

«Утверждаю»

Генеральный директор
ЗАО «Северо-Западная медицинская база»



Инструкция пользователя
изделия медицинского назначения

«Наборы реагентов для проведения лабораторных диагностических исследований генов гистосовместимости человека и проверки температурного режима термоциклера и контроля контаминации»,
производства BAG Health Care GmbH, Германия

«СОГЛАСОВАНО»

Зав.кафедрой КЛД ГОУ ДПО РМАПО
д.м.н., профессор

_____ В.В.Долгов

«__» _____ 2011 г.

М.П.

1. Назначение

Наборы реагентов предназначены для *in vitro* диагностики – гистотипирования HLA аллелей на молекулярно-генетической основе и подтверждения однородности температур в термоциклерах и контроля контаминации.

2. Общее описание

Наборы реагентов для проведения лабораторных диагностических исследований генов гистосовместимости человека и проверки температурного режима термоциклера и контроля контаминации:

1. HISTO SPOT A – набор реагентов для HLA-генотипирования Гисто спот A
2. HISTO SPOT B – набор реагентов для HLA-генотипирования Гисто спот B
3. HISTO SPOT C – набор реагентов для HLA-генотипирования Гисто спот C
4. HISTO SPOT DRB1 4D- набор реагентов для HLA-генотипирования Гисто спот DRB1 4D
5. HISTO SPOT DQB1 – набор реагентов для HLA-генотипирования Гисто спот DQB1
6. HISTO SPOT Reagent Kit – набор дополнительных реагентов для HLA-генотипирования
7. Histo Type Celiac Disease – реагент для HLA-генотипирования Гисто тайп Целиакия
8. Cycler Check – реагент для оценки равномерности температур в термоциклере
9. HISTO TYPE DRB1*10 high – реагент для HLA-генотипирования Гисто тайп DRB1*10 высокое разрешение
10. HISTO TYPE DQB1*02/04 – реагент для HLA-генотипирования Гисто тайп DQB1*02/04 высокое разрешение
11. HISTO TYPE DQB1*03 – реагент для HLA-генотипирования Гисто тайп DQB1*03 высокое разрешение
12. HISTO TYPE DQB1*05 – реагент для HLA-генотипирования Гисто тайп DQB1*05 высокое разрешение
13. HISTO TYPE DQB1*06 – реагент для HLA-генотипирования Гисто тайп DQB1*06 высокое разрешение
14. HISTO TYPE DQB high – реагент для HLA-генотипирования Гисто тайп DQB высокое разрешение
15. Wipe Test – реагент для контроля контаминации HLA I и II класса Вайп тест
16. KIR TYPE – реагент для генотипирования KIR рецепторов и их HLA лигандов
17. EPITOP TYPE – реагент для генотипирования KIR рецепторов и их HLA лигандов
18. HISTO TYPE Narcolepsy – реагент для HLA-генотипирования Гисто тайп Нарколепсия

HISTO SPOT представляют собой тесты для *in vitro* диагностики – гистотипирования HLA аллелей на молекулярно-генетической основе, она позволяет получить результаты типирования в диапазоне от низкого до среднего разрешения.

Реагенты для типирования HISTO SPOT содержат все компоненты, необходимые для проведения ПЦР реакции, а также тестовые лунки с иммобилизованными сайт-специфическими олигонуклеотидными зондами для обнаружения продуктов ПЦР. Набор реагентов HISTO SPOT содержит реагенты для гибридизации и обнаружения, которые могут использоваться в комбинации со всеми наборами для типирования HISTO SPOT. Устройство для обработки MR.SPOT

специально разработано для использования с наборами HISTO SPOT, что позволяет обрабатывать от 1 до 96 образцов, автоматизируя процесс на всех этапах от гибридизации и обнаружения до интерпретации результатов. Для интерпретации результатов необходимо программное обеспечение HISTO MATCH.

ПРИНЦИП ТЕСТА

Тест включает четыре базовых этапа:

- выделение ДНК
- ПЦР - амплификация
- гибридизация и обнаружение
- интерпретация данных

Выделение ДНК осуществляется на клиническом примере с использованием метода, используемого в лаборатории или с помощью имеющихся в продаже наборов. После этого ДНК амплифицируется в ходе локус-специфичной ПЦР с помощью мастер-микса и раствора $MgCl_2$, входящего в состав набора. Специфичность амплификации поддерживается набором биотинилированных праймеров, которые были разработаны для изолированной амплификации выбранного локуса HLA. После процесса ПЦР амплификации, планшет для ПЦР, содержащий меченый биотином ампликон, переносят в устройство для обработки MR.SPOT. MR.SPOT добавляет буфер для гибридизации к каждой лунке, а затем переносит каждый ампликон с буфером для гибридизации в тестовую лунку, содержащую серию иммобилизованных сайт-специфических олигонуклеотидных зондов (SSO). Эти зонды представляют собой либо однонуклеотидные зонды, либо комбинацию 2 или более отдельных зондов, иммобилизованных в той же зоне (Мозаичные зонды), которые были разработаны для того, чтобы повысить идентификацию расположенных в положении цис полиморфизмов.

Меченные биотином ампликоны связываются с теми зондами SSO, которые содержат обязательные последовательности-мишени, и следовательно могут быть обнаружены с помощью колориметрической реакции. Чтобы предотвратить неспецифическое связывание ампликона на поверхности тестовых лунок, MR.SPOT перед переносом ампликона блокирует лунки с помощью блокирующего буфера.

После обязательного этапа промывания, предпринятого с целью удаления всех не связавшихся ампликонов, в лунки добавляют конъюгат стрептавидин-щелочная фосфатаза, который связывается с меченым биотином ампликоном, захваченным зондом SSO. После последующих этапов промывания добавляют субстрат BCIP/NBT, который при конвертации под воздействием щелочной фосфатазы даёт сине-фиолетовое окрашивание. Получившиеся в результате окрашенные пятна на дне каждой лунки фотографируются MR.SPOT, а изображение передается в программное обеспечение HISTO MATCH, установленное на ПК пользователя. Программа анализа изображения программного обеспечения HISTO MATCH определяет интенсивность каждого пятна в серии и сравнивает её с интенсивностью фона. По этим данным рассчитывается положительная и отрицательная реакции. Программа сопоставления паттернов программного обеспечения HISTO MATCH определяет HLA тип образца, основываясь на специфичном варианте гибридизации.

Основной материал для типирования в наборе **HISTO TYPE Celiac Disease, HISTO TYPE, Wipe Test, KIR TYPE, EPITOR TYPE, HISTO TYPE Narcolepsy** - очищенная ДНК. Процедура анализа осуществляется с помощью ПЦР с использованием Праймеров, обладающих специфичностью к последовательности (SSP) (см. рис. 1). Этот метод основывается на том факте, что распрямление праймера и, следовательно, успех ПЦР, зависит от точного соответствия 3'-концов обоих праймеров. И только в том случае, если праймеры полностью соответствуют целевой последовательности, происходит амплификация, которая впоследствии визуализируется с помощью электрофореза на агарозном геле.

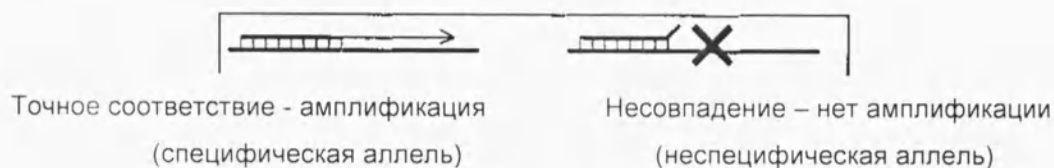


Рис. 1: Принцип SSP-ПЦР

Состав отдельных смесей праймеров позволяет осуществлять четкую идентификацию типов HLA, указанных в соответствующей диаграмме оценки. При каждом типировании используется определенное число (24) аликвотных и высушенных реакционных смесей, включая внутренний контроль амплификации с конечным объемом 10 мкл.

KIR TYPE и EPITOR TYPE

Натуральные киллеры (НК) и субпопуляции Т-лимфоцитов с CD8+ фенотипом или рецепторы Т-клеток $\gamma\delta$ экспрессируют ингибирующие или активирующие иммуноглобулиноподобные рецепторы клеток-киллеров (KIR). Из-за разницы в количестве генов и четкого полиморфизма отдельных генов, генная часть KIR рецепторов у отдельных лиц отличается высокой изменчивостью. При этом определённые молекулы HLA класса 1 были идентифицированы как лиганды для отдельных KIR рецепторов. Ингибирующий рецептор KIR2DL1 связывается с аллелями молекул HLA-C группы 2, которые несут в себе аминокислоты Asn⁷⁷ и Lys⁸⁰, а рецепторы KIR2DL2 / KIR2DL3 – с аллелями молекул HLA-C группы 1, которые несут в себе аминокислоты Ser⁷⁷ и Asn⁸⁰, при этом KIR3DL1 обладает сродством к аллелям HLA-B с эпитопом Bw4 в положении аминокислоты 77-83 спирали $\alpha 1$. Ингибирующий рецептор KIR3DL2 связывается с аллелями групп HLA-A*03 и *11. Лиганды активирующих рецепторов KIR недостаточно хорошо задокументированы – при этом считается, что они обладают сродством к тем же молекулам HLA-B и HLA-C, что и их соответствующие ингибирующие рецепторы.

