

8

«УТВЕРЖДАЮ»

Генеральный директор
ЗАО «Северо-Западная
медицинская база»



С.В. Калинин

Инструкция пользователя
изделия медицинского назначения
«Реагенты для HLA-генотипирования»

1. Описание изделия

Основной материал для типирования в наборах - очищенная ДНК. Процедура анализа осуществляется с помощью ПЦР с использованием Праймеров, обладающих специфичностью к последовательности (SSP)⁽¹⁾ (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.



Точное соответствие - амплификация (специфическая аллель) Несовпадение – нет амплификации (неспецифическая аллель)

Рисунок 1. Принцип SSP-ПЦР

Состав отдельных смесей праймеров позволяет осуществлять четкую идентификацию типов HLA, указанных на соответствующих диаграммах оценки. При каждом типировании используется некоторое количество (4, 8, 24, 32, 48 или 96) **аликвотных и высушенных** реакционных смесей, включая внутренний контроль амплификации с конечным объемом 10 мкл.

2. Комплектация

1. Histo type A low Реагент для HLA-генотипирования Гисто тайп А низкое разрешение
2. Histo type B low Реагент для HLA-генотипирования Гисто тайп В низкое разрешение
3. Histo type B27 low Реагент для HLA-генотипирования Гисто тайп B27 низкое разрешение
4. Histo type B57 low Реагент для HLA-генотипирования Гисто тайп B57 низкое разрешение
5. Histo type C low Реагент для HLA-генотипирования Гисто тайп С низкое разрешение
6. Histo type DR low Реагент для HLA-генотипирования Гисто тайп DR низкое разрешение
7. Histo type DRB3/4/5 low Реагент для HLA-генотипирования Гисто тайп DRB3/4/5 низкое разрешение
8. Histo type DQB low Реагент для HLA-генотипирования Гисто тайп DQB низкое разрешение

9. Histo type ABC low Реагент для HLA-генотипирования Гисто тайп ABC низкое разрешение
10. Histo type ABDR low Реагент для HLA-генотипирования Гисто тайп ABDR низкое разрешение
11. Histo type DR/DQB low Реагент для HLA-генотипирования Гисто тайп DR/DQB низкое разрешение
12. Histo type Celiac Disease low Реагент для HLA-генотипирования Гисто тайп Целиакия низкое разрешение
13. Histo type DRB1*01 high Реагент для HLA-генотипирования Гисто тайп DRB1*01 высокое разрешение
14. Histo type DRB1*03 high Реагент для HLA-генотипирования Гисто тайп DRB1*03 высокое разрешение
15. Histo type DRB1*04 Реагент для HLA-генотипирования Гисто тайп DRB1*04 высокое разрешение
16. Histo type DRB1*07/09 high Реагент для HLA-генотипирования Гисто тайп DRB1*07/09 высокое разрешение
17. Histo type DRB1*08/12 high Реагент для HLA-генотипирования Гисто тайп DRB1*08/12 высокое разрешение
18. Histo type DRB1*11 high Реагент для HLA-генотипирования Гисто тайп DRB1*11 высокое разрешение
19. Histo type DRB1*13 high Реагент для HLA-генотипирования Гисто тайп DRB1*13 высокое разрешение
20. Histo type DRB1*14 high Реагент для HLA-генотипирования Гисто тайп DRB1*14 высокое разрешение
21. Histo type DRB1*15 high Реагент для HLA-генотипирования Гисто тайп DRB1*15 высокое разрешение
22. Histo type DRB1*16 high Реагент для HLA-генотипирования Гисто тайп DRB1*16 высокое разрешение
23. Histo type B27 high Реагент для HLA-генотипирования Гисто тайп B27 высокое разрешение
24. HPA-type Реагент для HLA-генотипирования тромбоцитов HPA-тайп
25. Extra Gene Реагент для HLA-генотипирования Экстра Джен

3. Материал

3.1 Состав наборов

- 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 для 20 типирований
- Крышки полосок или ПЦР фольга для 20 типирований
- Руководство по эксплуатации, таблица специфичности, схема оценки и рабочий бланк

3.2 Требования и дополнительный материал

- Taq Полимераза (5 Ед/мкл)
- Набор **EXTRA-GENE** для выделения ДНК из крови / лимфоцитов / лейкоцитов или материал для других методов выделения ДНК
- поршневые пипетки (0,5-250 мкл)
- стерильные наконечники со встроенными фильтрами
- ДНК Амплификатор (например, PTC 200 с нагреваемой и регулируемой крышкой, MJ Research/BioRad)

Устройства и материал для электрофореза в геле

- ДНК агароза
- 0.5 x буфер TBE (45 ммоль трис, 45 ммоль борной кислоты, 0,5 ммоль этилендиаминтетрауксусной кислоты)
- бромистый этидий (EtBr)
- блок для электрофореза submarine
- электропитание (200-300 В, 200 мА)
- стандарт длины ДНК

