



INSTRUCTION FOR USE

Holotype HLA 24/7 reagent kit for creating DNA libraries of HLA genes for the following genotyping by the method of high-throughput sequencing at 7 locuses: A, B, C, DRB1, DQB1, DPB1, DQA1, configuration A1/A2/A3/A4 in assembly

Attila Bérces
Managing Director
Attila Bérces

Zoltan Simon
Managing Director
Zoltan Simon

Omixon Biocomputing Kft.
1117 Bp., Kaposvár utca 14-18.
Adószám: 23550070-2-43

14/06/2024



Dr. KÁDÁR ZSUZSANNA
Notarial Office
1114 Budapest, Ulászló u. 21.
Tel: 381-0405, 381-0407
KRID: 342479118 (MOKKIT)
drkadar@drkadar.hu

File No.: 11035/Z/1625/2024.-----
English language licence No: 3/2012.-----

I the undersigned Deputy Notary in and for the City of Budapest hereby certify that this document is to the best of my knowledge, a true copy of the original document having been produced to me. -----
At Budapest on the 19th (nineteenth) day of June, 2024 (two thousand and twenty-four). -----

Dr. FÖLDI Ágnes Fanni
Deputy Notary





ИНСТРУКЦИЯ ПО ПРИМЕНЕНИЮ

**Набор реагентов Holotype HLA 24/7 для
создания библиотек ДНК генов HLA для
последующего генотипирования методом
высокопроизводительного секвенирования по 7
локусам: A, B, C, DRB1, DQB1, DPB1, DQA1,
конфигурация A1/A2/A3/A4 в составе
(КОД:Н52.1, КОД:Н56, КОД:Н58 И КОД:Н60)**

Версия Протокола 3.0.2

Версия Документа 6.1

14.06.2024

Оглавление

ВВЕДЕНИЕ	7
ИНФОРМАЦИЯ О РАЗРАБОТЧИКЕ, ПРОИЗВОДИТЕЛЕ И МЕСТЕ ПРОИЗВОДСТВА.....	8
ИНФОРМАЦИЯ ОБ УПОЛНОМОЧЕННОМ ПРЕДСТАВИТЕЛЕ В РФ	9
НАЗНАЧЕНИЕ.....	10
ХАРАКТЕРИСТИКИ ИЗДЕЛИЯ	11
Состав набора реагентов Holotype HLA-24/7 – конфигурация A1/A2/A3/A4 & CE v2 (КОД:Н52.1, КОД:Н56, КОД:Н58 и КОД:Н60)	11
Принцип метода.....	13
ТЕХНИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ ИЗДЕЛИЯ	14
АНАЛИТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ ИЗДЕЛИЯ	15
ПЕРЕЧЕНЬ РИСКОВ, СВЯЗАННЫХ С ПРИМЕНЕНИЕМ НАБОРА «HOLOTYPE HLA».....	16
МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ ПРИ РАБОТЕ С НАБОРОМ.....	16
ДОПОЛНИТЕЛЬНОЕ ОБОРУДОВАНИЕ, РЕАГЕНТЫ И ВСПОМОГАТЕЛЬНЫЕ МАТЕРИАЛЫ	17
ЮРИДИЧЕСКОЕ ПРЕДУПРЕЖДЕНИЕ	20
ВАЖНОЕ ЗАМЕЧАНИЕ ПЕРЕД НАЧАЛОМ РАБОТЫ	22
КРАТКОЕ ИЗЛОЖЕНИЕ ШАГОВ	23
ГЛОССАРИЙ/ОПРЕДЕЛЕНИЯ	24
ШАГ 0 - НОРМАЛИЗАЦИЯ ГЕНОМНОЙ ДНК.....	25
Протокол	25
ШАГ 1 - ПОДГОТОВКА МАСТЕР-МИКСА ДЛЯ АМПЛИФИКАЦИИ HLA.....	26
Список реагентов.....	26
Протокол	26
ШАГ 2 – АМПЛИФИКАЦИЯ HLA КЛАССА I и II	28
Список реагентов.....	28
Протокол	28
Шаг 3 – КОЛИЧЕСТВЕННЫЙ АНАЛИЗ И НОРМАЛИЗАЦИЯ АМПЛИКОНА (ДЛЯ ПЛАНШЕТОВ ЕМКОСТЬЮ 200 МКЛ)	30
Список реагентов.....	30
Протокол	30
ШАГ 4 – ПУЛИРОВАНИЕ И ОЧИСТКА АМПЛИКОНОВ С ПОМОЩЬЮ EXOSAP-IT EXPRESS.....	33
Список реагентов.....	33
Протокол	33
ШАГ 5 – ПОДГОТОВКА БИБЛИОТЕКИ	35
Список реагентов.....	35

Протокол	35
ШАГ 6 - ВЫБОР РАЗМЕРА БИБЛИОТЕКИ ПРИ ПОМОЩИ МИКРОНОСИТЕЛЕЙ	41
Список реагентов.....	41
Протокол	42
ШАГ 7 - КОЛИЧЕСТВЕННЫЙ АНАЛИЗ БИБЛИОТЕКИ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ПРИБОРА ДЛЯ QPCR	46
Список реагентов.....	46
Протокол	46
ШАГ 8 - СЕКВЕНИРОВАНИЕ НА ILLUMINA MISEQ	49
Список реагентов.....	49
Протокол	49
ШАГ 9 - АНАЛИЗ ДАННЫХ СЕКВЕНИРОВАНИЯ HLA	51
Автоматизированный протокол	51
Протокол ручного управления	51
Протокол на рабочем столе.....	51
УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ И ТРАНСПОРТИРОВКИ.....	53
УТИЛИЗАЦИЯ	53
ГАРАНТИИ	53
ТЕХНИЧЕСКАЯ ПОДДЕРЖКА.....	54
ДОПОЛНИТЕЛЬНЫЕ ИЛЛЮСТРАЦИИ.....	55
.....	55
Приложение 1: КОЛИЧЕСТВЕННЫЙ АНАЛИЗ И НОРМАЛИЗАЦИЯ АМПЛИКОНОВ (ДЛЯ ПЛАНШЕТОВ ЕМКОСТЬЮ 100 МКЛ).....	57
Список реагентов.....	57
Протокол	57
Приложение 2: ВЫБОР РАЗМЕРА БИБЛИОТЕКИ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ПРИБОРА PIPPIN PREP	59
Список реагентов.....	59
Протокол	59
Программирование устройства Pippin Prep	61
Работа устройства Pippin Prep	61
Приложение 3: КОЛИЧЕСТВЕННЫЙ АНАЛИЗ БИБЛИОТЕКИ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ИНТЕРКАЛИРУЮЩЕГО ФЛУОРЕСЦЕНТНОГО КРАСИТЕЛЯ ДЛЯ ДВУХЦЕПОЧЕЧНОЙ ДНК	64
Список реагентов.....	64
Протокол	64

Приложение 4: ДЕНАТУРАЦИЯ И РАЗВЕДЕНИЕ PHIX CONTROL ДЛЯ MISEQ.....	66
Протокол	66
Приложение 5: РАСШИФРОВКА СИМВОЛОВ МАРКИРОВКИ	67
Приложение 6: СПИСОК ПРИМЕНИМЫХ МЕЖДУНАРОДНЫХ СТАНДАРТОВ И НОРМАТИВНЫХ ДОКУМЕНТОВ	68

История изменений документа — важные замечания и обновления

Версия документа	Дата	Краткая информация об изменениях
1	22.04.2022	Первоначальная версия Документа использовалась только во время внутреннего тестирования при производстве наборов. Первоначальная версия Инструкции, которую получал пользователь, IFU версия 2. Первоначальная версия Инструкции для Протокола версии 3.0.2. Основные изменения по сравнению с версией Протокола 3.0.1: - Шаг 4 больше основан не на наборе AMPure XP, а на наборе ExoSAPiT Express. - Шаг 5 - изменяются объемы реагентов в мастер-миксе для фрагментации, а также продолжительность программы фрагментации.
2	5.05.2022	Шаг 5 – скорректирована программа лигирования.
3	10.05.2022	Шаг 5 – удалена уточняющая информация по набору AMPure XP.
4	15.06.2022	Исправлено описание рядом с символом CE в документе. Обновлено официальное уведомление.
5	24.02.2023	Из протокола удален реактив для усиления амплификации 2 (Enhancer 2).
6	30.09.2023	Приведение версии в соответствие с английской версией инструкции "Holotype HLA 24_7 CE v2 - Protocol 3.0.2 - IFUv06" – в русской версии 5 ссылка MyHolotype заменена на MyOmixon, и общий объем мастер-микса qPCR был исправлен. В российскую версию инструкции были внесены следующие изменения в соответствии с российским законодательством: - Добавлена информация о местах производства и об уполномоченном представителе Omixon на территории РФ - Введены подпункты: целевой анализ; показания к применению; противопоказания к применению; стерильность; функциональное назначение; потенциальный потребитель. Добавлен пункт «Гарантии» - В инструкцию добавлены технические характеристики изделия - Добавлена информация о рисках, сопряженных с применением изделия

		• Утилизация изделия описана в соответствии с российским законодательством и не противоречит данным производителя
6.1	14.06.2024	• Изменено назначение изделия; • Удалена информация о работе с платформой секвенирования Illumina MiniSeq; • пункт Условия хранения и транспортировки: добавлено предупреждение о недопустимости многократной заморозки/разморозки; • Характеристики изделия рабочая тетрадь Excel: исправлено название адаптерных планшетов; название реагентов «MiSeq v2» исправлено на «MiSeq»; • Характеристики изделия 96-луночный планшет с адаптерами – исправлено количество генерируемых библиотек; • Характеристики изделия программное обеспечение – Omixon HLA TWIN: изменена информация по предоставлению ПО, указана версия ПО и дата выхода ПО; • Ограничения по применению продукта – валидацию нерекommenдованных материалов и оборудования должен проводить пользователь; • Технические рекомендации и рекомендации по оборудованию – добавлено требование к видеокарте компьютера; • Рекомендации по используемым реагентам: исправлено количество мастер-микса Promega GoTaq, необходимого для каждого образца и количество локусов; • Рекомендации по используемым реагентам: исправлено максимальное количество магнитных частиц AMpure XP • Рекомендацию по выделению геномной ДНК: указан 1 источник геномной ДНК – периферическая цельная кровь. • Шаг 0 – исправлена длительность процедуры; исправлены единицы измерения длин волн; • Шаг 1, пункт 1.2 – исправлено количество образцов • Шаг 5 примечание, п.5.3, п.5.19: исправлено количество анализируемых образцов; пункт 5.1 – исправлен; пункт 5.24 II – добавлена единица измерения объема пробирки «мл»; • Приложение 6: добавлен список национальных стандартов РФ, которым соответствует данное изделие.

ВВЕДЕНИЕ

Настоящая инструкция по применению описывает порядок использования следующих продуктов с Протоколом версии 3.0.2 (с набором Promega LR-PCR для амплификации)

Наименование продукта	Краткое наименование далее по тексту документа	Справочный код #	Образцы
Набор реагентов Holotype HLA 24/7 для создания библиотек ДНК генов HLA для последующего генотипирования методом высокопроизводительного секвенирования по 7 локусам: A, B, C, DRB1, DQB1, DPB1, DQA1, конфигурация A1 в составе	Holotype HLA 24/7 – Конфигурация A1 & CE v2	H52.1	24
Набор реагентов Holotype HLA 24/7 для создания библиотек ДНК генов HLA для последующего генотипирования методом высокопроизводительного секвенирования по 7 локусам: A, B, C, DRB1, DQB1, DPB1, DQA1, конфигурация A2 в составе	Holotype HLA 24/7 – Конфигурация A2 & CE v2	H56	24
Набор реагентов Holotype HLA 24/7 для создания библиотек ДНК генов HLA для последующего генотипирования методом высокопроизводительного секвенирования по 7 локусам: A, B, C, DRB1, DQB1, DPB1, DQA1, конфигурация A3 в составе	Holotype HLA 24/7 – Конфигурация A3 & CE v2	H58	24
Набор реагентов Holotype HLA 24/7 для создания библиотек ДНК генов HLA для последующего генотипирования методом высокопроизводительного секвенирования по 7 локусам: A, B, C, DRB1, DQB1, DPB1, DQA1, конфигурация A4 в составе	Holotype HLA 24/7 – Конфигурация A4 & CE v2	H60	24

Далее по тексту применяются указанные выше сокращения наименования изделия, а также – «изделие», «Набор», «Holotype HLA», «Holotype HLA 24/7».

ИНФОРМАЦИЯ О РАЗРАБОТЧИКЕ, ПРОИЗВОДИТЕЛЕ И МЕСТЕ ПРОИЗВОДСТВА

Разработчик	Omixon Biocomputing Ltd Омиксон Биокomпьютинг Лтд
Адрес (место нахождения) юридического лица	14-18. Kaposvar u., 1117 Budapest, Hungary
Номера телефонов	+ 36 21 2620413
Адрес электронной почты юридического лица	support@omixon.com
Производитель	Omixon Biocomputing Ltd Омиксон Биокomпьютинг Лтд
Адрес (место нахождения) юридического лица	14-18. Kaposvar u., 1117 Budapest, Hungary
Номера телефонов	+36 21 2620413
Адрес электронной почты юридического лица	support@omixon.com
Адрес в Интернет	www.omixon.com
Место производства	Omixon Biocomputing Ltd Омиксон Биокomпьютинг Лтд 1117 Budapest, Kaposvár utca 14-18, Hungary (Венгрия) Integrated DNA Technologies Интеррэйтед ДиЭнЭй Текнолоджис 1710 Commercial Park Coralville, Iowa, 52241 USA (США) Metabion GmbH Метабион ГмбХ Ammerthalstr. 26, 85551, Kirchheim bei Munich, Germany (Германия) GSP Global Szerviz Partner Kft. ДжиЭсПи Глобал Сервис Партнер Кфт Lorinci ut 61., H – 2220 Vecses, Hungary (Венгрия)

Далее название компании производителя указывается сокращенно – Omixon.