Наиболее широко распространённая модель активации клеток натуральных киллеров в настоящий момент представляет собой предположение о том, что реакционность клеток натуральных киллеров контролируется балансом между подавляющими и активирующими сигналами. Таким образом, активация клеток натуральных киллеров может происходить из-за снижения подавляющих сигналов или из-за роста связывания лигандами активирующих рецепторов. В случае трансформации (например, опухолевое заболевания или вирусная инфекция) с сопутствующей утратой экспрессии HLA в качестве лиганда, утраченные подавляющие сигналы приводят к активации клеток натуральных киллеров и лизису клеток-мишеней. Данное наблюдение стало основой гипотезы «потери своего», она заключается в том,

что здоровая ткань с устойчивой экспрессией HLA обходится без активации клеток натуральных киллеров.

Обнаружение отдельных рецепторов KIR / KIR HLA лигандов выполняется с помощью метода PCR-SSP (ПЦР с сайт-специфичными праймерами)

BAG Cycler Check представляет собой быстрый и лёгкий метод подтверждения однородности температур в термоциклерах. При диагностике нуклеиновых кислот очень важно гарантировать надёжность термоциклера в ходе его использования. Поэтому такие тесты следует выполнять достаточно регулярно. BAG Cycler Check включает одну реакционную смесь, которая анализируется во всех 96 позициях блока термоциклера. Реакционная смесь содержит одну пару праймеров для оценки температуры денатурации (540 пар оснований) и ещё одну пару праймеров для оценки температуры отжига (1040 пар оснований). С помощью этих двух пар праймеров можно оценить насколько ниже температура денатурации или насколько выше температура отжига, по сравнению со стандартными значениями.

Если значения температур соответствуют требованиям, а профиль распределения температур однороден, то все 96 позиций блока должны иметь две полосы (Рис. 2). Отклонение в значениях температур приводит к потере полос в некоторых или во всех позициях (Рис. 3).

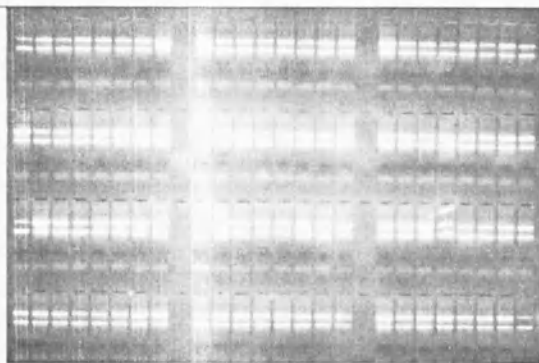


Рис. 2: Результаты для BAG Cycler Check с указанными ниже параметрами

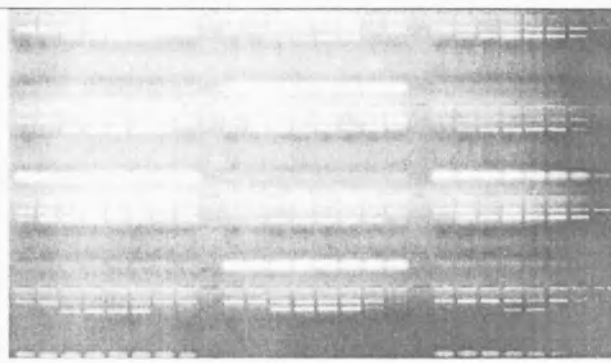


Рис. 3: Результаты для BAG Cycler Check с температурой денатурации, которая ниже на 2°C

Так как тестовая смесь в BAG Cycler Check соответствует условиям набора BAG HISTO TYPE, то она превосходно подходит для оптимизации параметров ПЦР на конкретном термоциклере. Такая оптимизация может потребоваться из-за разницы в настройках термоциклеров.

3. СОСТАВ НАБОРОВ

3.1 HISTO SPOT

Реагенты, поставляемые в локус-специфичных наборах для типирования HISTO SPOT Реагентов из одного набора достаточно для проведения 96 тестов. Каждый набор реагентов содержит:

Тестовые лунки, в отдельной упаковке, каждая полоска содержит 8 тестов, которые содержат иммобилизованные сайт-специфические олигонуклеотидные зонды 12 полосок

Мактер-микс, готовый к использованию, содержит биотинилированные праймеры для выбранного локуса, дезоксирибонуклеозидтрифосфат, Taq полимеразу, реакционный буфер, 0.05% азид натрия 1100 мкл

Хлорид магния, 6 мМ, готовый к использованию, содержит 0.001% Проклин 300 600 мкл

X = A, B, C, DRB1, DQB1 или DPB1

Блокирующий буфер, готовый к использованию, содержащий 0.001% Проклин 150, 2 x 60 мл

Буфер для гибридизации, готовый к использованию, содержащий 0.001% красителя, 0.1% додецилсульфат натрия, 0.001% Проклин 150, 40 мл

Буфер для обязательного промывания, готовый к использованию, содержащий 0.001% красителя, 0.1% додецилсульфат натрия, 0.001% Проклин 150, 100 мл

Промывной буфер TBS (Трис-буферный физиологический раствор), готовый к использованию, содержащий 20 мМ Триса, 0.003% красителей, 0.001% Проклин 150, 100 мл

Субстрат BCIP® / NBT, готовый к использованию 36 мл (5-бromo-4-хлоро-3-индолил фосфат / нитросиний тетразолий хлорид)

Конъюгат, Стрептавидин-щелочная фосфатаза, концентрат, 40 мкл, содержащий < 0.1% азид натрия (следует развести 1:1666 в Блокирующем буфере)

3.2 KIR-TYPE

- 10 планшетов KIR-TYPE, что достаточно для проведения 10 типирований KIR. Внесённые и высушенные реакционные смеси состоят из аллель-специфичных праймеров, праймеров внутреннего контроля (последовательность специфичная для хромосомы 1) и нуклеотидов.

Первая реакционная смесь несёт на себе пометку и содержит контроль загрязнения/ отрицательный контроль с праймерами внутреннего контроля и амплификат-специфичными праймерами (см. таблицу специфичности по партиям и диаграмму оценки). Номер партии напечатан на каждом планшете.

- Смесь 22 включает положительный контроль (только праймеры внутреннего контроля)

- 10 x ПЦР-буфер, что достаточно для проведения 10 типирований

- 8 крышек полосок, что достаточно для проведения 10 типирований

- Руководство по эксплуатации, рабочий бланк с таблицей специфичности и схемой оценки

3.3 EPITOR-TYPE

- 10 полос Epitor-TYPE, что достаточно для проведения 10 типирований Epitor. Внесённые и высушенные реакционные смеси состоят из аллель-специфичных праймеров, праймеров внутреннего контроля (последовательность специфичная для хромосомы 1) и нуклеотидов. Первая реакционная смесь несёт на себе отметку (напечатан номер партии).

- Последняя смесь включает контроль загрязнения/ отрицательный контроль (см. таблицу специфичности по партиям и диаграмму оценки)

- 10 ПЦР-буферов, что достаточно для проведения 10 типирований

- 8 крышек полосок, что достаточно для проведения 10 типирований

- Руководство по эксплуатации, рабочий бланк с таблицей специфичности и схемой оценки

3.4 HISTO TYPE Нарколепсия

- 20 полосок HISTO TYPE, что достаточно для проведения 20 типирований для диагностики нарколепсии. Аликвотные и высушенные реакционные смеси состоят из аллель-специфичных праймеров, праймеров внутреннего контроля (специфичных для человеческого гена G3PDH) и нуклеотидов. Первая реакционная смесь на каждой полоске несёт на себе номер партии.
- Реакционные смеси для ПЦР объединяют в себе контроль загрязнения с праймерами внутреннего контроля и амплификат-специфичными праймерами.
- 10 ПЦР-буферов, что достаточно для проведения 20 типирований
- 8 или 12 крышек-полосок, что достаточно для проведения 20 типирований
- Руководство по эксплуатации, таблица специфичности, схема оценки и рабочий бланк

3.5 Wipe Test

- 5 ПЦР полосок (8 тонкостенных пробирок для ПЦР), их достаточно для проведения 40 реакций (13 тестов для оценки загрязнения поверхности) Аликвотные и высушенные реакционные смеси, состоящие из аллель-специфичного набора праймеров, внутренних контрольных праймеров (специфичных для человеческого гена G3PDH) и нуклеотидов.
- 1 x 1,1 мл 10 ПЦР буферов
- 5 x 8 полосок-крышек
- Руководство по эксплуатации

3.6 HISTO TYPE

- Планшеты HISTO TYPE содержат аликвотные и высушенные реакционные смеси, которые состоят из аллель-специфичных праймеров, праймеров внутреннего контроля (специфичных для человеческого гена G3PDH) и нуклеотидов. Первая реакционная смесь несет на себе метку, и на планшете напечатан номер партии. В некоторых изделиях HISTO TYPE контроль загрязнения находится в последней позиции планшета (см. прилагаемую таблицу специфичности и диаграмму оценки для каждой партии).
- Реакционные смеси для ПЦР с контролем загрязнения, праймеры внутреннего контроля и специфичные праймеры для амплификации (не разделены, если контроль загрязнения встроен в последнюю позицию тестового планшета).
- 10 ПЦР-буферов
- Крышки полосок
- Руководство по эксплуатации, таблица специфичности, схема оценки, рабочий бланк и спецификация для данной партии

4. ТРЕБОВАНИЯ БЕЗОПАСНОСТИ

Биологический материал, используемый для выделения ДНК, например, кровь или ткани человека, следует рассматривать как потенциально инфицированный. При работе с биологическим материалом, следует порекомендовать использовать соответствующие меры предосторожности (не отбирать материал в пипетку ртом; при работе с биологическим материалом и выполнении теста следует использовать одноразовые перчатки; дезинфицируйте руки после окончания теста).

