



ИНСТРУКЦИЯ

По применению реагентов для HLA- генотипирования локусов DR, A, B методом SSP для "in-vitro" диагностики, в наборах и отдельных упаковках (с Приложением № 1), производства: Olerup SSP AB, Швеция.

Наборы предназначены для ДНК-типирования HLA Класс 1 и Класс 2 аллелей.

I. ОБЩАЯ ИНФОРМАЦИЯ

Наборы предназначены только для использования квалифицированным медицинским персоналом для определения HLA фенотипа. Тестируемый материал – ДНК. Прочитайте полностью эту инструкцию перед использованием.

II. НАЗНАЧЕНИЕ

Лейкоцитарные антигены человека (HLA) обычно использовались в лимфоцитотоксическом тесте. Однако со временем этот метод постепенно замещался методом, основанным на технологии ПЦР и применяющим праймеры, специфические к последовательностям (*Sequence Specific Primers – SSP*).

Каждая смесь праймеров содержит одну или несколько специфических праймерных пар, т. е., аллеле- и/или групп-специфические праймеры, а так же контрольную праймерную пару, соответствующую не-аллельным последовательностям в образцах. Контрольная праймерная пара играет роль внутреннего ПЦР-контроля для проверки эффективности амплификаций.

Постановка аллелей заключается в определении, произошли соответствующие амплификации или нет, т. е., в визуализации и детектировании путём гель-электрофореза. Технология ПЦР-SSP обеспечивает высокий уровень разрешения, поскольку каждая праймерная пара идентифицирует два связанных cis-локализованных полиморфных сайта. Метод обеспечивает высокую чувствительность, специфичность и воспроизводимость.

III. ПРИНЦИП МЕТОДА

Методология SSP использует тот факт, что полностью соответствующий праймер в ходе ПЦР вызывает более эффективную амплификацию, нежели праймеры, имеющие одно или несколько несоответствий на 3'-конце. Специфичность системы типирования обеспечивается на этапе ПЦР-амплификации. Пост-амплификационная обработка образцов сведена к минимуму. После ПЦР амплифицированные фрагменты ДНК становятся хорошо различимыми в агарозном геле благодаря добавлению в гель этидиум бромид и просвечивания изображения при помощи УФ-лампы. Полученный снимок в геле затем интерпретируется. Интерпретация ПЦР-SSP результатов основана на наличии/отсутствии специфических ПЦР-продуктов. Относительные величины специфических ПЦР-продуктов также помогают при интерпретации результатов. ПЦР-SSP методология была изначально охарактеризована О. Олеруп в 1991-92 гг.

Поскольку на процесс ПЦР могут оказывать негативное влияние различные факторы (например, ошибки пипеттирования, слишком низкая концентрация ДНК, низкое качество ДНК, наличие ПЦР-ингибиторов, точность работы термоблокатора), то внутренний контроль (положительная контрольная праймерная пара) включается в каждую ПЦР-реакцию.

IV. СОСТАВ НАБОРА

Компонент	Описание
1. Планшеты для ПЦР с высушенными праймерными смесями	Каждая лунка планшета 0.2 мл содержит высушенную праймерную смесь, состоящую из аллеле- и/или групп-специфичных праймеров и контрольных праймерных пар, соответствующих не-аллельным последовательностям. Кол-во лунок набора-специфическое.
2. Плёнки для ПЦР	Липкие плёнки для герметизации ПЦР-планшета
3. ПЦР Мастер-микс без Taq полимеразы	Готовая к применению буферная смесь, содержащая дезоксинуклеотидфосфаты в рабочей (1X) концентрации и буфер для загрузки в гель. Объем зависит от конкретного набора

4. Инструкции по применению/ Лот-специфическая информация/ Рабочие таблицы	Инструкции по применению набора и буклет с информацией, специфической для данной партии изделия (Lot-Specific Information, Worksheets)
--	--

Планшет полностью готов для добавления образца ДНК, Мастер-микса и воды.

