

## Istruzioni d'uso

### Amplificazione e sequenziamento mediante PCR dei loci HLA di classe I e II

Versione n.: 1.0  
Data di pubblicazione: ottobre 2017

**IVD**



CareDx Pty Ltd  
20 Collie Street  
Fremantle 6160  
Western Australia  
Australia

**EC REP**

Qarad bvba  
Cipalstraat 3  
B-2440 Geel  
Belgio

# INDICE

<b>PRINCIPIO</b> .....	<b>3</b>
<b>USO PREVISTO</b> .....	<b>3</b>
<b>COMPOSIZIONE DEL KIT</b> .....	<b>4</b>
<b>CONDIZIONI DI CONSERVAZIONE</b> .....	<b>9</b>
<b>MATERIALI, REAGENTI E ATTREZZATURE NON FORNITI</b> .....	<b>9</b>
<b>CAMPIONI NECESSARI</b> .....	<b>10</b>
<b>AVVERTENZE E PRECAUZIONI DI SICUREZZA</b> .....	<b>11</b>
<b>SIMBOLI</b> .....	<b>11</b>
<b>PROCEDURA</b> .....	<b>12</b>
1. PCR.....	12
2. ELETTROFORESI SU GEL DI AGAROSIO.....	13
3. PURIFICAZIONE DEL PRODOTTO DI PCR.....	13
4. REAZIONE DI SEQUENZIAMENTO .....	14
5. PURIFICAZIONE DEI PRODOTTI DI REAZIONE DEL SEQUENZIAMENTO.....	16
6. DENATURAZIONE & ELETTROFORESI DEI PRODOTTI DI REAZIONE DEL SEQUENZIAMENTO .....	16
7. MODIFICA E ANALISI DEGLI ELETTROFEROGRAMMI.....	17
<b>CARATTERISTICHE DI FUNZIONAMENTO</b> .....	<b>18</b>
ACCURATEZZA .....	18
LIMITE DI RILEVAZIONE.....	19
SPECIFICITÀ.....	19
<b>RESTRIZIONI E PRECAUZIONI</b> .....	<b>20</b>
<b>LICENZA</b> .....	<b>20</b>
<b>BIBLIOGRAFIA</b> .....	<b>20</b>
<b>RISOLUZIONE DEI PROBLEMI</b> .....	<b>21</b>
<b>PRODOTTI CORRELATI</b> .....	<b>29</b>
<b>ASSISTENZA TECNICA E RECAPITI</b> .....	<b>25</b>

## Principio

La procedura qui descritta per la tipizzazione di HLA basata sulla sequenza (SBT, Sequence Based Typing) è stata originariamente sviluppata da D. Sayer nel 2001<sup>1</sup> e adattata al formato di analisi in un'unica provetta nel 2004.<sup>2</sup> Essa prevede l'amplificazione iniziale della sequenza bersaglio seguita dal trattamento enzimatico per rimuovere i primer e i dNTP che non sono stati incorporati. L'amplicone viene poi usato come template per il sequenziamento diretto automatico del DNA in fluorescenza, usando primer di sequenziamento personalizzati e la chimica di sequenziamento del Big Dye<sup>®</sup> Terminator disponibile da Applied Biosystems<sup>™</sup> di Life Technologies<sup>™</sup>. I prodotti dell'estensione vengono purificati secondo il metodo di precipitazione in etanolo e denaturati con la formamide Hi-Di<sup>™</sup> disponibile da Applied Biosystems<sup>™</sup> di Life Technologies<sup>™</sup>, prima della separazione e dell'analisi mediante un sequenziatore automatico di DNA in fluorescenza. Si raccomanda di analizzare quindi i dati risultanti mediante il software di analisi delle sequenze ASSIGN<sup>™</sup> SBT disponibile da CareDx Pty Ltd.<sup>3-5</sup>

## Uso previsto

I kit OLERUP SBT<sup>™</sup> HLA SBT di CareDx Pty Ltd si utilizzano in laboratorio per tipizzare i geni HLA di Classe I (HLA-A, -B e -C) e di Classe II (HLA-DRB1, -DQB1 e -DPB1) a partire da DNA genomico. Ogni kit contiene reagenti che facilitano l'amplificazione mediante PCR e il sequenziamento del DNA di un dato gene. I dati di sequenziamento risultanti vengono poi interpretati mediante l'uso del software ASSIGN<sup>™</sup> SBT di CareDx Pty Ltd. Si sottolinea che questi kit SBT non vanno usati a scopo diagnostico.

## Composizione del kit

Kit	N. di catalogo		Contenuto PRE-PCR† (N. di provette)	Contenuto POST-PCR (N. di provette)										
<b>Classe I</b>														
HLA-A	XH-PD1.1-2(20)	20 test	<div style="border: 1px solid black; padding: 2px; display: inline-block;">DNA POL – HLA-A</div> <div style="border: 1px solid black; padding: 2px; display: inline-block;">HLA-A MIX</div>	1 x 25µL 1 x 352µL  1 x 60µL 1 x 880µL	<table border="1" style="border-collapse: collapse; text-align: center;"> <tr><td><b>AEX1F</b></td><td><b>AEX1R</b></td></tr> <tr><td><b>AEX2F</b></td><td><b>AEX2R</b></td></tr> <tr><td><b>AEX3F</b></td><td><b>AEX3R</b></td></tr> <tr><td><b>AEX4F</b></td><td><b>AEX4R</b></td></tr> </table>	<b>AEX1F</b>	<b>AEX1R</b>	<b>AEX2F</b>	<b>AEX2R</b>	<b>AEX3F</b>	<b>AEX3R</b>	<b>AEX4F</b>	<b>AEX4R</b>	1 x 44µL ciascuna  1 x 110µL ciascuna
	<b>AEX1F</b>	<b>AEX1R</b>												
<b>AEX2F</b>	<b>AEX2R</b>													
<b>AEX3F</b>	<b>AEX3R</b>													
<b>AEX4F</b>	<b>AEX4R</b>													
	XH-PD1.1-2(50)	50 test	<div style="border: 1px solid black; padding: 2px; display: inline-block;">DNA POL – HLA-A</div> <div style="border: 1px solid black; padding: 2px; display: inline-block;">HLA-A MIX</div>	1 x 25µL 1 x 352µL  1 x 60µL 1 x 880µL	<table border="1" style="border-collapse: collapse; text-align: center;"> <tr><td><b>AEX1F</b></td><td><b>AEX1R</b></td></tr> <tr><td><b>AEX2F</b></td><td><b>AEX2R</b></td></tr> <tr><td><b>AEX3F</b></td><td><b>AEX3R</b></td></tr> <tr><td><b>AEX4F</b></td><td><b>AEX4R</b></td></tr> </table>	<b>AEX1F</b>	<b>AEX1R</b>	<b>AEX2F</b>	<b>AEX2R</b>	<b>AEX3F</b>	<b>AEX3R</b>	<b>AEX4F</b>	<b>AEX4R</b>	1 x 44µL ciascuna  1 x 110µL ciascuna
<b>AEX1F</b>	<b>AEX1R</b>													
<b>AEX2F</b>	<b>AEX2R</b>													
<b>AEX3F</b>	<b>AEX3R</b>													
<b>AEX4F</b>	<b>AEX4R</b>													
HLA-B	BS-PD2.1-2(20)	20 test	<div style="border: 1px solid black; padding: 2px; display: inline-block;">DNA POL – HLA-B</div> <div style="border: 1px solid black; padding: 2px; display: inline-block;">HLA-B MIX</div>	1 x 25µL 1 x 352µL	<table border="1" style="border-collapse: collapse; text-align: center;"> <tr><td><b>BEX1F</b></td><td><b>BEX2F</b></td></tr> <tr><td><b>BEX2R</b></td><td><b>BEX3F</b></td></tr> <tr><td><b>BEX3R</b></td><td><b>BEX4F</b></td></tr> <tr><td><b>BEX4R</b></td><td></td></tr> </table>	<b>BEX1F</b>	<b>BEX2F</b>	<b>BEX2R</b>	<b>BEX3F</b>	<b>BEX3R</b>	<b>BEX4F</b>	<b>BEX4R</b>		1 x 44µL ciascuna
<b>BEX1F</b>	<b>BEX2F</b>													
<b>BEX2R</b>	<b>BEX3F</b>													
<b>BEX3R</b>	<b>BEX4F</b>													
<b>BEX4R</b>														

