

- inklusive Taq-Polymerase -

Gebrauchsinformation

HISTO TYPE SSP Kits

Low resolution

CE 0123

Testkits zur Typisierung von HLA - Allelen
(Klasse I: HLA-A,B,C und Klasse II: HLA-DR,DQ)
auf molekulargenetischer Basis

IVD

**20 Typisierungen
gebrauchsfertig vorgetropft**

REF 7204: HISTO TYPE A low	(24 Mixe, rot)
REF 7205: HISTO TYPE B low	(48 Mixe, weiß)
REF 7206: HISTO TYPE C low	(24 Mixe, gelb)
REF 7207: HISTO TYPE DR low	(24 Mixe, violett)
REF 7221: HISTO TYPE DQB low	(8 Mixe, weiß)
REF 7222: HISTO TYPE DQB high	(46 Mixe, blau)
REF 7223: HISTO TYPE ABDR	(96 Mixe, weiß)
REF 7225: HISTO TYPE ABC	(96 Mixe, blau)
REF 7226: HISTO TYPE DR/DQ	(32 Mixe, weiß)

Inhalt

1. Produktbeschreibung	2
2. Material	3
2.1 Inhalt der HISTO TYPE SSP Kits	3
2.2 Erforderliches bzw. zusätzliches Material	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 Gelelektrophorese	8
4.5 Dokumentation und Auswertung	9
5. Warn- und Entsorgungshinweise	10
6. Mögliche Fehlerquellen	11
7. Literatur	12
8. Erklärung der Symbole auf den Etiketten	12

1. Produktbeschreibung

Der Einsatz der Polymerase Chain Reaction (PCR) in der HLA-Typisierung ist inzwischen zur Routine geworden. Die Sequenzbestimmung von allen HLA-Allelen [1] 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) [2,3]. Diese Methode nutzt die Tatsache, daß für eine erfolgreiche Reaktion beide Primer, speziell am sogenannten 3'-Ende, keine Fehlpaarungen aufweisen dürfen. Somit führt nur eine vollständige Übereinstimmung der Primer mit der Zielsequenz zu einem Amplifikat, welches durch eine anschließende Gelelektrophorese sichtbar gemacht wird.

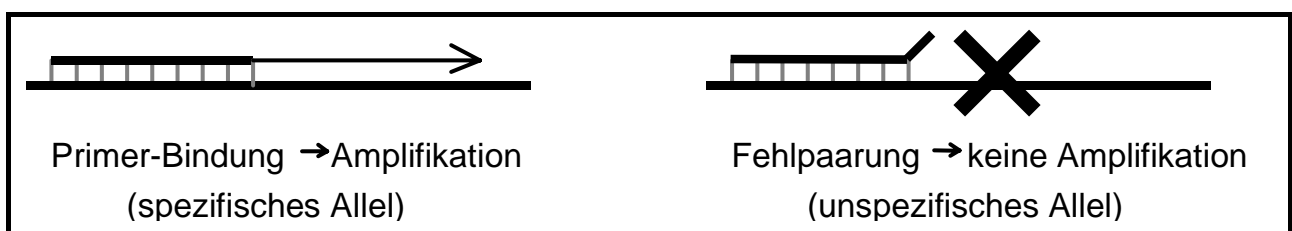


Abb. 1: Prinzip der SSP-PCR

Die Zusammensetzung der verschiedenen Primer-Mixe ermöglicht eine eindeutige Identifizierung der jeweils in den Auswertediagrammen angegebenen HLA-Typen. Je Typisierung wird eine bestimmte Anzahl (8, 24, 32, 48 oder 96) **vorgetropfter** und **getrockneter** Reaktionsansätze inkl. interner Amplifikationskontrolle mit einem Endvolumen von 10 µl eingesetzt.