ИНФОРМАЦИЯ ОБ УПОЛНОМОЧЕННОМ ПРЕДСТАВИТЕЛЕ В РФ

Организационно-правовая форма и полное наименование	Общество с ограниченной ответственностью «Диаэм»
Сокращенное наименование	ООО «Диаэм»
Адрес (место нахождения)	129345, Российская Федерация, г. Москва ул. Магаданская, д. 7, корпус 3, эт. 2, офис 210
Номера телефонов	(495) 745-05-08
Адрес электронной почты	info@dia-m.ru

Целевой анализ

Набор реагентов «Holotype HLA 24/7» используется для диагностики *in vitro*. Данный набор реагентов предназначен для создания библиотек ДНК генов HLA для последующего генотипирования методом высокопроизводительного секвенирования по 7 локусам - A, B, C, DRB1, DQB1, DPB1, DQA1.

Область применения набора реагентов

Клиническая лабораторная диагностика. Набор реагентов «Holotype HLA 24/7» является средством для диагностики *in vitro*.

Показания к применению:

Набор реагентов «Holotype HLA 24/7» рекомендуется использовать для диагностики *in vitro*. Созданные с помощью данного набора библиотеки ДНК генов HLA пригодны для проведения HLA-типирования.

Противопоказания к применению:

при использовании специально обученным персоналом и с учетом применения по назначению противопоказания не выявлены.

Стерильность:

изделие не стерильно.

НАЗНАЧЕНИЕ

Назначение:

Для диагностики *in vitro* для создания библиотек ДНК генов HLA для последующего генотипирования методом высокопроизводительного секвенирования в образцах геномной ДНК человека. Популяционные, демографические аспекты применения медицинского изделия отсутствуют.

Программное обеспечение Omixon HLA Twin, входящее в состав изделия, предназначено для интерпретации и сопоставления данных секвенирования, полученных на платформе Illumina MiSeq позволяя получить высокоточное типирование HLA на уровне аллелей за один проход с очень низким уровнем неоднозначности на уровне 2-го поля.

Функциональное назначение:

Для диагностики *in vitro*.

Потенциальный потребитель:

Набор предназначен для профессионального применения медицинскими работниками: врач клинической лабораторной диагностики, медицинский лабораторный техник

ХАРАКТЕРИСТИКИ ИЗДЕЛИЯ

Состав набора реагентов Holotype HLA-24/7 – конфигурация A1/A2/A3/A4 & CE v2 (КОД:Н52.1, КОД:Н56, КОД:Н58 И КОД:Н60)

Данный раздел описывает содержимое доступных возможных конфигураций продукта Holotype HLA 24/7 следующим образом:

Тип продукта	Код	Кол-во анализируемых образцов
Holotype HLA 24/7 – Конфигурация A1 & CE v2	H52.1	24
Holotype HLA 24/7 – Конфигурация A2 & CE v2	H56	24
Holotype HLA 24/7 – Конфигурация A3 & CE v2	H58	24
Holotype HLA 24/7 – Конфигурация A4 & CE v2	H60	24

Обратите внимание, что коробки с праймерами и реагентами для подготовки библиотеки во всех конфигурациях продукта одинаковы. Разные конфигурации отличаются друг от друга последовательностью индексов на 96-луночном планшете с индексированными адаптерами. Дополнительную информацию см. в разделе «96-луночный планшет с адаптерами» ниже.

Коробка с праймерами

Коробка с праймерами содержит готовые к применению растворы праймеров для целевой ПЦР-амплификации длинных фрагментов генов HLA: A, B, C, DPB1, DQA1, DQB1 и DRB1. Кроме того, она также содержит реактив для усиления амплификации 1 (Enhancer 1).

Смесь праймеров	Код	Кол-во анализируемых образцов	Объем в пробирке	Количество пробирок	Цветовой код
HLA-A	P013	24	60 мкл	1	Желтый
HLA-B	P023	24	60 мкл	1	Красный
HLA-C	P033	24	60 мкл	1	Оранжевый
HLA-DRB1	P043	24	60 мкл	1	Зеленый
HLA-DPB1	P073	24	60 мкл	1	Фиолетовый
HLA-DQA1	P083	24	60 мкл	1	Коричневый
HLA-DQB1 (набор 3)	P123	24	60 мкл	1	Синий
Реактив для усиления амплификации 1 (Enhancer 1)	E01	96	1100 мкл	1	Прозрачный

Коробка с реагентами для подготовки библиотеки

Коробка с реагентами для подготовки библиотеки содержит реагенты для подготовки библиотеки (фрагментации, получения тупых концов и аденилирования концов ампликонов, а также лигирования к ним последовательностей адаптеров) из ампликонов HLA.

Реагент	Код	Кол-во анализируемых образцов	Объем пробирки	Количество пробирок	Цветовой код
Фермент для фрагментирования (A)	R12	24	85 мкл	1	Желтый
Буфер для фрагментирования (B)	R22	24	85 мкл	1	Красный
Фермент для обработки концов (C)	R32	24	50 мкл	1	Зеленый
Буфер для обработки концов (D)	R42	24	95 мкл	1	Оранжевый
Фермент для лигирования (E)	R52	24	81 мкл	1	Синий
Буфер для лигирования (F)	R62	24	900 мкл	2	Черный

96-луночный планшет для адаптеров

96-луночный индексированный планшет с адаптерами содержит готовые к использованию адаптеры NGS (олигонуклеотиды двухнитевой ДНК) в растворе не менее 5 мкл для генерации отдельных NGS библиотек. На 96-луночном индексированном планшете с адаптерами имеется достаточное количество индексированных адаптеров для генерации 24 отдельных NGS библиотек и для идентификации образцов путем выделения и очистки.

Версия набора	Реагент	Код	Кол-во анализируемых образцов	Объем/ лунка	Планшеты
H52.1	Планшет с адаптерами A1 (i1-24)	N4	24	≥5 мкл	1
H56	Планшет с адаптерами A2 (i25-48)	N7	24	≥5 мкл	1
H58	Планшет с адаптерами A3 (i49-72)	N8	24	≥5 мкл	1
H60	Планшет с адаптерами A4 (i73-96)	N9	24	≥5 мкл	1

Запасные компоненты доступны по специальному запросу пользователя. Обратите внимание, что Omixon предлагает замену коробок с компонентами, а не отдельных флаконов. Обратитесь по адресу sales@omixon.com для получения дополнительной информации.

Рабочая тетрадь в Excel

Рабочая книга Excel предоставляется для поддержки протокола Holotype HLA 24/7 и реагентов MiSeq с расчетами объемов, схемами планшетов, прослеживаемостью реагентов и оборудования, ведением записей, а также созданием списка образцов MiSeq для всех поддерживаемых конфигураций адаптерных планшетов (A1/ A2/ A3/ A4). Версия Workbook, совместимая с данным руководством пользователя, — v3.0.2. Если у вас нет копии, пожалуйста, свяжитесь с support@omixon.com.

Программное обеспечение – Omixon HLA Twin

Пожалуйста, свяжитесь с sales@omixon.com, чтобы получить лицензию на Omixon HLA Twin в связи с приобретением набора Holotype HLA 24/7.

Набор Holotype HLA используется в комплекте с ПО Omixon HLA Twin, которое поставляется на электронном носителе и по сети Интернет.

Версия ПО: Omixon HLA TWIN 4.8.1 (дата выпуска 26.06.2023г.) и выше.

Инструкция по применению

Инструкция по применению поставляется по сети Интернет и на электронном носителе.

Важное замечание:

При проведении диагностики *in vitro* с помощью набора Holotype HLA 24/7 используйте только компоненты набора, предлагаемые производителем, и программное обеспечение Omixon HLA Twin. Пожалуйста, ознакомьтесь с разделом «Ограничения по применению продукта» перед использованием наборов.

Принцип метода

Принцип метода:

Создание библиотек ДНК генов состоит из следующих этапов:

На первом этапе работы проводится ПЦР-амплификация геномной ДНК с использованием специфических праймеров. Гены HLA A, B, C, DQA1 и DQB1 амплифицируются по всей длине их кодирования, включая элементы 5'- и 3'-нетранслируемых областей, в то время как DRB1 амплифицируются от интрона 1 до интрона 4, DPB1 амплифицируются от интрона 1 до 3'-нетранслируемой области.

Затем ампликоны фрагментируются с помощью Фермента для Фрагментирования A до размера, подходящего для секвенирования на платформе Illumina,

Далее, проводится специфическая обработка концов фрагментированных ампликонов последующим лигированием последовательностью адаптеров, которые используются на протяжении всего процесса на MiSeq для захвата, амплификации и секвенирования ДНК. Адаптеры также включают индекс, представляющий собой короткую последовательность, уникальную для каждого адаптера, которая идентифицирует происхождение библиотеки

(образец/локус).

После объединения проиндексированных библиотек, выбора размера и количественного анализа образец загружается в системы MiSeq для секвенирования. Весь процесс занимает менее 48 часов в зависимости от выбора проточной кюветы на платформе Illumina. Сгенерированные данные анализируются с использованием двух разных алгоритмов в HLA Twin (www.omixon.com). Использование двух независимых алгоритмов в HLA Twin обеспечивает высочайший уровень достоверности, так что результаты генотипирования HLA можно сообщать немедленно без дополнительной проверки. Образцы с сомнительным или неоднозначным генотипированием помечаются программным обеспечением для ручного анализа.

Ограничения по применению продукта

Набор реагентов по истечении срока годности применению не подлежит.

Набор реагентов, транспортированный или хранившийся с нарушением температурного режима, применению не подлежит.

Для наилучшей работы, пожалуйста, используйте наборы Holotype HLA и ПО Omixon HLA Twin для типирования HLA по NGS с материалами, реагентами и оборудованием, рекомендованными в разделе "Оборудование и реагенты".

Использование любых других материалов, не указанных в разделе "Оборудование и реагенты" должно быть проверено и подтверждено пользователем.

Не модифицируйте и не разводите реагенты в объемах, отличных от указанных в настоящей инструкции по применению. Не используйте объем меньше указанного в настоящей инструкции по применению. Такие действия могут привести к ошибкам в интерпретации результатов.

Не используйте продукт при наличии обнаруженных дефектов компонентов (разбитые сосуды, планшеты, не закрывающиеся колпачки, несоответствие состава, указанному на упаковке).

В случае несоблюдения требований производителя компания Omixon не несет ответственности за полученные результаты.

Для получения более конкретной информации, пожалуйста, обратитесь к документу «Ограничения по применению продукта» по известным погрешностям и ограничениям ПО Omixon HLA Twin. Документ распространяется вместе с инструкцией по применению наборов Holotype HLA, и находится в общем доступе на сайте компании Omixon в разделе «MyOmixon/Support» ("Мой Omixon/Поддержка") и в разделе «Услуги/Инструкции по использованию HLA Twin». Также документ «Ограничения по использованию продукта» может быть получен через запрос на электронный адрес support@omixon.com.

ТЕХНИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ ИЗДЕЛИЯ

Компонент	Физическое состояние	Цвет	Запах
Коробка с праймерами			
Смесь праймеров HLA-A (HLA-A Primer mix)	Жидкость	Прозрачный, бесцветный	Нет

Компонент	Физическое состояние	Цвет	Запах
Смесь праймеров HLA-B (HLA-B Primer mix)	Жидкость	Прозрачный, бесцветный	Нет
Смесь праймеров HLA-C (HLA-C Primer mix)	Жидкость	Прозрачный, бесцветный	Нет
Смесь праймеров HLA-DRB1 (HLA-DRB1 Primer mix)	Жидкость	Прозрачный, бесцветный	Нет
Смесь праймеров HLA-DQB1 (Набор 3) (HLA-DQB1 (Set 3) Primer mix)	Жидкость	Прозрачный, бесцветный	Нет
Смесь праймеров HLA-DQA1 (HLA-DQA1 Primer mix)	Жидкость	Прозрачный, бесцветный	Нет
Смесь праймеров HLA-DPB1 (HLA-DPB1 Primer mix)	Жидкость	Прозрачный, бесцветный	Нет
Реактив для усиления амплификации 1 (Enhancer 1)	Жидкость	Прозрачный, бесцветный	Нет
Коробка с реагентами для подготовки библиотеки			
Фермент для фрагментирования (A) (Fragmentation Enzyme (A))	Жидкость	Прозрачный, бесцветный	Нет
Буфер для фрагментирования (B) (Fragmentation Buffer (B))	Жидкость	Прозрачный, бесцветный	Нет
Фермент для обработки концов (C) (End Repair Enzyme (C))	Жидкость	Прозрачный, бесцветный	Нет
Буфер для обработки концов (D))	Жидкость	Прозрачный, бесцветный	Нет
Фермент для лигирования (E) (Ligation Enzyme (E))	Жидкость	Прозрачный, бесцветный	Нет
Буфер для лигирования (F) (Ligation Buffer (F))	Жидкость	Прозрачный, бесцветный	Нет
96-луночный планшет с адаптерами			
Реагент в 96-луночном планшете с адаптерами	Гель	Прозрачный, бесцветный	Нет

АНАЛИТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ ИЗДЕЛИЯ

Установлены основные аналитические параметры производительности в соответствии с валидацией продукта:

	HLA-A	HLA-B	HLA-C	HLA-DRB1	HLA-DPB1	HLA-DQA1	HLA-DQB1
Аналитическая Чувствительность	99,4%	98,99%	98,79%	96,77%	95,16%	96,57%	97,38%
Аналитическая	99,99%	99,99%	99,97%	99,95%	99,9%	99,85%	99,87%

Специфичность							
Прецизионность	99,4%	98,99%	98,79%	96,77%	95,16%	96,57%	97,38%
Точность	99,98%	99,98%	99,95%	99,91%	99,8%	99,71%	99,75%

Предел обнаружения:

Рекомендуемая минимальная концентрация исходной геномной ДНК - 20 нг/мкл со следующими показателями чистоты, определенными флуоресцентным методом: коэффициент поглощения 1,7-2 для соотношений 260 нм/280 нм и 260 нм/230 нм.

