

Beta talassiemia I

AMPLI-SET-beta I

Cat 1.630

Le talassiemie sono un gruppo di emoglobinopatie ereditarie, causate da difetti dei geni globinici, in conseguenza dei quali manca o è ridotta la sintesi della catena globinica corrispondente o vengono prodotti catene instabili, oppure con scarsa affinità per le catene complementari. Il risultato finale, comune a tutte queste condizioni, è uno squilibrio nei normali rapporti sintetici, con presenza nell'eritroblasto di rilevanti quantità di catene libere e, di una minore quantità di emoglobina. La tecnica usata nell'identificazione delle beta microcitemie è vantaggiosa per la sua semplicità, rapidità ed esattezza ed è quella denominata ASA (Allele Specific Amplification). Tale tecnica è basata sull'impiego di due distinte reazioni di amplificazione, di primer specifici che hanno l'estremità 3' l'uno, la base normale, l'altro la base relativa alla mutazione in esame. La rivelazione dei prodotti di PCR avviene per elettroforesi su gel di agarosio e colorazione con bromuro di etidio. Se l'amplificazione avviene sia con il primer mutato che con quello normale, vuol dire che il soggetto è portatore eterozigote della mutazione. Mentre se l'amplificazione avviene solo su uno dei due primer, il soggetto è portatore omozigote o non è portatore della mutazione in esame.

Il kit ampli-beta-I permette l'amplificazione e la rivelazione su gel di agarosio dei difetti di trascrizione del DNA delle seguenti mutazioni. 39(C-T), 1(-G), 5(-CT), 6(-A),8(-AA), 59(-A), 76(-C), 60(T-A), 114(T-C), 126(T-G), 126(-T)

Principio del metodo: A) estrazione del DNA genomico B) amplificazione C) rivelazione sul gel di agarosio.

Applicabilità: Su DNA estratto e purificato da campioni di sangue intero

Numero di Test: 20

200 – 1000 µl); Termociclatore programmabile; Cappa Biohazard classe II; Camera elettroforetica con alimentatore; Transilluminatore UV; Apparato fotografico.

Tutti i materiali necessari all'esecuzione del test devono essere sterili, DNase e RNase free e monouso.

CONTENUTO DEL KIT E SUA CONSERVAZIONE

ESTRAZIONE				
Soluzione di lisi				2-8°C
Reagente 1				2-8°C
Reagente 2				2-8°C
Reagente 3				2-8°C
				2-8°C
				2-8°C
AMPLIFICAZIONE				
Mix PCR	1	39(C-T)	n.20 tubi 0,2	-20°C
Mix PCR	2	1 (-G)	n.20 tubi 0,2	-20°C
Mix PCR	3	5 (-CT)	n.20 tubi 0,2	-20°C
Mix PCR	4	6 (-A)	n.20 tubi 0,2	-20°C
Mix PCR	5	8 (-AA)	n.20 tubi 0,2	-20°C
Mix PCR	6	59 (-A)	n.20 tubi 0,2	-20°C
Mix PCR	7	76 (-C)	n.20 tubi 0,2	-20°C
Mix PCR	8	60 (T-A)	n.20 tubi 0,2	-20°C
Mix PCR	10	114 (T-C)	n.20 tubi 0,2	-20°C
Mix PCR	11	126 (T-G)	n.20 tubi 0,2	-20°C
Mix PCR	12	126 (-T)	n.20 tubi 0,2	-20°C
RIVELAZIONE				
Gel precast di agarosio 2% per elettroforesi in TBE 1X				T.A.
Buffer di corsa 5 X (TBE 5X)				T.A.
Marker di peso molecolare ladder 100 bp				-20°C

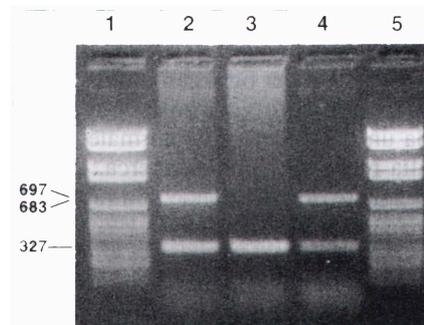
Stabilità: superiore a 12 mesi se correttamente conservato (I gels di agarosio se conservati lontano dalla luce, sono stabili per un anno a temperatura ambiente).

Materiali Richiesti: tubi da 1,5 ml; portaprovette refrigerato; puntali sterili con barriera antiaerosol; Portaprovette refrigerato; tubi PCR.

Reagenti richiesti non compresi nel kit: acqua bidistillata sterile

Strumenti richiesti: centrifuga con rotore ad angolo fisso per tubi da 2 ml (12.000 x g) eSet di pipette pre-PCR e post-PCR (0.5 – 20 µl, 10 – 100 µl, 20 – 200 µl,

INTERPRETAZIONE DEI RISULTATI



LEGENDA GEL:

Difetti di trascrizione del DNA.
Identificazioni delle mutazioni (C-t)

Linee 1 e 5 : DNA marker VI

Linee 2: portatore eterozigote di mutazione 39 (C-T). Presenza oltre al frammento di controllo di 327 b, di un frammento di DNA amplificato di 697 bp.

Linee 3: soggetto normale. Presenza del solo frammento di DNA amplificato, di controllo, di 327 bp.

Linee 4: Portatore eterozigote di mutazione 5 (C-T). Presenza di un frammento di DNA amplificato di 683 bp.

Referenze:

Nucleic Acids Res. 24:5021(1996)

BR.J Haematol 92:336 (1996)

Hemoglobin 19:237 (1995)

American J. Of Haematol 31:237 (1989)

American J. Of Haematol 37:133 (1991)