Каждый планшет в наборе низкого разрешения (за исключением наборов локуса DQ низкого разрешения) содержит отрицательную контрольную реакцию, которая детектирует наличие ПЦР-продуктов, генерированных более чем 95% Olerup SSP HLA Class I, DRB, DQB1, DPB1 ампликонами.

Праймеры подобраны таким образом, чтобы ПЦР-амплификация была оптимальной при использовании ПЦР Мастер-микса из набора и рекомендованной программы термоциклера.

V. ОБОРУДОВАНИЕ И РЕАГЕНТЫ

Термоциклер со следующими характеристиками:

Нагревание до 104 °C

Блок для размещения образцов (алюминиевый, серебро, либо серебро с золотым покрытием) для использования 96-луночных

ПЦР планшетов или 0.2 мл тонкостенных пробирок для ПЦР

Скорость вращения по меньшей мере 0.7°C C/сек.

Температура 4.0°C – 99.9°C

Температурная точность $\pm 0.25^\circ\text{C}$ в температурном интервале от 35°C до 99.9°C

Однородность температуры для различных образцов, размещенных в блоке, $\leq 0.75^\circ\text{C}$ при изменении температуры 55°C-95°C

Термоциклер программируется следующим образом:

10 циклов

1 цикл	94°C	2 мин.	денатурация
10 циклов	94°C	10 сек.	денатурация
	65°C	60 сек.	отжиг и расширение
20 циклов	94°C	10 сек.	денатурация
	61°C	50 сек.	отжиг
	72°C	30 сек.	расширение
Завершение-выдержка	комн. температура		если менее 8 часов
	4°C		если более 8 часов

Набор для выделения ДНК

Спектрофотометр

Раскапывающее устройство (мы рекомендуем электронный одноканальный диспенсер, способный откапывать 10 мкл аликвоты в лунки планшета)

Съёмные наконечники для микродозаторов

Полипропиленовые пробирки

Вортекс

Микроцентрифуга

Микроволновая печь или нагревательный блок для разогрева пластин агарозного геля

Агароза для электрофореза, например, Seakem LE

Этидиум бромид, например, 103.301-10

Раскапывающее устройство для загрузки в гель. Рекомендуется 8-канальный дозатор, рассчитанный на шаг 5-25 мкл ДНК ПЦР маркер, например 103.202-100 или маркер для коротких запусков 103.203-100.

Электрофоретическая ячейка

Фотодокументирующая система

Тaq ДНК полимеразы

VI. ПРИГОТОВЛЕНИЕ И ХРАНЕНИЕ РЕАГЕНТОВ

1. Подготовка образцов

Выделить ДНК из образцов любым доступным методом.

Провести амплификацию, используя планшеты из набора, либо храните ДНК до момента типирования

2. Подготовка реагентов/ оборудования

Запрограммировать термоциклер

Подготовьте Таq ДНК полимеразу

Подготовьте гель для электрофореза

Перенесите все реагенты в комнатную температуру

Поместите планшеты с праймерами в ПЦР держатель

Наборы низкого разрешения

Используя ручной одноканальный дозатор, добавьте 8 мкл смеси Мастер-микс-Таq полимеразы-деионизированная вода и 2 мкл деионизированной воды в лунку с отрицательным контролем

Используя ручной одноканальный дозатор, добавьте при комнатной температуре образцы ДНК к оставшейся смеси Мастер-микс-Тaq полимеразы-деионизированная вода (см таблицу для приготовления смеси ниже)

Закройте пробирку и перемешивать 5 секунд

Используя электронный одноканальный дозатор, добавьте 10 мкл смеси в каждую лунку планшета, за исключением лунки с отрицательным контролем.

