

**Sistema per la determinazione del grado di ipermutazione somatica nei geni V delle catene pesanti delle Immunoglobuline (IgH)**

## Hypermutation kit1-FL cod. HY.01FL

INTERVENTO REALIZZATO AVVALENDOSI DEL FINANZIAMENTO POR OBIETTIVO

COMPETITIVITÀ REGIONALE E OCCUPAZIONE PARTE FESR "FONDO EUROPEO DI SVILUPPO REGIONALE "2007-2013

Asse I : "Innovazione ed economia della conoscenza" Azione 1.1.3 "Contributi per l'utilizzo da parte delle imprese di strutture qualificate per l'attività di ricerca" Titolo progetto : "La diagnostica della determinazione del grado di permutazione somatica nei disordini linfoproliferativi".



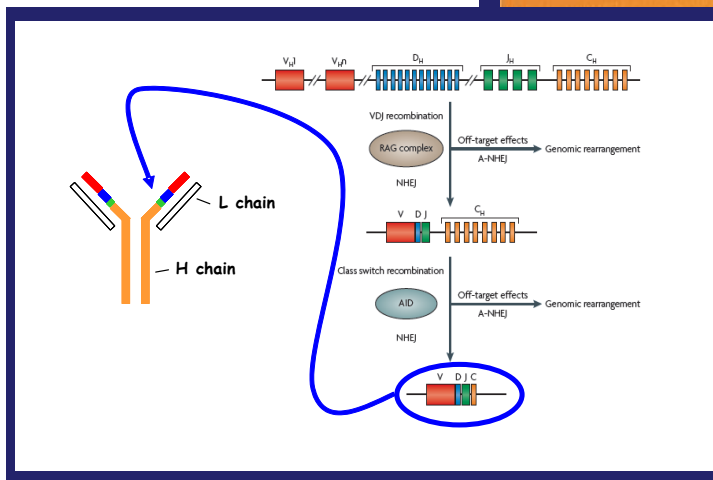
UNIONE EUROPEA



REGIONE DEL VENETO



IL VENETO UNA REGIONE DELL'EUROPA



### EXPERTEAM

via della Libertà 12-30175 Marghera (VE)

tel.: +39 041 5093101

fax: +39 041 5093102

e-mail: [expertm@vegapark.ve.it](mailto:expertm@vegapark.ve.it)

[www.experteam.it](http://www.experteam.it)

L'analisi molecolare mediante PCR del locus **IGH** (Immunoglobulin heavy chain) è una tecnica ampiamente utilizzata per la determinazione della **clonalità nelle sospette neoplasie a cellule B**. Essa si basa sull'utilizzo di primers specifici che permettono l'amplificazione selettiva di segmenti di DNA derivanti dal processo a due step del riarrangiamento dei geni IgH che avviene durante la maturazione dei linfociti B (**riarrangiamento VDJ**). Ogni cellula B presenterà quindi un unico riarrangiamento VDJ produttivo. Nei centri germinativi la sequenza del gene  $V_H$  riarrangiato viene ulteriormente modificata mediante l'inserimento di **mutazioni puntiformi** ed il grado di mutazione può essere calcolato paragonando queste sequenze mutate a quella germinale corrispondente. Lo **stato mutazionale della regione variabile delle catene pesanti delle immunoglobuline** rappresenta uno dei **fattori prognostici** nei pazienti con Leucemia Linfatica cronica di tipo B (**LLC-B**) e Linfoma linfocitico a piccole cellule (**SLL**): pazienti con omologia di sequenza  $\geq 98\%$  rispetto alla sequenza germ-line (**non mutati**) sono caratterizzati generalmente da una evoluzione aggressiva della malattia, mentre in pazienti con omologia di sequenza  $< 98\%$  rispetto alla sequenza germ-line (**mutati**), la malattia ha un decorso più lento ed indolente.

## Contenuto dei kit

Etichetta	Contenuto
6FAM/D4-HYP MASTER MIX	Mix per l'amplificazione del riarrangiamento FR1-JH
HYP MASTER MIX	Mix per l'amplificazione 2°step del riarrangiamento FR2-JH
JH primer	Primer JH consenso
HS Expert Taq polymerase	Taq DNA polimerasi hot-start

## Come funziona il kit?

L' "**Hypermutation kit 1-FL**" (cod. HY.01fFL) viene utilizzato per la determinazione della presenza di riarrangiamenti clonali delle catene pesanti delle immunoglobuline e successiva determinazione del grado di ipermutazione somatica.

Il kit, messo a punto secondo il protocollo **BIOMED-2**, analizza il riarrangiamento FR1-JH mediante un'unica reazione di PCR multiplex in cui vengono utilizzati 6 primers specifici per le regioni **FR1** combinati con un primer comune al 3' che riconosce la **regione consenso JH**. I prodotti di amplificazione relativi che comprendono quindi l'intera regione VH (contenente FR1, CDR1, FR1I, CDR1I e FR1II) vengono analizzati mediante elettroforesi capillare.

I campioni positivi per la clonalità IGVH vengono sottoposti ad una seconda amplificazione e poi sequenziati. Le sequenze così ottenute, che sono quelle espresse dal clone leucemico, vengono confrontate con le relative sequenze germline utilizzando i principali database, quali IMGT e/o BLAST in modo tale da stabilire la % di omologia.

**Campioni di partenza:** sangue periferico, tessuto paraffinato, tessuto congelato, tessuto fresco

**Metodo estrazione DNA:** QIAamp DNA mini kit (Qiagen)

**DNA Sequencer:** 310, 3100, 3130, 3730, 3500 Genetic Analyzers (Applied Biosystems), CEQ 8000/8800 Genetic Analysis System (Beckman Coulter)



**EXPERTEAM**

via della Libertà 12

30175 Marghera

tel.: +39 041 5093101

fax: +39 041 5093102

e-mail [expertm@vegapark.ve.it](mailto:expertm@vegapark.ve.it)