



«УТВЕРЖДАЮ»

Генеральный Директор

«БиохимМак»

Тамм Н.Е.

ИНСТРУКЦИЯ ПО ПРИМЕНЕНИЮ

Набор реагентов для HLA генотипирования для «in - vitro» диагностики иммунофлуоресцентным методом производства «Gen-Probe Transplant Diagnostics, Inc.», (Ген-Проб Трансплант Диагностикс, Инк.), США), в различных вариантах исполнения.

Инструкция по применению

LIFECODES HLA-SSO Typing Kits

Назначение

Данный тест предназначен для типирования ДНК и обеспечивает результаты HLA-типирования с разрешением от низкого к среднему. Тест выполняется при помощи анализатора LumineX

Введение

Локус HLA главного комплекса гистосовместимости человека, локализованный на коротком плече 6-й хромосомы [1, 2], кодирует два отдельных класса высоко полиморфных поверхностных клеточных молекул, которые связывают процессированные антигены в форме пептидов и презентуют их Т-лимфоцитам. В запуске как гуморального, так и клеточного иммунного ответа этап презентации является критическим событием. Следовательно, эти молекулы играют центральную роль в регуляции иммунной системы [3, 4], в трансплантационной биологии [5-7], а также восприимчивости к ряду заболеваний, включая аутоиммунные нарушения [8, 9] и некоторые опухоли [10]. Химически эти поверхностные молекулы являются гликопротеинами. Они связывают процессированные производные эндогенных белков (в частности, протеинов вирусов или опухолевых клеток) и презентуют их CD8⁺ Т-клеткам. Это гетеродимеры, состоящие из HLA-кодируемой альфа-цепи, ассоциированной с полипептидом β 2-микроглобулином. В то время как β 2-микроглобулин мономорфен, гены альфа-цепи чрезвычайно полиморфны. Их вариабельные фрагменты локализованы преимущественно на экзонах 2 и 3 [11], которые кодируют экстрацеллюлярные домены, оканчивающиеся аминокислотной группой и функционирующие как сайты связывания пептидов. Внутри этих двух экзонов полиморфизм концентрируется в дискретных кластерах, лежащих в относительно защищённых структурных областях. Анализ кристаллических структур HLA класса I показывает, что эти полиморфные участки образуют пептид-связывающую впадину и непосредственно взаимодействуют с пептидом и Т-клеточным рецептором [12-15].

Принципы метода

В основе теста лежат три основных процесса: ПЦР-амплификация [16, 17], гибридизация амплифицированных продуктов с матрицей иммобилизованных олигонуклеотидных зондов, специфических к последовательности, и детекция связанных зондами продуктов амплификации посредством окрашивания [18].

Реакция ПЦР-амплификации

Смесь ПЦР-реагентов с образцом ДНК, нагревается до 95 °С. Двойная спираль ДНК разделяется, и целевые нуклеотидные последовательности становятся доступными для специфических праймеров. При охлаждении смеси происходит отжиг биотинилированных праймеров своими мишенями. Термостабильная рекомбинантная Taq (*Thermus aquaticus*) ДНК-полимераза в присутствии избыточного количества дезоксинуклеотидтрифосфатов (dNTPs), включая дезокси-аденозин, дезокси-гуанозин, дезокси-цитидин и дезокси-уридин (вместо дезокси-тимидина), используя целевую последовательность как шаблон, достраивает праймеры и формирует биотинилированную ДНК-последовательность, называемую ампликоном. Этот процесс повторяется множество раз (циклов). В каждом

цикле количество целевой ДНК удваивается. Для данного теста оптимальным считается 35 циклов, теоретически обеспечивающих выход более миллиарда копий.

Реакция гибридизации

По завершении процесса ПЦР-амплификации ампликоны подвергаются химической денатурации для формирования одиночных цепей ДНК. Биотинилированные ампликоны наносятся на нейлоновую мембрану, на которой иммобилизованы SSO-зонды (SSO - sequence-specific oligonucleotide). Происходит связывание (гибридизация) ампликонов с SSO-зондами. Причём, гибридизуются только ампликоны, содержащие нуклеотидную последовательность, полностью комплементарную зондовой. Таким образом, мембрана «поглощает» биотинилированные ампликоны-мишени. После гибридизации проводится жёсткая отмывка несвязавшихся ампликонов, обеспечивающая специфичность реакции.

