur Gewinnung von DNA verwendet werden (z.B. Blut, sonstige Körperflüssigkeiten) sollten als potentiell infektiös betrachtet werden. Beim Umgang mit biologischen Materialien werden deshalb angemessene Sicherheitsvorkehrungen empfohlen (nicht mit dem Mund pipettieren; Schutzhandschuhe bei der Testdurchführung tragen; Händedesinfektion nach der Testdurchführung).

Biologische Materialien müssen vor der Entsorgung inaktiviert werden (z.B. durch Autoklavieren). Einwegmaterialien sind nach Gebrauch zu autoklavieren oder zu verbrennen.

Verschüttetes potentiell infektiöses Material sollte unverzüglich mit einem saugfähigen Papiertuch entfernt werden und der kontaminierte Bereich mit einem geeigneten Desinfektionsmittel oder 70%igem Ethanol desinfiziert werden. Material, das für die Entfernung von Verschüttetem benutzt wurde, muss vor der Entsorgung inaktiviert werden (z.B. durch Autoklavieren).

7. Fehlermöglichkeiten






Fehler	mögliche Ursache	Beseitigung
keine Amplifikation, Längenstandard sichtbar	DNA verunreinigt DNA degradiert	DNA-Isolierung wiederholen, evtl. andere Methode
	DNA-Konzentration zu hoch / zu niedrig	DNA-Konzentration ändern, DNA-Isolierung wiederholen
	Enzym fehlt oder Konzentration zu niedrig	Typisierung wiederholen, Enzym-Konzentration ändern
	DNA aus Heparin-Blut	Typisierung mit EDTA-/Citrat-Blut wiederholen
	falsche Amplifikationsparameter	Optimierung der Parameter (siehe 4.4)☆
Wiederholte Ausfälle (keine Kontroll- Bande) in einzelnen Spuren	Deckel der Reaktionsgefäße schließen nicht dicht; dadurch Wasserverlust und Konzentra- tionsänderung während PCR	Auf festen Sitz der Deckel achten
unspezifische Amplifikation, Zusatzbanden (zusätzliche Banden falscher Größe sind zu vernachlässigen)	Kontamination mit Amplifikaten	Typisierung wiederholen auf sauberes Arbeiten achten
	DNA mit Salzen verunreinigt	DNA-Isolierung wiederholen, evtl. andere Methode
	DNA-Konzentration zu hoch	weniger DNA einsetzen
	Enzym-Konzentration zu hoch	weniger Enzym einsetzen
	falsche Amplifikationsparameter	Optimierung der Parameter (siehe 4.4)☆
keine oder sehr schwache Banden sichtbar, Längenstandard kaum sichtbar	EtBr-Färbung zu schwach	Färbung wiederholen
Gel-Hintergrund leuchtet zu stark	Färbung zu lange, EtBr- Konzentration zu hoch	mit H ₂ O entfärben, EtBr niedriger konzentrieren
Verschmierte Banden im Gel	Laufpuffer zu heiß oder verbraucht; falscher Laufpuffer; Gel nicht ausgehärtet	Geringere Voltzahl wählen (frischen) 0,5x TBE Puffer verwenden mind. 30 Min. zwischen Präparation und Beladung des Gels warten

☆ Bei Verwendung der angegebenen Geräte und Materialien ist eine Optimierung der Amplifikationsparameter als letztes Hilfsmittel einzusetzen. In den meisten Fällen ist eine Auswertung durch die Eliminierung der Zusatzbanden aufgrund der Größenabweichung möglich.

8. Literatur

- 1 Cano P, et al., 2007, Human Immunology 68:392-417
- 2 http://bioinformatics.nmdp.org/POLICIES/policies_idx.html
- 3 Bodmer, J. et al., 1997. Tissue Antigens 49:297-321
- 4 Newton CR, 1989. Nucleic Acids Res. **17**:2503-2516
- 5 Maniatis et al., 1989. Molecular Cloning: A Laboratory Manual. New York: Cold Spring Harbour Laboratory
- 6 Beutler, E. et al., 1990. BioTechniques **9**:166

9. Erklärung der Symbole auf den Etiketten

	In-vitro-Diagnostikum
	Lagertemperatur
	Lot-Nr.
	Verwendbar bis
REF	Bestell-Nr.
	Gebrauchsinformation beachten

① Die SSP-Methode entspricht der geschützten Bezeichnung ARMS™ der Firma ZENECA, Manchester. Die Methode ist geschützt unter der europäischen Patentnummer 0 332 435 B1 und wird mit Einverständnis der Firma ZENECA benutzt.



BAG Health Care GmbH
 Amtsgerichtsstraße 1-5
 35423 Lich/Germany

Tel.: +49 (0) 6404/925-0 www.bag-healthcare.com
 Fax: +49 (0) 6404/925-250 info@bag-healthcare.com

Auftragsannahme/Ordering:
 Tel.: +49 (0) 6404/925-450
 Fax: +49 (0) 6404/925-460
 verkauf@bag-healthcare.com

Customer Service:
 Tel.: +49 (0) 6404/925-125
 Fax: +49 (0) 6404/925-421
 service@bag-healthcare.com