Kit	N. di catalogo	$\Sigma$	Contenuto PRE-PCR <sup>†</sup> (N. di provette)		Contenuto POST-PCR (N. di provette)		
	BS-PD2.1-2(50)	50 test	DNA POL – HLA-B HLA-B MIX	1 x 60µL 1 x 880µL	BEX1F BEX2R BEX3R BEX4R	BEX2F BEX3F BEX4F	1 x 110µL ciascuna
HLA-C	HH-PD 3.2-2(20)	20 test	DNA POL – HLA-C HLA-C MIX	1 x 25µL 1 x 352µL	CEX1F CEX2F CEX3F CEX4F CEX5F CEX6F CEX7F	CEX1R CEX2R CEX3R CEX4R CEX5R CEX6R	1 x 44µL ciascuna
	HH-PD 3.2-2(50)	50 test	DNA POL – HLA-C HLA-C MIX	1 x 60µL 1 x 880µL	CEX1F CEX2F CEX3F CEX4F CEX5F CEX6F CEX7F	CEX1R CEX2R CEX3R CEX4R CEX5R CEX6R	1 x 110µL ciascuna

Kit	N. di catalogo	$\Sigma$	Contenuto PRE-PCR <sup>†</sup> (N. di provette)	Contenuto POST-PCR (N. di provette)		
<b>Classe II</b>						
HLA-DRB1	HH-PD5.2-5(20)	20 test	DNA POL – DRB1 HLA-DRB1 MIX	1 x 10 $\mu$ L 1 x 370 $\mu$ L	DRB1EX2F DRB1EX2R-2 DRB1EX3R-2 RB-TG344-R	1 x 44 $\mu$ L ciascuna
	HH-PD5.2-5(50)	50 test	DNA POL – DRB1 HLA-DRB1 MIX	1 x 20 $\mu$ L 1 x 920 $\mu$ L	DRB1EX2F DRB1EX2R-2 DRB1EX3R-2 RB-TG344-R	1 x 110 $\mu$ L ciascuna
	LG-PD5.2-7(20)	20 test	DNA POL – DRB1 HLA-DRB1 MIX	1 x 10 $\mu$ L 1 x 370 $\mu$ L	DRB1EX2F DRB1EX2R-2 DRB1EX3F-7 DRB1EX3R-7 RB-TG344-R	1 x 44 $\mu$ L ciascuna
	LG-PD5.2-7(50)	50 test	DNA POL – DRB1 HLA-DRB1 MIX	1 x 20 $\mu$ L 1 x 920 $\mu$ L	DRB1EX2F DRB1EX2R-2 DRB1EX3F-7 DRB1EX3R-7 RB-TG344-R	1 x 110 $\mu$ L ciascuna
HLA-DQB1	PQ-PD6.2-2(20)	20 test	DNA POL – DQB1 HLA-DQB1 MIX	1 x 10 $\mu$ L 1 x 370 $\mu$ L	DQB1EX2F DQB1EX2R DQB1EX3F DQB1EX3R	1 x 44 $\mu$ L ciascuna
	PQ-PD6.2-2(50)	50 test	DNA POL – DQB1 HLA-DQB1 MIX	1 x 20 $\mu$ L 1 x 920 $\mu$ L	DQB1EX2F DQB1EX2R DQB1EX3F DQB1EX3R	1 x 110 $\mu$ L ciascuna

Kit	N. di catalogo	$\Sigma$	Contenuto PRE-PCR <sup>†</sup> (N. di provette)		Contenuto POST-PCR (N. di provette)		
	AN-PD6.2-3(20)	20 test	DNA POL – DQB1 HLA-DQB1 MIX	1 x 10 $\mu$ L 1 x 370 $\mu$ L	DQB1EX2F DQB1EX3F	DQB1EX2R-3 DQB1EX3R	1 x 44 $\mu$ L ciascuna
	AN-PD6.2-3(50)	50 test	DNA POL – DQB1 HLA-DQB1 MIX	1 x 20 $\mu$ L 1 x 920 $\mu$ L	DQB1EX2F DQB1EX3F	DQB1EX2R-3 DQB1EX3R	1 x 110 $\mu$ L ciascuna
HLA-DPB1	HH-PD10.1(20)	20 test	DNA POL – DPB1 HLA-DPB1 MIX	1 x 10 $\mu$ L 1 x 370 $\mu$ L	DPB1EX2F	DPB1EX2R	1 x 44 $\mu$ L ciascuna
	HH-PD10.1(50)	50 test	DNA POL – DPB1 HLA-DPB1 MIX	1 x 20 $\mu$ L 1 x 920 $\mu$ L	DPB1EX2F	DPB1EX2R	1 x 110 $\mu$ L ciascuna
	KD-PD10.2-1(20)	20 test	DNA POL – DPB1 HLA-DPB1 MIX	1 x 10 $\mu$ L 1 x 370 $\mu$ L	DPB1EX1F DPB1EX2F DPB1EX3F DPB1EX4F DPB1EX5F PB-AG341-R	DPB1EX1R DPB1EX2R DPB1EX3R DPB1EX4R DPB1EX5R	1 x 44 $\mu$ L ciascuna