Биологический материал следует инактивировать перед утилизацией (например, в автоклаве). Изделия для одноразового использования следует автоклавировать или сжигать после использования.

Разлив потенциально инфицированных материалов следует удалять немедленно с помощью впитывающей бумаги, а загрязнённые зоны следует протереть соответствующим стандартным дезинфектантом или 70% спиртом.

Материал, используемый для устранения разливов, включая перчатки, следует инактивировать перед утилизацией (например, в автоклаве).

Блокирующий буфер, Буфер для гибридизации, Буфер для обязательного промывания и Трис-буфер для промывания содержат ProClin150, а раствор хлорида магния содержит ProClin300. Данный реагент содержит всего 0.001% консерванта, но всё же следует избегать контакта с кожей и слизистыми.

Мастер-микс и Конъюгат содержат консервант - азид натрия. Данный реагент содержит < 0.1% азид натрия, что не является опасной концентрацией. Несмотря на это, следует избегать контакта с кожей и слизистыми. Азид натрия может реагировать со свинцовыми и медными элементами трубопроводов с образованием взрывоопасных азидов металлов. При сливе растворов, содержащих азид натрия, в раковину в лаборатории, промойте слив большим объёмом воды, чтобы предотвратить скопление азидов.

Все виды работы с реагентами должны осуществляться с соответствующими предосторожностями. При работе с реагентами используйте защиту для глаз, лабораторные халаты и одноразовые перчатки. Избегайте контакта этих материалов с кожей, глазами или слизистыми. Если контакт всё же имеет место, немедленно промойте поражённое место большим количеством воды. Если вы этого не сделаете, могут возникнуть ожоги.

Если произойдёт разлив реагента, то перед тем как вытереть его, разведите реагент водой. Не подвергайте субстрат действию металлов и окисляющих веществ.

Утилизация всех образцов, неиспользованных реагентов и отходов должна осуществляться в соответствии с законами данной страны, федеральными законами, законами штата и местными инструкциями.

Избегайте микробного загрязнения реагентов при удалении аликуотов из бутылок с реагентами. Мы рекомендуем использовать стерильные одноразовые пипетки и наконечники для пипеток. Не используйте мутные реагенты или реагенты с признаками микробного загрязнения.

ПЦР является чрезвычайно чувствительным методом. Следует принять особые меры предосторожности, чтобы избежать загрязнения и ложных реакций:

- На работе носите перчатки (если это возможно, без талька).
- Каждый раз при работе с пипеткой используйте новые наконечники (со встроенным фильтром).
- Используйте отдельные рабочие зоны для преамплификации (выделение ДНК и подготовка реакции) и постамплификации (гель-электрофорез, документация). Лучше использовать две отдельные комнаты.
- Используйте устройства и другие материалы только в соответствующих местах и не меняйте их местами.

Бромистый этидий - мощный мутаген. При работе с гелями или растворами, содержащими бромистый этидий, используйте перчатки! Обратите внимание на руководство по эксплуатации, предупреждения и предосторожности изготовителя! Трансиллюминатор формирует ультрафиолетовое излучение с чрезвычайно короткими волнами, которое может вызвать ожог кожи и сетчатки. Используйте лицевую маску для защиты от УФ облучения!

Со всеми биологическими материалами, используемыми для выделения ДНК, например, с кровью или человеческой тканью, следует обращаться как с потенциально инфицированными. При работе с биологическими материалами рекомендуется придерживаться соответствующих мер предосторожности (Не всасывать материал в пипетку; при работе с биологическими материалами и при выполнении теста следует использовать одноразовые перчатки; продезинфицируйте руки, когда закончите тест).

Перед утилизацией биологический материал следует инактивировать (например, в автоклаве). После использования расходные материалы следует автоклавировать или сжечь.

Разливы потенциально инфицированных материалов следует устранять незамедлительно с помощью впитывающего бумажного полотенца, при этом заражённые участки следует протереть с использованием соответствующего стандартного дезинфицирующего вещества или 70% спирта. Перед утилизацией материал, используемый для сбора разливов, включая перчатки, следует инактивировать (например, в автоклаве).

5. ХРАНЕНИЕ И СТАБИЛЬНОСТЬ

Все реагенты и компоненты набора следует хранить при температуре 2...8°C. Срок годности указан на этикетке каждого реагента и действителен для первоначально запечатанных реагентов. Дата окончания срока хранения, указанная на внешней этикетке, относится к реагенту с самым коротким временем стабильности, содержащимся в наборе. Можно открывать отдельные полоски из 8 лунок, при этом можно отломить требуемое число лунок для теста, а неиспользованные лунки вернуть в открытый фольгированный пакет и сохранить для использования в будущем с набором. Лунки для тестов, которые хранятся в открытых фольгированных пакетах, следует использовать в течение 30 дней после открытия. Другие открытые реагенты следует использовать в течение 3 месяцев. Для каждого теста следует всегда готовить новое разведение конъюгата.

6. ПРОЦЕДУРА ПРОВЕДЕНИЯ ТЕСТА

6.1 HISTO SPOT

6.1.1 Условия безопасности и особые примечания

Молекулярно-генетические методики представляют собой особо чувствительные методы, которые должны выполняться хорошо обученным персоналом, имеющим опыт в области методов молекулярной генетики и тестах тканевой совместимости. Результаты этих тестов не следует использовать в качестве единственного определяющего фактора для принятия клинических решений.

Следует выполнять требования руководств по трансплантации, а также стандартов EFI, что позволит минимизировать риск ошибочного типирования, в частности – погрешностей в серологических и молекулярно-генетических методах.

Следует указать на особые условия безопасности, что позволит избежать загрязнения и ложных реакций:

- В процессе работы носите перчатки (если это возможно, без талька).
- При каждом отмеривании пипеткой используйте новые наконечники (со встроенным фильтром).
- Используйте отдельные рабочие зоны для преамплификации (выделение ДНК и подготовка реакций) и постамплификации (гибридизация и обнаружение). Лучше использовать две отдельные комнаты.
- Ампликон не следует возвращать в зону подготовки ПЦР.
- Используйте устройства и другие материалы только в соответствующих местах и не меняйте их местами.

6.1.2 Выделение ДНК

Подготовьте образец ДНК с помощью стандартного метода выделения ДНК для данной лаборатории с целью использования в ПЦР (лучше не использовать метод высаливания). Присутствие гепарина потенциально подавляет ПЦР. Таким образом, для типирования рекомендуется этилендиаминтетрауксусная кислота (ЭДТК) или Цитратная кровь. Образец ДНК должен иметь концентрацию примерно 15 нг/мкл и коэффициент чистоты (коэффициент экстинкции OD_{260}/OD_{280}) в диапазоне от 1.5 до 2.0. Более высокие значения указывают на наличие РНК, более низкие значения указывают на загрязнение протеином.

6.1.3 Амплификация

Для амплификации используйте окаймлённые планшеты для ПЦР, поскольку впоследствии их нужно будет удерживать за край с помощью зажима в устройстве для обработки MR.SPOT®. Для каждого образца, который будет подвержен амплификации к пробирке ПЦР добавьте следующие реагенты:

10 мкл Мастер-микс

5 мкл $MgCl_2$

5 μl Образец ДНК (15 нг/мкл)

Общий объём для каждой реакции амплификации составляет 20 мкл.

Если необходим отрицательный контроль, подготовьте одну ПЦР с дистиллированной водой вместо образца ДНК.

Закройте пробирки для амплификации с помощью крышек или клейкой ленты, поместите их в термоциклер и выполните амплификацию при условиях, указанных в таблице 1:

Таблица 1.

Этап программы	Время	Температура	Число циклов
Первая денатурация	2 Мин	96°C	1 Цикл
Денатурация	15 Сек	96°C	10 Циклов
Отжиг + Элонгация	60 Сек	65°C	
Денатурация	10 Сек	96°C	20 Циклов

Отжиг	50 Сек	61°C	
Элонгация	30 Сек	72°C	
Пауза	∞	22°C	

Условия такие же, как и во всех термоциклерах, но общее время, необходимое для этого этапа, будет варьироваться в зависимости от скорости конкретного термоциклера.

Как только будет завершён этап аппликации, образцы можно немедленно тестировать или хранить при 2...8°C в течение до 5 дней.

6.1.4 Автоматический анализ гибридизации с помощью устройства для обработки MR.SPOT

Приготовление реагента

Возьмите реагенты HISTO SPOT и тестовые лунки HISTO SPOT из холодильника и дайте им нагреться при комнатной температуре.

Кристаллы соли можно видеть в буфере для гибридизации, а также в растворе для обязательного промывания. Если видны кристаллы, нагрейте реагенты до 30°C, чтобы они растворились. Нагрейте всё содержимое бутылки, а не аликвоту.