Состав набора

Наборы LIFECODES для HLA- типирования (локусы A, B, C, DRB, DRB1, DQB) на базе Lumiplex (максимальное число тестов – 50)

Реагент		Объём	Хранение
MX-	LIFECODES HLA	870 мкл	2-8°C
	Раствор для ПЦР		
BM-	LIFECODES HLA	810 мкл	2-8°C
	Флюоресцентный конъюгат		Беречь от света!
DS	Раствор для разведения	9.9 мл	18-30°C

Замечание: Флюоресцентный конъюгат свето-чувствителен, беречь от света

Получение и подготовка образца

Предупреждение: Со всеми биологическими образцами следует обращаться как с потенциально инфицированными.

Данный набор предназначен для применения с образцами крови, взятыми с EDTA или КЦД, из которых ДНК выделяется высококачественным методом экстракции, например, при помощи набора Dynal DNA Extraction Kit [код изделия 633.01]. Перед выделением ДНК необходимо соблюдать условия хранения образцов крови, приведённые в руководстве набора для экстракции.

Выделенную ДНК разведите деионизованной водой или буфером из набора для экстракции до конечной концентрации 13-15 нг/мкл и получения соотношения A260/280 в диапазоне 1.65-1.80.

Образцы ДНК можно либо использовать непосредственно после выделения, либо хранить при температуре -4 °C до 5 дней.

ДНК допустимо хранить до 1 года при температуре -20 °C или ниже, что не вызывает снижения качества исследования данным набором.

Для минимизации эффектов деградации ДНК необходимо избегать лишних циклов заморозки/оттаивания ДНК.

Замечание: при слишком малом количестве ДНК амплификация может не произойти, а чрезмерное количество ДНК приводит к предпочтительной амплификации некоторых аллелей или экзонов, в некоторых реакциях зашкаливающей.

Замечание: если отношение A260/280 выходит за указанный диапазон, загрязнения ДНК могут ингибировать ПЦР.

Постановка ПЦР

ВЫПОЛНЯЕТСЯ В ПРЕ-ПЦР-ПОМЕЩЕНИИ

1. Определите подходящее количество пробирок для ПЦР, необходимых для тестирования пациентов и контролей. При выполнении амплификации каждый раз обязательна постановка одного негативного и одного позитивного контроля.
2. Используя для каждого реактива отдельный наконечник, внесите реагенты во все пробирки в таком порядке:

При использовании набора 50 тестов:

15 мкл раствор 6.0 mM MgCl₂

30 мкл Mastermix

15 мкл ДНК (концентрация 13-15 нг/мкл, т. е., примерно 200 нг на реакцию)

При использовании набора 100, 500 и 1000 тестов:

7,5 мкл раствор 6.0 mM MgCl₂

15 мкл Mastermix

7,5 мкл ДНК (концентрация 13-15 нг/мкл, т. е., примерно 200 нг на реакцию)

3. В пробирку для позитивного контроля в качестве образца внесите 15мкл (7,5 мкл) позитивной контрольной ДНК из набора, а в пробирку для негативного контроля – 15 мкл (7,5 мкл) стерильной деионизованной воды. Разметьте позиции образцов пациентов и контролей в ПЦР планшете.
4. Закройте пробирки крышками или клейкой плёнкой. Пробы готовы к амплификации.
5. Оставшиеся реагенты набора следует хранить при температуре 2-8 °С.

ПЦР-амплификация

ВЫПОЛНЯЕТСЯ В ПОСТ-ПЦР-ПОМЕЩЕНИИ

1. Поместите образцы в термоциклер.
2. Установите в соответствии с инструкцией термоциклера следующие параметры амплификации:

ЦИКЛ (35 циклов)	15 с 95 °С, 45 с 60 °С, 15 с 72 °С
------------------	--

ХРАНЕНИЕ	5 минут 72 °С
----------	---------------

ХРАНЕНИЕ	15 °С до окончания
----------	--------------------

3. Запустите программу. Её выполнение продолжается примерно 1.6 часа.
4. По завершении программы извлеките образцы из термоциклера.

