



Инструкции по использованию наборов реагентов для типирования Biofortuna SSPGo™ HLA Версия 4. Июнь 2011 г.

1. Назначение

Biofortuna HLA SSPGo Kit - набор реагентов для ДНК-зависимого HLA-типирования в «высоком разрешении» или в «среднем разрешении» при помощи групп-специфической амплификации. Общепринятый уровень разрешения считается средним, когда большинство результатов четко определяются на уровне двух цифр, напр., DQB1*02, DQB1*05 и т.д. Высоким обычно считается уровень, на котором большинство аллелей имеют 4-цифровой уровень, напр., DQB1*02:01, DQB1*05:01 и т.д. Это продукт диагностики *in vitro*, предназначенный для использования только квалифицированными специалистами.

2. Введение

Молекулы HLA (лейкоцитарных антигенов человека) играют ключевую роль в иммунитете и распознавании "свой - не-свой", следовательно, проведение HLA-генотипирования и исследований на HLA-совместимость обязательны в большинстве случаев перед трансплантацией. Поскольку HLA-антигены ограничивают специфичность регулируемого Т-клетками иммунного ответа, HLA-генотипирование целесообразно при любых иммунных заболеваниях или при прогнозировании иммунного ответа на патогены, вакцинацию или медицинское лечение. HLA-генотипирование также рекомендовано при диагностировании заболевания, когда доказано, что определённые HLA-аллели в значительной степени связаны с течением заболевания.

Большинство HLA-генов высокополиморфичные, и обычно ДНК-генотипирование требуется для точного определения HLA-антигенов. ПЦР-типирование с использованием сиквенс-специфических праймеров (SSP)¹ - быстрый метод HLA-генотипирования, особенно пригодный в ситуациях, в которых требуется разрешение среднего уровня. Наборы Biofortuna SSP - готовые решения, в них входят сухие реагенты, включая полимеразу, и пользователю перед ПЦР требуется только добавить ДНК.

Наборы постоянно совершенствуются в соответствии с последней информацией по HLA-типированию в базе данных IMGT. Последние данные по наборам доступны на www.biofortuna.com.

3. Описание теста

Технология ПЦР - SSP основывается на следующем принципе: амплификация происходит только с праймерами, у которых 3'-концы полностью комплементарны последовательности-мишени. Праймеры с «мисматчами» не дают положительных результатов амплификации². В каждую реакционную смесь ПЦР добавлена пара праймеров внутреннего контроля, амплифицирующая консервативную область конститутивного гена (housekeeping gene); пара праймеров внутреннего контроля является индикатором достоверности результатов реакции ПЦР. В SSP HLA-генотипировании обычно применяются различные реакции, которые при

совместном исследовании указывают на генотип. Визуализация амплифицированных продуктов достигается с использованием систем для электрофореза в агарозном геле, разделяющем фрагменты ДНК по размеру.

4. Содержимое набора

- 10-40х полипропиленовые плашки для ПЦР или стрипы, 1-96-луночные ячейки PCR (в зависимости от расфасовки), каждая ячейка содержит 10 мкл лиофилизированных праймеров, полимеразу, dNTPs* и буфер. Каждый тест или стрип упакованы отдельно в пакет из фольги.
- 1x Инструкция по использованию.
- Таблицы интерпретаций, MSDS (ГОСТ) и Сертификат анализа могут быть скачаны с сайта Biofortuna www.biofortuna.com. Если вы не можете скачать с сайта, обратитесь к местному дистрибьютору.

*CleanAmp™ dNTPs лицензированы Trilink Biotechnologies Inc для использования в продуктах Biofortuna SSPGo.