Установлены основные параметры клинической эффективности в соответствии с валидацией продукта:

	HLA-A	HLA-B	HLA-C	HLA-DRB1	HLA-DPB1	HLA-DQA1	HLA-DQB1
Диагностическая Чувствительность	99,29%	98,83%	98,58%	97,17%	97,88%	98,58%	99,53%
Диагностическая Специфичность	99,98%	99,98%	99,95%	99,94%	99,95%	99,93%	99,98%
Прецизионность	99,29%	98,83%	98,58%	97,17%	97,88%	98,58%	99,53%
Точность	99,96%	99,97%	99,90%	99,89%	99,90%	99,87%	99,96%

ПЕРЕЧЕНЬ РИСКОВ, СВЯЗАННЫХ С ПРИМЕНЕНИЕМ НАБОРА «HOLOTYPE HLA»

Неизвестны прямые риски для здоровья пациента, когда результаты испытаний используются в качестве вспомогательного средства для диагностики определенного состояния здоровья; в то же время неспособность анализа работать в соответствии с предусмотренным применением или ошибка в интерпретации результатов могут привести к неправильному медицинскому лечению пациентов, которым требуется операция по трансплантации, поэтому может вызвать косвенный риск.

С использованием Holotype HLA обычно связаны следующие риски для здоровья:

- Неправильное медицинское ведение, связанное с данными о HLA-генотипе пациента
- Задержка, вызванная ненадлежащей работой продукта, при оказании медицинских услуг пациенту
- Ошибочный диагноз, неправильные результаты HLA-типирования
- Неправильный подбор донора и реципиента во время операции по трансплантации

МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ ПРИ РАБОТЕ С НАБОРОМ

Перед началом работы прочитайте разделы "Информация по технике безопасности" и "Важные замечания" в инструкциях всех реагентов, указанных в разделе "Дополнительное оборудование, реагенты и вспомогательные материалы".

- При работе с химическими лабораторными реагентами всегда надевайте подходящий лабораторный халат, одноразовые перчатки и защитные очки. Для дополнительной информации, пожалуйста, обратитесь за справкой к подходящим паспортам безопасности вещества (ПБВ). Паспорт безопасности материала предоставляется пользователю поставщиком по запросу.

Обзор химических компонентов реагентов продукта может быть найден в ПБВ или в наборе Holotype и доступен по запросу.

- При работе с химическими лабораторными реагентами соблюдайте соответствующие меры предосторожности. Не допускайте их попадания в рот и контакта с кожей и слизистыми оболочками.

- Только для диагностики *in vitro*.

- При случайном попадании химического лабораторного реагента в глаза или ротовую полость, а также на кожу немедленно обильно промойте это место водой. При необходимости обратитесь к врачу для получения медицинской помощи.

- Утилизация всех отходов должна проводиться в соответствии с местным законодательством.

- Все образцы и материалы, используемые для проведения теста, подлежат утилизации как содержащие инфекционные агенты. При обращении с лабораторными, химическими или биологически опасными отходами и их удалении необходимо соблюдать местные, региональные и национальные правила.

- К работе с изделием допускается только квалифицированный персонал, владеющий методикой лабораторных исследований и знакомый с возможными опасностями при обращении с данным набором. Необходимо использовать защитную одежду, перчатки и средства защиты глаз и лица и обращаться с набором в соответствии с требованиями надлежащей лабораторной практики.

ДОПОЛНИТЕЛЬНОЕ ОБОРУДОВАНИЕ, РЕАГЕНТЫ И ВСПОМОГАТЕЛЬНЫЕ МАТЕРИАЛЫ

Важное замечание:

Используйте только исправно работающее откалиброванное оборудование. Отсутствие этого требования может привести к неправильной интерпретации результатов.

Технические рекомендации и рекомендации по оборудованию

- Термоциклер с форматом 96-луночного планшета (например, Термостат электрический для проведения полимеразной цепной реакции (ПЦР) ДНК Veriti Thermal Cycler, вариант исполнения Veriti 96-Well Thermal Cycle, производства «Life Technologies Corporation», США, РУ № ФСЗ 2011/09244 от 02.06.2017 г.).

- Флуориметр (или другой измерительный прибор, позволяющий определить концентрацию образцов в 96-луночных планшетах для использования с набором Promega QuantiFluor dsDNA, например «Анализатор "FluoVista" (ФлюоВиста) флуориметрический», производства «inno-train Diagnostik GmbH», Германия, РУ № РЗН 2022/17081 от 12.05.2022 г.).
- Система для препаративного электрофореза ДНК/РНК Pippin Prep (№ по каталогу PIP0001) или Blue Pippin (№ по каталогу BLU0001), производства Sage Science.
- Прибор для qPCR, рассчитанный на 96- или 384-луночный планшет (например, «Термоциклер для амплификации нуклеиновых кислот 1000, с принадлежностями исполнения: C1000, S1000, C1000 Touch», производства Bio-Rad Laboratories Inc., США, РУ № ФСЗ 2008/03399 от 21.06.2016 г.).
- Генетический секвенатор MiSeq, вариант исполнения MiSeq, производства «Illumina, Inc.», США (№ по каталогу SY-410-1003), РУ № РЗН 2014/1568 от 29.04.2014 г.,
- Персональный компьютер 64-битный с минимум 4 ядрами, 16 Гб оперативной памяти и видеокартой, совместимой с OpenGL 2.0.
- Долговременное хранилище данных (приблизительно 2 ТБ данных на один генетический секвенатор MiSeq в год).

Рекомендации по используемым расходным реагентам

- Мастер-микс GoTaq 2X Long PCR (№ по каталогу M402A), производства Promega. Каждому образцу требуется 49 мкл мастер-микса Promega GoTaq для 7 локусов.
- Набор для определения концентрации двуцепочечной ДНК QuantiFluor dsDNA System (№ по каталогу E2670), производства Promega
- Набор для очистки продуктов ПЦР ExoSAP-IT Thermo Fisher (№ по каталогу 75001-200, 75001-1ML, 75001-4X-1ML, 75001-10ML)
 - Для каждого образца требуется 4 мкл реагента ExoSAP-IT Express
 - №75001-200 по каталогу содержит 200 мкл реагента ExoSAP-IT Express
 - №75001-1ML по каталогу содержит 1 мл реагента ExoSAP-IT Express
 - №75001-4X-1ML по каталогу содержит 4 мл реагента ExoSAP-IT Express
 - №75001-10ML по каталогу содержит 10 мл реагента ExoSAP-IT Express
- Магнитные частицы Agencourt AMPure XP (№ по каталогу A63880, A63881 или A63882), производства Beckman Coulter.

Каждый прогон Holotype HLA требует максимум 1610 мкл магнитных частиц AMPure XP

 - №A63880 по каталогу содержит 5 мл магнитных частиц AMPure XP
 - №A63881 по каталогу содержит 60 мл магнитных частиц AMPure XP
 - №A63882 по каталогу содержит 450 мл магнитных частиц AMPure XP
- Картридж с гелем, 1,5% агарозы, без красителя, с внутренним стандартным раствором (Marker K/R2) для Pippin Prep/Blue Pippin (№ по каталогу CDF1510 для Pippin Prep и BDF1510 для Blue Pippin) производства Sage Science (опционально)
- Набор для количественного анализа библиотеки – Illumina/Universal производства KAPA Biosystems (№ по каталогу KK4824)
- Аналитический набор Qubit dsDNA BR (№ в каталоге Q32850 или Q32853) производства Thermo Fisher Scientific (опционально)

- № в каталоге Q32850 с содержанием 100 образцов
- № в каталоге Q32853 с содержанием 500 образцов
- Буфер 1 X Tris-EDTA (pH 8,0)
- Полисорбат Tween 20
- Сверхчистый свободный от примесей этанол (безводный спирт)
- Сверхчистая вода (без ДНКазы и РНКазы)
- 10 н. гидроксида натрия
- Наборы реагентов для генетических секвенаторов MiSeq от Illumina (Набор реагентов ИВД MiSeq™ Dx v3 (MiSeq™ Dx Reagent Kit v3) для секвенирования нуклеиновых кислот, производства «Illumina, Inc.», США, РУ № РЗН 2020/13097 от 30.12.2020 г.)

Рекомендованные вспомогательные материалы

- Пробирки для микроцентрифугирования объемом 1,5 мл (например, «Изделия медицинские полимерные для лабораторных исследований in vitro варианты исполнения: Микроцентрифужные пробирки, градуированные объемом 1,5 мл», РУ № ФСЗ 2009/05024 от 19.12.2022).
- Пробирки для микроцентрифугирования с низкой адгезией объемом 1,5 мл (рекомендуются Пробирки Eppendorf DNA LoBind, производства «Eppendorf AG», Германия, РУ № ФСЗ 2009/04520 от 19.06.2009 (№ в каталоге 0030108051))
- Пробирки для микроцентрифугирования с низкой адгезией объемом 2,0 мл (рекомендуются Пробирки Eppendorf DNA LoBind, производства «Eppendorf AG», Германия, РУ № ФСЗ 2009/04520 от 19.06.2009 (№ в каталоге 0030108078))
- Тонкостенные пробирки объемом 0,5 мл для прибора Qubit (например, «Изделия Eppendorf из полимерных материалов для лабораторных исследований in vitro. Пробирки Safe-Lock PCR clean с защелкой, объемом от 0,5мл до 2,0мл (Safe-Lock PCR clean tubes 0,5-2,0ml)», Германия, РУ № ФСЗ 2009/04520 от 19.06.2009 (№ в каталоге 0030124537)))
- Дозаторы с переменным объемом (емкостью 1,0-1000 мкл) (например, «Пипетки-дозаторы одноканальные и многоканальные фиксированным и регулируемым объемом доз Dlab и Apexlab» РУ № РЗН 2022/18393 от 29.09.2022)
- 8-канальные дозаторы с переменным объемом (емкостью 1,0-100 мкл) (например, «Пипетки-дозаторы одноканальные и многоканальные фиксированным и регулируемым объемом доз Dlab и Apexlab» РУ № РЗН 2022/18393 от 29.09.2022)
- 96-луночные планшеты, совместимые с термоциклером (например, «Термостат электрический для проведения полимеразной цепной реакции (ПЦР) ДНК Veriti Thermal Cycler. Плашки реакционные оптические 96-луночные MicroAmp для ПЦР», производства «Life Technologies Corporation», США, РУ № ФСЗ 2011/09244 от 02.06.2017 г)
- 96-луночные оптические планшеты, совместимые с флуориметром для планшетов или измерительным прибором для qPCR (например «Посуда из полимерных материалов для лабораторных исследований in vitro. Планшеты для проведения полимеразной цепной реакции (ПЦР-диагностики) на 96 лунки, с объемом лунки от 1,0 мкл до 2,2 мл», производства «Scientific Specialties Incorporated (SSI)», США, РУ № ФСЗ 2011/10287 от 11.04.2017 г.)
- Пленка для планшетов, совместимая с термоциклерами (проверялась на ПЦР длинных фрагментов) (например, «Термостат электрический для проведения полимеразной

цепной реакции (ПЦР) ДНК Veriti Thermal Cycler. Пленка самоклеющаяся для плашек реакционных оптических 96-луночных MicroAmp для скоростной ПЦР», производства «Life Technologies Corporation», США, РУ № ФСЗ 2011/09244 от 02.06.2017 г).

- Оптически прозрачная пленка для планшетов, совместимая с измерительным прибором для qPCR (например «Посуда из полимерных материалов для лабораторных исследований in vitro. Пленки адгезивные для заклеивания ПЦР-планшетов», производства «Scientific Specialties Incorporated (SSI)», США, РУ № ФСЗ 2011/10287 от 11.04.2017 г.)
- Магнитный штатив, совместимый с пробирками для микроцентрифугирования объемом 2 мл (например, «Штатив лабораторный по ТУ 32.50.50-005-01813981-2020. Магнитный штатив для работы с пробирками объемом 1,5/2,0 мл. Артикул: MagSi», производства ООО "Компания Совтех", Россия, РУ № РЗН 2022/16856 от 19.08.2022)
- 96-луночные штативы-охладители (2 шт) (например, «Изделия медицинские лабораторные. Настольный штатив для амплификации с охлаждением Labtop Cooler», производства «Nunc A/S», Дания, РУ № ФСЗ 2012/11874 от 21.06.2016)
- Конические пробирки объемом 50 мл (например, «Пробирки медицинские полимерные по ТУ 9464-015-29508133-2014.. Пробирки конические с винтовой крышкой: 10 мл, 15 мл, 50 мл.», производства ООО "МиниМед", РУ № РЗН 2015/2596 от 13.01.2020)
- Емкости объемом 50 мл

ЮРИДИЧЕСКОЕ ПРЕДУПРЕЖДЕНИЕ

Инструкция по применению Holotype HLA 24/7 и все ее содержимое являются собственностью «Омиксон Биокomпьютинг Лтд» (Omixon) и предназначены исключительно для использования клиентом на условиях договора в отношении изделия (изделий), описанных в настоящем документе, и ни для какой другой цели. Настоящий документ и его содержание не должны использоваться или распространяться в любых других целях и/или иным образом передаваться, раскрываться или воспроизводиться каким-либо иным образом без предварительного письменного согласия компании Omixon. Компания Omixon не предоставляет посредством настоящего документа какую-либо лицензию на использование патента, товарного знака, авторских прав или прав, предоставляемых в соответствии с системой общего права, а также аналогичных прав третьих лиц.

Использование Omixon Holotype (включая программное обеспечение и анализ) регулируется условиями и положениями, которые являются частью коммерческого предложения. Условия и положения принимаются по умолчанию путем отправки заявки на заказ изделий Omixon. Лицензионное соглашение на использование продукта Omixon HLA Twin опубликовано на веб-сайте Omixon (www.omixon.com/hla-twin-eula/).

Использование только программного обеспечения Omixon HLA Twin регулируется лицензионным соглашением конечного пользователя Omixon HLA Twin (www.omixon.com/hla-twin-eula/).

Для правильного и безопасного использования продуктов Omixon все шаги, прописанные

по инструкции в этом документе, должны выполняться квалифицированным и обученным персоналом. Перед использованием продуктов Omixon необходимо полностью ознакомиться с настоящим документом.