Конъюгат следует развести в соотношении 1:1666 в блокирующем буфере. Разведение конъюгата следует всегда готовить заново для каждого теста.

Требуемые объёмы реагентов будут варьироваться в зависимости от числа тестируемых полосок. MR.SPOT выводит на экран требуемые объёмы для выбранного числа полосок. Перенесите требуемые объёмы реагентов в емкости с соответствующими этикетками.

Поместите тестовые лунки и планшет для ПЦР в соответствующие отсеки устройства для обработки MR SPOT.

Обратите внимание на правильное расположение планшета для ПЦР.

Подготовка устройства для обработки MR.SPOT

Выключите устройство для обработки MR.SPOT, внутренний ПК и сенсорный экран. Появится начальный экран. Следуйте рекомендациям, указанным на экране. Более детальную информацию можно найти в руководстве по эксплуатации устройства MR.SPOT.

Передача результатов на ПК для интерпретации

Передайте данные в программное обеспечение HISTO MATCH через сеть или USB-накопитель в соответствии с описанием, приведённым в руководстве по эксплуатации программного обеспечения HISTO MATCH.

Интерпретация результатов

Откройте программное обеспечение HISTO MATCH (если оно ещё не установлено, то его можно установить с CD, поставляемого с устройством для обработки MR.SPOT) и интерпретируйте

данные в соответствии с описанием программного обеспечения HISTO MATCH.

6.2 Cyclor Check

6.2.1 Амплификация

- С помощью пипетки возьмите мастер-микс, состоящий из 10 х буфер ПЦР, раствора ДНК, Taq-полимеразы и Дистиллированной воды, тщательно перемешайте на вортексе.

104 мкл контрольной ДНК (60 нг / мл)

824 мкл дистиллированной воды

104 мкл 10 х буфер для ПЦР

8,3 мкл Taq полимеразы (5 Ед/мкл)

- Добавьте 10 мкл этой смеси к предварительно капельно внесённым реакционным смесям. Плотнo закройте пробирки соответствующей фольгой. При работе с термоциклерами, оснащёнными регулируемой крышкой, можно также использоваться маты для ПЦР плашек многократного использования. Немного встряхните плашку в направлении вниз, чтобы растворить синий шарик в основании плашки. Все растворы ПЦР должны оседать на дне. Если используется подогреваемая и регулируемая крышка, то наслоение на реакционные смеси минерального масла не требуется!

- Поместите реакционные пробирки в термоциклер, и плотно закройте крышку. Реакционные пробирки должны быть надёжно фиксированы в блоке. Запустите программу ПЦР. Положение плашки в блоке термоциклера (А1 сверху и с левой стороны) очень важно, это позволяет поменять реакции в позициях циклера.

Таблица 2. Параметры амплификации

Программа-Этап	Темп.	Время	Число циклов
Первая Денатурация	96°C	5 мин	1 Цикл
Денатурация	96°C	20 сек	5 Циклов
Отжиг+Элонгация	68°C	1 мин	
Денатурация	96°C	20 сек	
Отжиг	64°C	50 сек	10 Циклов
Элонгация	72°C	45 сек	
Денатурация	96°C	20 сек	
Отжиг	61°C	50 сек	15 Циклов
Элонгация	72°C	45 сек	
Окончательная элонгация	72°C	5 мин	
			1 Цикл

Типы термоциклеров:

PTC 100 / 200 (MJ Research / Biozym) и ПЦР-система GeneAmp 9600 / 9700 (Perkin Elmer)

6.2.2 Гель-электрофорез

Разделение продуктов амплификации производится в ходе электрофореза в (горизонтальном) агарозном геле. В качестве буфера для электрофореза мы рекомендуем 0.5 х TBE (45 мм триса,

45 мм борной кислоты, 0.5 мм ЭДТА). Концентрация геля должна составить 2.0 - 2.5% агарозы. Перед загрузкой образцов обеспечьте полимеризацию геля в течение, по крайней мере, 30 минут. После окончания амплификации, выньте образцы из термоциклера и аккуратно загрузите в каждую порцию геля полноценные реакционные смеси. Помимо этого добавьте 10 мкл стандарта длины ДНК для сравнения размера. Электрофоретическое разделение осуществляется при 10-12 В/см (при расстоянии 20 см между электродами приблизительно 200-240 В) в течение 20-40 мин. По окончании цикла весь гель окрашивается раствором бромид этидия (EtBr) (приблизительно 0.5 мкг/мл EtBr в H₂O или буфере TBE в течение 30-45 мин.). В качестве альтернативы можно также добавить EtBr (0.5 мкг/мл) к буферу для электрофореза или к агарозному гелю. Если это необходимо, избыток EtBr может быть удален при замачивании геля в H₂O или в 0.5 х буфера TBE в течение 20-30 минут.

6.3 Histo Type Celiac Disease

6.3.1 Безопасные условия и особые примечания

ПЦР является чрезвычайно чувствительным методом и должен выполняться хорошо обученным персоналом, обладающим достаточным опытом в области методов молекулярной генетики и оценки тканевой совместимости. Следует выполнять требования руководящих принципов в области трансплантации, а также стандарты EFI, что позволит минимизировать риск ложного типирования в конкретном случае несоответствий серологического и молекулярно-генетического методов.

Необходимо учитывать особые условия безопасности, что позволит избежать загрязнения и, таким образом, формирования ложной реакции:

- При работе используйте перчатки (если это возможно, используйте перчатки без талька).
- При использовании пипетки каждый раз берите новые наконечники (со встроенным фильтром).
- Используйте отдельные рабочие зоны для преамплификации (выделение ДНК и подготовка реакций) и постаmplификации (электрофорез в геле, регистрация). Лучше это делать в двух отдельных помещениях.
- Используйте устройства и другие материалы только в соответствующих местах и не меняйте их.

6.3.2 Выделение ДНК

Для HLA-SSP типирования одного пациента требуется 5-10 мкг ДНК (что соответствует приблизительно 0.5 мл крови). Например, набор BAG EXTRA-GENE больше других подходит для выделения, так как чистую ДНК можно получить из цельной крови за короткое время без использования токсичных химикатов или растворителей. Помимо этого, для получения ДНК достаточной чистоты можно использовать и другие методы, описанные в литературе [5], типа, хлороформ-триэтил-аммония-бромид (СТАВ) или фенол-хлороформной очистки. Наличие гепарина может ингибировать ПЦР⁽¹⁾ [6]. Поэтому для типирования рекомендуется использовать кровь, обработанную ЭДТА или цитратом. ДНК должна иметь индекс чистоты (коэффициент экстинкции OD₂₆₀/OD₂₈₀) между 1.5 и 2.0.

6.3.3 Амплификация

Все аликвотные и высушенные реакционные смеси уже содержат аллель-, контроль-специфичные праймеры и нуклеотиды. Они поставляются высушенными в реакционных сосудах. Параметры амплификации оптимизированы для окончательного объема 10 мкл.

6.3.4 Регистрация и интерпретация результатов

Для регистрации необходимо визуализировать амплификацию ПЦР с помощью прибора для УФ-просвечивания (220-310 нм), а также сделать снимок соответствующей камерой с использованием соответствующей плёнки и фильтров (например, полароид, тип плёнки 667). Выберите значение выдержки и диафрагмы таким образом, чтобы полосы были резкими и выделялись на тёмном фоне (примерные установки – диафрагма 11, выдержка 1 секунда).

Возможные результаты:

- Если значения температуры в термоциклере верны для всего блока, то должны быть две полосы во всех позициях (540 пар оснований + 1040 пар оснований).
- Если температура денатурации будет слишком низка, то в некоторых или во всех позициях будет отсутствовать меньшая полоска.
- Если температура отжига слишком высока, то в некоторых или во всех позициях будет отсутствовать в большинстве случаев большая, а также и нижняя полосы.
- Если температура отжига будет слишком низкой, то могут иметь место неспецифичные полосы.

Если результат ПЦР не соответствует требованиям, то необходимо проверить значения температуры с помощью электронного измерительного прибора, а в случае необходимости, связаться с отделом обслуживания компании-производителя.

6.3.5 Электрофорез в геле

Разделение продуктов амплификации осуществляется с помощью электрофореза через (горизонтальный) агарозный гель. В качестве буфера для электрофореза мы рекомендуем использовать 0.5 x TBE (45 ммоль трис, 45 ммоль борной кислоты, 0.5 ммоль ЭДТА). Концентрация геля должна составить 2.0 - 2.5% агарозы. Перед загрузкой образца дайте гелю полимеризоваться, по крайней мере, в течение 30 минут. После того, как амплификация будет завершена, возьмите образцы из термоциклера и загрузите реакционные смеси в полном объеме в каждую ячейку геля. Кроме того, добавьте 10 мкл стандарта длины ДНК для сравнения размера. Электрофоретическое разделение осуществляется при 10-12 В/см (при расстоянии между электродами 20 см и приблизительно 200-240 В), в течение 20-40 минут. После завершения процедуры весь гель окрашивается раствором бромистого этидия (EtBr) (приблизительно 0.5 мкг/мл Бромистого этидия в H₂O или буфере TBE) в течение 30-40 минут. В качестве альтернативы EtBr (0.5 мкг/мл) можно также добавить в буфер для электрофореза или агарозный гель. Если потребуется, избыток EtBr можно удалить, замочив гель в H₂O или 0.5 x TBE буфере на 20-30 минут.