Наборы высокого разрешения

Используя ручной одноканальный дозатор, добавьте при комнатной температуре образцы ДНК к смеси Мастер-микс-Тaq полимеразы-деионизированная вода (см таблицу для приготовления смеси ниже)

Закройте пробирку и перемешивать 5 секунд

Используя электронный одноканальный дозатор, добавьте 10 мкл смеси в каждую лунку планшета.

Таблица: Объёмы компонентов в расчёте на 1 тест для различного кол-ва лунок в планшете (Мастер-микс без Тaq ДНК полимеразы)

Кол-во лунок на тест	Объём Мастер-микса (мкл)	Объём образца ДНК (мкл)	Объём деионизированной воды (мкл)	Объём Тaq полимеразы (мкл)	Кол-во лунок на тест	Объём Мастер-микса (мкл)	Объём образца ДНК (мкл)	Объём деионизированной воды (мкл)	Объём Тaq полимеразы (мкл)
2	12	8	19.7	0.3	25	87	58	142.7	2.3
3	15	10	24.6	0.4	26	90	60	147.6	2.4
4	18	12	29.5	0.5	27	93	62	152.5	2.5
5	21	14	34.4	0.6	28	96	64	157.4	2.6
6	24	16	39.4	0.6	29	99	66	162.4	2.6
7	27	18	44.2	0.8	30	102	68	167.3	2.7
8	30	20	49.2	0.8	31	105	70	172.2	2.8
9	33	22	54.1	0.9	32	108	72	177.1	2.9
10	36	24	59	1.0	36	126	84	206.6	3.4
11	39	26	63.9	1.1	40	138	92	226.3	3.7
12	42	28	68.9	1.1	44	150	100	246.0	4.0
13	45	30	73.8	1.2	48	162	108	265.7	4.3
14	48	32	78.7	1.3	52	174	116	285.4	4.6
15	51	34	83.6	1.4	56	186	124	305.0	5.0
16	54	36	88.6	1.4	60	198	132	324.7	5.3
17	60	40	98.4	1.6	64	210	140	344.4	5.6
18	63	42	103.3	1.7	68	228	152	373.9	6.1
19	66	44	108.2	1.8	72	240	160	393.6	6.4
20	69	46	113.2	1.8	76	252	168	413.3	6.7
21	72	48	118.1	1.9	80	264	176	433.0	7.0
22	75	50	123	2.0	84	276	184	452.6	7.4
23	78	52	127.9	2.1	88	288	192	472.3	7.7
24	81	54	132.8	2.2	92	300	200	492.0	8.0
					96	312	208	511.7	8.3

Наборы комбинированных локусов A-B-DR, A-B-C, Cw высокого разрешения:

Перемешайте Мастер-микс

Используя ручной одноканальный дозатор, добавьте при комнатной температуре 8.3 мкл Тaq полимеразы и 511.7 мкл деионизированной воды в пробирку объёмом 1.5 мл, содержащую 312 мкл Мастер-микса

Закройте пробирку и перемешивать 5 секунд

Используя ручной одноканальный дозатор, добавьте 8 мкл смеси Мастер-микс-Тaq полимеразы-деионизированная вода и 2 мкл деионизированной воды в лунку с негативным контролем №96, т.е. в лунку с негативной контрольной парой праймеров.

Используя ручной одноканальный дозатор, добавьте 206 мкл образца ДНК к оставшейся смеси Мастер-микс-Тaq полимеразы-деионизированная вода.

Закройте крышкой и перемешивайте 5 секунд.

Используя электронный одноканальный диспенсер, перенесите 10 мкл ПЦР смеси в каждую лунку планшета за исключением лунки с отрицательным контролем №96.

VII. ХРАНЕНИЕ И СТАБИЛЬНОСТЬ РЕАГЕНТОВ

A. Неоткрытые флаконы

Долгосрочное хранение: все реагенты должны храниться при -20°C. Смеси праймеров стабильны при таких условиях хранения в течение 24 месяцев с даты производства.

ПЦР Мастер-микс без Тaq полимеразы при хранении при -20°C стабилен в течение 27 месяцев с даты производства.