Kit	N. di catalogo	$\Sigma$	Contenuto PRE-PCR <sup>†</sup> (N. di provette)		Contenuto POST-PCR (N. di provette)		
	KD-PD10.2-1(50)	50 test	<div style="border: 1px solid black; padding: 2px; display: inline-block;">DNA POL – DPB1</div> <div style="border: 1px solid black; padding: 2px; display: inline-block;">HLA-DPB1 MIX</div>	1 x 20 $\mu$ L 1 x 920 $\mu$ L	<div style="border: 1px solid black; padding: 2px; display: inline-block;">DPB1EX1F</div> <div style="border: 1px solid black; padding: 2px; display: inline-block;">DPB1EX1R</div> <div style="border: 1px solid black; padding: 2px; display: inline-block;">DPB1EX2F</div> <div style="border: 1px solid black; padding: 2px; display: inline-block;">DPB1EX2R</div> <div style="border: 1px solid black; padding: 2px; display: inline-block;">DPB1EX3F</div> <div style="border: 1px solid black; padding: 2px; display: inline-block;">DPB1EX3R</div> <div style="border: 1px solid black; padding: 2px; display: inline-block;">DPB1EX4F</div> <div style="border: 1px solid black; padding: 2px; display: inline-block;">DPB1EX4R</div> <div style="border: 1px solid black; padding: 2px; display: inline-block;">DPB1EX5F</div> <div style="border: 1px solid black; padding: 2px; display: inline-block;">DPB1EX5R</div> <div style="border: 1px solid black; padding: 2px; display: inline-block;">PB-AG341-R</div>	1 x 110 $\mu$ L ciascuna	

<sup>†</sup>Il kit PRE-PCR contiene una provetta di un mix per PCR locus-specifico (ad es. 

HLA-A MIX

) costituito da tampone per PCR, dNTP, MgCl<sub>2</sub> e primer per PCR locus-specifici, insieme a una provetta singola di DNA polimerasi (ad es. 

DNA POL- HLA-A

).

Il kit POST-PCR contiene i primer di sequenziamento (ad es. 

AEX1F

).

## Condizioni di conservazione

Le scatole PRE- e POST-PCR possono essere separate e conservate in appositi freezer PRE- e POST-PCR. Quando conservati a -20°C (un range di temperatura da -15°C a -25°C è accettabile), i componenti del kit possono essere utilizzati fino alla data di scadenza indicata nei contenitori esterni del kit e possono tollerare fino a 25 cicli di congelamento-scongelamento.

I test di stabilità accelerata per i kit HLA-A, -B, -C, DRB1, -DQB1 e -DPB1 hanno indicato una durata pari a 2,5 anni dalla data di fabbricazione quando conservati a -20°C. Poiché i test di conferma realizzati su tempi reali sono ancora in corso, si raccomanda caldamente di NON utilizzare questi kit oltre la loro data di scadenza.

Per mantenere ottimali le prestazioni del kit, i suoi componenti vanno rimossi dal luogo di conservazione a -20°C e portati rapidamente a temperatura ambiente prima dell'uso. I componenti del kit, con l'eccezione della polimerasi, devono quindi essere vortexati delicatamente per miscelare bene il contenuto di ciascuna provetta dopo lo scongelamento. Dopo l'uso, i kit/componenti vanno riposti immediatamente a -20°C.

## Materiali, reagenti e attrezzature non forniti

### PCR

1. Acqua sterile.
2. Pipette elettroniche o meccaniche e puntali resistenti alla contaminazione da aerosol.
3. Ciclatore termico con coperchio riscaldato.

Questi kit sono stati convalidati usando i seguenti ciclatori termici:

MJ Research PTC 225 DNA Engine DYAD™, Applied Biosystems™ di Life Technologies™, ciclatore termico Veriti™, Gene Amp® PCR System 9700 e Eppendorf Mastercycler® Pro.

**L'uso di questi kit su altri ciclatori termici necessita previa convalida da parte dell'utente.**

4. Provette per reazioni di ciclizzazione termica da 0,2 mL con parete sottile (strisce da 8 pozzetti o piastre da 96 pozzetti).  
Utilizzare le provette raccomandate per l'uso con il vostro ciclatore termico.
5. Provette sterili da 1,5 mL.
6. Area di lavoro sterile, come una cabina o una cappa aspirante di sicurezza biologica.
7. Centrifuga da banco con adattatore per piastre e capacità di raggiungere 2.500 x g.
8. Vortex.

### Elettroforesi su gel di agarosio

9. Apparato per elettroforesi su gel di agarosio.
10. Gel di agarosio (per biologia molecolare) all'1% in TBE contenente 0,1 µg/mL di etidio bromuro.
11. Tampone di caricamento.
12. Marcatori di PCR in grado di coprire l'intervallo da 300 a 1.300 pb.
13. Transilluminatore UV.

## **Purificazione del prodotto di PCR**

14. ExoSAP (USB® ExoSAP-IT® Cat N. 78200 per 100 reazioni o Illustra™ ExoProStar™ Cat N. US77702 per 100 reazioni)
15. MgCl<sub>2</sub> 2mM (disponibile da CareDx Pty Ltd, codice prodotto MgCl<sub>2</sub>-1.0(50) oppure MgCl<sub>2</sub>-1.0(3000))
16. Agitatore

**L'uso di tecniche alternative per la purificazione dei prodotti di PCR necessita la previa convalida da parte dell'utente.**

## **Reazione di sequenziamento**

17. Kit di sequenziamento BigDye® Terminator Cycle Sequencing Kit v3.1 o v1.1, Applied Biosystems™ di Life Technologies™.
18. Tampone per la reazione di sequenziamento 5X (CareDx Pty Ltd, codice prodotto SEQ BUF-2.0(400) oppure SEQ BUF-2.0(5000)) o tampone per sequenziamento 5X BigDye® Terminator v3.1 o v1.1 5X, Applied Biosystems™ di Life Technologies™.

## **Purificazione dei prodotti della reazione di sequenziamento**

19. EDTA 125mM, pH 8,0 (disponibile da CareDx Pty Ltd, codice prodotto EDTA-3.0(200) oppure EDTA-3.0(5000)).
20. Etanolo assoluto e all'80%. Ogni corsa richiede l'uso di etanolo all'80% preparato fresco, a base di etanolo assoluto e acqua sterile. **NON UTILIZZARE ETANOLO DENATURATO** (in alcuni Paesi noto anche come alcol metilato).

**L'uso di tecniche alternative per la purificazione dei prodotti del sequenziamento necessita la previa convalida da parte dell'utente.**

## **Denaturazione ed elettroforesi dei prodotti della reazione di sequenziamento**

21. Formamide Hi-Di™, Applied Biosystems™ di Life Technologies™, codice prodotto 4311320.
22. Sequenziatore automatico di DNA e accessori (ad es. ABI Prism® 3730 di Applied Biosystems™ di Life Technologies™), comprendente la raccolta dati e il software.  
Questi kit sono stati testati e convalidati sui sequenziatori capillari 3100, 3730 e 3730xl di Applied Biosystems™ di Life Technologies™ e relativi software.

**L'uso di altre tecniche di denaturazione e piattaforme di sequenziamento necessita la previa convalida da parte dell'utente.**

23. Software di analisi del sequenziamento del gene HLA (ad es. ASSIGN™ SBT, versione 3.6+ o successive, CareDx Pty Ltd).