НЕСОБЛЮДЕНИЕ ИНСТРУКЦИЙ, СОДЕРЖАЩИХСЯ В ДАННОМ ДОКУМЕНТЕ МОЖЕТ ПРИВЕСТИ К ПОВРЕЖДЕНИЮ ПРОДУКТОВ, ТРАВМАМ ПЕРСОНАЛА, В ТОМ ЧИСЛЕ ПОЛЬЗОВАТЕЛЕЙ ИЛИ ТРЕТЬИХ ЛИЦ, МАТЕРИАЛЬНОМУ УЩЕРБУ.

КОМПАНИЯ ОМІХОН НЕ НЕСЕТ ОТВЕТСТВЕННОСТИ ЗА НЕПРАВИЛЬНОЕ ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ПРОДУКТОВ, ОПИСАННЫХ В ДАННОМ ДОКУМЕНТЕ (ВКЛЮЧАЯ ИХ ЧАСТЕЙ ИЛИ ПРОГРАММНОЕ ОБЕСПЕЧЕНИЕ) ИЛИ ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ТАКИХ ПРОДУКТОВ ЗА ПРЕДЕЛАМИ ДЕЙСТВИЯ ПРЯМЫХ ПИСЬМЕННЫХ ЛИЦЕНЗИЙ ИЛИ РАЗРЕШЕНИЙ, ПРЕДОСТАВЛЕННЫХ КОМПАНИЕЙ ОМІХОН, В СЛЕДСТВИЕ ПРИОБРЕТЕНИЯ КЛИЕНТОМ ТАКИХ ПРОДУКТОВ.

О любом серьезном происшествии, которое произошло в связи с использованием продукта Omixon Holotype HLA, следует немедленно сообщить в компанию Omixon по адресу support@omixon.com и в компетентный орган государства, членом которого является пострадавший пользователь и/или пациент.

ТОЛЬКО ДЛЯ ДИАГНОСТИЧЕСКОГО ПРИМЕНЕНИЯ *IN VITRO*

© 2023 «Омиксон Биокomпьютинг Лтд» Все права защищены

ВАЖНОЕ ЗАМЕЧАНИЕ ПЕРЕД НАЧАЛОМ РАБОТЫ

Рекомендации по выделению геномной ДНК

Геномная ДНК человека выделяется из периферической крови, с использованием проверенных и зарекомендовавших себя наборов для выделения ДНК. Вне зависимости от выбранного подхода, для надежного проведения анализа требуется точное определение концентрации и чистоты выделенной ДНК.

ДНК не должна содержать примесей, которые могли бы повлиять на последующие операции по амплификации, подготовке библиотеки и секвенированию (например, спирта, солей, моющих средств, формальдегида и гепарина). Забор крови не следует проводить в пробирки с гепарином. Также не следует использовать образцы крови пациентов, проходящих гепариновую терапию, образцы липемичной и гемолизированной крови.

Подготовленную геномную ДНК, разведенную в воде без нуклеаз, можно использовать немедленно либо хранить в течение длительного времени при температуре -20°C и ниже. Мы рекомендуем использовать для подготовки геномной ДНК именно воду, так как ЭДТА в ТЕ-буфер могут ингибировать реакции ПЦР длинных фрагментов. Следует избегать повторных циклов замораживания и оттаивания, чтобы избежать деградации ДНК.

Для получения 80-120 нг входной геномной ДНК на амплификацию ПЦР настоятельно рекомендуется использовать концентрацию ДНК 20-30 нг/мкл. Для определения концентрации геномной ДНК мы рекомендуем использовать флуоресцентный метод.

Настоятельно рекомендуется использовать коэффициент поглощения 1,7-2 для соотношений 260 нм/280 нм и 260 нм/230 нм. Для амплификации генов HLA-A, HLA-B, HLA-C, HLA-DRB1, HLA-DPB1, HLA-DQA1 и HLA-DQB1 требуется 560-840 нг геномной ДНК образца.

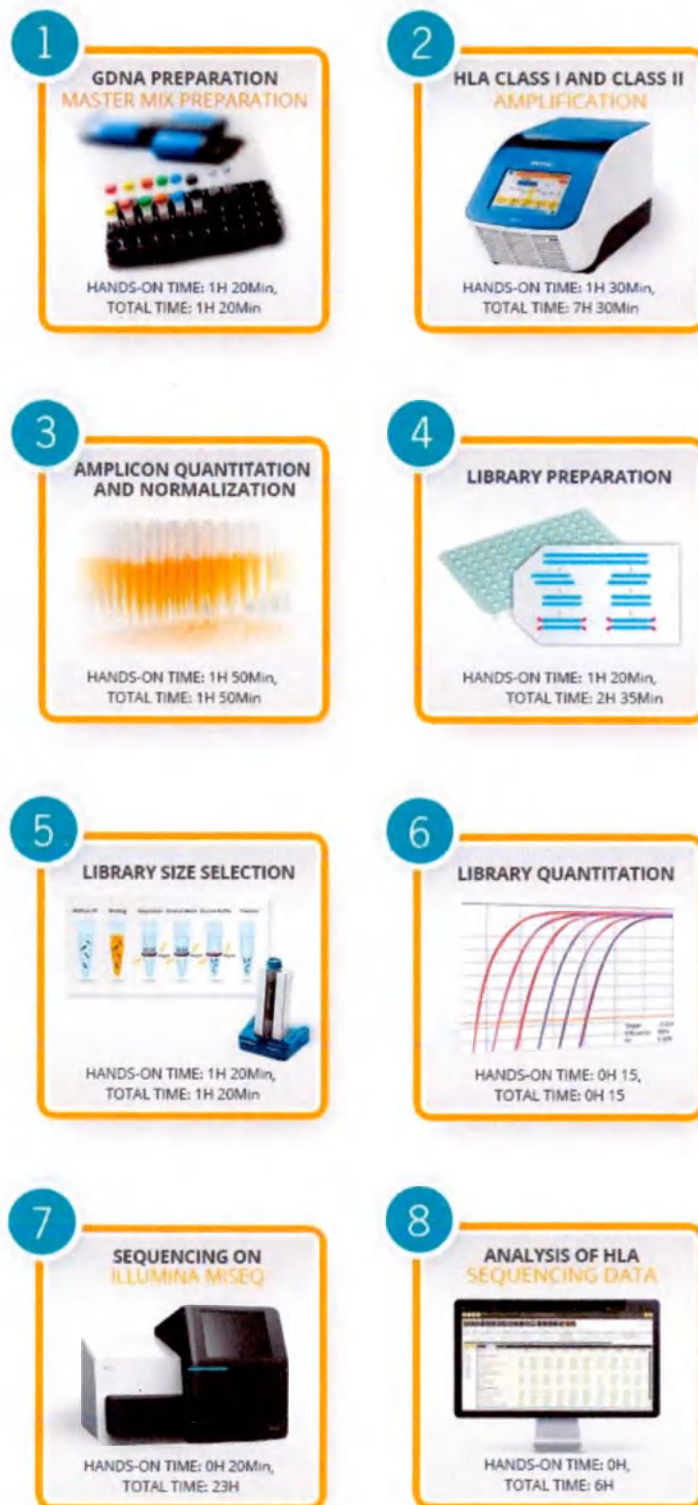
Утвержденные термоциклеры

Для всех наборов Holotype HLA 24/7, конфигураций A1/A2/A3/A4 была проведена валидация на следующих термоциклерах:

- Термостат электрический для проведения полимеразной цепной реакции (ПЦР) ДНК Veriti Thermal Cycler, вариант исполнения Veriti 96-Well Thermal Cycle, производства «Life Technologies Corporation», США, РУ № ФСЗ 2011/09244 от 02.06.2017 г.
- Термостат электрический для проведения полимеразной цепной реакции (ПЦР) амплификации ДНК, модели GeneAmp PCR System 9700, производства «Applied Biosystems Group of The Applera Corporation», Сингапур.

Скорость линейного изменения для обоих аппаратов была максимальной.

КРАТКОЕ ИЗЛОЖЕНИЕ ШАГОВ



ГЛОССАРИЙ/ОПРЕДЕЛЕНИЯ

- Планшет для ампликонов - альтернативное название для планшета для амплификации
- Планшет для количественного анализа ампликонов - 96-луночный планшет, совместимый с флуориметром для планшетов, где производится количественный анализ разведенных ампликонов
- Планшет для амплификации - 96-луночный планшет для ПЦР, использующийся для амплификации локусов HLA
- Свободные от примесей пулы ампликонов - планшеты, содержащие все пулированные ампликоны после очистки от примесей при помощи микроносителей
- Библиотека образца — библиотека, подготовленная с помощью комбинирования (пулирования) всех локусов HLA для данного образца
- Планшет для реакции: планшет, на котором проводятся последовательные реакции с фрагментацией, обработкой концов и лигированием индексированных адаптеров к библиотекам образца
- Планшет для реагентов - планшет, используемый для разделения на аликвоты различных реагентов, используемых для приготовления библиотек образцов
- Окончательная библиотека - библиотека, включающая все библиотеки образцов, готовые к секвенированию за один сеанс обработки на MiSeq
- Планшет для количественного анализа стандартных растворов - 96-луночный планшет, совместимый с флуориметром для планшетов или устройством для qPCR, куда стандартные растворы ДНК помещаются для количественного анализа ампликонов

ШАГ 0 - НОРМАЛИЗАЦИЯ ГЕНОМНОЙ ДНК

Длительность: ~20 минут



См. Рабочую тетрадь: вкладка подготовки геномной ДНК
(Refer to Workbook: gDNA preparation tab)

Выделите геномную ДНК из биологических образцов. Геномная ДНК должна быть разведена в воде без нуклеаз либо ТЕ-буфере с низким содержанием солей, поскольку высокое содержание ЭДТА в ТЕ-буфере может ингибировать ПЦР длинных фрагментов. Для определения концентрации геномной ДНК мы настоятельно рекомендуем использовать флуоресцентный метод.

Качество геномной ДНК должно соответствовать следующим показателям:

1. 260 нм/280 нм поглощающая способность между 1,7 и 1,9.
2. 260 нм/230 нм поглощающая способность 1,7 и выше.
3. Минимальный распад. Старая ДНК или ДНК, прошедшая несколько циклов заморозки/разморозки будет иметь больший распад.

Для амплификации генов HLA-A, HLA-B, HLA-C, HLA-DRB1, HLA-DPB1, HLA-DQA1 и HLA-DQB1 требуется 560-840 нг геномной ДНК для каждого образца.

Протокол

1. Разведите геномную ДНК до концентрации 20-30 нг/мкл (минимальный объем 44 мкл) в 96-луночном ПЦР-планшете или 8-луночных стрипах. Обратитесь к рабочей тетради, чтобы рассчитать необходимые объемы.
2. Закройте планшет/стрипы и отложите нормализованные образцы геномной ДНК до Шага 2.

ШАГ 1 - ПОДГОТОВКА МАСТЕР-МИКСА ДЛЯ АМПЛИФИКАЦИИ HLA

Длительность: ~15 минут



См. рабочую тетрадь: Вкладка подготовки ПЦР
(Refer to Workbook: PCR preparation tab)

Данный шаг предназначен для подготовки мастер-миксов для каждого локуса HLA с целью индивидуальной амплификации этого локуса. Локусы, подвергающиеся амплификации по данному протоколу: HLA-A, HLA-B, HLA-C, HLA-DRB1, HLA-DPB1, HLA-DQA1 и HLA-DQB1.

Список реагентов

Позиция	Хранение	Поставлен о
Смесь праймеров HLA-A	-20 °C	Omixon
Смесь праймеров HLA-B	-20 °C	Omixon
Смесь праймеров HLA-C	-20 °C	Omixon
Смесь праймеров HLA-DRB1	-20 °C	Omixon
Смесь праймеров HLA-DPB1	-20 °C	Omixon
Смесь праймеров HLA-DQA1	-20 °C	Omixon
Смесь праймеров HLA-DQB1 (Набор 3)	-20 °C	Omixon
Реактив для усиления амплификации 1 (Enhancer 1)	-20 °C	Omixon
Мастер-микс Promega GoTaq 2X Long PCR	-20°C	Promega
Вода для молекулярной биологии (без ДНКаза и РНКазы)	-20°C	Пользователь

Протокол

1.1 Вытащите все смеси праймеров, реактив для усиления амплификации 1 (Enhancer 1) и мастер-миксы Promega GoTaq 2X Long PCR из морозильника и дайте оттаять при комнатной температуре.



Примечание: Мастер-микс Promega GoTaq 2X Long PCR содержит термостабильную ДНК-полимеразу с горячим стартом, поэтому он не требует хранения на льду.

1.2 Тщательно перемешайте все пробирки со смесью праймеров и мастер-миксами Promega GoTaq 2X PCR на вортексе в течение 5 секунд, а затем центрифугируйте их в течение 5 секунд с помощью функции быстрого центрифугирования (quick spin). Подготовьте мастер-микс для каждой смеси праймеров в соответствии с таблицами ниже (для

количества менее 24 образцов используйте рабочую тетрадь Excel для расчета объемов):

Мастер-микс: HLA-A, B, C, DRB1, DPB1 и DQA1

Реагент	Объем/образец/локус	Объем/24 образца/локус
Вода для молекулярной биологии (без ДНКазы и РНКазы)	7,5 мкл	195 мкл
Мастер-микс Promega GoTaq 2X Long PCR	7 мкл	182 мкл
Смесь праймеров	1,5 мкл	39 мкл
Общий объем	16 мкл	416 мкл

Мастер-микс: HLA-DQB1 Набор 3

Реагент	Объем/образец/локус	Объем/24 образцов/локус
Вода для молекулярной биологии (без ДНКазы и РНКазы)	5,5 мкл	143 мкл
Мастер-микс Promega GoTaq 2X Long PCR	7 мкл	182 мкл
Реактив для усиления амплификации 1 (Enhancer 1)	2 мкл	52 мкл
Смесь праймеров	1,5 мкл	39 мкл
Общий объем	16 мкл	416 мкл

- 1.3 Перемешайте каждую пробирку с мастер-миксом на вортексе в течение 5 секунд и центрифугируйте их в течение 5 секунд с помощью функции быстрого центрифугирования (quick spin).