Устройства для интерпретации и регистрации

- источник УФ излучения (220-310 нм)
- камера (например, Polaroid) с пленками (тип Polaroid 667)

3.3 Хранение и стабильность

Набор поставляется замороженным. Храните все реактивы при температуре - 20 ... - 80°C в темном месте. Срок годности указан на ярлыке каждого реактива, он действителен также и для открытых реактивов. Срок годности, указанный на внешнем ярлыке, относится к реактиву с самой низкой стабильностью, находящемуся в наборе. Разморозьте 10 x ПЦР-буфер непосредственно перед использованием.

4. Рабочие характеристики

Аналитическая чувствительность: Гарантируется надежное типирование при использовании 50-80 нг ДНК на реакционную смесь.

Диагностическая специфичность: Состав смеси праймера гарантирует надежную идентификацию HLA-типов (основанную на данных последней последовательности), указанных на диаграмме оценки. Будет производиться регулярное обновление.

Для каждой партии специфичность каждой смеси праймера была проверена с использованием ДНК по контрольным образцам: каждая ПЦР реакция прошла, по крайней мере, однократную положительную проверку. Аллели, которые не включены и по причине их редкости, не прошли соответствующую проверку, показаны на диаграмме оценки или в таблице специфичности.

Оценка рабочих характеристик производилась для всех наборов, по крайней мере, с 50 образцами ДНК. Сравнение результатов анализа с другими типированиями, выполненными с SSP комплектами другого поставщика, не выявило никаких несоответствий.

5. Процедура анализа

5.1 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 EFl, 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 постаплификации (электрофорез в геле, регистрация). Лучше это делать в двух отдельных помещениях.
- Используйте устройства и другие материалы только в соответствующих местах и не меняйте их.

5.2 Выделение ДНК

Для HLA-SSP типирования одного пациента требуется 5-10 мкг ДНК (что соответствует приблизительно 0.5 мл крови). Например, набор 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, 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 индекс чистоты (коэффициент экстинкции OD_{260}/OD_{280}) между 1.5 и 2.0.

5.3 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 SSP работают с одной Основной смесью, поэтому их можно объединять. Состав основной смеси в зависимости от числа реакционных смесей приведен в Таблице 1 (стр.6).

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 1. Состав Основной смеси в зависимости от числа реакционных смесей:

Число смесей	Дист. вода	Буфер 10 х ПЦР	Раствор ДНК (50-80 нг/мкл)	Тақ-полимер аза (5 Ед/мкл)	Общий объем	
1	8	1	1	0.08	10	мкл
4	63	8	8	0,6	80	мкл
8	79	10	10	0.8	100	мкл
16	151	19	19	1.5	190	мкл
24	222	28	28	2.2	280	мкл
30	269	34	34	2.7	340	мкл
32	285	36	36	2.9	360	мкл
48	412	52	52	4.2	520	мкл
54	459	58	58	4.6	580	мкл
56	475	60	60	4.8	600	мкл
72	618	78	78	6.2	780	мкл
80	681	86	86	6.9	860	мкл
96	808	102	102	8.2	1020	мкл

- 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)

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	1 минута	
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 BAC-Cycler Check (Номер по каталогу: 7104).

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

5.4 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.

5.5 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» (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. Предупреждения и предосторожности

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 биологическим материалом следует придерживаться некоторых правил безопасности (не засасывайте материал в пипетку ртом; используйте одноразовые перчатки при работе с биологическим материалом и при проведении анализа; по окончании теста продезинфицируйте руки).

Перед утилизацией биологический материал следует инактивировать (например, в автоклаве). Расходные материалы следует обработать в автоклаве или сжечь после использования.

Разлив потенциально инфицированных материалов следует немедленно устранить, используя абсорбирующую бумажную салфетку, а загрязненные зоны промыть подходящим стандартным дезинфицирующим средством или 70% спиртом. Материал, используемый для устранения разлива, включая перчатки, перед утилизацией должен быть инактивирован (например, в автоклаве).

7. Поиск и устранение неисправностей

Проблема	Возможная причина	Решение
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 этилендиаминтетрауксус

		ной кислотой или цитратом
	неверные параметры амплификации	оптимизируйте параметры амплификации (см. 4.3) *
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 (см. 4.3) *
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

* При использовании перечисленного оборудования и материалов, оптимизация параметров амплификации является последним средством. В большинстве случаев можно оценить результаты испытания, устранив дополнительные полосы, вызванные несоответствиями в размерах.

рошито,
Пронумеровано,
И скреплено печатью

Количество листов

(десять)

Генеральный директор

ЗАО «СМБ»

/Кали