6.3.6 Регистрация и интерпретация результатов

С целью регистрации визуализируйте ПЦР амплификацию, используя ультрафиолетовый трансиллюминатор (220-310 нм), и сфотографируйте её, используя соответствующую камеру,

пленки и фильтры (например, Polaroid, тип пленки 667). Выберите выдержку и диафрагму, чтобы полосы выглядели четкими и выделялись на темном фоне (примерная диафрагма 11, время выдержки 1 секунда).

Для интерпретации воспользуйтесь таблицей специфичности и диаграммой оценки (см. дополнительный лист); положительными следует считать только те полосы, которые имеют правильный размер по сравнению со стандартом длины ДНК. Правильные размеры приведены в таблице соответствующей диаграммы. На всех дорожках без аллель-специфичной амплификации, должен быть хорошо виден внутренний контроль 1070 bp / 429 bp. В большинстве случаев при наличии аллель-специфичной амплификации, внутренний контроль слабо выражен или полностью исчезает! При получении неверных результатов обратитесь к разделу «Поиск и устранение неисправностей».

6.4 HISTO TYPE

6.4.1 Безопасные условия и особые примечания

ПЦР является чрезвычайно чувствительным методом и должен выполняться хорошо обученным персоналом, обладающим достаточным опытом в области методов молекулярной генетики и оценки тканевой совместимости. Следует выполнять требования руководящих принципов в области трансплантации, а также стандарты EFI, что позволит минимизировать риск ложного типирования в конкретном случае несоответствий серологического и молекулярно-генетического методов.

Необходимо учитывать особые условия безопасности, что позволит избежать загрязнения и, таким образом, формирования ложной реакции:

- При работе используйте перчатки (если это возможно, используйте перчатки без талька).
- При использовании пипетки каждый раз берите новые наконечники (со встроенным фильтром).
- Используйте отдельные рабочие зоны для преамплификации (выделение ДНК и подготовка реакций) и постамплификации (электрофорез в геле, регистрация). Лучше это делать в двух отдельных помещениях.
- Используйте устройства и другие материалы только в соответствующих местах и не меняйте их.

6.4.2 Выделение ДНК

Для HLA-SSP типирования одного пациента требуется 5-10 мкг ДНК (что соответствует приблизительно 0.5 мл крови). Например, набор BAG EXTRA-GENE больше других подходит для выделения, так как чистую ДНК можно получить из цельной крови за короткое время без использования токсичных химикатов или растворителей. Помимо этого, для получения ДНК достаточной чистоты можно использовать и другие методы, описанные в литературе [5], типа, хлороформ-триэтил-аммония-бромид (СТАВ) или фенол-хлороформной очистки. Наличие гепарина может ингибировать ПЦР⁽¹⁾ [6]. Поэтому для типирования рекомендуется использовать кровь, обработанную ЭДТА или цитратом. ДНК должна иметь индекс чистоты (коэффициент экстинкции OD_{260}/OD_{280}) между 1.5 и 2.0.

6.4.3 Амплификация

Все аликвотные и высушенные реакционные смеси уже содержат аллель-, контроль-специфичные праймеры и нуклеотиды. Они поставляются высушенными в реакционных сосудах. Параметры амплификации оптимизированы для окончательного объема 10 мкл.

1. Извлеките требуемое число планшетов HISTO TYPE HLA-SSP из - 20°C и разморозьте 10 х ПЦР-буфер при комнатной температуре.

2. С помощью пипетки возьмите Основную смесь (Master-Mix), состоящую из 10 х ПЦР-буфера, раствора ДНК, Таq полимеразы и дистиллированной воды, хорошо перемешайте. Разные наборы HISTO TYPE работают с одной Основной смесью, поэтому их можно объединять. Состав основной смеси в зависимости от числа реакционных смесей приведен в Таблице 3.

Если необходимо осуществить **контроль загрязнения**, получите Основную смесь без раствора ДНК и с помощью пипетки перенесите 10 мкл этого соединения в контроль загрязнения. Впоследствии добавьте раствор ДНК и распределите Основную смесь по предварительно внесенным реакционным смесям.

Таблица 3. Состав Основной смеси в зависимости от числа реакционных смесей

Число смесей	Дист. вода	Буфер 10 х ПЦР	Раствор ДНК (50-100 нг/мкл)	Таq-полимераза (5 ед/мкл)	Общий объем, мкл
1	8	1	1	0.08	10
8	79	10	10	0.8	100
16	151	19	19	1.5	190
24	222	28	28	2.2	280
30	269	34	34	2.7	340
32	285	36	36	2.9	360
48	412	52	52	4.2	520
54	459	58	58	4.6	580
56	475	60	60	4.8	600
72	618	78	78	6.2	780
80	681	86	86	6.9	860
96	808	102	102	8.2	1020

- для различных концентраций ДНК, количество ДНК и воды должно отличаться (например, для 24 смесей: 11,7 мкл раствора ДНК (120 нг/мкл) и 238 мкл дистиллированной воды.).

3. После перемешивания немедленно добавьте 10 мкл этой смеси к предварительно внесенным и высушенным реакционным смесям. Маркировка



Меняйте наконечник после каждого использования пипетки. Плотнo закройте пробирки соответствующими крышками. Не касаетесь внутренней стороны крышек и верхних краев пробирок пальцами, это позволит вам избежать загрязнения. Если используются амплификаторы с плотной крышкой, то можно также использовать ПЦР маты многократного использования.

Немного потрясите планшет, чтобы растворить синий шарик на дне планшета. Весь ПЦР раствор должен осесть на дне.

4. Поместите реакционные пробирки в термоциклер и закрепите крышку так, чтобы реакционные сосуды не деформировались при нагреве. Запустите программу ПЦР. Покрытие реакционных смесей минеральным маслом не требуется, если используется обогреваемая и регулируемая крышка!

Типы амплификаторов: PTC 100/200 (MJ Research / BioRad) и GeneAmp PCR-System 9600/9700 (пожалуйста, используйте скорость нагрева 9600) (ABI)

Таблица 4. Параметры амплификации

Этап программы	Температура	Время	Число циклов
Первая денатурация	96°C	5 минут	1 Цикл
Денатурация	96°C	20 секунд	5 Циклов
Отжиг+Элонгация	68°C	60 секунд	
Денатурация	96°C	20 секунд	10 Циклов
Отжиг	64°C	50 секунд	
Элонгация	72°C	45 секунд	
Денатурация	96°C	20 секунд	15 Циклов
Отжиг	61°C	50 секунд	
Элонгация	72°C	45 секунд	
Заключительная элонгация	72°C	5 минут	1 Цикл

Так как амплификаторы различных производителей имеют разные рабочие характеристики, и даже устройства одного типа могут быть откалиброваны по-разному, может возникнуть необходимость в оптимизации параметров амплификации.

Чтобы оптимизировать работу вашего устройства, воспользуйтесь следующими принципами:

Ложноположительные реакции (неспецифичные полосы, дополнительные типы): Увеличить температуру отжига с шагом 1°C.

Ложноотрицательные реакции (отсутствие полос): Снизить температуру отжига с шагом 1°C и/или увеличить период отжига с шагом 5 секунд и/или увеличить периоды денатурации с шагом 5 секунд.

Рекомендуется использовать только те амплификаторы, которые регулярно проходят калибровку. Для этого с успехом можно использовать набор BAG-Cycler Check (Номер по каталогу: 7104).

Тесты в рамках контроля качества были выполнены на PTC-200 - 100 (MJ Research) и 9700 (ABI) соответственно.

6.4.4 Электрофорез в геле

Разделение продуктов амплификации осуществляется с помощью электрофореза через (горизонтальный) агарозный гель. В качестве буфера для электрофореза мы рекомендуем использовать 0.5 x TBE (45 ммоль трис, 45 ммоль борной кислоты, 0.5 ммоль ЭДТА). Концентрация геля должна составить 2.0 - 2.5% агарозы. Перед загрузкой образца дайте гелю полимеризоваться, по крайней мере, в течение 30 минут. После того, как амплификация будет

завершена, возьмите образцы из термоциклера и загрузите реакционные смеси в полном объеме в каждую ячейку геля. Кроме того, добавьте 10 мкл стандарта длины ДНК для сравнения размера. Электрофоретическое разделение осуществляется при 10-12 В/см (при расстоянии между электродами 20 см и приблизительно 200-240 В), в течение 20-40 минут. После завершения процедуры весь гель окрашивается раствором бромистого этидия (EtBr) (приблизительно 0.5 мкг/мл Бромистого этидия в H₂O или буфере TBE) в течение 30-40 минут. В качестве альтернативы EtBr (0.5 мкг/мл) можно также добавить в буфер для электрофореза или агарозный гель. Если потребуется, избыток EtBr можно удалить, замочив гель в H₂O или 0.5 x TBE буфере на 20-30 минут.