Не используйте планшеты с видимыми повреждениями, т.к. это может вызвать испарение реагентов во время ПЦР амплификации. Пеллеты в лунках должны быть красного цвета. Изменение цвета пеллета до жёлтого может означать деградацию смеси праймеров.

Мастер-микс должна быть цветом от красного до фиолетового. Изменение цвета мастер-микса до оранжевого может означать деградацию ПЦР мастер-микса.

В. Открытые флаконы

Все неиспользованные остатки реагентов должны храниться при 2-8 °C.

VIII. СБОР ОБРАЗЦОВ, ПРИГОТОВЛЕНИЕ, ХРАНЕНИЕ И РАЗБАВЛЕНИЕ

А. Сбор образцов и приготовление

Набор предназначен для использования образцов ДНК. Образцы ДНК для проведения ПЦР SSP HLA-типирования должны быть разведены деионизированной водой. Отношение A260/A280 при спектрофотометрии должно быть в интервале 1.6-2.0 для оптимальной визуализации продуктов во время гель-электрофореза.

Рекомендуется автоматическое выделение ДНК из гепаринизированной крови, либо любой другой метод выделения, дающий ДНК с хорошей степенью очистки (в этом случае не используйте гепаринизированную кровь). При использовании ручного выделения ДНК концентрация ДНК должна быть доведена до 30 нг/мкл.

ВНИМАНИЕ:

Рекомендуемая концентрация ДНК для использования с наборами

15 нг/мкл (при автоматическом выделении)

30 нг/мкл (при альтернативных методах выделения)

Концентрации ДНК свыше 50 нг/мкл увеличивают риск неспецифических амплификаций и слабо проявленных продуктов, особенно для HLA Класс 1 высокоразрешающих SSP типирований.

Образцы ДНК должны быть разведены в растворах, содержащих хелаты, такие как ЭДТА, свыше 0.5 mM.

Собирать образцы необходимо в асепригенные пробирки.

В. Хранение

Образцы сыворотки необходимо хранить при 4°C после сбора в течение максимум 2 недель. Если анализ не предполагается провести в течение 2 недель, то образцы следует заморозить и хранить при -20°C и ниже в течение времени до 9 месяцев. Чистоту и концентрацию выделенных образцов ДНК, если они хранились длительное время, необходимо проверить перед проведением HLA-типирования.

IX. ПРОЦЕДУРА

Для получения достоверных результатов необходимо следовать рекомендациям настоящей инструкции.

А. Замечания по выполнению анализа

ПЦР SSP процесс высоко чувствителен к условиям проведения, от этого зависит качество амплификации. Поэтому следует строго придерживаться рекомендаций инструкции.

Образцы ДНК для проведения ПЦР SSP HLA-типирования должны быть разведены деионизированной водой. Отношение A260/A280 при спектрофотометрии должно быть в интервале 1.6-2.0 для оптимальной визуализации продуктов во время гель-электрофореза.

Все приборы, а именно, термоциклёр, раскапывающие устройства должны быть правильно калиброваны в соответствии с рекомендациями производителей.

Вся необходимая лот-специфическая информация, необходимая для интерпретации результатов, приложена к наборам.

Не используйте реагенты с истекшим сроком хранения

Не смешивайте разные лоты и реагенты из разных лотов.

В. Процедура анализа

1. Накройте ПЦР планшеты липкими плёнками. Проверьте, что все реакционные лунки закрыты плёнкой (во избежание испарения во время амплификации).

2. Поместите планшет в термоциклёр. Не допускайте между временного промежутка свыше 5 минут между постановкой ПЦР и помещением планшета в термоциклёр.

3. Обозначьте реакционный объём в 10 мкл.

4. Поставьте ПЦР. Это занимает примерно 1 час 20 мин.

5. Удалите планшет из термоциклера. Осмотрите его, убедитесь, что в каждой лунке планшета содержится примерно одинаковое кол-во жидкости.