5. Не поставляемые реагенты и оборудование

- Соответствующие дозаторы и стерильные наконечники с фильрами, напр., P10 и 10мкл наконечники.
- Набор/оборудование для изоляции ДНК.
- Спектрофотометр в УФ.
- Полипропиленовые пробирки.
- Деионизированная вода (Molecular Grade).
- Уплотняющие плёнки или крышки для ПЦР. (Крышки для стрипов предоставляются в наборах со стрипами для пробирок)
- Термоциклер, 96 лунок, с нагревающей крышкой. ПЦР-плашки и пробирки, поставляющиеся с наборами Biofortuna, подходят для большинства типов термоциклеров, представленных на рынке, включая MJ Research PTC-100, PTC-200, Hybaid MBS и Techne TC-512. Возможно, пользователю потребуется подтвердить использование других моделей.
- Реагенты для гель-электрофореза (агароза, 0,5x TBE, ДНК-маркер молекулярного веса 1000bp, 10мг/мл Ethidium Bromide).
- Оборудование для гель-электрофореза (ёмкость для геля, источник питания, система гель-документации с прибором для УФ-просвечивания).

6. Безопасность и предупреждения

- Для диагностики *in vitro*.
- Тесты должны проводиться только соответствующими обученными специалистами.
- Все результаты типирования должны быть проверены квалифицированными сотрудниками и подтверждены другой методикой типирования, если используются при принятии клинических решений.
- Обращайтесь со всеми реагентами в соответствии с правилами лабораторной практики.
- Рабочие зоны лаборатории для пред- и пост-ПЦР стадий должны быть разделены. Не вносите никакие материалы стадии пост-ПЦР в зоны пробоподготовки и пре-ПЦР.
- **Предупреждение о биологической опасности:** Обращайтесь со всеми продуктами крови как с потенциально инфекционными.
- **Предупреждение о биологической опасности:** Бромид этидия является потенциальным карциногеном. При его использовании всегда надевайте перчатки, лабораторный халат и защитные очки.
- **Предупреждение о биологической опасности:** При использовании источников УФ-излучения соблюдайте меры предосторожности: всегда надевайте перчатки, лабораторный халат и защитные очки. Никогда не смотрите без защитных очков на источник ультрафиолетового излучения.
- Таблицы факторов риска доступны на www.biofortuna.com.

7. Хранение и стабильность

Храните наборы Biofortuna SSPGo kit при 4-30°C. После того как вы достали ячейки ПЦР из фольгированных пакетов, добавьте в реагенты в течение 3 часов воду и ДНК. См. на упаковке срок годности. Не используйте продукты после истечения срока годности.

Не используйте наборы, если фольгированные пакеты порваны или проколоты.

Убедитесь в том, что ячейки ПЦР плотно закрыты после добавления ДНК, так как это может вести к испарению во время ПЦР-амплификации. Особо обратите внимание на края и углы.

8. Инструкции по использованию

Требования к образцу ДНК

Каждая реакция в тесте оптимизирована с тем, чтобы использовать 50 - 100 нг ДНК, но в каждую реакцию необходимо добавить точно 10 мкл жидкости. Поэтому тест может быть проведён с 10 мкл ДНК, 5-10 нг/мкл, или можно добавить вначале объём воды, чтобы затем добавить ДНК в большей концентрации, напр., добавьте 9 мкл воды, а затем 1 мкл ДНК при 50-100 нг/мкл. Поскольку гепарин может ингибировать ПЦР, не рекомендуется экстрагировать ДНК из гепаринизированных образцов крови. OD_{260/280} образца ДНК должен быть 1,6 - 2 в соответствии с УФ-спектрофотометрией.

Инструкции по предварительной подготовке PCR

- i. Достаньте плашку SSPGo или стрип из запечатанного мешка.
- ii. Запишите номер серии, номер продукта и версии теста(ов).
- iii. Обратите внимание, что во всём наборе первая реакция каждого локуса теста всегда помечена красным цветом.
- iv. В некоторых плашках ПЦР в последней лунке находится помеченный пурпурным цветом «отрицательный контроль без матрицы ДНК».
- v. С помощью стерильного оборудования добавьте 10 мкл раствора ДНК в каждую реакционную ячейку или стрип. См. примечание в Разделе 8, "Требования к образцу ДНК". Если в плашке имеется помеченная пурпурным цветом лунка с «отрицательным контролем без матрицы ДНК», добавьте в неё 10 мкл буфера или деионизированной воды (не содержащей ДНК). См. примечание в Разделе 8, "Без контроля по шаблону".
- vi. ДНК должна вступить в контакт с сухими реагентами в каждой реакции до термического циклирования. Чтобы обеспечить контакт раствора ДНК с сухими реагентами, можно использовать центрифугирование.
- vii. Закройте реакционные лунки уплотняющими плёнками или крышечками для пробирок. Убедитесь, что лунки закрыты как можно плотнее, чтобы предохранить содержимое от испарения. Особо обратите внимание на края и углы.
- viii. Поместите плашку или стрипы непосредственно в термоциклер. Убедитесь, что ячейки полностью вставлены в блок, а крышка плотно закрыта. Если крышка не закрыта плотно, это может вести к ошибке отдельной ПЦР. С некоторыми моделями машин ПЦР может быть необходимо использовать специальные прокладки, чтобы обеспечить оптимальную герметичность планшета.
- ix. Активируйте программу ПЦР (см. Параметры ПЦР).