Примечание: Набор Holotype HLA содержит достаточный объем реагентов для 24 реакций плюс дополнительный объем, предусматривающий потери при пипетировании и неудачной амплификации.

ШАГ 2 – АМПЛИФИКАЦИЯ HLA КЛАССА I и II

Длительность: ~ 6 часов



См. рабочую тетрадь: Вкладка с разметкой планшетов
(Refer to Workbook: Plate maps tab)

Шаг 2 предназначен для амплификации локусов HLA. Для амплификации локусов HLA класса I и II оптимизированы разные условия для проведения ПЦР. После выполнения реакций ПЦР амплификация подтверждается электрофорезом в агарозном геле (опционально).



Подсказка – хотя и рекомендуется проводить электрофорез в агарозном геле, он не является необходимым условием для успешного выполнения протокола Holotype HLA. Амплификация считается успешной, если при подсчете ампликонов (шаг 3) концентрация выше 50 нг/мкл.

Список реагентов

Позиция	Хранение	Поставлено
Мастер-микс HLA-A	-20 °C	Шаг 1
Мастер-микс HLA-B	-20 °C	Шаг 1
Мастер-микс HLA-C	-20 °C	Шаг 1
Мастер-микс HLA-DRB1	-20 °C	Шаг 1
Мастер-микс HLA-DPB1	-20 °C	Шаг 1
Мастер-микс HLA-DQA1	-20 °C	Шаг 1
Мастер-микс HLA-DQB1 (Набор 3)	-20 °C	Шаг 1
геномная ДНК	4 °C	Пользователь

Протокол

- 2.1 Внесите аликвоты от каждого мастер-микса в размере 16 мкл в отдельные лунки 96-луночного планшета для ПЦР.



Примечание: Для амплификации локусов HLA класса I и II были оптимизированы разные условия ПЦР, поэтому мастер-миксы отдельных классов I и II не должны присутствовать на одном планшете.

- 2.2 Добавьте 4 мкл каждого образца разведенной геномной ДНК в соответствующую лунку на планшетах, подготовленных в предыдущем шаге. Аккуратно перемешайте пипетированием.
- 2.3 Закройте планшет термической пленкой и осмотрите каждую лунку. Центрифугируйте все планшеты для амплификации в течение 5 секунд с помощью функции быстрого центрифугирования (quick spin).

2.4 Поместите планшеты для амплификации в термоциклеры и запустите программы амплификации класса I и II согласно следующим таблицам:

Амплификация класса I (HLA-A, B и C)

Количество циклов	Температура	Время
1	95 °C	2 минуты
40	95 °C	15 секунд
	65 °C	30 секунд
	68 °C	4 минуты
	68 °C	10 минут
1	4 °C	∞

Амплификация класса II (HLA-DRB1, DPB1, DQA1 и DQB1)

Количество циклов	Температура	Время
1	95 °C	2 минуты
40	95 °C	15 секунд
	65 °C	30 секунд
	68 °C	8 минут
	68 °C	10 минут
1	4 °C	∞

Ожидаемые размеры ампликонов

Локус HLA	Ожидаемый размер ампликона (т.н.)
HLA-A, B и C	~3
HLA-DRB1	~4,3
HLA-DPB1	~6,6
HLA-DQA1	~5,5
HLA-DQB (Набор 3)	~6,5



Примечание: Успешность амплификации можно проверить, прогнав каждый ампликон через стандартный 2% агарозный гель при 250 В на протяжении 30 минут (опционально).



Безопасная точка остановки. Ампликоны можно хранить при 4 °C одну ночь или при -20 °C на протяжении 3 месяцев.

Шаг 3 – КОЛИЧЕСТВЕННЫЙ АНАЛИЗ И НОРМАЛИЗАЦИЯ АМПЛИКОНА (ДЛЯ ПЛАНШЕТОВ ЕМКОСТЬЮ 200 МКЛ)

Длительность: ~ 30 минут



См. рабочую тетрадь: Вкладка количественного анализа ампликонов (Refer to Workbook: Amplicon quantitation tab)

Концентрация ампликона измеряется с помощью системы QuantiFluor dsDNA, которая содержит флуоресцентный ДНК-связывающий краситель и стандарт ДНК для точного количественного анализа малых объемов двухцепочечной ДНК (dsDNA).

Инструкцию по количественному анализу ампликонов в планшетах емкостью 100 мкл см в Приложении 1.

Примечание: Количественное определение ампликонов не является обязательным шагом, но мы рекомендуем его для оптимальной подготовки последующей библиотеки. Оценка концентрации ампликонов также может быть проведена после тщательной внутренней проверки с помощью электрофореза в агарозном геле. Шаг количественной оценки ампликонов не стоит пропускать при отсутствии опыта работы с протоколами Hologate HLA.

Список реагентов

Позиция	Хранение	Поставлено
Планшет для амплификации класса I	4 °C	Шаг 2
Планшеты для амплификации класса II	4 °C	Шаг 2
Lambda DNA Standard (100 нг/мкл)	4 °C	Promega
Краситель QuantiFluor dsDNA (200x)	4 °C	Promega
буфер 20x TE (pH 7.5)	4 °C	Promega
Вода для молекулярной биологии (без ДНКазы и РНКазы)	от 20 °C до 25 °C	Пользователь

Протокол

- 3.1 Подготовьте стандарты ДНК путем серийного разведения реагента Lambda DNA standard (100 нг/мкл), входящего в состав набора QuantiFluor, согласно таблице ниже:

Этикетка на пробирке	Исходная ДНК	Объем ДНК (мкл)	Объем 1х ТЕ (мкл)	Конеч. конц. (нг/мкл)
Стандарт 1	Lambda DNA	7,5 мкл	492,5 мкл	1,5 нг/мкл
Стандарт 2	Стандарт 1	250 мкл	250 мкл	0,75 нг/мкл
Стандарт 3	Стандарт 2	250 мкл	250 мкл	0,38 нг/мкл
Стандарт 4	Стандарт 3	250 мкл	250 мкл	0,19 нг/мкл
Стандарт 5	Стандарт 4	250 мкл	250 мкл	0,09 нг/мкл
Стандарт 6	Стандарт 5	250 мкл	250 мкл	0,05 нг/мкл
Холостая проба	Холостая проба	0 мкл	250 мкл	0 нг/мкл

- 3.2 Подготовьте планшеты для количественного анализа ампликонов (см. дополнительные иллюстрации). Добавьте 99 мкл 1х буфера ТЕ в лунки 96-луночного оптически прозрачного планшета.
- 3.3 Добавьте 1 мкл ампликонов из соответствующих лунок планшета для ампликонов в отдельные лунки на планшетах для количественного анализа ампликонов. Аккуратно перемешайте пипетированием.
- 3.4 Подготовьте раствор 1х рабочего красителя QuantiFluor Dye по следующей формуле: 0,5 мкл QuantiFluor Dye (200X) + 99,5 мкл 1х буфера ТЕ. Подготовленного раствора 1х QuantiFluor должно хватать на каждый образец в планшетах с ампликонами и стандарты (всего 14) из расчета 100 мкл на образец.
- 3.5 Подготовьте планшеты для количественного анализа стандартных растворов и ампликонов. Добавьте 100 мкл рабочего раствора 1х QuantiFluor Dye из шага 3.2 в лунки 96-луночного оптического планшета (планшет для количественного анализа стандартов) и в планшеты для количественного анализа ампликонов.
- 3.6 Добавьте 100 мкл каждого стандарта, подготовленных выше, в двух повторностях в отдельные лунки планшета для количественного анализа стандартов (всего 14 лунок). Аккуратно перемешайте пипетированием.
- 3.7 Перемешайте в вортексе в течение 5 секунд и осадите методом центрифугирования (на высокой скорости).
- 3.8 Инкубируйте пробы в течение 5 минут при комнатной температуре в защищенном от света месте.
- 3.9 Проверьте концентрацию стандартов в планшете с помощью флуориметра или qPCR амплификатора, аналогично проверьте концентрацию ампликонов. Используйте следующий режим на qPCR амплификаторе (в зависимости от модели анализатора может потребоваться настройка параметров):

Количество циклов	Температура	Время
1	25 °C	10 секунд
2	25 °C	15 секунд
	25 °C	30 секунд (операции сбора данных)

- 3.10 Рассчитайте концентрацию ДНК в планшетах для количественного анализа

ампликонов, используя технические возможности флуориметра или qPCR амплификатора. Для помощи в расчетах см. вкладку "Разведение" (Dilution) в предоставленной рабочей тетради.

3.11 Разведите ДНК в планшетах с ампликонами водой для молекулярной биологии (без ДНКазы и РНКазы), чтобы конечная концентрация ДНК находилась в пределах 50-120 нг/мкл.

- Если концентрация ДНК составляет 180 нг/мкл или выше: добавьте 20 мкл H₂O
- Если концентрация ДНК составляет 115-180 нг/мкл или выше: добавьте 10 мкл H₂O
- Если концентрация ДНК составляет 115 нг/мкл или выше: не добавляйте H₂O



Безопасная точка остановки. Ампликоны можно хранить при 4 °C одну ночь или при -20 °C на протяжении 3 месяцев.

ШАГ 4 – ПУЛИРОВАНИЕ И ОЧИСТКА АМПЛИКОНОВ С ПОМОЩЬЮ EXOSAP-IT EXPRESS

Длительность: ~5 минут



См. рабочую тетрадь: Вкладка подготовки библиотеки
(Refer to Workbook: Library preparation tab)

Список реагентов

Позиция	Хранение	Поставлено
Планшеты для нормализованной амплификации класса I	4° C	Шаг 3
Планшеты для нормализованной амплификации класса II	4° C	Шаг 3
Набор для очистки продуктов ПЦР ExoSAP-IT	20° C	Affymetrix

Протокол

- 4.1 Объедините все локусы для каждого образца в лунки одного планшета с ампликонами. Смешайте объемы, указанные для каждого локуса, согласно следующей таблице, чтобы получить окончательный объем в 38 мкл:

Локус HLA	Пулированный объем
A	3 мкл
B	3 мкл
C	3 мкл
DQA1	6 мкл
DPB1	7 мкл
DQB1	7 мкл
набор 3	
DRB1	9 мкл

- 4.2 Добавьте 4 мкл реагента из набора для очистки продуктов ПЦР ExoSAP-IT в каждую библиотеку образцов. Аккуратно промойте наконечник от остатков путем пипетирования. Запечатайте планшет пленкой. Центрифугируйте планшет в течение 10 секунд с помощью функции быстрого центрифугирования (quick spin).
- 4.3 Поместите планшет с объединенными ампликонами в термоциклер и запустите следующую программу:

Количество циклов	Температура	Время
1	37 °C	4 минуты
1	80 °C	1 минута
1	4 °C	∞



Безопасная точка остановки. Пулы очищенных ампликонов можно хранить при 4°C одну ночь или при -20°C на протяжении 3 месяцев.

ШАГ 5 – ПОДГОТОВКА БИБЛИОТЕКИ

Длительность: ~2 часа



См. рабочую тетрадь: Вкладка подготовки библиотеки
(Refer to Workbook: Library preparation tab)

На этой стадии пулированные ампликоны подготавливаются к секвенированию на платформе Illumina MiSeq. Ампликоны ферментативно фрагментируются, концы репарируются и аденилируются и к ним присоединяются индексированные адаптеры.



Примечание: Omixon рекомендует использовать объемы больше чем необходимо для анализа 24 образцов, потому что многие ферменты и буферы имеют вязкую структуру, что приводит к излишним потерям при пипетировании. Также рекомендуется использовать планшет с реагентами на более чем 8 лунок. 96-луночный планшет с реагентами помещается в 96-луночный штатив-охладитель, где каждый мастер-микс разделяется на аликвоты в чистую колонку для дозирования многоканальной пипеткой.

Список реагентов

Позиция	Хранение	Поставлено
Пулы очищенных ампликонов	4 °C	Шаг 4
Вода для молекулярной биологии (без ДНКазы и РНКазы)	от 20 °C до 25 °C	Пользователь
Фермент для фрагментирования (A)	-20 °C	Omixon
Буфер для фрагментирования (B)	-20 °C	Omixon
Фермент для обработки концов (C)	-20 °C	Omixon
Буфер для обработки концов (D)	-20 °C	Omixon
Фермент для лигирования (E)	-20 °C	Omixon
Буфер для лигирования (F)	-20 °C	Omixon
Планшет с адаптерами	-20 °C	Omixon

Протокол

- Включите термоциклер. Убедитесь, что крышка нагревается. Запустите программу фрагментации из пункта 10 и продолжайте подготовку реакции фрагментации.
- Разморозьте буфер для фрагментации до комнатной температуры и оставьте его на льду.



Примечание: Тщательно перемешайте фермент для фрагментирования (A) в вортексе (30 секунд) перед использованием. Центрифугируйте на протяжении 5

секунд с помощью функции быстрого центрифугирования (quick spin) и положите на лед.

- 5.3 Подготовьте мастер-микс для фрагментации согласно таблице ниже (если образцов меньше 24, см. в рабочей тетради Excel информацию по расчету объемов):

Мастер-микс для фрагментации

Реагент	Объем на библиотеку (мкл)	Рекомендованные объемы для библиотек на 24 образца (мкл)	Цветовой код
Вода для молекулярной биологии (без ДНКазы и РНКазы)	2 мкл	56 мкл	
Буфер для фрагментирования (B)	2 мкл	56 мкл	Красный
Фермент для фрагментирования (A)	1 мкл	28 мкл	Желтый
Общий объем	5 мкл	140 мкл	



Примечание: Реакция фрагментации была разработана для получения ДНК идеального размера для секвенирования на платформе Illumina. Важно, чтобы реагенты оставались холодными до начала реакции в термоциклере во избежание излишней фрагментации. Для минимизации излишней фрагментации рекомендуется использовать многоканальные пипетки.