ЗАМЕЧАНИЕ: ОРГАНИЗУЙТЕ РАБОТУ В ЛАБОРАТОРИИ ТАКИМ ОБРАЗОМ, ЧТОБЫ АМПЛИФИЦИРОВАННЫЕ ОБРАЗЦЫ НИКОГДА НЕ ПОПАДАЛИ В ПРЕ-ПЦР-ПОМЕЩЕНИЕ. Амплифицированные образцы следует рассматривать как наиболее вероятные источники контаминации.

5. Осторожно, чтобы не разбрызгивать содержимое пробирок, удалите с них крышки (или клейкую плёнку).
6. В каждую пробирку внесите по 60 мкл раствора для денатурации. Перемешайте несколько раз пипетированием. Для каждого внесения используйте отдельный наконечник.
7. Для полной денатурации инкубируйте не менее 10 минут при комнатной температуре.

8. Если выполнение детекции планируется начать в пределах 1-2 часов, то денатурированный ампликон следует хранить при комнатной температуре. Если нет, то закройте пробирки новыми крышками и храните при температуре 2-8 °С до начала анализа. В таком виде допустимо хранить не более 1 недели. Денатурированный ампликон нельзя замораживать. Неденатурированный ампликон можно хранить при температуре -20 °С или ниже до 3 месяцев.

Процедура гибридизации и детекции

Проводится в зоне постаmplификации.

1. Нагрейте в водяной бане Буфер для гибридизации (Hibridisation buffer) и отмеренные 275 мл промывочного буфера (Stingent Wash Buffer). Преципитированные соли должны раствориться. Остальные растворы используются при комнатной температуре.
2. Включите блот-гибридизатор BabyBee.
3. Промаркируйте стрипы со свободного конца водостойкими чернилами, и уложите их в лунки блот-гибридизатора, маркировкой вверх и к себе. Количество стрипов по каждому локусу должно соответствовать к-ву пациентов плюс один положительный контроль. Держите стрип за свободный от олигонуклеотидов конец.
4. Добавьте в каждую лунку BabyBee, содержащую стрипы, 5 мл подогретого до 50С Hibridisation buffer.
5. Добавьте в каждую лунку 70 мкл денатурированных ампликонов, в соответствии с маркировкой.
6. Закройте крышку прибора. Нажмите «старт». Процедура инкубации длится 30 мин., при 50С. Убедитесь что реагент покрывает каждый стрип полностью, и не переливается в соседние лунки.
7. По окончании инкубации аспирируйте реагент механическим отсосом.
8. Добавьте в каждую лунку 5 мл Ambient Wash Buffer (комнатной температуры). Нажмите «старт» (инкубация 5 мин)
9. Аспирируйте реагент механическим отсосом.
10. Добавьте в каждую лунку 5 мл подогретого на водяной бане до 50С Stingent Wash Buffer. Нажмите «старт» (инкубация 15 мин)
11. Приготовьте раствор рабочего конъюгата (Working Conjugate Solution) в соответствии с Таблицей 1 (стр 15) англоязычной инструкции к набору. Данный раствор готовится не ранее чем за 15 мин до использования.
12. Аспирируйте реагент по окончании инкубации п.12.
13. Добавьте в каждую лунку 5 мл Working Conjugate Solution. Нажмите «старт» (инкубация 15 мин)
14. Аспирируйте реагент механическим отсосом.
15. Добавьте в каждую лунку 5 мл Ambient Wash Buffer (комнатной температуры). Нажмите «старт», инкубация 5 мин.