РЕСУСПЕНДИРОВАНИЕ, ПРИМЕЧАНИЕ: Смеси ПЦР должны быть ресуспендированы с образцами ДНК в течение 3 часов после извлечения плашки из пакета из фольги.

«ОТРИЦАТЕЛЬНЫЙ КОНТРОЛЬ БЕЗ МАТРИЦЫ ДНК», ПРИМЕЧАНИЕ: Некоторые наборы в последней лунке содержат отрицательный контроль без матрицы ДНК (NTC). Эта лунка окрашена в пурпурный цвет, чтобы отличить её от остальных реакций. Эта лунка нужна для контроля за контаминацией, которая может произойти вследствие контаминирования воды или буфера, в котором ресуспендируют ДНК. Если имеет

место контаминация ПЦР-ампликонами, то на фореже будут наблюдаться ампликоны разных значений; если имеется контаминация геномной ДНК, то будет видна полоса 187bp.

ПРОФИЛЬ ВЫСОТЫ ПЛАШЕК/СТРИПА ПЦР, ПРИМЕЧАНИЕ: Рекомендуется, чтобы высота плашек и стрипов при помещении их в одну и ту же машину ПЦР была одинаковой. Разные профили высоты могут вести к плохому контакту с нагреваемой крышкой машины ПЦР. Это может быть причиной слабой или ошибочной ПЦР амплификации.

Параметры ПЦР

Следует использовать следующие параметры ПЦР. Скорость температурного нагрева должны составлять по крайней мере 1°C в секунду, подключите нагреваемую крышку. Подробные инструкции по использованию находятся в руководстве по эксплуатации производителя термоциклера. Термоциклер должен быть откалиброван в соответствии с правилами аккредитации Американского общества гистосовместимости и иммуногенетики (American Society of Histocompatibility and Immunogenetic) (ASHI) или Европейской федерации иммуногенетики (European Federation of Immunogenetics) (EFI).

Денатурация	94°C	5 минут		
Денатурация	96°C	15 секунд	←	10 циклов
Отжиг	66°C	50 секунд		
Удлинение	72°C	30 секунд		
Денатурация	96°C	15 секунд	←	20 циклов
Отжиг	64°C	50 секунд		
Удлинение	72°C	30 секунд		
Остановка (HOLD)	15°C			

Гель-электрофорез

Эти инструкции относятся к горизонтальному электрофорезу в агарозном геле: Приготовьте 2% агарозный гель в 0,5x буфере TBE. Когда гель охладится до температуры 60°C, добавьте бромид этидия, конечная концентрация должна быть 0,5мкг/мл. Разлейте гель и установите пластиковые гребёнки (напр., 12x8 лунок с расстоянием 9мм). Затем удалите гребёнки и поместите гель в 0,5x буфер TBE. Перенесите минимум 5 мкл и максимум 10 мкл из каждой платы или стрипа в соответствующую лунку на геле, отмечая позицию каждой реакции. Используйте масс-лэддер в 100 bp для установления размера полученных полос. Условия электрофореза - 20 минут при 10в/см.

См. подробную информацию о специальном оборудовании в инструкциях производителя системы для электрофореза. Визуализация результатов осуществляется при помощи УФ-трансиллюминатора и системы гель-документации.