6. Проведите электрофорез.

7. Интерпретируйте результаты при помощи Лот-специфической информации, Рабочих таблиц, приложенных к набору.

X. КОНТРОЛЬ КАЧЕСТВА

- Отрицательный контроль должен быть включён в каждую постановку ПЦР. Лунка для отрицательного контроля имеется в наборах реагентов HLA-A, HLA-B, HLA-C, HLA-DR низкого разрешения и в наборах комбинированных локусов A-B-DR, A-B-C, DQ-DR.

- Пулы сыворотки или гепаринизированной плазмы, а также супернатанты стимулированных клеточных культур, немедленно собранные в аликвоты и замороженные, могут использоваться в качестве контролей. Повторное замораживание-размораживание не допускаются.

- Ведение записей: хорошим лабораторным правилом считается запись серии набора и даты растворения (разбавления) используемых реагентов.

- Контроли: рекомендуется использовать контроли рутинно при каждой постановке для оценки вариабельности анализа.

Рекомендуется вести контрольные карты качества для отслеживания характеристик наборов. Контрольные диапазоны указаны на этикетках флаконов. Результаты вне контрольного диапазона означают, что анализ необходимо повторить.

Повторное измерение образцов также может быть использовано для оценки межсерийной воспроизводимости.

Образцы: строго следуйте инструкции пользователя при сборе и хранении образцов. Всегда используйте одноразовые наконечники для исключения контаминации остатками реагентов.

XI. ДИАПАЗОН ОЖИДАЕМЫХ ЗНАЧЕНИЙ

Внимательно рассмотрите изображение геля и определите положительные треки.

Каждая дорожка геля, содержащая загруженный образец, должна иметь контрольную полосу, кроме дорожки, содержащей контроль на контаминацию.

В случае присутствия специфического продукта контрольная полоса иногда может, а иногда не может быть эффективно амплифицирована из-за субстратной конкуренции. Контрольные праймеры присутствуют в более низкой концентрации, для того, чтобы преобладала аллель-специфичная реакция.

Слабые полосы над внутренним контролем (кроме внутреннего контроля размером 200 п.о.) могут появиться в некоторых дорожках. Это не очень важно. Они являются индикаторами очень хорошей амплификации.

Отсутствие контрольных полос и специфической амплификации является индикатором того, что амплификация не произошла.

Если аллели могут быть определены в присутствии произошедшей амплификации, и произошедшая амплификация не нарушила определение аллелей, нет необходимости повторять тест.

Если, однако, присутствует видимый гомозиготный результат или пропущенная реакция могла изменить определение аллелей, типирование необходимо повторить.

Если присутствуют слабые полосы или продукты неверных размеров, не учитывайте их, если общая чистота и сила амплификации хороша.

Неиспользованные праймеры образуют диффундирующее пятно, бегущее ниже 50 п. о.

Над пятном праймеров может появиться димер праймеров, но он будет расположен ниже области расположения специфического продукта, в области 80 п.о.

Некоторые дорожки могут иметь два или более возможных размеров ПЦР продуктов. Эти лунки имеют мультиплексные праймерные пары, из которых образуются различные ампликоны, в зависимости от присутствующих аллелей. Обратитесь к таблице специфичности праймерных смесей, для того чтобы получить информацию по определению аллелей.

Для получения деталей по разрешению смотрите таблицу специфичности праймерных смесей.

Неверные отрицательные реакции могут быть вызваны неэффективной амплификацией, малым количеством ДНК, неверным размещением плашки в блоке, различием температур между блоками самого термоциклера или неверной калибровкой термоциклера.

Неверные отрицательные реакции редко возникают когда присутствует контрольная полоса.

Возможно, что неверные отрицательные реакции являются следствием новой или еще не охарактеризованной аллели.

Лунка с контролем на контаминацию содержит пары праймеров, которые амплифицируют ДНК, которая образовалась вследствие специфической ПЦР амплификации, или геномную ДНК.