- 5.4 Тщательно перемешайте мастер-микс для фрагментации в вортексе (5 секунд) и осадите посредством центрифугирования 5 секунд (quick spin). Поместите мастер-микс для фрагментации на лед. Запустите программу фрагментации в термоциклере и поддерживайте предварительный нагрев блока при подготовке реакции.
- 5.5 Центрифугируйте пулы очищенных ампликонов 5 секунд (quick spin) и поместите их на лед или на штатив-охладитель.
- 5.6 Подготовьте планшет для реакции: поместите новый 96-луночный планшет для ПЦР на штатив-охладитель.
- 5.7 Добавить 5 мкл мастер-микса для фрагментации в пустые лунки планшета для реакции в соответствии с образцами в планшете пулированных ампликонов. Рекомендуется использовать многоканальные пипетки.
- 5.8 Перенесите 15 мкл каждого пула ампликонов из планшета с пулами очищенных ампликонов в соответствующие лунки на планшет для реакции с помощью многоканальной пипетки. Смешайте посредством пипетирования. Оставьте планшет для реакции на штативе-охладителе.
- 5.9 Закройте планшет для реакции термической пленкой и центрифугируйте его на протяжении 5 секунд (quick spin).
- 5.10 Перенесите планшет для реакции в термоциклер, затем нажмите <Пропустить шаг>.

чтобы немедленно возобновить программу фрагментации::

Программа фрагментации

Количество циклов	Температура	Время
1	37 °C	∞
1	37 °C	10 минут
1	70 °C	15 минут
1	4 °C	∞



Безопасная точка остановки. Библиотеки можно хранить при 4 °C одну ночь или при -20 °C более длительное время.

- 5.11 Разморозьте Буфер для обработки концов и подготовьте мастер-микс для обработки концов согласно таблице ниже (если образцов меньше 24, см. в рабочей тетради Excel информацию по расчету объемов):

Мастер-микс для обработки концов

Реагент	Объем на библиотеку (мкл)	Рекомендованные объемы для библиотек на 24 образца (мкл)	Цветовой код
Вода для молекулярной биологии (без ДНКазы и РНКазы)	1,25 мкл	35 мкл	
Буфер для обработки концов (D)	2,5 мкл	70 мкл	Оранжевый
Фермент для обработки концов (C)	1,25 мкл	35 мкл	Зеленый
Общий объем	5 мкл	140 мкл	

- 5.12 Перемешайте мастер-микс для обработки концов в вортексе и осадите посредством центрифугирования на протяжении 5 секунд (quick spin). Держите мастер-микс на льду до использования.
- 5.13 Центрифугируйте планшет (содержащий фрагментированные образцы) для реакции на протяжении 5 секунд. Добавьте 5 мкл мастер-микса для обработки концов в каждую лунку планшета для реакции и перемешайте посредством пипетирования. Рекомендуется использовать многоканальные пипетки.
- 5.14 Закройте планшет для реакции термической пленкой и центрифугируйте его на протяжении 5 секунд (quick spin).
- 5.15 Инкубируйте планшет для реакции в термоциклере по следующей программе:

Программа обработки концов

Количество циклов	Температура	Время
1	20 °C	30 минут
1	70 °C	5 минут
1	4 °C	∞



Безопасная точка остановки. Библиотеки можно хранить при 4 °C одну ночь или при -20 °C более длительное время.

- 5.16 Извлеките планшет с индексированными адаптерами и дайте ему разморозиться до комнатной температуры после запуска программы обработки концов в термоциклере. После того как планшет с адаптерами нагреется до комнатной температуры, центрифугируйте его на протяжении 1 минуты на скорости 3000 об/мин.
- 5.17 Аккуратно снимите пленку с планшета с адаптерами. После снятия пленки не встряхивайте планшет во избежание перекрестного загрязнения.
- 5.18 Перенесите 5 мкл из каждой лунки планшета с адаптерами в соответствующие лунки на планшета для реакции. Перемешайте посредством пипетирования. Для остальных шагов данного протокола используйте планшет для реакции.



Примечание: Если вы НЕ собираетесь использовать планшет с адаптерами целиком, можно использовать только необходимое количество адаптеров. Разрежьте пленку между теми лунками, которые вы собираетесь использовать, и теми, которые хотите оставить. Аккуратно снимите пленку с планшета с адаптерами, оставив ее только на тех лунках, которые не предполагается использовать.

- a. Перенесите 5 мкл из каждой лунки планшета с адаптерами в соответствующие лунки на планшета для реакции и перемешайте посредством пипетирования.
 - b. Закройте планшет с адаптерами и верните его на хранение при -20°C. Для остальных шагов, описанных в руководстве, используйте планшет для реакции.
- 5.19 Разморозьте буфер для лигирования и подготовьте мастер-микс для лигирования согласно таблице ниже (если образцов меньше 24, см. в рабочей тетради Excel информацию по расчету объемов):

Мастер-микс для лигирования

Реагент	Объем на библиотеку (мкл)	Рекомендованные объемы для библиотек на 24 образца (мкл)	Цветовой код
Буфер для лигирования (F)	30 мкл	840 мкл	Черный
Фермент для лигирования (E)	2,5 мкл	70 мкл	Синий
Общий объем	32,5 мкл	910 мкл	

5.20 Тщательно перемешайте мастер-микс для лигирования в вортке (5 секунд) и осадите посредством центрифугирования 5 секунд (quick spin).

5.21 Добавить 32,5 мкл мастер-микса для лигирования в каждую лунку в планшете для реакции. Рекомендуется использовать многоканальные пипетки. Смешайте посредством пипетирования.

5.22 Закройте планшет для реакции термической пленкой и центрифугируйте его на протяжении 5 секунд (quick spin).

5.23 Инкубируйте планшет для реакции в термоциклере по следующей программе:

Программа лигирования

Количество циклов	Температура	Время
1	25 °C	30 минут
1	70 °C	10 минут
1	4 °C	∞



Безопасная точка остановки. Библиотеки можно хранить при 4 °C одну ночь или при -20 °C более длительное время.

Пулирование библиотеки

5.24 Создайте окончательную библиотеку, совместив аликвоту из каждого пулированного ампликона и библиотеку отдельного образца в 2 мл центрифужной пробирке с низкой адгезией.

- I. **При количестве образцов 16 и более** – рассчитайте объем библиотеки каждого образца для пулирования их в одну **Библиотеку** общим объемом 900 мкл. Разделите 900 мкл на количество библиотек образцов. Это объем аликвоты, который необходимо взять из каждой библиотеки образцов и пипетировать в Библиотеку.
- II. **При количестве образцов менее 16** – перенесите 60 мкл из библиотеки каждого образца в пробирку со слабой адгезией объемом 2,0 мл, которая будет содержать пулированную Библиотеку.

Для выбора размера Библиотеки с использованием магнитных частиц AMPure XP

перейдите к шагу 6. Для выбора размера Библиотеки с использованием Pirpin Prep перейдите к Приложению 2.

ШАГ 6 - ВЫБОР РАЗМЕРА БИБЛИОТЕКИ ПРИ ПОМОЩИ МИКРОНОСИТЕЛЕЙ

Длительность: ~1 час 20 минут



См. рабочую тетрадь: Вкладка подготовки библиотеки
(Refer to Workbook: Library preparation tab)

В шаге 6 описывается протокол выбора размера одного пула индексированных библиотек образцов с использованием магнитных частиц AMPure XP. Микроносители Agencourt AMPure XP используют технологию обратимой твердофазной иммобилизации для связывания ДНК определенного размера к магнитным частицам в пропорции частица/образец (об./об.). При меньших соотношениях частиц (0.2X- 0.8X) привязываются более крупные фрагменты ДНК, оставляя в растворе фрагменты меньшего размера. При увеличении соотношения частица/образец (1X – 2X) микроносители могут привязывать к себе также и фрагменты меньшего размера.

Список реагентов

Позиция	Хранение	Поставлено
Общая библиотека	4° C	Шаг 5
Реагент для очистки продуктов ПЦР AMPure XP	4° C	производства Beckman Coulter
1X Tris-EDTA	от 20°С до 25°С	Пользователь
Tween 20	от 20°С до 25°С	Пользователь
80% этанол (свежеприготовленный)	от 20°С до 25°С	Пользователь
Вода для молекулярной биологии (без ДНКазы и РНКазы)	от 20°С до 25°С	Пользователь



Примечание: Следующий протокол написан для библиотек, содержащих минимум 12 образцов, где объем пула составляет 700 мкл. Если ваша пулированная библиотека составляет менее 700 мкл, см. в рабочей тетради Excel инструкции по расчету объемов, либо используйте следующие пропорции:

Библиотека: Соотношение частиц	
Первый отбор	1 : 0,2
Второй отбор	1 : 1
Третий отбор	Всегда фиксировано

Протокол

Подготовка реагента:

6.1 Подготовьте буфер для очистки частиц согласно следующей таблице:

Реагент	Объем
1X Tris-EDTA	40 мл
Tween 20	20 мкл
Общий объем	40,02 мл



Примечание: Буфер для очистки частиц может храниться при комнатной температуре до 3 месяцев.

- 6.2 Подготовьте 5 мл свежего 80%-го этанола (4 мл EtOH + 1 мл H₂O).
- 6.3 **Тщательно** перемешайте магнитные частицы AMPure XP в вортексе (30 секунд).
- 6.4 Разделите магнитные частицы AMPure XP на аликвоты по 840 мкл в пробирки со слабой адгезией объемом 2 мл и **нагрейте их до комнатной температуры**. Для использования в третьем отборе, описанном ниже, частицы AMPure должны быть комнатной температуры.
- 6.5 Добавьте 840 мкл буфера очистки к магнитным частицам, разделенным на аликвоты. Тщательно перемешайте в вортексе 10 секунд. Осадите посредством центрифугирования на протяжении 5 секунд (quick spin).
- 6.6 Инкубируйте на протяжении 1 минуты при комнатной температуре.
- 6.7 Установите пробирку на магнитный штатив на 2 минуты или до момента, пока раствор не станет прозрачным (обычно не более 4 минут).
- 6.8 Аккуратно удалите и выбросьте надосадочную жидкость. Будьте аккуратны и не заденьте частицы.
- 6.9 Добавьте 840 мкл буфера очистки частиц к частицам. Тщательно перемешайте в вортексе в течение 10 секунд. Осадите посредством центрифугирования на протяжении 5 секунд (quick spin).
- 6.10 Инкубируйте на протяжении 1 минуты при комнатной температуре.
- 6.11 Перемешайте частицы в вортексе в течение 10 секунд до перерастворения и разделите их на аликвоты по 140 мкл в чистые пробирки с низкой адгезией объемом 2 мл. *При использовании менее 12 образцов см. используемый объем частиц в рабочей тетради Excel.*
- 6.12 **ОСТАВЬТЕ** остальные 700 мкл частиц в буфере очистки для второго отбора.

Первый отбор:

- 6.13 Поместите пробирку с 140 мкл частиц в буфере очистки на магнитный штатив на 2

минуты. При использовании менее 12 образцов см. используемый объем частиц в рабочей тетради Excel.

- 6.14 Аккуратно удалите и выбросьте надосадочную жидкость. Снимите пробирку со штатива.
- 6.15 Добавьте к частицам **700 мкл** пулированной библиотеки. – Перемешайте в вортексе в течение 5 секунд и осадите посредством центрифугирования на протяжении 5 секунд (quick spin). При использовании менее 12 образцов см. используемый объем пулируемой библиотеки в рабочей тетради Excel.
- 6.16 Инкубируйте при комнатной температуре в течение 5 минут.
- 6.17 Снова установите пробирку на магнитный штатив на 4 минуты, чтобы частицы осели.
- 6.18 **СОБЕРИТЕ надосадочную жидкость (библиотека)** в чистую пробирку с низкой адгезией объемом 2 мл.

Второй отбор:

- 6.19 Поместите пробирку с 700 мкл магнитных частиц в буфере очистки на магнитный штатив на 2 минуты, чтобы частицы осели. Аккуратно удалите и выбросьте надосадочную жидкость. При использовании менее 12 образцов см. используемый объем частиц в рабочей тетради Excel.
- 6.20 Снимите пробирку с частицами со штатива.
- 6.21 Добавьте надосадочную жидкость из библиотеки, собранную в первом отборе, шаг 5.18, к частицам.
- 6.22 Тщательно перемешать в вортексе в течение 10 секунд до перерастворения частиц. Осадите посредством центрифугирования на протяжении 5 секунд (quick spin).
- 6.23 Инкубируйте при комнатной температуре в течение 5 минут.
- 6.24 Снова установите пробирку на магнитный штатив на 4 минуты, чтобы частицы осели.
- 6.25 Аккуратно удалите и выбросьте надосадочную жидкость.
- 6.26 Добавьте ~0,7-1 мл свежеприготовленного 80%-го этанола в пробирку, пока она находится на магнитном штативе. Объем должен быть таким, чтобы покрыть частицы.
- 6.27 Инкубируйте пробирку на магнитном штативе при комнатной температуре на протяжении 30 секунд, затем аккуратно удалите и выбросьте надосадочную жидкость.
- 6.28 Повторите шаги 6.26 и 6.27.
- 6.29 Центрифугируйте пробирку на протяжении 3 секунд (quick spin), после чего быстро поставьте ее обратно на магнитный штатив и удалите пипеткой остатки этанола.
- 6.30 Оставьте пробирку на магнитном штативе с открытой крышкой на 5 минут, чтобы высушить осевшие частицы.

- 6.31 Снимите пробирку с магнитного штатива и элюируйте ДНК, добавив 200 мкл воды (без ДНКазы и РНКазы) к частицам.
- 6.32 Тщательно перемешайте в вортексе в течение 10 секунд до перерастворения частиц. Осадите посредством центрифугирования в течение 5 секунд (quick spin).
- 6.33 Инкубируйте при комнатной температуре в течение 2 минут.
- 6.34 Поместите пробирку с библиотекой на магнитный штатив на 2 минуты.
- 6.35 ПЕРЕНЕСИТЕ 200 мкл элюата (библиотека) в чистую пробирку с низкой адгезией объемом 2 мл.