## **Campioni necessari**

1. Acqua sterile (controllo negativo/senza templat).
2. DNA genomico umano ad alto peso molecolare (intervallo di concentrazione di 20-100 ng/μL in tampone Tris/EDTA e OD<sub>260/280</sub> > 1,8) estratto da campioni di sangue in toto anticoagulati con ACD o EDTA. **NON utilizzare campioni di sangue in toto contenenti eparina.**



## Avvertenze e precauzioni di sicurezza

- Questo kit deve essere utilizzato da personale di laboratorio addestrato e autorizzato.
- Tutti i campioni, le attrezzature e i reagenti devono essere manipolati secondo le norme di buona pratica di laboratorio. In particolare, tutto il materiale prelevato dai pazienti deve essere considerato come potenzialmente infetto. Si raccomanda caldamente l'impiego di guanti e di camici da laboratorio. Manipolare e smaltire tutti i materiali entrati in contatto con i campioni secondo le normative locali e nazionali vigenti.
- I componenti dei kit NON contengono sostanze pericolose.
- NON utilizzare i reagenti dopo la data di scadenza indicata.
- L'uso di componenti dei kit provenienti da lotti diversi NON è consigliato, perché potrebbe compromettere le prestazioni dell'analisi.
- L'uso di reagenti non compresi in questo kit o non elencati nel paragrafo "Materiali, reagenti e attrezzatura non forniti in questo kit" (ad es. *Taq* DNA polimerasi alternative) NON è consigliato. Tale uso potrebbe compromettere le prestazioni dell'analisi.
- Si deve prestare cautela per evitare contaminazioni incrociate dei campioni di DNA. Laddove possibile, cambiare puntale tra campioni diversi di DNA.
- Le attività di Pre- e di Post-PCR devono essere sempre svolte in ambienti separati fisicamente. Utilizzare attrezzature, reagenti e camici di laboratorio esclusivamente destinati a questo uso.
- L'etidio bromuro è un potenziale cancerogeno. Si devono sempre indossare guanti protettivi durante la preparazione e la manipolazione dei gel. Smaltire i gel e i tamponi contenenti etidio bromuro secondo le normative locali e nazionali vigenti.
- Quando si osservano e si fotografano i gel di agarosio sotto luce UV, evitare sempre l'esposizione diretta e indossare appropriate visiere di protezione dai raggi UV, guanti e camici da laboratorio monouso.

## Simboli

Sono stati utilizzati i seguenti simboli non standard:

Simbolo	Descrizione
	Mix per PCR locus-specifico
	DNA polimerasi
	Primer forward di sequenziamento dell'esone 1 di HLA-A. Consultare il paragrafo "Composizione del kit" e la Tabella 4 per gli altri primer di sequenziamento.
	Data di produzione (indispensabile per i mercati non UE).

# Procedura

## 1. PCR

- 1.1. Per ogni locus da amplificare e per ogni singolo campione da analizzare sarà necessario allestire una reazione di PCR separata. Ogni corsa deve includere tutti gli appropriati controlli positivi di genotipo noto e almeno un controllo negativo per ognuno dei loci che vengono amplificati.
- 1.2. Preparare una soluzione fresca di master mix per PCR ogni volta che si effettua una PCR. Portare rapidamente a temperatura ambiente il mix per PCR locus-specifico. Quando scongelato, vortexare brevemente.
- 1.3. In una provetta sterile erogare la quantità necessaria di mix per PCR e di DNA polimerasi in base al numero di campioni da analizzare (consultare la Tabella 1 sotto riportata per il volume necessario in ogni reazione). Vortexare la soluzione sottoponendola a 3-4 impulsi.

Locus	A	B	C	DRB1	DQB1	DPB1
Mix per PCR locus-specifico ad es. <b>HLA-A MIX</b>	16µL	16µL	16µL	16,7µL	16,7µL	16,7µL
DNA polimerasi ad es. <b>DNA POL- HLA-A</b>	1µL	1µL	1µL	0,3µL	0,3µL	0,3µL

**Tabella 1: Composizione della master mix necessaria per campione.**

- 1.4. Erogare 17µL di master mix in ogni pozzetto di reazione.
- 1.5. A ciascun pozzetto di reazione aggiungere 3µL di DNA del campione o degli appropriati controlli positivi. Al pozzetto di controllo negativo, aggiungere 3µL di acqua sterile.
- 1.6. Sigillare i pozzetti di reazione. Miscelare delicatamente vortexando e centrifugare brevemente.
- 1.7. Posizionare i pozzetti di reazione nel ciclatore termico e impostare le condizioni dei cicli termici sotto specificate.

95°C - 10 min  
96°C - 20 sec  
60°C - 30 sec } 33 cicli  
72°C - 3 min  
15°C - mantenere

- 1.8. L'amplificazione richiede circa 2,5 ore per essere completata.
- 1.9. Al termine della PCR, rimuovere i pozzetti/la piastra di reazione dal ciclatore termico e procedere direttamente all'elettroforesi su gel oppure conservare a 4°C fino al momento dell'uso.

**NOTA:** La purificazione degli ampliconi mediante trattamento con ExoSAP deve essere condotta entro 24 ore dal termine della PCR.

## 2. Elettroforesi su gel di agarosio

- 2.1. Confermare la riuscita dell'amplificazione mediante elettroforesi su gel di agarosio, unendo 2 $\mu$ L di ciascun prodotto di PCR a 5  $\mu$ L di tampone di caricamento (volumi alternativi di tampone di caricamento devono essere convalidati prima dell'uso). Si raccomanda l'uso di gel di agarosio all'1%.
- 2.2. Il numero e le dimensioni attese degli ampliconi risultanti varieranno a seconda del locus e del genotipo dei campioni. Le dimensioni attese degli ampliconi ottenuti dalla PCR sono indicate in Tabella 2.

Locus	Dimensioni di banda attese	
HLA-A	$\approx$ 2 kpb	
HLA-B	$\approx$ 2 kpb	
HLA-C	$\approx$ 1,1 kpb e 1,4 kpb	
HLA-DRB1	$\approx$ 450 bp - 850 bp	(HH-PD5.2-5)
	$\approx$ 630 bp - 980 bp	(LG-PD5.2-7)
	Il pattern delle bande varierà a seconda della presenza di gruppi di alleli specifici	
HLA-DQB1	$\approx$ 300 bp e 500 bp	(PQ-PD6.2-2)
	$\approx$ 400 bp e 500 bp	(AN-PD6.2-3)
HLA-DPB1	$\approx$ 400 bp	(HH-PD10.1)
	$\approx$ 400 bp, $\approx$ 780 bp e $\approx$ 1470 bp	(KD-PD10.2-1)

**Tabella 2: Dimensioni attese del prodotto per ogni analisi.**

## 3. Purificazione del prodotto di PCR

**NOTA:** Per purificare questi prodotti di PCR si possono utilizzare sistemi di purificazione diversi da ExoSAP-IT<sup>®</sup> o ExoProStar<sup>™</sup> (ad es. Agencourt<sup>®</sup> AMPure<sup>®</sup> XP oppure sistemi basati su colonna). Prima di procedere, si raccomanda caldamente all'utente di convalidare queste procedure. Se si utilizza il trattamento con EXOSAP<sup>®</sup>, si raccomanda all'utente di seguire la procedura descritta sotto.