Если смесь буфер/ Taq полимеразы была добавлена правильно, любая полоса в этой дорожке является свидетельством контаминации и результаты тестов являются недействительными.

Полоса димера праймеров <80 п.о. может присутствовать. Это не влияет на действительность теста.

Вычислите приблизительный размер продукта, используя форму документации геля или рабочий лист.

Отметьте положительные дорожки на рабочем листе.

Используя подчеркивающую ручку, подчеркните каждую положительную дорожку (колонку) вертикальной линией, проходящей через колонки схемы сверху вниз.

Выводите линейку с первым рядом рабочего листа и сканируйте слева на право. Изучите каждый ряд сверху донизу, маркируя определение первой аллели только там, где все черные ячейки для данного выбора аллелей соответствуют подчеркнутым дорожкам.

Определите выбор второй аллели, если необходимо, продолжая сканировать оставшиеся аллели, как описано выше. Убедитесь, что вы закончили полное ревьюирование рабочего листа. Для того, чтобы определить все возможные определения аллелей, вам необходимо посчитать все положительные дорожки по крайней мере один раз. Однако дорожки могут быть использованы для определения более одной аллели.

РАЗРЕШЕНИЕ НЕОДНОЗНАЧНОСТЕЙ

Проблема	Вероятная причина	Рекомендуемое решение
Амплификация отсутствует (как специфическая, так и для внутреннего контроля)	Количество ДНК недостаточно	Проверьте, чтобы объём и концентрации были правильными

	Образец ДНК содержит ингибиторы ПЦР, в частности – белки, этанол (оставшиеся от этапа преципитации)	Исследуйте качество образца ДНК. A260/A280 при спектрофотометрии до интервале 1.6-2.0 для оптимальной продуктов во время гель-электрофорез следуйте указаниям методики получения Д. Попробуйте применить альтернативный м ДНК. Выделите новый образец ДНК.
	Для получения ДНК была использована гепаринизированная кровь.	Используйте кровь с иным видом антико это затруднительно, попробуйте провол образца гепариной
	ДНК разведена буфером, содержащим ЭДТА	Повторите экстракцию ДНК и разводите в воде.
Неудачная амплификация в некоторых лунках.	Крышки пробирок/ плёнки планшет, в которых проводится ПЦР, закрыты неплотно, что приводит к испарению и, как следствие, неудачной амплификации.	Прижимайте крышки/ плёнки плотно. Г этого специальный инструмент, напри Compression Pad 103.505-06 для того, испарения во время работы термоциклера.
	При внесении в гелевые лунки произошла какая-то ошибка. В некоторые лунки попало по две амплифицированных ПЦР-смеси.	Проверьте, что у Вас загружено правиль гелевых лунок. Каждая лунка должна соде одинаковое количество ПЦР-смеси.
	Пипеточные дозаторы неисправны или неправильно откалиброваны.	Проверьте и откалибруйте инструменты в инструкциями производителя.
	Ошибки пипеттирования.	Проводите дозирование с большей аккурат
	Образец ДНК, Taq-полимераза или ПЦР-смеси были перед применением недостаточно перемешаны.	Перед внесением перечисленные жид кратковременно встряхивать на вортексе.
Бледные полосы внутреннего контроля	Загрязнение образца ДНК.	Оцените чистоту выделенной ДНК A260/A280 при спектрофотометрии до интервале 1.6-2.0 для оптимальной продуктов во время гель-электрофореза. экстракцию заново, приготовив для реактивы. Мы рекомендуем автоматичес ДНК при помощи QIAGEN EZ1 DSP DNA
	Низкая концентрация ДНК.	Измерьте концентрацию ДНК и доведите или 15 нг/мкл для ДНК, выделенной QIAGEN EZ1 DSP DNA Blood System.
	Слишком высокая температура отжига. Термоциклер не откалиброван.	Проверьте программу. Откалибруйте те ПЦР-SSP это следует делать не реже одн месяцев.
	ПЦР Мастер-микс хранился при +4°C более 2 недель	Храните ПЦР Мастер-микс в ре производителем условиях
Неспецифическая амплификация (пятна или штрихи на треках).	Избыточная концентрация образца ДНК	Измерьте концентрацию ДНК и доведите или 15 нг/мкл для ДНК, выделенной QIAGEN EZ1 DSP DNA Blood System.
	Загрязнённый образец ДНК (некоторые праймерные смеси особенно требовательны к чистоте ДНК)	Все полосы размера больше внутреннего к игнорировать при интерпретации получен Проверьте качество ДНК. Проведите повторное выделение ДНК. Полное отсутствие ДНК тоже может штриховым картина на треке.
Яркость амплификационных полос от постановки к постановке ухудшается.	Раствор для окраски геля на основе этидия бромид состарился.	Приготовьте новую порцию окрашивающе
	Одна из УФ ламп трансиллюминатора вышла из строя.	Проверьте УФ-осветитель.
	Использование слишком низкой концентрации ДНК	Измерьте концентрацию ДНК и доведите или 15 нг/мкл для ДНК, выделенной QIAGEN EZ1 DSP DNA Blood System.
	Слишком высокая температура отжига. Термоциклер не откалиброван.	Проверьте программу. Откалибруйте те ПЦР-SSP это следует делать не реже полгода.