6.5 Wipe Test

6.5.1 Выделение ДНК

Для положительного контроля требуется ДНК из лейкоцитов. Например, набор BAG EXTRA-GENE лучше всего подходит для выделения, так как чистую ДНК можно получить из цельной крови за короткое время без использования токсичных химикатов или растворителей. Среди других методов, описанных в литературе [5], метод с использованием бромид цетилтриметиламмония (СТАВ) или фенол-хлороформной очистки также подходит для получения ДНК достаточной чистоты. Наличие гепарина потенциально подавляет ПЦР [6]. Таким образом, рекомендуется использовать кровь, обработанную ЭДТА, или цитратную кровь. ДНК должна иметь коэффициент чистоты (коэффициент экстинкции OD₂₆₀/OD₂₈₀) между 1.6 и 2.0.

6.5.2 Амплификация

Аликвотные и высушенные реакционные смеси уже содержат аллель-специфичный набор праймеров, внутренние контрольные праймеры и нуклеотиды. Параметры амплификации оптимизированы до конечного объема 20 мкл. В каждом тесте используется три реакции.

Процедура проведения теста для оценки загрязнения поверхности

1. Реакционные сосуды объемом 1,5 мл несут на себе название исследованных участков (например, рабочее место, дверная ручка...) и содержат 200 мкл стерильной дистиллированной воды.
2. При выполнении каждого теста кусочек флиса погружают в соответствующий реакционный сосуд, и тестовую зону протирают влажным флисом.
3. Поместите флис в соответствующий реакционный сосуд и выдерживайте в течение 2 часов при комнатной температуре в 200 мкл дистиллированной воды. После этого флис нужно выбросить.
4. Извлеките требуемое количество ПЦР сосудов из зоны с температурой - 20°C и разморозьте при комнатной температуре. Обозначьте один из сосудов "тестовый участок", второй - "положительный контроль", а третий - "контроль подавления".
5. Приготовьте предварительное разведение Taq (минимум 5 реакций) и перемешайте смесь на вортексе в течение короткого промежутка времени. Приготовление предварительного разведения Taq для нескольких реакций

Таблица 5.

	на 1 реакцию	5 реакций	8 реакций
10 ПЦР буферов	2 мкл	10,0 мкл	16 мкл
Taq Полимераза (5 Ед/мкл)	0,12 мкл	0,60 мкл	0,96 мкл

4. Перенесите пипеткой следующие реакционные смеси в сосуды для ПЦР с этикетками

Таблица 6

	исследуемый участок	положительный контроль	контроль подавления
стерильная дистиллированная вода	14 мкл	17 мкл	13 мкл
проба с участка испытания	4 мкл	-	4 мкл
геномная ДНК (40 нг/мкл)	-	1 мкл	1 мкл
предварительное разведение Taq	2 мкл	2 мкл	2 мкл

7. Плотно закройте пробирки соответствующими крышками. Не касайтесь внутренней поверхности крышек и верхних краёв пробирок пальцами, чтобы избежать загрязнения. Тальк, который содержится в перчатках, является сильным ингибитором ПЦР! Слегка потрясите планшет, чтобы растворить синий шарик на дне планшета. Весь раствор ПЦР должен осесть на дне.

8. Поместите реакционные пробирки в термоциклер и закройте посылнее крышку, чтобы реакционные сосуды не деформировались при нагреве. Запустите программу ПЦР. Если используется крышка с подогревом и возможностью регулировки, то заливка реакционных смесей минеральным маслом не требуется!

Параметры амплификации:

Типы циклеров: PTC 100 / 200 (MJ Research/ BioRad) и ПЦР система GeneAmp 9600 / 9700 (используйте тепловой режим 9600) (ABI)

Таблица 7.

Программа - Этап	Время	Температура	Число циклов
Первая денатурация	5 минут	96°C	1 цикл
Денатурация	20 секунд	96°C	5 циклов
Отжиг+Элонгация	60 секунд	68	
Денатурация	20 секунд	96	10 циклов
Отжиг	50 секунд	64	
Элонгация	45 секунд	72	

Денатурация	20 секунд	96	15 циклов
Отжиг	50 секунд	61	
Элонгация	45 секунд	72	
Заключительная элонгация	5 минут	72	1 цикл

Так как амплификаторы различных производителей имеют разные рабочие характеристики, и даже устройства одного типа могут быть откалиброваны по-разному, может возникнуть необходимость в оптимизации параметров амплификации.

Чтобы оптимизировать работу вашего устройства, воспользуйтесь следующими принципами:

Ложноположительные реакции (неспецифичные полосы, дополнительные типы): Увеличить температуру отжига с шагом 1°C.

Ложноотрицательные реакции (отсутствие полос): Снизить температуру отжига с шагом 1°C и/или увеличить период отжига с шагом 5 секунд и/или увеличить периоды денатурации с шагом 5 секунд.

Рекомендуется использовать только те амплификаторы, которые регулярно проходят калибровку. Для этого с успехом можно использовать набор BAG-Cycler Check.

Тесты в рамках контроля качества были выполнены на PTC-200 - 100 (MJ Research) и 9700 (ABI) соответственно.

6.5.3 Электрофорез в геле

Разделение продуктов амплификации осуществляется с помощью электрофореза через (горизонтальный) агарозный гель. В качестве буфера для электрофореза мы рекомендуем использовать 0.5 x TBE (45 ммоль трис, 45 ммоль борной кислоты, 0.5 ммоль ЭДТА). Концентрация геля должна составить 2.0 - 2.5% агарозы. Перед загрузкой образца дайте гелю полимеризоваться, по крайней мере, в течение 30 минут. После того, как амплификация будет завершена, возьмите образцы из термоциклера и загрузите реакционные смеси в полном объеме в каждую ячейку геля. Кроме того, добавьте 10 мкл стандарта длины ДНК для сравнения размера. Электрофоретическое разделение осуществляется при 10-12 В/см (при расстоянии между электродами 20 см и приблизительно 200-240 В), в течение 20-40 минут. После завершения процедуры весь гель окрашивается раствором бромистого этидия (EtBr) (приблизительно 0.5 мкг/мл Бромистого этидия в H₂O или буфере TBE) в течение 30-40 минут. В качестве альтернативы EtBr (0.5 мкг/мл) можно также добавить в буфер для электрофореза или агарозный гель. Если потребуется, избыток EtBr можно удалить, замочив гель в H₂O или 0.5 x TBE буфере на 20-30 минут.

6.5.4 Регистрация и интерпретация результатов

С целью регистрации визуализируйте ПЦР амплификацию, используя ультрафиолетовый трансиллюминатор (220-310 нм), и сфотографируйте её, используя соответствующую камеру,

пленки и фильтры (например, Polaroid, тип пленки 667). Выберите выдержку и диафрагму, чтобы полосы выглядели четкими и выделялись на темном фоне (примерная диафрагма 11, время выдержки 1 секунда).

В том случае, если исследуемый участок не загрязнён, в образце из исследуемой зоны не должно быть никаких видимых полос.

Следующие полосы указывают на загрязнения:

Загрязнение амплификатом: 78 bp и/или 104 bp и/или 282 bp

Загрязнение геномной ДНК: 282 bp и возможно 78 bp, 104 bp, 176 bp, приблизительно 580 bp

Положительный контроль и контроль подавления должны иметь полосы, соответствующие ожидаемым при геномной ДНК. Если в положительном контроле нет амплификатов, ПЦР не произошла, и весь тест интерпретировать нельзя. Если в положительном контроле видны правильные полосы, но в контроле подавления нет видимых полос, в тестовом участке были ингибиторы. В данном случае образец из чистого "исследуемого участка" не смог доказать отсутствия загрязнений в исследуемом участке.

6.6 KIR TYPE и EPITOR TYPE

6.6.1 Выделение ДНК

Для типирования одного пациента требуется 1,5 - 3 мкг ДНК (что соответствует приблизительно 0.2 мл крови).

Например, набор BAG EXTRA-GENE лучше всего подходит для выделения, так как чистую ДНК можно получить из цельной крови за короткое время без использования токсичных химикатов или растворителей. Другие методы выделения ДНК достаточной чистоты включают имеющиеся в продаже системы на основе колонок или сфер, а также методы, описанные в литературе [5], такие как: метод с использованием бромида цетилтриметиламмония (СТАВ) или фенол-хлороформной очистки. Наличие гепарина потенциально подавляет ПЦР [17]. Поэтому для типирования рекомендуется использовать кровь, обработанную ЭДТА или цитратом. ДНК должна иметь коэффициент чистоты (коэффициент экстинкции OD260/OD280) между 1,5 и 2,0.

6.6.2 Амплификация

Все аликвотные реакционные смеси уже содержат аллель-, контроль-специфичные праймеры и нуклеотиды. Они поставляются высушенными в реакционных сосудах. Параметры амплификации оптимизированы до конечного объема 10 мкл.

1. Извлеките требуемое число планшетов KIR-TYPE / полос EpiTop-TYPE из - 20°C и разморозьте 10 x ПЦР-буферов при комнатной температуре.
2. С помощью пипетки возьмите Основную смесь (Master-Mix), состоящую из 10 x ПЦР-буфера, раствора ДНК, Taq полимеразы и дистиллированной воды, хорошо перемешайте. Набор KIR-TYPE / EpiTop-TYPE работает с той же Основной смесью, что и другие Наборы HISTO TYPE SSP, поэтому их можно объединять. Состав Основной смеси приведен в Таблице 8.