- 3.1. Preparare una mastermix costituita da 4 $\mu$ L di ExoSAP-IT<sup>®</sup> o ExoProStar<sup>™</sup> e 8 $\mu$ L di MgCl<sub>2</sub> 2mM per campione da purificare. Vortexare delicatamente mediante impulsi per miscelare. Erogare 12 $\mu$ L di mastermix nel pozzetto di ogni campione della reazione. Sigillare i pozzetti, vortexare e quindi posizionare su un agitatore o vortexare delicatamente per 2 minuti. Centrifugare brevemente prima di posizionare nel ciclatore termico. Avviare il ciclatore termico impostando il seguente profilo:

37°C - 30 minuti  
80°C - 15 minuti  
4°C - mantenere

- 3.2. Al termine, il prodotto purificato va diluito 1:4 con acqua sterile. Questa diluizione garantisce una quantità sufficiente di template per effettuare le reazioni di



DRB1EX3R-2 è un primer di sequenziamento di DRB1 presente nei kit HH-PD5.2-5, caratterizzato da un comportamento simile a HARP e disegnato per sequenziare i seguenti gruppi di alleli: \*03, \*08, \*11, \*12, \*13, \*14, \*15 e \*16. Questo primer produrrà dati di sequenziamento indicanti eterozigosi, emizigosi o nessun sequenziamento a seconda del genotipo del campione in fase di tipizzazione. Durante l'analisi dei dati ottenuti con DRB1EX3R-2 rispetto al riferimento DRB1-FullX2 tramite Assign™, i dati relativi all'esone 3 verranno analizzati in uno strato separato e permetteranno la risoluzione di un certo numero di ambiguità alleliche nell'esone 3, come l'ambiguità DRB1\*14:01 vs. \*14:54. Il suo uso è facoltativo e dipende dalla strategia di tipizzazione usata dal laboratorio. Ciò non è applicabile ai kit LG-PD5.2-7, per il quale è disponibile il sequenziamento bidirezionale per l'esone 3.

- 4.2. Preparare su ghiaccio una soluzione fresca di mix contenenti i primer di sequenziamento ogni qualvolta si effettua una reazione di sequenziamento. La composizione e i volumi della mix sono indicati **per campione**.

<b>Componente</b>	<b>Volume</b>
Primer di sequenziamento	2µL
Acqua sterile	11,5µL
BigDye® Terminator	1µL
Tampone di sequenziamento 5X	3,5µL

- 4.3. Miscelare ogni mix della reazione di sequenziamento con leggeri impulsi di vortex.

- 4.4. Erogare 18µL del mix della reazione di sequenziamento nell'appropriata provetta/pozzetto di reazione.

**NOTA:** nel caso di cicli con pochi campioni ma con molti primer di sequenziamento, è accettabile erogare i primer di sequenziamento (2µL) direttamente nei singoli pozzetti di reazione. Si può quindi creare una master mix costituita da acqua sterile, BigDye® Terminators e tampone di sequenziamento 5X, di cui 16µL andranno aggiunti a ogni pozzetto di reazione. Si raccomanda caldamente all'utente di convalidare l'uso di questa procedura alternativa prima dell'implementazione.

- 4.5. Ad ogni pozzetto appropriato, aggiungere 2µL di prodotto di PCR purificato.

**NOTA:** Si deve prestare attenzione per evitare contaminazioni incrociate delle reazioni di sequenziamento.

- 4.6. Sigillare i pozzetti di reazione, miscelare delicatamente e centrifugare brevemente per assicurarsi che il contenuto del pozzetto di reazione si trovi tutto sul fondo.

- 4.7. Posizionare le provette di reazione nel ciclatore termico e attivarlo secondo il profilo seguente:

<b>Numero di cicli</b>	<b>Temperatura e durata</b>
25	96 °C – 10 sec 50 °C – 5 sec 60 °C – 2 min
1	4 °C - mantenere

- 4.8. Al termine del programma, rimuovere i pozzetti/la piastra di reazione dal ciclatore termico e procedere direttamente alla purificazione dei prodotti di reazione o conservare al buio a 4°C fino al momento dell'uso. Si raccomanda di purificare e di sequenziare il DNA dei campioni entro 24 ore.

## 5. Purificazione dei prodotti di reazione del sequenziamento

**NOTA:** La purificazione dei prodotti di reazione può essere effettuata con procedure diverse dal metodo di precipitazione in etanolo descritto qui. Prima di procedere, si raccomanda caldamente all'utente di convalidare queste procedure.

- 5.1. Centrifugare brevemente i pozzetti/la piastra di reazione prima di procedere. Se durante la PCR sono stati usati tappi/coperchi riutilizzabili, contrassegnarli per evitare contaminazioni incrociate.
- 5.2. Rimuovere con cautela la chiusura.
- 5.3. A ogni provetta, aggiungere 5µL di EDTA 125 mM, pH 8,0. Controllare che l'EDTA raggiunga la base della provetta.
- 5.4. Aggiungere 60µL di etanolo al 100% a ogni pozzetto di reazione. Sigillare i pozzetti/la piastra e vortexare brevemente ma accuratamente per ottenere una miscela uniforme.
- 5.5. Pellettare i prodotti dell'estensione centrifugando a 2.000 g per 45 minuti. **PROCEDERE IMMEDIATAMENTE AL PASSAGGIO SUCCESSIVO.** Se ciò non fosse possibile, ricentrifugare per altri 10 minuti prima di procedere.
- 5.6. Rimuovere i coperchi dai pozzetti di reazione e scartare il supernatante capovolgendo i pozzetti di reazione su carta assorbente o su fazzoletti di carta.
- 5.7. Posizionare nella centrifuga i pozzetti di reazione capovolti e la carta assorbente o i fazzoletti di carta. Centrifugare a 350g per 1 minuto per rimuovere tutto il supernatante rimasto.
- 5.8. Rimuovere i pozzetti di reazione dalla centrifuga e posizionarli a faccia in su sul banco di lavoro. Gettare la carta assorbente o i fazzoletti di carta.
- 5.9. Preparare una soluzione fresca di etanolo all'80% con etanolo assoluto e acqua sterile.
- 5.10. Aggiungere a ogni pozzetto 60µL di etanolo all'80%. Risigillare i pozzetti e vortexare brevemente.
- 5.11. Centrifugare a 2.000g per 5 min.
- 5.12. Ripetere i passaggi 5.6 e 5.7.
- 5.13. Rimuovere dalla centrifuga le provette e scartare la carta assorbente. Risigillare i pozzetti e procedere alla fase di denaturazione. Altrimenti conservare a -20°C al buio. Si raccomanda di eseguire il sequenziamento del DNA dei prodotti di estensione entro 24 ore dall'esecuzione delle reazioni di sequenziamento.

## 6. Denaturazione & Elettroforesi dei prodotti di reazione del sequenziamento

**NOTA:** la procedura per la denaturazione dei prodotti di estensione in formamide Hi-Di™ qui descritta potrebbe non essere necessaria nel caso in cui siano state utilizzate procedure di purificazione diverse dalla precipitazione in etanolo. Si raccomanda caldamente all'utente di convalidare le procedure alternative prima di procedere.