Ложноотрицательная амплификация.	Термоциклер не откалиброван	Проверьте программу. Откалибруйте терм. ПЦР-SSP это следует делать не реже один раз в месяц.
	Неверная интерпретация артефакта как специфической полосы	Сверьтесь с таблицей интерпретации таблицами
Ложноположительная амплификация.	Контаминация ДНК	Используйте перчатки, наконечники для фильтров, проводите операции в хороших зонах пре-амплификации и пост-ампл. пренебрегайте культурой проведения исследования на предмет контаминации праймеры контроля контаминации
	Избыточная концентрация образца ДНК	Измерьте концентрацию ДНК и доведите до 15 нг/мкл для ДНК, выделенной QIAGEN EZ1 DSP DNA Blood System.
	Загрязнение образца ДНК.	Оцените чистоту выделенной ДНК. экстракцию заново, приготовив для реактивы.
	Слишком низкая температура отжига. Термоциклер не откалиброван.	Проверьте программу. Откалибруйте терм. ПЦР-SSP это следует делать не реже раз в полгода.
	Слишком большой промежуток времени между постановкой ПЦР и началом термоциклирования	Промежуток должен составлять не более 5 минут
	Слишком большой промежуток времени между размещением планшетов в термоциклёр и началом его работы	Используйте предварительно нагретый терм. блок
Необычная картина треков.	Применяется неподходящая таблица интерпретации	Проверьте, чтобы номер серии набора совпадал с номером серии таблицы интерпретации.
	Трек содержит ложнопозитивный результат.	Проверьте правильность размеров специфической амплификации. Проверьте ложнопозитивная полоса появилась в результате или не образована ли она димером праймера
	Новый аллель, не отражённый таблицей интерпретации.	Повторите типирование. Если не воспроизводится, обратитесь к производителю за информацией об образцах амплификации описанных аллелей.
Слаборазличимые полосы в пятнах.	Возможно, электрофорезный буфер перегрелся.	Применяйте рекомендованный буфер и напряжение разгонки.
	Лунки в геле чрезмерно широкие.	Применяйте гребёнку с более тонкими зубцами
Ампликон разгоняется по треку неровно	Для приготовления геля и для разгонки использованы буферы разной ионной силы. Разгоночный буфер несовместим с ПЦР-ампликоном. Пузырьки в наконечнике пипетки.	Для плавления агарозы при приготовлении рекомендуется брать тот же раствор, что использован в качестве разгоночного. Рекомендуется 0,5X TBE.