16. Аспирируйте реагент механическим отсосом.
17. Добавьте в каждую лунку 5 мл Ambient Wash Buffer (комнатной температуры). Нажмите «старт», инкубация 5 мин.
18. Аспирируйте реагент механическим отсосом.
19. Добавьте в каждую лунку 5 мл Citrate Buffer. Нажмите «старт», (инкубация 5 мин).
20. Приготовьте рабочий Субстрат (Working Substrat) в соответствии с Таблицей 1 (стр 15). Раствор готовится не более чем за 3 часа до использования. Хранится в темном месте.
21. Аспирируйте реагент (п. 19) механическим отсосом.
22. Добавьте в каждую лунку 5 мл Working Substrat. Нажмите «старт», (инкубация 10 мин).
23. Аспирируйте реагент механическим отсосом
24. Добавьте в каждую лунку 5 мл деионизованной воды. Нажмите «старт», (инкубация 5 мин).
25. Аспирируйте реагент механическим отсосом
26. Добавьте в каждую лунку 5 мл деионизованной воды. Нажмите «старт», (инкубация 5 мин)
27. Аспирируйте реагент. Если стрипы будут анализироваться не сразу, добавьте в каждую лунку планшета цитратный буфер. Хранить не более 3-х дней при 2-8С

Ограничения метода

1. Вследствие высокой аналитической чувствительности ПЦР особое внимание следует уделять сохранению реагентов и амплификационных смесей в строгой чистоте. Рабочий процесс в лаборатории должен быть организован однонаправленно, так чтобы ампликон ПЦР не мог попадать в зону пре-амплификации. Чистота реагентов обеспечивается обязательным облюдением правил Хорошей Лабораторной Практики (GLP), а сохранность характеристик теста гарантирована только при строгом следовании рекомендациям данного руководства.
2. Тест Dynal RELI™ SSO HLA-B при разработке испытывался на негепаринизированных образцах цельной крови. Его характеристики в отношении иных образцов не исследовались.
3. Образец ДНК представляет собой шаблон для процесса ПЦР-амплификации. Его качество, определяемое концентрацией и чистотой, должно удовлетворять требованиям, обозначенным в данном руководстве.
4. Допустимо использование любого сертифицированного термоциклера, по характеристикам эквивалентного аппарату Perkin-Elmer GeneAmp PCR System 9600 или 9700.
5. Необходимо обеспечить надлежащую настройку инструментов и оборудования в соответствии с рекомендациями производителя.

Ожидаемые значения результатов

Вводный контроль качества

В начале использования набора из нового лота следует провести контроль качества путём типирования нескольких аттестованных образцов гетерозиготной ДНК, дающих позитивную реакцию на каждом зонде хотя бы в одном случае. В таблице 4 приведён предлагаемый список аллелей.

ТАБЛИЦА 4: Аллели, предлагаемые для проверки нового лота набора

HLA-B* Allele	Positive Probes
0701	1, 7, 13, 15, 20, 28, 29, 32, 39, 50, 54, 56, 60, 61, 62
0801	5, 7, 13, 15, 16, 28, 29, 32, 40, 49, 52, 56, 59, 61, 62
1402	2, 7, 13, 15, 17, 28, 29, 38, 42, 48, 52, 56, 58, 61, 62
1512	6, 9, 14, 18, 28, 29, 31, 43, 51, 53, 55, 61, 62
2702	3, 7, 13, 14, 19, 27, 29, 35, 44, 48, 54, 56, 61, 62
3701	3, 8, 13, 14, 18, 23, 26, 29, 37, 42, 49, 52, 56, 61, 62
3801	1, 7, 13, 15, 17, 27, 29, 31, 45, 52, 56, 61, 62
4402	6, 10, 14, 18, 25, 29, 30, 46, 49, 53, 57, 61, 62
4601	6, 9, 14, 22, 24, 28, 31, 43, 51, 53, 56, 61, 62
4701	6, 10, 14, 18, 23, 26, 29, 36, 44, 48, 54, 56, 61, 62
4901	4, 10, 14, 18, 27, 29, 47, 48, 53, 56, 61, 62
5401	6, 11, 12, 15, 20, 28, 29, 33, 41, 48, 52, 56, 61, 62
5701	6, 9, 21, 27, 29, 34, 43, 48, 53, 56, 61, 62

Внутрисерийный контроль качества

При каждой постановке теста необходимо анализировать один позитивный контрольный образец ДНК (из состава набора) и один негативный контрольный образец.