- 6.1. Aggiungere 12µL di formamide Hi-Di™ a ciascuna provetta di reazione. Vortexare e centrifugare brevemente i pozzetti/la piastra.

6.2. Incubare i pozzetti di reazione a 98°C per 5 minuti. Dopo l'incubazione, ricordarsi di raffreddare velocemente i pozzetti di reazione portandoli a temperatura ambiente (ad es. posizionare su ghiaccio o utilizzare il ciclatore termico per eseguire le fasi di denaturazione e raffreddamento) prima di inserirli nel sequenziatore. Se non fosse possibile procedere immediatamente, conservare le piastre a 4°C fino al momento dell'uso.

**NOTA:** controllare che non vi siano bolle d'aria nei pozzetti di reazione, perché potrebbero entrare nel capillare e danneggiarlo.

6.3. Caricare i pozzetti/la piastra di reazione sul sequenziatore automatico e preparare il file di raccolta dei dati seguendo le specifiche fornite dal produttore del sequenziatore.

6.4. I seguenti parametri strumentali sono stati convalidati dal produttore utilizzando il kit di sequenziamento Big Dye® Terminator Sequencing v3.1 e POP-7™. Questi parametri potrebbero dover essere convalidati dall'utente per altri polimeri, chimiche di sequenziamento e strumenti. Si prega di consultare il manuale per l'utente del relativo strumento per istruzioni e linee guida dettagliate (ad es. verificare che le impostazioni relative al set di fluorocromi utilizzato siano adatte per la chimica impiegata, ad esempio la chimica di sequenziamento per v1.1 Big Dye® Terminator richiederà un diverso set di fluorocromi).

<b>Parametro</b>	<b>Impostazione</b>
Dye set (Set di fluorocromi)	Z_BigDyeV3
Mobility file (File di mobilità)	KB_3730_POP7_BDTV3
Basecaller (Lettore di basi)	KB.bcp
Run Module (Modulo di corsa)	Regular FastSeq50_POP7
Injection time (Tempo di iniezione)	15 sec
Run time (Durata della corsa)	3.000 sec

6.5. Usare il software di raccolta dati dello strumento per elaborare i dati raccolti e creare i file delle sequenze. Si prega di consultare il manuale per l'utente del relativo strumento per istruzioni e linee guida dettagliate.

## 7. Modifica e analisi degli elettroferogrammi

I kit OLERUP SBT™ sono stati sviluppati e convalidati utilizzando il software OLERUP ASSIGN™ SBT sviluppato da CareDx Pty Ltd. Si raccomanda all'utente di utilizzare il software ASSIGN SBT versioni 3.6+ e successive, poiché queste versioni utilizzano impostazioni e file di riferimento concepiti specificamente per i kit di tipizzazione OLERUP SBT™ e HARPS®. Per altri dettagli sull'utilizzo di questi software fare riferimento ai rispettivi manuali per l'utente disponibili per il download sul sito web di Olerup (<http://www.olerup.com>).

I dati di tipizzazione basati sul sequenziamento generati con i kit di tipizzazione OLERUP SBT™ devono essere analizzati confrontandoli con i seguenti file di riferimento di ASSIGN™, forniti da CareDx Pty Ltd:

<b>Saggio</b>	<b>Codice del prodotto</b>	<b>File di riferimento Assign</b>
OLERUP SBT™ HLA-A	XH-PD1.1-2	A.xml
OLERUP SBT™ HLA-B	BS-PD2.1-2	B.xml

<b>Saggio</b>	<b>Codice del prodotto</b>	<b>File di riferimento Assign</b>
OLERUP SBT™ HLA-C	HH-PD3.2-2	C.xml or Cw.xml
OLERUP SBT™ HLA-DRB1	HH-PD5.2-5	DRB1-FullX2.xml
	LG-PD5.2-7	527_DRB1.xml
OLERUP SBT™ HLA-DQB1	PQ-PD6.2-2	DQB1.xml
	AN-PD6.2-3	623_DQB1.xml
OLERUP SBT™ HLA-DPB1	HH-PD10.1	DPB1.xml
	KD-PD10.2-1	DPB1.xml

## Caratteristiche di funzionamento

### Accuratezza

Pannelli di fino a 90 campioni ottenuti dal programma "UCLA International DNA Exchange proficiency testing program" (2008- 2010) usati per i test interni sui kit OLERUP SBT™ hanno dato i seguenti risultati:

<b>Locus</b>	<b>Num. campioni testati</b>	<b>Sensibilità diagnostica (% di PCR con esito positivo)</b>	<b>Specificità diagnostica (% di genotipi ottenuti)</b>	<b>Num. campioni discordanti</b>	<b>Num. campioni eterozigoti</b>	<b>Num. alleli unici</b>
HLA-A	81	100%	100%	0	74	20
HLA-B	82	100%	98,8%	0	79	81
HLA-C	39	97,5%	97,5%	0	35	21
HLA-DRB1	93	96,7%	96,7%	0	84	39
HLA-DQB1 (PQ-PD6.2-2)	42	100%	100%	0	36	14
HLA-DQB1 (AN-PD6.2-3)	38	100%	100%	0	34	15
HLA-DPB1 (HH-PD10.1)	77	100%	100%	0	60	18
HLA-DPB1 (KD-PD10.2-1)	16	100%	100%	2*	14	13

\* I due campioni discordanti contenevano informazioni aggiuntive sulla sequenza esterna all'esone 2 non riportate dal programma "UCLA International DNA Exchange proficiency testing program". Un campione conteneva 131:01, ma veniva riportato come 13:01 dal programma "UCLA International DNA Exchange proficiency testing program". Gli alleli differiscono negli esoni 3 e 4. L'altro campione testato conteneva 107:01, ma veniva riportato

come 13:01 dal programma "UCLA International DNA Exchange proficiency testing program". Questi alleli differiscono nell'esone 1.

Per i kit OLERUP SBT™ HLA-DRB1 (codice del prodotto LG-PD5.2-7), nei test interni è stato usato un pannello di 23 campioni ben caratterizzati, che coprivano un'ampia gamma di alleli. Inoltre, è stato anche tipizzato un pannello di 293 campioni ottenuti da fonti esterne, senza conoscenza a priori di altri dati di tipizzazione di HLA. Anche questi campioni sono stati tipizzati con il saggio OLERUP SBT™ HLA-DQB1 (PQ-PD6.2-2). Nei casi in cui si otteneva un risultato omozigote, le associazioni DQB1/DRB1 di quei campioni venivano analizzate per confermare il risultato nonché per individuare i casi in cui poteva essere avvenuto un dropout allelico.

Risultati dei test:

Locus	Num. campioni testati	Sensibilità diagnostica	Specificità diagnostica	Num. campioni discordanti	Num. campioni eterozigoti	Num. alleli unici
HLA-DRB1	23	100%	100%	0	23	12
	286*	97.9%	99.6%	0	253	33

\* Per sei campioni l'amplificazione non è andata a buon fine, a causa della bassa qualità dei campioni di DNA. Un campione è risultato contenere DNA contaminante, la cui fonte veniva fatta risalire al laboratorio dal quale erano stati ottenuti i campioni. Per via della contaminazione, non è stato possibile ottenere il genotipo di quel campione.

