

DETERMINAZIONE DELLA MONOCLONALITÀ DEI LINFOMI A CELLULE B (elettroforesi capillare)

AMPLI-SET-Lymphoma B Cat. n. 1.400FAM-CAP

Il riarrangiamento funzionale del gene IGH, prima DH a JH e successivamente V a DH-JH, è seguito dall'espressione dell'anticorpo, la caratteristica delle cellule B mature. Tali riarrangiamenti sono sfruttati come marker clonali nelle malattie linfoproliferative.

Il kit **AMPLI-set-lymphoma-B** permette di identificare, mediante l'uso della Polymerase Chain Reaction (PCR), i riarrangiamenti della catena pesante (IgH). Il gene IGH è localizzato sul cromosoma 14q32.3 in un'area di circa 1250 Kb. In tutto, sono stati identificati 46-52 segmenti VH funzionali che possono essere raggruppati in base alla loro omologia in sei o sette sottogruppi VH.

I segmenti contengono tre regioni "framework - (FRI-II-III)" e due regioni "complementarity-determining - (CDRs)". Le FRs sono caratterizzate dalla loro somiglianza tra i vari segmenti VH, mentre le CDRs differiscono anche all'interno della stessa famiglia VH. Inoltre, le CDRs rappresentano le sequenze bersaglio preferite per le ipermutazioni somatiche nel corso della reazione germinale centrale, che aumenta la variabilità all'interno di quelle regioni. Sostituzioni nucleotidiche possono avvenire dentro le FRs specialmente in cellule B in corso di un forte processo mutazionale.

Ogni set di primers consiste di sei o sette oligonucleotidi capaci di riconoscere i corrispondenti segmenti VH (VH1-VH7) con nessun mismatches per la maggior parte dei segmenti VH e uno o al massimo due mismatches per alcuni rari segmenti VH. I primers sono utilizzati in associazione con un singolo primer consenso per JH, disegnato per apparirsi ai sei segmenti JH. Tutti i primers funzionano con alta efficienza e sensibilità (almeno 1×10^{-2}) e permettono una *detection rate* del 99%. L'uso combinato di primers standardizzati e marcati con fluorocromi in tre differenti FRs aiuta a diminuire significativamente la percentuale di risultati falsi negativi dovuti a ipermutazioni nei siti di legame dei primers dei segmenti VH coinvolti.

L'elettroforesi capillare è in grado di distinguere i prodotti di amplificazione anche per la differenza di un singolo nucleotide. I prodotti dell'analisi del frammento di amplificazione appaiono come picchi di altezza ed area diversa in relazione alla quantità e alla dimensione (bp) del prodotto in riferimento allo standard utilizzato.

Principio del metodo:

- a) estrazione del DNA genomico;
- b) amplificazione;
- c) rivelazione per elettroforesi capillare

Applicabilità: su DNA genomico estratto e purificato da campioni di sangue intero, midollo osseo, tessuto, tessuto paraffinato.

Numero di test: 45.

CONTENUTO DEL KIT E SUA CONSERVAZIONE

AMPLIFICAZIONE	
Mix PCR Fr1 marcato con fluorocromo	-20°C
Mix PCR Fr2 marcato con fluorocromo	-20°C
Mix PCR Fr3 marcato con fluorocromo	-20°C
H ₂ O DNase/RNase-free	-20°C
Taq Polymerase (5U/μl)	-20°C
Controllo DNA	-20°C

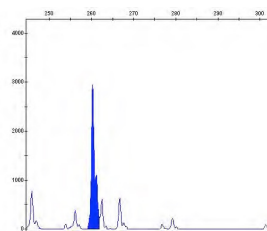
Stabilità: superiore a 10 mesi se correttamente conservato.

INTERPRETAZIONE DEI RISULTATI

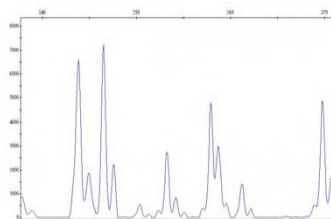
Presenza di monoclonalità = MALATTIA LINFOPROLIFERATIVA →
I campioni producono una o due bande discrete di grandezza compresa tra:

310 – 360 bp per Fr1
250 – 295 bp per Fr2
100 – 170 bp per Fr3

Rivelazione della monoclonalità con apparecchiatura per elettroforesi capillare o sequenziatore:



Amplificazione
Fr2-JH :
Monoclonalità



Amplificazione
Fr2-JH :
Policlonalità

Bibliografia

- Aithal GP, et al., Lancet (1999) 353: 717-19
Klein TE, et al., N Engl J Med (2009) 360:753-64
Rieder MJ, et al., N Engl J Med. (2005) 352:2285-93
Limdi NA, et al., Blood (2010) 115:3827-34

Il kit è aggiornato alle direttive europee stabilite dallo studio cooperativo BIOMED-2.