Если необходимо осуществить контроль загрязнения, получите Основную смесь без раствора ДНК и с помощью пипетки перенесите 10 мкл этой смеси в контроль загрязнения. Впоследствии

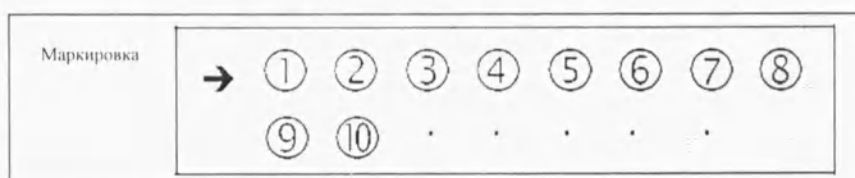
добавьте раствор ДНК и распределите Основную смесь по предварительно внесенным реакционным смесям.

Таблица 8 Состав Основной смеси в зависимости от числа реакционных смесей:

Число смесей	Дист. вода	10 буферов ПЦР	Раствор ДНК (25-40 нг/мкл)	Taq Полимераза (5 Ед/мкл)	Общий объем, мкл
1	7	1	2	0,08	10
6	55	8	16	0,64	80
22	180	26	52	2,1	260
28	221	32	64	2,6	320
30	235	34	68	2,7	340
46	346	50	100	4,0	500
54	401	58	116	4,6	580
70	526	76	152	6,1	760
118	858	124	248	9,9	1240

Количество ДНК должно составлять 50-80 нг на смесь. Для различных концентраций ДНК, количество ДНК и воды должно отличаться (например, для 22 смесей: 26,0 мкл раствора ДНК (50 нг/мкл) и 206 мкл Дистиллированной воды).

3. После перемешивания немедленно добавьте 10 мкл этой смеси к предварительно внесенным и высушенным реакционным смесям.



Меняйте наконечник после каждого использования пипетки. Плотнo закройте пробирки соответствующими крышками. Не касайтесь внутренней поверхности крышек и верхних краёв пробирок пальцами, чтобы избежать заражения. Если используются амплификаторы с плотной крышкой, то можно также использовать ПЦР маты многократного использования. Слегка потрясите планшет, чтобы растворить синий шарик на дне планшета. Весь раствор ПЦР должен осесть на дне.

4. Поместите реакционные пробирки в термоциклер и плотно закройте крышку, чтобы реакционные сосуды не деформировались при нагреве. Запустите программу ПЦР. Если используется крышка с подогревом и возможностью регулировки, то заливка реакционных смесей минеральным маслом не требуется!

Параметры амплификации

Типы термоциклеров:

PTC 100/200 (MJ Research / BioRad), GeneAmp PCR-System 9600/9700 (пожалуйста, используйте скорость нагрева 9600) (ABI) и Mastercycler epGradient S (Eppendorf)

Таблица 9.

Программа – Этап	Температура, °C	Время	Число циклов
Первая денатурация	94	2 минут	1 цикл
Денатурация	94	15 секунд	10 циклов
Отжиг	65	50 секунд	
Элонгация	72	45 секунд	
Денатурация	94	15 секунд	20 циклов
Отжиг	61	50 секунд	
Элонгация	72	30 секунд	

При использовании термоциклеров с очень высокой скоростью нагрева и охлаждения рекомендуется использовать более низкую скорость нагрева и охлаждения.

Так как амплификаторы различных производителей имеют разные рабочие характеристики, и даже устройства одного типа могут быть откалиброваны по-разному, может возникнуть необходимость в оптимизации параметров амплификации.

Чтобы оптимизировать работу вашего устройства, воспользуйтесь следующими принципами:

Ложноположительные реакции (неспецифичные полосы, дополнительные типы): Увеличить температуру отжига с шагом 1°C.

Ложноотрицательные реакции (отсутствие полос): Снизить температуру отжига с шагом 1°C и/или увеличить период отжига с шагом 5 секунд и/или увеличить периоды денатурации с шагом 5 секунд.

Рекомендуется использовать только те амплификаторы, которые регулярно проходят калибровку. Для этого с успехом можно использовать набор BAG-Cycler Check.

Тесты в рамках контроля качества были выполнены на PTC-200 - 100 (MJ Research), 9700 (ABI) и Mastercycler epGradient S (Eppendorf).

6.6.3 Электрофорез в геле

Разделение продуктов амплификации осуществляется с помощью электрофореза через (горизонтальный) агарозный гель. В качестве буфера для электрофореза мы рекомендуем использовать 0.5 x TBE (45 ммоль трис, 45 ммоль борной кислоты, 0.5 ммоль ЭДТА). Концентрация геля должна составить 2.0 - 2.5% агарозы. Перед загрузкой образца дайте гелю полимеризоваться, по крайней мере, в течение 30 минут. После того, как амплификация будет завершена, возьмите образцы из термоциклера и загрузите реакционные смеси в полном объеме в каждую ячейку геля. Кроме того, добавьте 10 мкл стандарта длины ДНК для сравнения размера. Электрофоретическое разделение осуществляется при 10-12 В/см (при расстоянии между электродами 20 см и приблизительно 200-240 В), в течение 20-40 минут. После завершения процедуры весь гель окрашивается раствором бромистого этидия (EtBr) (приблизительно 0.5 мкг/мл Бромистого этидия в H₂O или буфере TBE) в течение 30-40 минут. В качестве альтернативы EtBr (0.5 мкг/мл) можно также добавить в буфер для электрофореза или агарозный

гель. Если потребуется, избыток EtBr можно удалить, замочив гель в H₂O или 0.5 x TBE буфере на 20-30 минут.

6.6.4 Регистрация и интерпретация результатов

С целью регистрации визуализируйте ПЦР амплификацию, используя ультрафиолетовый трансиллюминатор (220-310 нм), и сфотографируйте её, используя соответствующую камеру, пленки и фильтры (например, Polaroid, тип пленки 667). Выберите выдержку и диафрагму, чтобы полосы выглядели четкими и выделялись на темном фоне (примерная диафрагма 11, время выдержки 1 секунда).

Для интерпретации воспользуйтесь таблицей специфичности и диаграммой оценки. Положительными следует считать только те полосы, которые имеют правильный размер по сравнению со стандартом длины ДНК. Правильные размеры приведены в таблице соответствующей диаграммы. На всех дорожках без аллель-специфичной амплификации, должен быть хорошо виден внутренний контроль 659 bp. В большинстве случаев при наличии аллель-специфичной амплификации, внутренний контроль слабо выражен или полностью исчезает! При получении неверных результатов обратитесь к разделу «Поиск и устранение неисправностей» (6). В контроле загрязнения не должно быть видимых полос. Если имеет место загрязнение геномной ДНК, будет иметь место полоса на 282 bp. Дополнительные полосы могут встречаться на 78 bp, 104 bp, 176 bp и приблизительно 580 bp. Если имеет место загрязнение амплификатами, то полосы появятся на 78 bp и/или 104 bp и/или 282 bp.

6.7 HISTO TYPE Narcolepsy

6.7.1 Выделение ДНК

Для HLA-SSP типирования одного пациента требуется 1 мкг ДНК (что соответствует приблизительно 0.1 - 0.5 мл крови). Например, набор BAG EXTRA-GENE лучше всего подходит для выделения, так как чистую ДНК можно получить из цельной крови за короткое время без использования токсичных химикатов или растворителей. Помимо этого, для получения ДНК достаточной чистоты можно использовать и другие методы, описанные в литературе, типа, хлороформ-триэтил-аммония-бромид (СТАВ) или фенол-хлороформной очистки. Наличие гепарина может ингибировать ПЦР. Поэтому для типирования рекомендуется использовать кровь, обработанную ЭДТА или цитратом. ДНК должна иметь коэффициент чистоты (коэффициент экстинкции OD₂₆₀/OD₂₈₀) между 1,5 и 2,0.

6.7.2 Амплификация

Все аликвотные и высушенные реакционные смеси уже содержат аллель- и контроль-специфичные праймеры, а также нуклеотиды. Они поставляются высушенными в реакционных сосудах.

Параметры амплификации оптимизированы до конечного объема 10 мкл.

1. Извлеките требуемое число полос HISTO TYPE из - 20°C и разморозьте 10 ПЦР-буферов при комнатной температуре.

2. С помощью пипетки возьмите Основную смесь (Master-Mix), состоящую из 10 ПЦР-буферов, раствора ДНК, Taq полимеразы и дистиллированной воды, хорошо перемешайте. Набор HISTO TYPE Narcolepsy работает с той же Основной смесью, что и другие Наборы BAG HISTO TYPE SSP, поэтому их можно объединять. Состав Основной смеси приведен в Таблице 10.

Если необходимо осуществить **контроль загрязнения**, получите Основную смесь без раствора ДНК и с помощью пипетки перенесите 10 мкл этой смеси в контроль загрязнения. Впоследствии добавьте раствор ДНК и распределите Основную смесь по предварительно внесенным реакционным смесям.

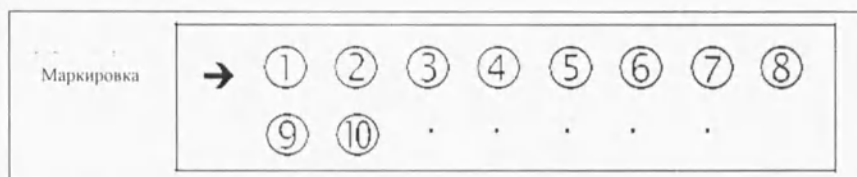
Таблица 10. Состав Основной смеси:

Число смесей	Дист. вода	10 буферов ПЦР	Раствор ДНК (25 - 40 нг/мл)	Taq Полимераза (5 Ед/мкл)	Общий объем. мкл
8	69	10	20	0,8	100

Количество ДНК должно составлять 50-80 нг на смесь. Для различных концентраций ДНК, количество ДНК и воды должно отличаться.