L'analisi delle sequenze della PCR e dei siti di amplificazione dei primer di sequenziamento nonché gli studi per la valutazione delle prestazioni non hanno identificato nessun allele comune e ben documentato che non sia stato amplificato in seguito all'uso raccomandato di questi kit. Per ulteriori informazioni fare riferimento al documento *OLERUP SBT™ Primer Analysis* disponibile insieme a ogni edizione della pubblicazione di riferimento OLERUP ASSIGN™ SBT, scaricabile dal sito web di Olerup (<http://www.olerup.com>).

## Limite di rilevazione

La concentrazione raccomandata per il DNA genomico umano ad alto peso molecolare è pari a 20-100 ng/μL. Test interni hanno dimostrato che si possono usare campioni con concentrazioni fino a 5 ng/μL. Anche con DNA di bassa qualità o frammentato sono stati ottenuti genotipi corretti.

## Specificità

I kit OLERUP SBT™ di CareDx Pty Ltd sono analisi locus-specifiche. L'uso dei kit secondo queste istruzioni deve amplificare soltanto un unico locus. Nella maggioranza dei casi, l'uso dei primer di sequenziamento contenuti nei kit permetterà di ottenere una tipizzazione HLA per la maggior parte dei campioni, senza necessità di ulteriore risoluzione. Nei casi in cui permanga un'ambiguità di eterozigosi, si raccomanda l'uso di appositi primer di sequenziamento per la risoluzione delle ambiguità (come OLERUP SBT™ HARPS®).

Si noti che sono possibili mutazioni nei siti di amplificazione o dei primer di sequenziamento, potenzialmente responsabili del mancato riconoscimento degli alleli. Quando un campione viene tipizzato come omozigote, questo risultato deve essere confermato con procedure alternative.

## Restrizioni e precauzioni

- Si raccomanda caldamente all'utente di convalidare questi kit prima dell'implementazione in laboratorio, usando campioni la cui tipizzazione HLA sia stata determinata mediante altre procedure su base molecolare. In particolare, qualsiasi deviazione da questa procedura (ad es. l'uso di procedure alternative per la purificazione dei prodotti di PCR o per il sequenziamento del DNA) deve essere convalidata dall'utente prima dell'implementazione.
- Questi kit sono stati convalidati utilizzando pannelli di campioni i cui genotipi comprendono un'ampia gamma di alleli. Tuttavia va segnalato che si possono riscontrare alleli rari e alleli con polimorfismi nei siti di amplificazione e dei primer di sequenziamento. Questi alleli non verranno né amplificati né sequenziati.
- La natura della tipizzazione di HLA in base alla sequenza è tale per cui fattori diversi dal mix per la PCR possono determinare un'amplificazione preferenziale o il mancato riconoscimento degli alleli. Pertanto, quando un campione viene tipizzato come omozigote, questo risultato deve essere confermato con metodi alternativi e/o con una tipizzazione genetica familiare.
- In ogni corsa di PCR si deve aggiungere un controllo positivo (DNA umano) e un controllo negativo (acqua sterile). Il controllo positivo deve dare un prodotto di PCR di dimensioni appropriate in funzione del locus amplificato e la sequenza risultante deve concordare con il genotipo del campione. Il controllo negativo senza template non deve mai dare prodotti di PCR, in nessun caso. Se compare una banda significa che si è verificata una contaminazione in un dato momento, quindi la corsa va ripetuta.
- Occasionalmente possono comparire prodotti di PCR più grandi e meno definiti. Queste bande aggiuntive non interferiscono con i risultati della sequenza o con la qualità.

## Licenza

Il kit OLERUP SBT™ contiene la polimerasi GoTaq® Hot Start Polymerase (DNA POL), prodotta da Promega Corporation per la distribuzione da parte di CareDx Pty Ltd. Licenza concessa a Promega ai sensi dei brevetti degli Stati Uniti N. 5.338.671 e 5.587.287 e dei brevetti esteri corrispondenti.

## Bibliografia

1. Sayer D, Whidborne R, Brestovac B, Trimboli F, Witt C, Christiansen F (2001): *HLA-DRB1 DNA sequencing based typing: an approach suitable for high throughput typing including unrelated bone marrow registry donors*. Tissue Antigens **57**: 46-54.
2. Sayer D, Whidborne R, DeSantis D, Rozemuller EH, Christiansen F, Tilanus MG (2004). *A multicentre international evaluation of single-tube amplification protocols for sequencing-based typing of HLA-DRB1 and HLA-DRB3, 4, 5*. Tissue Antigens **63**: 412-423.
3. *ASSIGN™ SBT v3.6+ Operator Manual*, CareDx Pty Ltd
4. *ASSIGN™ SBT v4.7 Operator Manual*, CareDx Pty Ltd
5. *OLERUP ASSIGN™ SBT v471 Operator Manual*, CareDx Pty Ltd
6. Altre informazioni sull'“UCLA DNA Exchange Program” sono reperibili all'indirizzo: <http://www.hla.ucla.edu/cellDNA/DNA/programInfo.htm>.
7. Gli alleli HLA correnti sono reperibili all'indirizzo: <http://www.ebi.ac.uk/imgt/hla>.

## Risoluzione dei problemi

<b>Problema</b>	<b>Possibili cause</b>	<b>Soluzione</b>
Prodotto di PCR debole o assente	DNA di scarsa qualità.	Valutare la qualità del DNA mediante elettroforesi su gel. Il DNA intatto deve essere di circa 3 kb, con deboli o nulle strisciate sul gel. Riestrarre il DNA e ripetere la PCR se possibile.
	Quantità insufficiente di DNA aggiunto alla PCR.	Controllare che la concentrazione di DNA sia nell'intervallo 20-100 ng/μL. Riestrarre il DNA e ripetere la PCR se possibile.
	Presenza di inibitori della PCR nel DNA genomico.	Evitare l'uso di campioni di sangue in toto contenenti eparina. Riestrarre il DNA e ripetere la PCR se possibile.
	Mancata aggiunta della DNA polimerasi alla master mix o miscelazione insufficiente della master mix prima dell'aggiunta ai campioni.	Ripetere la PCR. Assicurarsi di aver aggiunto i componenti del master mix e miscelare adeguatamente con il vortex.
	Problemi di ciclizzazione termica.	Controllare i parametri di corsa del ciclatore termico. Controllare il corretto svolgimento della corsa per assicurarsi che non sia stata interrotta in anticipo. Assicurarsi che il ciclatore termico operi secondo le istruzioni del produttore e che sia sottoposto a regolare manutenzione.
	Mancata aggiunta di etidio bromuro al gel.	Immergere il gel in un bagno colorante contenente TBE 1X con 0,5 mg/mL di etidio bromuro. Decolorare in TBE 1X prima di catturare l'immagine del gel. Prima di versare il gel, controllare di avervi aggiunto l'etidio bromuro.
	Probabilmente i campioni di DNA sono stati eluiti o diluiti in acqua a pH leggermente acido.	Cercare di usare sempre acqua sterile a pH neutro.
Prodotto di PCR debole o assente per la banda dell'esone 3-5 nel saggio KD-PD10.2-1	DNA di bassa qualità	La qualità molto bassa dei campioni amplificati può causare una debole amplificazione dell'amplicone dell'esone 3-5. Si può