9. Интерпретация

Наборы SSPGo kits разработаны таким образом, что результаты можно определить вручную с использованием таблиц интерпретаций, доступных на сайте www.biofortuna.com. Если вы не можете зайти на веб-сайт, обращайтесь к местному дистрибьютору.

Приложите фотографию геля к соответствующей форме интерпретации, номер набора и номер версии должны совпадать. Изучите изображение геля. В каждой реакции должна быть полоска положительного контроля. См. таблицы интерпретаций, так как в разных продуктах SSPGo размер может быть различным. Полоски внутренних контролей могут быть намного бледнее, если имеются специфические полоски аллелей. Если имеется специфическая полоска аллеля, а полоски контроля - нет, результат всё равно должен считаться

положительным. Игнорируйте все полосы менее 70bp, так как они являются "неинкорпорированными" праймерами.

Определите положительные реакции. Индикаторами положительных реакций являются полосы ожидаемой величины, как указано в таблицах интерпретаций. Имейте в виду, что в определённой реакции могут быть продукты более одного размера – это мультиплексные реакции, они представлены в таблицах интерпретаций.

Сравните положительные реакции с таблицами интерпретаций. Положительный результат реакции указывает на наличие по крайней мере одного аллеля, приведённого в таблице интерпретаций для данной реакции. Любой аллель может быть амплифицирован в нескольких пробирках – если присутствует аллель, во всех соответствующих лунках должен присутствовать продукт реакции.

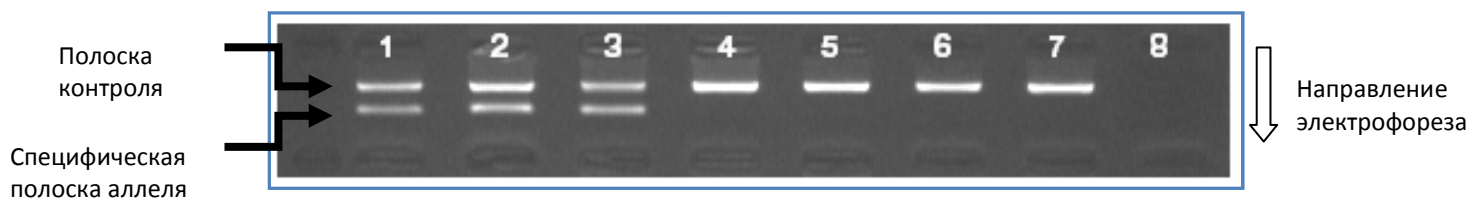


Рис. 1 Примеры положительных реакций, на которые указывает наличие специфической полосы аллеля и полосы контроля (реакции 1-3); отрицательные реакции, на которые указывает наличие полосы контроля и отсутствие специфических полосок аллелей (реакции 4-7); ошибочная реакция, в которой отсутствуют любые полосы (реакция 8).

Убедитесь, что версия набора соответствует версии в таблице интерпретаций.

10. Обеспечение и контроль качества

До того как Biofortuna выпускает продукт в продажу, проверяется качество каждого набора SSPGo. Образцы каждой партии набора проверяются по определённой панели образцов ДНК человека, чтобы обеспечить адекватные рабочие характеристики. Каждая реакция валидирована в соответствии с по крайней мере 48 хорошо описанными образцами ДНК клеточных линий. Biofortuna рекомендует каждой лаборатории провести внутреннюю валидацию всех новых продуктов для типирования до использования их на клинических образцах. Только полностью обученный и квалифицированный персонал может проводить диагностическое типирование, а результаты должны быть перепроверены другим обученным сотрудником.

11. Библиография

- 1) Bunce M et al Tissue Antigens. 1995 Nov;46(5):355-67.
- 2) Saiki RK et al. Nature. 1986 Nov 13-19;324(6093):163-6.