Третий отбор:

- 6.36 **Тщательно перемешайте вортексом** (в течение 30 секунд) сток магнитных частиц AMPure XP комнатной температуры. Добавьте 160 мкл аликвоты частиц к 200 мкл библиотеки из шага 6.35 второго отбора.
- 6.37 Тщательно перемешайте в вортексе в течение 5 секунд до перерастворения частиц в библиотеке. Осадите посредством центрифугирования на протяжении 5 секунд (quick spin).
- 6.38 Инкубируйте при комнатной температуре в течение 5 минут.
- 6.39 Снова установите пробирку на магнитный штатив на 4 минуты, чтобы частицы осели.
- 6.40 Аккуратно удалите и выбросьте надосадочную жидкость.
- 6.41 Добавьте ~0,5-1 мл только что подготовленного 80%-го этанола в пробирку, пока она находится на магнитном штативе. Объем должен быть таким, чтобы покрыть частицы.
- 6.42 Инкубируйте пробирку на магнитном штативе при комнатной температуре на протяжении 30 секунд, затем аккуратно удалите и выбросьте надосадочную жидкость.
- 6.43 Повторите шаги 6.41 и 6.42.
- 6.44 Центрифугируйте пробирку в течение 5 секунд (quick spin), быстро перенесите ее обратно на магнитный штатив и удалите пипеткой остатки этанола.
- 6.45 Оставьте пробирку на магнитном штативе с открытой крышкой на 5 минут, чтобы высушить микроносители.
- 6.46 Снимите пробирку с магнитного штатива и элюируйте библиотеку, добавив 25 мкл воды (без ДНКазы и РНКазы) к частицам.
- 6.47 Тщательно перемешать в вихревой мешалке на протяжении 10 секунд до перерастворения микроносителей. Осадите посредством центрифугирования в течение 5 секунд (quick spin).
- 6.48 Инкубируйте при комнатной температуре в течение 2 минут.
- 6.49 Поместите пробирку с библиотекой на магнитный штатив на 2 минуты.

6.50 ПЕРЕНЕСИТЕ 25 мкл элюата (библиотека) в чистую пробирку с низкой адгезией объемом 1,5 мл.



Безопасная точка остановки. Библиотеки можно хранить при -20 °C в течение длительного времени.

ШАГ 7 - КОЛИЧЕСТВЕННЫЙ АНАЛИЗ БИБЛИОТЕКИ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ПРИБОРА ДЛЯ qPCR

Длительность: ~1 час 15 минут



См. рабочую тетрадь: Таблица количественного анализа библиотеки
(Refer to Workbook: Library quantitation tab)

Необходимо провести количественную оценку библиотеки выбранного размера для оптимального использования секвенатора Illumina MiSeq. Концентрацию выбранной по размеру библиотеки можно точно определить с помощью qPCR.

По желанию можно использовать набор Qubit dsDNA BR и флуориметр Qubit для измерения концентрации библиотеки. Для этого протокола см. Приложение 3.



Примечание. флуорометрический метод количественной оценки библиотеки является быстрым, однако, как заявляет Illumina, с этим методом связан риск переоценить концентрацию библиотеки, поскольку он измеряет концентрацию всей двухцепочечной ДНК в пуле. Сюда входят частично сконструированные фрагменты (неполные фрагменты библиотеки) и остаточные димеры праймеров из ПЦР. Поэтому мы рекомендуем метод на основе qPCR для количественного определения библиотеки, однако при использовании флуорометрического метода мы настоятельно рекомендуем выполнять собственную внутреннюю проверку перед рутинным использованием.

Список реагентов

Позиция	Хранение	Поставлено
10x готовая смесь праймеров Illumina	-20 °C	KAPA Biosystems
Мастер-микс 2x KAPA SYBR FAST qPCR	-20 °C	KAPA Biosystems
Стандартный раствор 1 (20,00 пМ)	-20 °C	KAPA Biosystems
Стандартный раствор 2 (2,00 пМ)	-20 °C	KAPA Biosystems
Стандартный раствор 3 (0,20 пМ)	-20 °C	KAPA Biosystems
Стандартный раствор 4 (0,02 пМ)	-20 °C	KAPA Biosystems
Стандартные растворы Illumina для ДНК	-20 °C	KAPA Biosystems
Вода для молекулярной биологии (без ДНКазы и РНКазы)	от 20 °C до 25 °C	Пользователь
1x TE буфер (pH 8,0)	от 20 °C до 25 °C	Пользователь
Выбранная по размеру библиотека	4 °C	Шаг 6

Протокол

- 7.1 Подготовьте смесь праймеров для qPCR с использованием 10x готовой смеси праймеров Illumina и мастер-микса 2x KAPA SYBR FAST qPCR:



Примечание: Реагенты набора KAPA SYBR FAST qPCR (qPCR мастер-микс, готовая смесь праймеров и референсный краситель) смешиваются во время первого использования набора. Полученный раствор устойчив в течение минимум 30 циклов заморозания-оттаивания. Следуйте документации KAPA для определения, рекомендован ли референсный краситель для вашего устройства для qPCR.

Смесь праймеров для qPCR

Реагент	Объем (мл)
10x готовая смесь праймеров Illumina	1 мл
Мастер-микс 2x KAPA SYBR FAST qPCR	5 мл
Общий объем	6 мл

- 7.2 Подготовьте мастер-микс для qPCR.

Мастер-микс для qPCR

Реагент	Объем на лунку (мкл)	Объем на 1 библиотеку и стандартные растворы (мкл)
Смесь праймеров для qPCR	12 мкл	276 мкл
Вода для молекулярной биологии (без ДНКазы и РНКазы)	4 мкл	92 мкл
Общий объем	16 мкл	368 мкл

- 7.3 Подготовьте серийное разведение библиотеки выбранного размера.
- Подготовьте разведение 1:1000 путем добавления 1 мкл библиотеки к 999 мкл 1x TE буфера (pH 8,0), аккуратно перемешивая пипетированием. Перемешайте в вортексе и осадите путем центрифугирования.
 - Подготовьте разведение 1:2000 путем добавления 100 мкл разведения 1:1000 к 100 мкл 1x TE буфера (pH 8,0). Перемешайте в вортексе и осадите путем центрифугирования.
 - Подготовьте разведение 1:4000 путем добавления 20 мкл разведения 1:2000 к 20 мкл 1x TE буфера (pH 8,0). Перемешайте в течение 5 секунд в вортексе и центрифугируйте в течение 5 секунд (quick spin).
- 7.4 Подготовьте планшет количественного подсчета для qPCR на новом ПЦР-планшете, совместимом с вашей системой для qPCR.
- 7.5 Внесите в лунки планшета аликвоты мастер-микс для qPCR в трех экземплярах по 16 мкл для стандартных растворов 1-4, разведений 1:1000, 1:2000 и 1:4000 (см. вспомогательные иллюстрации).

- 7.6 Внесите в соответствующие лунки аликвоты по 4 мкл стандартных растворов 1-4, разведений 1:1000, 1:2000 и 1:4000.
- 7.7 Закройте планшет пленкой совместимой с qPCR и центрифугируйте в течение 5 секунд.



Примечание: Избегайте появления пузырьков в лунках планшета. Центрифугируйте по мере необходимости для устранения пузырьков.

- 7.8 Установите тройные повторы разведений 1:1000, 1:2000 и 1:4000 как целевые образцы и определите стандартные растворы (точки: 4, исходная концентрация: 20 пМ, разведение: 1:10). Запустите следующую программу на qPCR амплификаторе для определения концентрации ДНК в библиотеке выбранного размера:

Количество циклов	Температура	Время
1	95 °C	5 минут
25	95 °C	30 секунд
	60 °C	90 секунд (операции сбора данных)

- 7.9 Для преобразования результатов qPCR из концентрации пМ в концентрацию нМ, введите полученные значения в таблицу рабочей тетради Omixon под названием "Количественный анализ библиотеки".
- 7.10 **Реагенты Illumina MiSeq v2:** Используя объемы из рабочей тетради, разведите 10 мкл библиотеки выбранного размера до концентрации **2 нМ** стерильной водой в новой 1,5 мл центрифужной пробирке с низкой адгезией. Храните остатки библиотеки при -20 °C.
- Реагенты Illumina MiSeq v3:** см. оригинальную документацию Illumina для разбавления библиотеки.



Безопасная точка остановки. Библиотеки можно хранить при -20 °C в течение длительного времени. В случае длительного хранения, строго рекомендуется провести повторный количественный анализ библиотеки перед ее запуском на платформах MiSeq.

ШАГ 8 - СЕКВЕНИРОВАНИЕ НА ILLUMINA MISEQ

Длительность: ~ 17 часов



См. рабочую тетрадь: Вкладка секвенирования и вкладка шаблон протокола исследования MiSeq

(Refer to Workbook: Sequencing tab and MiSeq Sample Sheet tab)

Секвенатор Illumina MiSeq - универсальная NGS система, способная секвенировать библиотеки выбранного размера, подготовленные на предыдущих этапах. Демультиплексирование индексированных образцов выполняется автоматически после завершения цикла секвенирования. **Следующие шаги описывают разведение и загрузку библиотеки с использованием реагентов MiSeq v2. При использовании реагентов MiSeq v3 следуйте документации Illumina.**

Список реагентов

Позиция	Хранение	Поставлен о
Набор реагентов MiSeq 1	-20 °C	Illumina
Набор реагентов MiSeq 2	4 °C	Illumina
Набор Phix Control v3 (опционально)	-20 °C	Illumina
Библиотека концентрацией 2 нМ	4 °C	Шаг 7
Гидроксид натрия NaOH 0,2 Н	от 20 °C до 25 °C	Пользователь
Вода для молекулярной биологии (без ДНКазы и РНКазы)	от 20 °C до 25 °C	Пользователь

Протокол

- 8.1 Подготовьте систему секвенирования MiSeq согласно стандартным протоколам Illumina.
- 8.2 *Подготовка денатурированной библиотеки 2 нМ:* Смешайте 10 мкл свежеприготовленного 0,2 Н гидроксида натрия NaOH и 10 мкл 2 нМ разведенной библиотеки выбранного размера в новой 1,5 мл центрифужной пробирке с низкой адгезией. Перемешайте на вортексе в течение 5 секунд и центрифугируйте в течение 5 секунд (quick spin). Инкубируйте эту 1 нМ денатурированную библиотеку при комнатной температуре в течение 5 минут.
- 8.3 *Подготовка денатурированной библиотеки 20 пМ:* Добавьте 980 мкл охлажденного гибридизационного буфера HT1 к 20 мкл 1 нМ денатурированной библиотеки. – Перемешайте в вортексе в течение 5 секунд и центрифугируйте в течение 5 секунд (quick spin).

- 8.4 *Подготовка денатурированной библиотеки 9 пМ:* Смешайте 550 мкл охлажденного гибридизационного буфера HT1 и 450 мкл 20 пМ денатурированной библиотеки в новой 1,5 мл центрифужной пробирке с низкой адгезией. Перемешайте в вортексе в течение 5 секунд и центрифугируйте в течение 5 секунд (quick spin). В результате должно получиться 1000 мкл 9 пМ денатурированной библиотеки.
- 8.5 Отложите все на лед до того момента как будете готовы загрузить библиотеки в картридж.



Рекомендация – Настоятельно рекомендуется добавлять в библиотеки 1% PhiX в качестве дополнительного контроля для мониторинга реакции секвенирования. Использование PhiX поможет отслеживать качество секвенирования между запусками и устранять неполадки. Дополнительную информацию см. в инструкциях к Illumina по работе с PhiX.

Для секвенирования **без добавления 1% PhiX** перейдите к **шагу 8.9**.

Для секвенирования с **добавлением 1% PhiX** подготовьте реагент в соответствии с Приложением 5 — Денатурация и разведение Phix Control до секвенирования на MiSeq, затем перейдите к **шагу 8.6**.

- 8.6 Разведите денатурированный PhiX до загрузочной концентрации (9 пМ): объедините 12,2 мкл предварительно охлажденного буфера HT1 и 10 мкл денатурированной библиотеки PhiX. Переверните пробирку для смешивания.
- 8.7 Смешайте 643,5 мкл 9 пМ денатурированной библиотеки и 6,5 мкл 9 пМ денатурированной библиотеки PhiX. Переверните пробирку для смешивания. В результате получается 650 мкл 9 пМ библиотеки с добавлением 1% Phix Spike-In.
- 8.8 Отложите все на лед до того момента как будете готовы загрузить библиотеки в картридж.
- 8.9 Перенесите 600 мкл 9 пМ денатурированной библиотеки в резервуар для загрузки образцов картриджа с реагентами MiSeq.



Совет – Рекомендуется использовать предоставленную рабочую тетрадь для создания Листа с образцами, необходимых для Miseq.



Примечание – Загрузочная концентрация 9 пМ показала наилучшие результаты, однако из-за различий между приборами MiSeq может потребоваться небольшая корректировка загрузочных концентраций для достижения наилучших результатов реакции секвенирования. Требуется внутренняя проверка.



Примечание – Фактический процент PhiX зависит от качества и количества библиотечного пула

ШАГ 9 - АНАЛИЗ ДАННЫХ СЕКВЕНИРОВАНИЯ HLA

Длительность: ~6 часов

Приборы Illumina MiSeq обработают библиотеку и сгенерируют данные секвенирования в виде файлов "fastq". Пожалуйста, обратитесь к руководству пользователя приложения HLA Twin для правильной установки программного обеспечения HLA Twin и получения информации об интерпретации результатов генотипирования. По вопросам запуска автоматического протокола и анализу данных, свяжитесь с support@omixon.com.

Автоматизированный протокол

Настройка и конфигурация IT

- Установите сервер приложения HLA Twin на ваш сервер.
- Установите пользовательское приложение HLA Twin на ваш компьютер - к серверу можно подключить несколько пользователей HLA Twin.
- Обратитесь в Службу поддержки Omixon (support@omixon.com) за инструкцией для пользовательской инсталляции автоматизированного протокола.

Протоколы анализа

1. Запустите приложение HLA Twin и войдите в систему.
2. Данные уже обработаны или находятся в процессе обработки. Просмотрите результаты, используя систему Traffic Light System ("Светофор") в приложении HLA Twin.
3. При необходимости, экспортируйте результаты генотипирования и/или полученные консенсусные последовательности.

Протокол ручного управления

Настройка и конфигурация IT

- Установите сервер приложения HLA Twin на ваш сервер.
- Установите пользовательское приложение HLA Twin на ваш компьютер.