<b>Problema</b>	<b>Possibili cause</b>	<b>Soluzione</b>
		comunque ottenere la tipizzazione utilizzando i dati di sequenza degli esoni 1 e 2. In alternativa, se possibile estrarre nuovamente il DNA e ripetere la PCR.
Banda di dimensioni errate	Uso del kit sbagliato.	Controllare di aver usato il kit appropriato.
	Uso di un programma di ciclizzazione termica sbagliato.	Controllare i parametri dei cicli termici.
	Contaminazione della PCR.	Controllare se nel controllo negativo ci sono evidenze di contaminazione. Decontaminare l'area di lavoro e ripetere la PCR. Ripetere la PCR per identificare la fonte della contaminazione. Valutare l'opportunità di usare un nuovo kit. Se il DNA genomico di un campione risulta contaminato, riestrarre o ottenere una fonte alternativa di DNA.
Intensità debole degli elettroferogrammi	Prodotto di PCR debole.	Controllare l'immagine del gel. Si <b>SCONSIGLIA</b> di sequenziare bande deboli di PCR, perché la qualità della sequenza può essere insufficiente per la SBT. Valutare l'opportunità di usare un fattore di diluizione più basso (ad es. 1:2, 1:3) dopo la purificazione della PCR.
	Quantità insufficiente di prodotti di reazione inseriti nel sequenziatore.	Controllare i parametri del sequenziatore. Potrebbe essere necessario aumentare il tempo di iniezione e il voltaggio.
	Problemi durante la purificazione dei prodotti del sequenziatore.	Prestare estrema attenzione quando si scarta il supernatante, perché si potrebbe causare lo spostamento del pellet.
Intensità di segnale troppo alta (presenza di picchi fortemente fluorescenti - artefatti)	Troppo prodotto di PCR.	Controllare l'immagine del gel. Valutare l'opportunità di usare un fattore di diluizione più alto dopo la purificazione della PCR. Controllare la quantità di DNA polimerasi usata nella PCR.
	Quantità troppo elevata di prodotti di reazione inseriti nel	Controllare i parametri dello strumento. Valutare

<b>Problema</b>	<b>Possibili cause</b>	<b>Soluzione</b>
	sequenziatore.	l'opportunità di ridurre il tempo di iniezione e il voltaggio.
Rumore di fondo (background alto)	Prodotto di PCR contaminato.	Fare riferimento alle azioni correttive elencate sopra.
	Amplificazione di geni HLA strettamente correlati.	Controllare i parametri di ciclizzazione termica.
	Scarsa purificazione dei prodotti di PCR.	Assicurarsi che il trattamento con ExoSAP <sup>®</sup> sia stato effettuato secondo le istruzioni del produttore del kit. Controllare di aver miscelato bene la miscela di PCR con ExoSAP <sup>®</sup> . Valutare l'uso di ExoSAP <sup>®</sup> secondo la procedura indicata dal produttore (aumentando la quantità di enzima) o l'impiego di una tecnica di purificazione alternativa.
	Reazioni di sequenziamento contaminate.	Assicurarsi di aver intrapreso tutte le precauzioni per evitare contaminazioni incrociate. Cambiare i puntali delle pipette laddove possibile. L'aggiunta dei liquidi va effettuata dalla parte superiore dei pozzetti di reazione. Evitare la formazione di aerosol.
	Primer di sequenziamento contaminati.	Controllare la qualità della sequenza degli altri primer di sequenziamento e degli altri campioni usando lo stesso primer. Valutare l'uso di un'aliquota fresca di primer di sequenziamento.
	Contaminazione della miscela di fluorocromi terminatori o del tampone di sequenziamento.	Ripetere il sequenziamento con aliquote fresche di reagenti.
	Scarsa purificazione dei prodotti di sequenziamento.	Ripetere il sequenziamento e assicurarsi che la purificazione sia eseguita secondo le istruzioni del produttore.
Presenza di chiazze di fluorocromi	Scarsa purificazione dei prodotti di sequenziamento.	Purificare i prodotti seguendo le istruzioni del kit. Controllare che i prodotti siano stati sufficientemente lavati con etanolo all'80%.

## Prodotti correlati

IVD a marchio CE:

ASSIGN™ SBT V3.6+                      Codice del prodotto: CGX0036+

ASSIGN™ SBT V4.7                      Codice del prodotto: CGX00470

OLERUP ASSIGN™ SBT V471          Codice del prodotto: CGX00471

### **OLERUP SBT™ HARPS®**

Riferimento alle istruzioni d'uso – OLERUP SBT™ HARPS®.

Solo per uso in ambito di ricerca:

### **OLERUP SBT™**

AN-PD11.0-0(20)      OLERUP SBT™ HLA-DRB3 kit (20 e 50 test)  
AN-PD11.0-0(50)

AN-PD12.0-0(20)      OLERUP SBT™ HLA-DRB4 kit (20 e 50 test)  
AN-PD12.0-0(50)

AN-PD13.0-0(20)      OLERUP SBT™ HLA-DRB5 kit (20 e 50 test)  
AN-PD13.0-0(50)

LC-PD2.9(20)          OLERUP SBT™ HLA-B57 kit (20 e 50 test)  
LC-PD2.9(50)

**Nota: i prodotti sopra elencati sono autorizzati come IVD in Australia**

## Reagenti di laboratorio per scopi generali

MgCl2 – 1.0(50)              2mM MgCl<sub>2</sub>  
MgCl2 - 1.0(3000))

SEQ BUF – 2.0(400)          5x Seq Rxn Buffer  
SEQ BUF – 2.0(5000)

EDTA – 3.0(200)              125mM EDTA, pH8.0  
EDTA – 3.0(5000)

Rivolgersi al proprio distributore locale per ulteriori dettagli.



### **Kit autocertificati:**

HH-PD3.2-2(20)              OLERUP SBT™ HLA-C kit (20 and 50 tests)

HH-PD3.2-2(50)

PQ-PD6.2-2(20)              OLERUP SBT™ HLA-DQB1 kit (20 and 50 tests)

PQ-PD6.2-2(50)

AN-PD6.2-3(20)

AN-PD6.2-3(50)

HH-PD10.1(20)              OLERUP SBT™ HLA-DPB1 kit (20 and 50 tests)

HH-PD10.1(50)

KD-PD10.2-1(20)

KD-PD10.2-1(50)

## Assistenza tecnica e recapiti

CareDx Pty Ltd  
PO Box 1294  
Fremantle 6959  
Western Australia  
Australia

Tel: +61-08-9336-4212

Email: [olerup-aus@ caredx.com](mailto:olerup-aus@ caredx.com)

Sito web: [www.olerup.com](http://www.olerup.com)

Per informazioni sugli ordini, consultare il sito web di Olerup (<http://www.olerup.com>).