- Позитивная контрольная ДНК.** Контрольный образец даёт позитивные сигналы на зондах 3, 6, 7, 8, 13, 14, 15, 16, 19, 23, 26, 27, 29, 33, 35, 40, 44, 48, 53, 54, 56, 58, 61, 62. Тип контрольного образца ДНК - В*2705, 5101. Он входит в список типов, распознаваемых программным обеспечением. При несовпадении результата анализа контрольного образца с указанным выше шаблоном вся аналитическая серия, включая пробоподготовку, амплификацию и детекцию, считается недействительной и должна быть проведена повторно. Возможно, проблему помогут решить рекомендации раздела Troubleshooting Guide2.
- Негативный контроль.** Каждый зонд стрипа должен давать с негативным контролем отрицательный результат. При наличии позитивного сигнала хотя бы на одном зонде вся аналитическая серия считается недействительной и должна быть проведена повторно. Возможно, проблему помогут решить рекомендации раздела Troubleshooting Guide

3. Внутренний контроль

На стрип для типирования HLA-B нанесены два зонда референтной интенсивности: один – для экзона 2 (зонд 29) и один для экзона 3 (зонд 61). Помимо того, на стрипе имеется внутренний позитивный контрольный зонд (зонд 62).

1. Зонды референтной интенсивности (Intensity Reference Probes)

Эти зонды выполняют две функции

- Служат признаком адекватной амплификации и гибридизации образца. Референтный зонд подобран таким образом, чтобы сигнал на нём был более слабым, чем на всех прочих зондах. Следовательно, если сигнал на нём отсутствует, правильное определение HLA-B типа невозможно, поскольку нельзя

исключить, что и позитивные сигналы некоторых других зондов не детектируются. В этой ситуации тест, включая амплификацию, считается недействительным и подлежит повторному проведению.

- б) Указывают пороговый уровень сигнала. Каждый зонд, равный или превышающий по величине сигнала референтный, должен учитываться как позитивный. Зонды 1-28 сравниваются с референтным зондом экзона 2 (зонд 29), а зонды 30-60 сравниваются с референтным зондом экзона 3 (зонд 61).

2. Внутренний позитивный контрольный зонд (Assay Control Probe)

Этот зонд для каждого исследуемого образца должен дать позитивный сигнал, то есть выше референтного. Если он отсутствует, включая амплификацию, считается недействительным и должен быть проведён повторно.

Интерпретация результатов

ЗАМЕЧАНИЕ: Нельзя допускать высыхания стрипов до интерпретации результатов.

Тип HLA-B устанавливается путём составления списка позитивных сигналов (голубых линий), определяющих, какие из В* аллелей присутствуют в образце ДНК.

Найдите в упаковке набора Таблицу интерпретации (Interpretation Table: Homozygous Hybridisation Patterns), содержащую (Sequence Motifs) детектируемых 62 зондами. Эти таблицы обновляются дважды в год в соответствии с базой данных Комитета по номенклатуре ВОЗ (WHO Nomenclature Committee) и IMGT/HLA. Последний вариант таблиц можно найти на сайте www.tissue-typing.com

Вручную регистрацию результатов можно вести при помощи накладной номерной шкалы зондов (Overlay), входящей в состав набора для типирования, отмечая позитивные зонды в Scoresheet. Как указывалось выше, позитивным сигналом считается окраска, по интенсивности равная или превосходящая соответствующую референтную полосу. Затем по таблице интерпретации устанавливается результат типирования.

Неопределённые результаты

Система RELITTM SSO стремится обеспечить определённую результат на уровне аллельных групп, как показано в следующей таблице.

Allele Group	Allele Group	Allele Group
B*07	B*41	B*54
B*03	B*42	B*55
B*13	B*44	B*56
B*14	B*45	B*57
B*15	B*46	B*53
B*13	B*47	B*59
B*27	B*48	B*67
B*35	B*49	B*73
B*37	B*50	B*73
B*33	B*51	B*31
B*39	B*52	B*32
B*40	B*53	B*33

В силу сложной природы полиморфизма HLA-B, достичь этого иногда не удаётся. В этих случаях образец следует протестировать с применением метода более высокого разрешения, как, например, PCR-SSP (Sequence Specific Primers) или PCR-SBT (Sequence Based Typing).

Всего
прислано
протипи
7 (семь)
Генераль
Директ
ЗОО "БиоД
Там