2. Material

2.1 Inhalt der HISTO TYPE SSP Kits

- ◆ 10/20 HISTO TYPE Platten ausreichend für 10/20 HLA Typisierungen. Die vorpipettierten und getrockneten Reaktionsansätze enthalten allelspezifische Primer, interne Kontroll-Primer (spezifisch für das humane G3PDH Gen) und Nukleotide. Der Reaktionsmix Nr. 1 ist markiert. In der letzten Position befindet sich bei einigen HISTO TYPE - Produkten die Kontaminationskontrolle (siehe beiliegende lotspezifische Spezifitätstabelle und Auswertediagramm). Die Lot-Nummer ist auf jede Platte/Streifen gedruckt.
- ◆ 3 x PCR-Streifen (à 8) Kontaminationskontrolle mit internen Kontrollprimern und amplifikatspezifischen Primern (liegen nicht extra bei, wenn die Kontaminationskontrolle in der letzten Position der Testplatten integriert ist).
- ◆ 10 x PCR-Puffer für jeweils 10/20 Typisierungen
- ◆ Taq-Polymerase (5 U/µl)
- ◆ 8er-Streifen Deckel (à 12 Stück) oder PCR Folie für jeweils 10/20 Typisierungen
- ◆ Gebrauchsinformation, Spezifitätstabelle, Auswertediagramm und Worksheet

2.1 Erforderliches bzw. zusätzliches Material

- ◆ **BAG EXTRA-GENE** Kit (optional) zur DNA-Extraktion aus Blut / Lymphozyten / Leukozyten oder Material für andere DNA-Extraktions-Methoden
- ◆ Kolbenhubpipetten (0,5-250 µl)
- ◆ sterile Spitzen, ggf. mit Filter
- ◆ DNA-Cycler (z. B. PTC 200 von MJ Research/Fa. BioRad mit beheiztem, justierbarem Deckel)

Geräte und Material für die Gelelektrophorese

- ◆ DNA-Agarose
- ◆ 0,5 x TBE-Puffer (45 mM Tris, 45 mM Borsäure, 0,5 mM EDTA)
- ◆ Ethidiumbromid (EtBr)
- ◆ Flachgelkammer mit Kämmen (mind. 25 Taschen)
- ◆ Spannungsgeber (200 – 300 V, 200 mA)
- ◆ DNA Längenstandard (Bestellnr.: 7097)

Geräte zur Auswertung und Dokumentation

- ◆ UV-Leuchtplatte (220-310 nm)
- ◆ Photoeinrichtung (z.B. Polaroid-System mit Filmen Polaroid Typ 667)

2.3 Lagerung und Haltbarkeit

Der Kit wird auf Trockeneis versandt. Nach Erhalt werden alle Kit-Reagenzien bei -20...-80°C lichtgeschützt gelagert. Die Haltbarkeitsdauer ist den Etiketten auf den jeweiligen Reagenzien zu entnehmen und gilt auch nach dem ersten Öffnen. Die auf dem Außenetikett angegebene Haltbarkeit entspricht dem Kitbestandteil mit der kürzesten Haltbarkeit. Den 10 x PCR-Puffer kurz vor Gebrauch auftauen.

3. Leistungsdaten

Analytische Sensitivität: Eine zuverlässige Typisierung ist bei einer Einsatzmenge von 50 – 80 ng DNA pro Reaktionsmix gewährleistet.

Diagnostische Spezifität: Die Zusammensetzung der Primermixe gewährleistet eine zuverlässige Identifizierung der auf dem Auswertediagramm angegebenen HLA-Typen basierend auf den zur Zeit bekannten Sequenzdaten. Es werden regelmäßig Updates durchgeführt.

Die Richtigkeit und Reproduzierbarkeit der Reaktivität der einzelnen Mixe wird für jedes Lot anhand von Kontrollproben mit bekannten HLA-Antigenen überprüft. Nicht erfasste bzw. wegen ihrer Seltenheit nicht getestete Allele sind auf dem Auswertediagramm bzw. in der Spezifitätstabelle kenntlich gemacht.