(например: 20 мкл раствора ДНК (20 нг/мкл) и 69 мкл дистиллированной воды; 10 мкл раствора ДНК (50 нг/мкл) и 79 мкл дистиллированной воды).

3. После перемешивания немедленно добавьте 10 мкл этой смеси к предварительно внесенным и высушенным реакционным смесям.



Меняйте наконечник после каждого использования пипетки. Плотнo закройте пробирки соответствующими крышками. Не касайтесь внутренней поверхности крышек и верхних краёв пробирок пальцами, чтобы избежать заражения. Если используются амплификаторы с плотной крышкой, то можно также использовать ПЦР маты многократного использования. Слегка потрясите планшет, чтобы растворить синий шарик на дне планшета. Весь раствор ПЦР должен осесть на дне.

4. Поместите реакционные пробирки в термоциклер и закройте посильнее крышку, чтобы реакционные сосуды не деформировались при нагреве. Запустите программу ПЦР. Если используется крышка с подогревом и возможностью регулировки, то заливка реакционных смесей минеральным маслом не требуется!

Параметры амплификации:

Типы циклеров:

PTC 100/200 (MJ Research / BioRad), GeneAmp PCR-System 9600/9700 (используйте скорость нагрева 9600) (ABI) и Mastercycler epGradient S (Eppendorf)

Таблица 11.

Программа - Этап	Температура, °C	Время	Число циклов
------------------	-----------------	-------	--------------

Программа - Этап	Температура, °C	Время	Число циклов
Первая денатурация	96	5 минут	1 цикл
Денатурация	96	20 секунд	5 циклов
Отжиг+Элонгация	68	60 секунд	
Денатурация	96	20 секунд	10 циклов
Отжиг	64	50 секунд	
Элонгация	72	45 секунд	
Денатурация	96	20 секунд	15 циклов
Отжиг	61	50 секунд	
Элонгация	72	45 секунд	
Заключительная элонгация	72	5 минут	1 цикл

При использовании термоциклеров с очень высокой скоростью нагрева и охлаждения рекомендуется использовать более низкую скорость нагрева и охлаждения.

Так как амплификаторы различных производителей имеют разные рабочие характеристики, и даже устройства одного типа могут быть откалиброваны по-разному, может возникнуть необходимость в оптимизации параметров амплификации.

Чтобы оптимизировать работу вашего устройства, воспользуйтесь следующими принципами:

Ложноположительные реакции (неспецифичные полосы, дополнительные типы): Увеличить температуру отжига с шагом 1°C.

Ложноотрицательные реакции (отсутствие полос): Снизить температуру отжига с шагом 1°C и/или увеличить период отжига с шагом 5 секунд и/или увеличить периоды денатурации с шагом 5 секунд.

Рекомендуется использовать только те амплификаторы, которые регулярно проходят калибровку. Для этого с успехом можно использовать набор BAG-Cycler Check (Номер по каталогу: 7104).

Тесты в рамках контроля качества были выполнены на PTC-200 - 100 (MJ Research), 9700 (ABI) и Mastercycler epGradient S (Eppendorf).

6.7.3 Электрофорез в геле

Разделение продуктов амплификации осуществляется с помощью электрофореза через (горизонтальный) агарозный гель. В качестве буфера для электрофореза мы рекомендуем использовать 0.5 x TBE (45 ммоль трис, 45 ммоль борной кислоты, 0.5 ммоль ЭДТА). Концентрация геля должна составить 2.0 – 2.5% агарозы. Перед загрузкой образца дайте гелю полимеризоваться, по крайней мере, в течение 30 минут. После того, как амплификация будет завершена, возьмите образцы из термоциклера и загрузите реакционные смеси в полном объеме в каждую ячейку геля. Кроме того, добавьте 10 мкл стандарта длины ДНК для сравнения размера. Электрофоретическое разделение осуществляется при 10-12 В/см (при расстоянии между электродами 20 см и приблизительно 200-240 В), в течение 20-40 минут. После завершения

процедуры весь гель окрашивается раствором бромистого этидия (EtBr) (приблизительно 0.5 мкг/мл Бромистого этидия в H₂O или буфере TBE) в течение 30-45 минут. В качестве альтернативы EtBr (0.5 мкг/мл) можно также добавить в буфер для электрофореза или агарозный гель. Если потребуется, избыток EtBr можно удалить, замочив гель в H₂O или 0.5 x TBE буфере на 20-30 минут.

6.7.4 Регистрация и интерпретация результатов

С целью регистрации визуализируйте ПЦР амплификацию, используя ультрафиолетовый трансиллюминатор (220-310 нм), и сфотографируйте её, используя соответствующую камеру, пленки и фильтры (например, Polaroid, тип пленки 667). Выберите выдержку и диафрагму, чтобы полосы выглядели четкими и выделялись на темном фоне (примерная диафрагма 11, время выдержки 1 секунда).

Для интерпретации воспользуйтесь таблицей специфичности и диаграммой оценки (см. дополнительный лист); положительными следует считать только те полосы, которые имеют правильный размер по сравнению со стандартом длины ДНК. Правильные размеры приведены в таблице соответствующей диаграммы. На всех дорожках без аллель-специфичной амплификации, должен быть хорошо виден внутренний контроль 1070 bp. В большинстве случаев при наличии аллель-специфичной амплификации, внутренний контроль слабо выражен или полностью исчезает! При получении неверных результатов обратитесь к разделу «Поиск и устранение неисправностей».

В контроле загрязнения не должно быть видимых полос. Если имеет место загрязнение геномной ДНК, будет иметь место полоса на 282 bp. Дополнительные полосы могут встречаться на 78 bp, 104 bp, 176 bp и приблизительно 580 bp. Если имеет место загрязнение амплификатами, то полосы появятся на 78 bp и/или 104 bp и/или 282 bp.

7. ПОИСК И УСТРАНЕНИЕ НЕИСПРАВНОСТЕЙ

Признак	Возможная проблема(ы)	Потенциальное решение(я)
Неисправность прибора	Множество	См. руководство к MR.SPOT
Сообщение об ошибке при передаче данных	Ошибка передачи данных	Передайте данные вручную через привод USB
Нет результата	Ошибка при формировании изображения по сетке	Выполните разделение вручную
Нет пятен в лунке	Ошибка при добавлении мастер-микса к ПЦР	Повторите весь анализ и проверьте продукт ПЦР на геле
Положительную реакцию дают только контрольные пятна	Ошибка при добавлении ДНК к ПЦР или ошибка амплификации	Повторите весь анализ и проверьте продукт ПЦР на геле
Никаких результатов / неуверительные результаты из-за слабых сигналов	Ошибка при разбавлении конъюгата или неисправность инструмента для амплификации	Повторите анализ. Проверьте температуру гибридизации на инструменте
отсутствие амплификации, виден стандарт длины	ДНК содержит ингибиторы ПЦР	повторите выделение ДНК, попробуйте разные методы
	слишком высокая / слишком низкая концентрация ДНК	измените концентрацию ДНК, повторите выделение ДНК
	отсутствует фермент или его концентрация слишком низкая	повторите типирование, измените концентрацию фермента
	ДНК из гепаринизированной крови	повторите типирование, используя кровь, обработанную этилендиаминтетрауксусной

Признак	Возможная проблема(ы)	Потенциальное решение(я)
		кислотой или цитратом
	неверные параметры амплификации	оптимизируйте параметры амплификации
повторный дефект в отдельных дорожках (нет контроля амплификации)	течь в реакционных пробирках; потеря воды и изменение концентрации в ходе ПЦР	плотно закройте пробирки крышками; возьмите другие реакционные пробирки
неспецифическая амплификация, дополнительные полосы, (дополнительные полосы несоответствующего размера следует отбрасывать)	загрязнение продуктами амплификации	повторите типирование, гарантируйте точность исполнения
	ДНК загрязнена солями	повторите выделение ДНК, попробуйте разные методы
	слишком высокая концентрация ДНК	возьмите меньшее количество ДНК
	слишком высокая концентрация фермента	возьмите меньшее количество фермента
	неверные параметры амплификации	оптимизируйте параметры амплификации
при оценке выявлено более 2 специфичностей	загрязнение при переносе (продукты амплификации!) новая аллель	проверьте смеси для типирования (ДНК не добавлена) гарантируйте точность исполнения
полосы не видны или видны только очень светлые полосы, стандарт длины не виден	слишком слабое окрашивание EtBr (бромистым этидием)	повторите окрашивание
слишком яркое фоновое свечение геля	слишком длительное окрашивание, слишком высокая концентрация EtBr (бромистого этидия)	замочите гель в H ₂ O или в TBE (трис-борат-ЭДТА буфере) снизьте концентрацию EtBr (бромистого этидия)
размытая полоса	слишком горячий буфер для электрофореза неправильный буфер для электрофореза	понижьте напряжение воспользуйтесь буфером 0,5xTBE