12. Используемые символы

- Количество тестов
- Представитель ЕС
- консультации инструкции по применению
- Местоположение производителя
- In Vitro диагностика
- Срок годности
- Температура хранения
- Номер серии

13. Контактная информация производителя

Biofortuna Ltd
 1 Hawkshead Road
 Croft Business Park
 Bromborough, CH62 3RJ, UK
 T: +44 (0) 151 334 0182
 E: info@biofortuna.com
 W: www.biofortuna.com

**14. Переводы**

Française:	Traductions disponibles
Deutsch:	Übersetzungen verfügbar
Español:	Traducciones disponibles
Italiano:	Traduzioni disponibili
České:	Překlady k dispozici
Danske:	Tilgængelige oversættelser
Έλληνες:	διαθέσιμες μεταφράσεις
Magyar:	Fordítások
Norske:	Oversettelser tilgjengelig
Polska:	Dostępne tłumaczenia
Português:	Traduções disponíveis
Русский:	Переводы доступны
Slovenskému:	Preklady k dispozícii
Türk:	Çeviriler mevcut
Svenska:	Översättningar tillgängliga

www.biofortuna.com

15. Руководство по устранению неисправностей SSPGo

Проблема	Возможная причина	Устранение
Нет амплификации ни в одной реакции	Неправильная концентрация используемой ДНК	Определите количество ДНК, убедитесь, что всего 50 - 100нг ДНК добавлено в объёме 10мкл на реакцию.
	Ингибиторы ПЦР в образце ДНК	Не используйте гепаринизированную кровь или, если это невозможно, выделите ДНК из промытых неповреждённых лимфоцитов, чтобы гепарин не был в контакте с ДНК. Описаны протоколы использования гепариназы для удаления гепарина из образцов ДНК. Снова выделите ДНК. См. инструкции к набору производителя для выделения ДНК.
	Низкое качество использованного образца ДНК	Определите качество ДНК. Соотношение спектрофотометрических показателей A260/A280 должно быть 1,6 – 2,0. ДНК до использования должна полностью ресуспендироваться в растворе.
	Реагенты не полностью ресуспендированы	Осадок должен быть полностью гидратирован при добавлении ДНК. При необходимости отцентрифугируйте плашку. Должно использоваться 10мкл раствора ДНК в каждой реакции.
	Термоциклер неправильно настроен	Убедитесь, что программа ПЦР введена корректно, в соответствии с инструкциями по использованию. Убедитесь, что нагревательная крышка термоциклера зафиксирована и плотно закреплена. См. более подробную информацию в инструкциях по использованию термоциклера.
	Проблемы электрофореза	Убедитесь, что в резервуаре для электрофореза есть питание – проверьте блок питания и очистите электроды. Повторите фореz в 0,5X буфере TBE. Убедитесь, что используется свежий бромистый этидий, 0,5мкг/мл. Проверьте достаточность УФ освещения при формировании сигналов изображения гелей. См. дальнейшие инструкции в руководстве производителя камеры для геля и блока питания.
Плашки не запечатаны корректно.	Неплотно запечатанные плашки могут быть причиной испарения во время ПЦР. Biofortuna предоставляет рекомендованные уплотняющие плёнки (каталожный	

Проблема	Возможная причина	Устранение
		<p>номер VF-40-11).</p> <p>Убедитесь, что лунки закрыты герметично. Обратите особое внимание на лунки по краям плашки или стрипа ПЦР.</p>
Выборочные пропадания сигналов специфических ампликонов контроля и/или аллеля.	Ошибки фореа	<p>Убедитесь, что продукты реакции были нанесены во все соответствующие лунки в рекомендованном объёме.</p> <p>Калибруйте дозаторы в соответствии с инструкциями производителя.</p> <p>Убедитесь, что лунки полностью сформировались. Осторожно удаляйте гребёнки, так как можно легко повредить дно лунки.</p> <p>До разливания геля убедитесь, что агароза полностью растворилась.</p> <p>Форез не должен проходить слишком долго, так как более мелкие ампликоны могут «убежать» из геля.</p> <p>Убедитесь, что форез полностью прошёл и полоски разделились.</p> <p>Используйте свежий раствор бромида этидия.</p>
	Проблемы термоциклера	<p>Ошибки в крайних лунках могут быть в результате того, что крышка закрыта недостаточно плотно. Это может вести к испарению и конденсации реакции ПЦР в камере ПЦР на полпути вверх и к неправильным результатам анализа ПЦР.</p> <p>Обязательно следуйте инструкциям производителя по техобслуживанию и калибровке термоциклера.</p> <p>Убедитесь, что параметры ПЦР корректны и соответствуют инструкциям по использованию.</p>
	Проблемы испарения	<p>Убедитесь, что лунки закрыты герметично. Обратите особое внимание на лунки по краям плашки или стрипов ПЦР.</p> <p>Убедитесь, что нагревательная крышка закреплена и обеспечивает достаточную компрессию. Biofortuna поставляет рекомендованные уплотняющие плёнки (каталожный номер VF-40-11).</p>
	Спорадические ошибки из-за проблем ДНК	<p>Не присутствует ДНК: убедитесь, что в каждой лунке имеется ДНК.</p> <p>Неправильный объём: убедитесь, что в каждую реакцию добавлено 10мкл раствора ДНК.</p>