XII. ХАРАКТЕРИСТИКИ АНАЛИЗА

Было проведено сравнительное исследование наборов Olerup SSP HLA Typing Kits с полимеразой и без неё в ПЦР Мастер-миксе. Целью данного исследования было показать, что ручное добавление полимеразы и добавление полимеразы других лотов не оказывает влияния на результаты. В исследовании использовались наборы низкого разрешения HLA-A, -B (Класс 1) и HLA-DRB (Класс 2), протипировано было 15 образцов ДНК с известным генотипом. Образцы были подготовлены и закодированы персоналом, отличающимся от персонала, проводящего исследование. Т.е. исследование было слепым. Каждый образец был протестирован параллельно с тестированием набором Olerup SSP HLA-A-B-DR с ПЦР Мастер-миксом без полимеразы (контрольная группа). Тестирование было проведено в лаборатории производителя Olerup SPP AB Laboratory в Saltsjobaden, Швеция с использованием набора одного лота и полимеразы 2-х лотов. Полимераза использовалась производства Roche GMP Grade. Тестирование каждого образца состояло из низкоразрешающего типирования набором Olerup HLA-A-B-DR с

- 1) ПЦР Мастер-миксом с полимеразой (контрольное исследование)
- 2) ПЦР Мастер-миксом с полимеразой Roche GMP Grade, лот №2.

После постановки ПЦР детекция проводилась в гель-электрофорезе.

Сравнение	Класс 1 результаты типирования (совпадение/общее кол-во)		Класс 2 результаты типирования (совпадение/общее кол-во)	% согласия (95% доверительный интервал)а*
*	HLA-A	HLA-B	HLA-DRB	
Тест Лот№1/ Контрольный лот	15/15	15/15	15/15	100% (84.7-100.0%)
Тест Лот№1/ Консенсус b*	15/15	15/15	15/15	100% (84.7-100.0%)
Тест Лот№2/ Контрольный лот	15/15	15/15	15/15	100% (84.7-100.0%)
Тест Лот№2/ Консенсус	15/15	15/15	15/15	100% (84.7-100.0%)
Тест Лот№1/ •Лот№2	15/15	15/15	15/15	100% (84.7-100.0%)

а* - метод суммарной оценки

б* - по данным международного рабочего совещания по антигенам гистосовместимости (International Histocompatibility Workshop Collection)

ХIII. ПРЕДОСТЕРЕЖЕНИЯ

Реагенты предназначены для использования in vitro.

Данные реагенты не должны использоваться как единственный базис для принятия клинического решения.

Этидиум бромид, используемый для подкрашивания ДНК в агарозном геле, является канцерогеном. Обращайтесь с ним с осторожностью.

ВНИМАНИЕ: ПОТЕНЦИАЛЬНО БИОЛОГИЧЕСКИ ОПАСНЫЙ МАТЕРИАЛ!

Все компоненты крови и биологические материалы могут быть потенциально опасны. Так как не существует метода, дающего полную гарантию отсутствия каких-либо инфекционных агентов, то с образцами крови надо обращаться как с потенциально инфекционно опасным материалом.

Внимание: Надевайте специальные защитные очки при работе с источником УФ-света, так как его воздействие очень вредно для глаз.

Микродозаторы и другое оборудование, используемые в пост-ПЦР помещении, не должны применяться в пре-ПЦР помещении.

Информация для заказа

119899, Москва, Ленинские горы,

ЗАО "БиоХимМак"

тел. (095) 939-24-21, факс (095) 939-09-97

info@biochemmack.ru

«СОГЛАСОВАНО»

Зав. Кафедрой клинической

Лабораторной диагностики ГОУ ДПО

«РМАПО Росздрава»

д.м.н., профессор Долгов В.В.

«___» _____ 2011г.



Всего прошито

и пронумеровано

Вместе

Генеральный Директор

ЗАО "БиоХимМак"

Тамм Н.Е.



Тамм