Für alle HISTO TYPE SSP Produkte wurde eine Leistungsstudie mit mindestens 50 DNA Proben durchgeführt. Die erzielten Ergebnisse wurden mit denen eines anderen Anbieters von SSP Kits 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 (möglichst 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); möglichst zwei getrennte Räume
- ◆ Geräte und andere Materialien nur an den jeweiligen Arbeitsplätzen verwenden und nicht austauschen

4.2 DNA-Isolierung

Für die Typisierung eines Patienten werden 5-10 µg Leukozyten-DNA (entspricht etwa 0,5 ml Blut) benötigt. Bestens geeignet für die Isolierung ist z.B. der **BAG EXTRA-GENE** Kit, welcher ohne Einsatz von giftigen Chemikalien oder Lösungsmitteln in kurzer Zeit reine DNA aus Vollblut liefert. Weiterhin sind andere in der Literatur beschriebene Methoden [5] wie die Chloroform-Triethylammoniumbromid (CTAB)-Methode oder Phenol-Chloroform Reinigung geeignet, DNA mit ausreichender Reinheit zu erhalten. Heparin kann unter Umständen die PCR-Reaktion hemmen [6]. Es wird daher der Einsatz von EDTA- oder Citrat-Blut für die Typisierung empfohlen. Die DNA sollte einen Reinheitsindex (Extinktionsverhältnis OD_{260}/OD_{280}) von >1.5 und <2.0 aufweisen.

4.3 Amplifikation

Alle vorpipettierten Reaktionsmische beinhalten bereits die allelspezifischen Primer, Nukleotide sowie die Primer der internen Amplifikationskontrolle und liegen in getrockneter Form vor. Die Amplifikationsparameter sind auf ein Endvolumen von 10 µl optimiert.

- 1.: Die gewünschte Anzahl der HISTO TYPE -Platten aus dem Gefrierschrank entnehmen und den 10 x PCR-Puffer auftauen.
- 2.: Den Master-Mix bestehend aus 10 x PCR-Puffer, DNA-Lösung, Taq-Polymerase und Aqua dest. zusammenpipettieren und gründlich vortexen. Die verschiedenen HISTO TYPE SSP Kits werden mit dem gleichen Master-Mix angesetzt und sind daher miteinander kombinierbar. Die Zusammensetzung des Master-Mixes in Abhängigkeit von der Anzahl der Reaktionsmische ist in Tabelle 1 (S.6) angegeben.

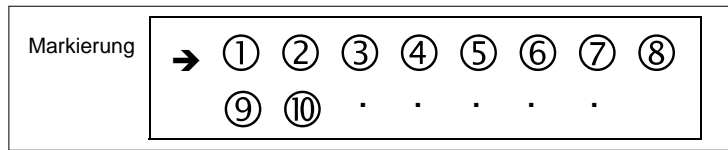
Wenn eine **Kontaminationskontrolle** mitgeführt werden soll, wird der Master-Mix zunächst ohne DNA-Lösung angesetzt und 10 µl von diesem Mix in die Kontaminationskontrolle pipettiert. Anschließend wird die DNA-Lösung zugegeben und der restliche Master-Mix auf die vorgetropften Reaktionsmische verteilt.

Tabelle 1: Zusammensetzung des Master-Mixes in Abhängigkeit von der Anzahl der Reaktionsmische:

Anzahl Mixe	Aqua dest.	10 x PCR-Puffer	DNA-Lsg. (50-80 ng/µl)	Taq-Polymerase (5 U/µl)	Gesamt-volumen	
1	8	1	1	0,08	10	µl
8	79	10	10	0,8	100	µl
24	222	28	28	2,2	280	µl
30	269	34	34	2,7	340	µl
32	285	36	36	2,9	360	µl
48	412	52	52	4,2	520	µl
54	459	58	58	4,6	580	µl
56	475	60	60	4,8	600	µl
72	618	78	78	6,2	780	µl
80	681	86	86	6,9	860	µl
96	808	102	102	8,2	1020	µl

⇒ Bei abweichenden DNA-Konzentrationen sind die Mengen von DNA und Wasser entsprechend zu variieren. (z.B. für 24 Mixe: 11,7 µl DNA (120 ng/µl) und 238 µl Aqua dest.)