Проблема	Возможная причина	Устранение
		<p>Добавлено слишком много ДНК: концентрация выше 200нг может вести к ошибке PCR.</p> <p>Контаминанты в ДНК могут быть причиной спорадической или масштабной ошибки амплификации.</p>
Наличие смазанных полос – «шмера» на геле	ДНК	Проверьте концентрацию и чистоту ДНК. Добавление слишком большого количества ДНК в реакции ПЦР может быть причиной получения смазанных изображений.
Слабая амплификация.	Проблема концентрации ДНК	Проверьте концентрацию ДНК: она должна быть не слишком высокой и не слишком низкой. Целевая концентрация - 100нг ДНК на реакцию, в 10мкл.
	Проблемы термоциклера	<p>Обязательно следуйте инструкциям производителя по техобслуживанию и калибровке термоциклера.</p> <p>Убедитесь, что параметры ПЦР корректны и соответствуют инструкциям по использованию.</p>
	Ошибки при фореze	<p>В каждую лунку необходимо добавлять одинаковый объём реакции, от 5мкл до 10мкл.</p> <p>Калибруйте дозаторы в соответствии с инструкциями производителя.</p> <p>Используйте свежий раствор бромида этидия.</p>
Не-специфическая амплификация	Проблема концентрации ДНК	Проверьте концентрацию ДНК: она должна быть не слишком высокой и не слишком низкой. Целевая концентрация - 50 - 100нг ДНК на реакцию, в 10мкл.
	Реакции загружены в неправильном порядке	<p>Проверьте расположение полос ПЦР и геля.</p> <p>Не допускайте физического перетекания через край из соседних лунок при электрофорезе, не переполняйте лунки, удаляйте гребёнки из застывшего геля.</p>
	Определен новый аллель	Аллели, ранее не выявленные методом прямого секвенирования, могут присутствовать с новым рисунком амплификации. Если вы используете старые таблицы интерпретаций, загрузите более позднюю версию с сайта www.biofortuna.com . Если это не соответствует новому рисунку, необходимо провести проверку с использованием набора Biofortuna или попробовать определить последовательность типированием последовательности. Или обратитесь за помощью в службу технической поддержки Biofortuna.
Рисунок амплификации не может быть интерпретирован	Неправильная интерпретация артефакта как специфической полосы	<p>Проверьте правильность размера полоски в таблицах интерпретаций разных версий.</p> <p>Проверьте правильность размеров определённых</p>

Проблема	Возможная причина	Устранение
		полосок на возможность артефакта (перенос, праймер-димер), который был неправильно интерпретирован как истинный продукт амплификации.
	Реакции загружены в неправильном порядке	Проверьте расположение полос ПЦР и геля.
	Ошибка отдельной ПЦР	Убедитесь, что присутствуют все внутренние положительные контроли. Интерпретируйте снова без каких-либо пропущенных реакций.
	Отсутствуют ампликоны небольшого размера	Проверьте параметры электрофореза. Слишком длительное время или неоптимальные параметры могут привести к тому, что мелкие ампликоны "убегают" из геля.
	В образце определён новый аллель	Эпизодически могут обнаруживаться новые аллели, которые дают рисунок амплификации, не соответствующий ни одному из существующих. Обратитесь к местному дистрибьютору .