3.: Nach dem Vortexen werden von diesem Gemisch umgehend je **10 µl** zu den bereits in den Reaktionsgefäßen vorgelegten Reaktionsmischen pipettiert. Nach jedem



Pipettierschritt muss die Spitze gewechselt werden. Die Gefäße werden mit den dafür vorgesehenen Deckeln **dicht** verschlossen. Es ist darauf zu achten, dass die Deckelinnenseiten und die oberen Ränder nicht mit den Fingern berührt werden, um Verunreinigungen zu vermeiden. Bei Cyclern mit festdrehbarem Deckel können auch wiederverwendbare PCR-Matten zum Verschließen verwendet werden.

Durch leichtes nach unten Schütteln der Platte sollte das blaue Pellet am Gefäßboden etwas angelöst werden, und es sollte darauf geachtet werden, dass sich die gesamte Reaktionslösung im Gefäßboden befindet.

4.: Die Reaktionsgefäße in den Cyler stellen (auf festen Sitz achten!) und das PCR-Programm starten. Ein Überschichten der Ansätze mit Mineralöl ist bei Verwendung eines beheizten und justierbaren Deckels **nicht** nötig !

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:

PTC 100 / 200 (MJ Research/Fa. BioRad) und GeneAmp PCR-System 9600 / 9700 (bitte Heizrate vom 9600 verwenden) (Fa. ABI)

Da Cyler 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.

4.4 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 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 Elektrodenabstand 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.

4.5 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).

Unter Einbeziehung der Spezifitätstabelle und des Auswertediagramms (Extra-Beilage) werden nur solche Banden als positiv gewertet, die bezüglich des DNA - Längen-

standards die richtige Größe besitzen. Die korrekten Größen sind der Tabelle bzw. dem Diagramm zu entnehmen. In allen Spuren ohne spezifische Amplifikation muß in jedem Fall die interne Kontrolle bei **1070 bp** 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 Fehlerbeseitigung (6.).

In der **Kontaminationskontrolle** darf keine Bande erscheinen. Beim Vorliegen einer Kontamination mit genomischer DNA erscheint eine Bande bei 282 bp. Zusätzlich können Banden bei 78 bp, 104 bp, 176 bp und ca. 580 bp zu sehen sein. Liegt eine Kontamination mit Amplifikaten vor, erscheint eine Bande bei 78 bp und/oder 104 bp und/oder 282 bp.

5. 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).

6. Mögliche Fehlerquellen






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-Blut wiederholen
	falsche Amplifikationsparameter	Optimierung der Parameter (siehe 4.3)☆
Wiederholte Ausfälle (keine Kontroll- Bande) in einzelnen Spuren	Deckel der Reaktionsgefäße schließen nicht dicht; dadurch Wasserverlust und Konzentra- tionsänderung während PCR	Deckel fest verschließen; evtl. Reaktionsgefäße von anderen Herstellern verwenden
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 4.3)☆
Auswertung ergibt mehr als 2 Spezifitäten	Kontamination mit Fremd-DNA (Amplifikat !) Neues Allel	Reaktionsmixe testen (ohne Zugabe von DNA) auf sauberes Arbeiten achten
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 Falscher Laufpuffer	Geringere Voltzahl wählen 0,5x TBE Puffer verwenden

☆ 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.

7. Literatur

1. Bodmer, J. et al., 1997. Tissue Antigens **49**:297-321
2. Olerup, O., Zetterquist H., 1992. Tissue Antigens **39**:225-235
3. Olerup, O., Zetterquist H., 1993. Tissue Antigens **41**:55-56
4. Lu, Y.H. and Négre, S., 1993. Trends in Genetics **9**:297
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
7. Bunce, M., 1995. Tissue Antigens **46**:355-367

8. 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 ARMSTTM 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 Tel.: +49 (0) 6404/925-0 www.bag-healthcare.com
35423 Lich/Germany 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