Протоколы анализа

1. Запустите приложение HLA Twin и войдите в систему.
2. Выберите данные секвенирования в формате "fastq" или "fastq.gz" и запустите цикл типирования Holotype HLA.
3. После окончания цикла типирования Holotype HLA просмотрите результаты с использованием системы "Светофор" приложения HLA Twin.
4. При необходимости, экспортируйте результаты генотипирования и/или полученные последовательности.

Протокол на рабочем столе

Настройка и конфигурация IT

- Установите приложение HLA Twin.

Протоколы анализа

1. Запустите HLA Twin и войдите в систему.
2. Выберите данные секвенирования в формате "fastq" или "fastq.gz" и начните цикл

типирования Holotype HLA.

- 3 После окончания сеанса типирования Holotype HLA, просмотрите результаты с использованием системы "Светофора" приложения HLA Twin.
- 4 По необходимости, экспортируйте результаты генотипирования и/или полученные последовательности.

УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ И ТРАНСПОРТИРОВКИ

Срок годности набора реагентов составляет 17 месяцев с даты изготовления при хранении при рекомендованных условиях и невскрытой упаковке.

Наборы поставляются в пакетах с сухим льдом в пенопластовых коробках для транспортировки и по прибытии должны храниться при температуре от -15 °C до -20 °C. Пожалуйста, проверьте установленную температуру в вашем морозильнике, регулярно проводите мониторинг температуры в камере и плановое техническое обслуживание морозильника.

Нераспечатанные наборы остаются стабильными до истечения срока годности набора (указан на этикетке набора) при хранении от -15 °C до -20 °C.

Открытые наборы остаются устойчивыми до 3 месяцев при хранении с температурным режимом от -15 °C до -20 °C.

Не замораживайте/размораживайте продукт более четырех (4) раз после его открытия. Многократная заморозка/разморозка приводит к потере стабильности реагентов, входящих в состав набора.

УТИЛИЗАЦИЯ

Все части данного медицинского изделия, в том числе реагенты с истекшим сроком годности, не имеющие контакта с биологическими жидкостями пациентов, инфекционными больными, следует классифицировать как эпидемиологически безопасные отходы, по составу приближенные к ТКО (далее - класс А). и утилизировать в соответствии с пунктом 170 СанПин 2.1.3684-21:

Сбор медицинских отходов класса А должен осуществляться в многоразовые емкости или одноразовые пакеты. Цвет пакетов может быть любой, за исключением желтого и красного.

Одноразовые пакеты располагаются на специальных тележках или внутри многоразовых контейнеров.

Емкости для сбора медицинских отходов и тележки должны быть промаркированы "Отходы. Класс А".

Заполненные многоразовые емкости или одноразовые пакеты перегружаются в маркированные контейнеры, предназначенные для сбора медицинских отходов данного класса, установленные на специальной площадке (в помещении).

Многоразовая тара после удаления из нее отходов подлежит мойке и дезинфекции.

Транспортирование отходов класса А организуется с учетом схемы санитарной очистки, принятой для данной территории, в соответствии с требованиями санитарного законодательства к содержанию территорий населенных мест и обращению с отходами производства и потребления.

ГАРАНТИИ

Производитель гарантирует соответствие характеристик медицинского изделия заявленным в эксплуатационной документации при условии применения изделия в

соответствии с инструкцией и по назначению, предусмотренной производителем.

По всем вопросам, для получения консультаций и поддержки следует обращаться к уполномоченному представителю производителя на территории РФ:

ООО «Диаэм»

129345, Российская Федерация, г. Москва ул. Магаданская, д. 7, корпус 3, эт. 2, офис 210,

Тел.: +7 (495) 745-05-08

info@dia-m.ru

При возникновении претензий по качеству наборов, нежелательных событий, которые имеют признаки неблагоприятного события (инцидента), следует направлять информацию Производителю по адресу:

Omixon Biocomputing Ltd.

14-18. Kaposvar u., 1117 Budapest, Hungary

Tel: + 36 21 2620413

support@omixon.com

ТЕХНИЧЕСКАЯ ПОДДЕРЖКА

Для получения поддержки по этому протоколу обращайтесь по адресу support@omixon.com.

Запрос инструкции

- Этот документ можно загрузить с веб-сайта MyOmixon,
- запросить по электронной почте support@omixon.com
- по телефону +36 21 2620413.

ДОПОЛНИТЕЛЬНЫЕ ИЛЛЮСТРАЦИИ

Образец планшета для ампликонов, планшет для амплификации, планшет для разведения, планшет для количественного анализа ампликонов (для отдельного локуса) и планшет для реакций

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	#1	#9	#17									
B	#2	#10	#18									
C	#3	#11	#19									
D	#4	#12	#20									
E	#5	#13	#21									
F	#6	#14	#22									
G	#7	#15	#23									
H	#8	#16	#24									

Пример планшета для количественного анализа стандартных растворов

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	#1	#1										
B	#2	#2										
C	#3	#3										
D	#4	#4										
E	#5	#5										
F	#6	#6										
G	#7	#7										
H												

Пример планшета для количественного анализа библиотеки КАРА

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	#1	#1	#1	#2	#2	#2	#3	#3	#3	#4	#4	#4
B	1:1000	1:1000	1:1000	1:2000	1:2000	1:2000	1:4000	1:4000	1:4000			
C												
D												
E												
F												
G												
H												

Приложение 1: КОЛИЧЕСТВЕННЫЙ АНАЛИЗ И НОРМАЛИЗАЦИЯ АМПЛИКОНОВ (ДЛЯ ПЛАНШЕТОВ ЕМКОСТЬЮ 100 МКЛ)

Длительность: ~30 минут



См. рабочую тетрадь: Вкладка количественного анализа ампликонов
(Refer to Workbook: Amplicon quantitation tab)

Список реагентов

Позиция	Хранение	Поставлено
20x TE буфер (pH 7.5)	4 °C	Promega
Стандарт Lambda DNA (100 нг/мкл)	4 °C	Promega
Краситель 200x QuantiFluor dsDNA	4 °C	Promega
Вода для молекулярной биологии (без ДНКазы и РНКазы)	от 20 °C до 25 °C	Пользователь
Планшет(ы) для амплификации класса I	4 °C	Шаг 2
Планшет(ы) для амплификации класса II	4 °C	Шаг 2

Протокол

1. Подготовьте стандарты ДНК путем серийного разведения стандарта Lambda DNA (100 нг/мкл), входящего в набор QuantiFluor, в соответствии с приведенной ниже таблицей:

Этикетка на пробирке	Входящая ДНК	Объем ДНК (мкл)	Объем 1x TE (мкл)	Конечная концентрация (нг/мкл)
Стандарт 1	Lambda DNA	7,5 мкл	492,5 мкл	1,5 нг/мкл
Стандарт 2	Стандарт 1	250 мкл	250 мкл	0,75 нг/мкл
Стандарт 3	Стандарт 2	250 мкл	250 мкл	0,38 нг/мкл
Стандарт 4	Стандарт 3	250 мкл	250 мкл	0,19 нг/мкл
Стандарт 5	Стандарт 4	250 мкл	250 мкл	0,09 нг/мкл
Стандарт 6	Стандарт 5	250 мкл	250 мкл	0,05 нг/мкл
Холостая проба	Холостая проба	0 мкл	250 мкл	0 нг/мкл

2. Подготовьте планшеты для количественного анализа ампликонов (см. дополнительные иллюстрации). Добавьте по 49,5 мкл 1x буфера TE в лунки нового 96-луночного планшета.
3. Добавьте 0,5 мкл ампликонов из соответствующих лунок планшетов для ампликонов

в отдельные лунки на планшетах для количественного анализа ампликонов. Аккуратно перемешайте пипетированием.

4. Подготовьте раствор 1х рабочего красителя QuantiFluor Dye по следующей формуле: 0,25 мкл QuantiFluor Dye (200X) + 49,75 мкл 1х буфера TE. Подготовленного раствора 1х QuantiFluor должно хватать на каждый образец в планшетах с ампликонами и стандарты (всего 14) из расчета 50 мкл на образец.
5. Подготовьте планшеты для количественного анализа стандартных растворов и ампликонов. Добавьте 50 мкл 1х рабочего раствора QuantiFluor Dye в лунки 96-луночных оптически прозрачных планшетов, используя формат планшетов для количественного анализа стандартных растворов и количественного анализа ампликонов (см. вспомогательные иллюстрации).
6. Используя стандарты, подготовленные выше, добавьте 50 мкл стандарта в двух повторностях в отдельные лунки планшета для количественного анализа стандартных растворов (всего 14 лунок). Перемешайте пипетированием.
7. Перемешайте в течение 5 секунд на вортексе и центрифугируйте в течение 5 секунд.
8. Инкубируйте пробы при комнатной температуре в течение 5 минут в защищенном от света месте.
9. Поместите каждый из планшетов для количественного анализа в флуориметр или qPCR амплификатор, по одному за раз, и запустите следующую программу (вам может потребоваться отрегулировать настройки в зависимости от модели qPCR амплификатора):

Количество циклов	Температура	Время
1	25 °C	10 секунд
2	25 °C	15 секунд
	25 °C	30 секунд (операции сбора данных)

10. Рассчитайте концентрацию ДНК в планшетах для количественного анализа ампликонов, используя инструкцию к флуориметру или qPCR амплификатору. Обратитесь ко вкладке «Разведение» в прилагаемой рабочей тетради для помощи в расчетах.
11. Разведите ДНК в планшетах с ампликонами водой (без ДНКаз и РНКаз), чтобы конечная концентрация ДНК находилась в пределах 50-120 нг/мкл.
 - Если концентрация ДНК составляет 180 нг/мкл или выше: добавьте 20 мкл H₂O
 - Если концентрация ДНК составляет 115-180 нг/мкл или выше: добавьте 10 мкл H₂O
 - Если концентрация ДНК составляет 115 нг/мкл и ниже: не добавляйте H₂O.



Безопасная точка остановки. Ампликоны можно хранить при 4 °C одну ночь или при -20 °C на протяжении 3 месяцев.

Приложение 2: ВЫБОР РАЗМЕРА БИБЛИОТЕКИ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ПРИБОРА PIPPIN PREP

Длительность: ~1 час 20 минут



См. рабочую тетрадь: Вкладка подготовки библиотеки
(Refer to Workbook: Library preparation tab)

В настоящем шаге используется библиотека из шага 5, очистка осуществляется с помощью магнитных частиц AMPure XP, а выбор размеров проводится при помощи устройства Pippin Prep. Устройство Pippin Prep способно автоматически выбирать диапазон размеров фрагментов ДНК и отбирать их в отдельные емкости. Примечание: Вместо Pippin Prep может быть использовано устройство Blue Pippin.



Совет – Инструкции по настройке Pippin Prep см. на стр. 61

Список реагентов

Позиция	Хранение	Поставлен о
Пулированная библиотека	4° C	Шаг 5
Реагент для очистки продуктов ПЦР AMPure XP	4° C	производства Beckman Coulter
80% этанол (свежеприготовленный)	от 20°С до 25°С	Пользователь
Вода для молекулярной биологии (без ДНКазы и РНКазы)	от 20°С до 25°С	Пользователь
Кассета 1,5 % бесцветного агарозного геля	от 20°С до 25°С	Sage Science
Вводимый раствор/смесь маркеров для Pippin (маркер K)	4° C	Sage Science



Примечание: Для Pippin Prep используется маркер K. Для Blue Pippin используется маркер R2.

Протокол

Очистка библиотеки

1. Дайте магнитным частицам AMPure XP нагреться до комнатной температуры. Убедитесь, что они однородны (отсутствие кусочков и частиц) путем перемешивания в вортексе в течение 30 секунд.
2. Подготовьте 5 мл свежеприготовленного 80% этанола (4 мл EtOH + 1 мл H₂O).
3. Добавьте 900 мкл частиц AMPure XP в пробирку, содержащую 900 мкл библиотеки. Тщательно перемешайте в вортексе в течение 10 секунд и центрифугируйте в течение 5

секунд (quick spin). Не допускайте отделения частиц. Инкубируйте библиотеку при комнатной температуре в течение 10 минут.



Примечание: Если в конечном пуле находится менее 900 мкл библиотеки, добавьте к ней эквивалентное количество частиц AMPure XP. Следует соблюдать соотношение 1:1 конечного пула и частиц AMPure XP.

4. Поместите пробирку с библиотекой на магнитный штатив и инкубируйте в течение 10 минут.
5. Не вынимая пробирку из магнитного штатива, аккуратно отберите и выбросьте надсадочную жидкость, не потревожив частицы.
6. Не вынимая пробирку из магнитного штатива, добавьте ~1,5-2 мл свежеприготовленного 80% этанола к библиотеке с частицами. Объем добавленного этанола должен быть достаточно для покрытия частиц.



Примечание: Вносите этанол по стороне пробирки без частиц.

7. Инкубируйте пробирку с библиотекой при комнатной температуре в течение 30 секунд; затем аккуратно отберите и выбросьте надсадочную жидкость.
8. Повторите шаги 6 и 7.
9. Быстро осадите (в течение 3 секунд) пробирку с библиотекой и поместите ее обратно на магнитный штатив с открытой крышкой. Удалите оставшийся этанол при помощи пипетки. Не тревожьте частицы.



Примечание: Убедитесь, что частицы не содержат остаточного этанола. Для этого может потребоваться вращение пробирки на магнитном штативе для удаления этанола без касания частиц.

10. Позвольте частицам подсохнуть на воздухе в течение 5-8 минут на магнитном штативе до полного высыхания.
11. Уберите пробирку с библиотекой с магнитного штатива. Добавьте 31 мкл воды (без ДНКаз и РНКаз). Не допускайте касания частиц кончиком наконечника, так как они прилипнут к нему.
12. Перемешайте библиотеку на вортексе в течение 20 секунд для полного ресуспендирования частиц. Центрифугируйте в течение 5 секунд (quick spin), если на боковых стенках останутся капли. Убедитесь, что частицы остаются во взвешенном состоянии.
13. Инкубируйте библиотеку при комнатной температуре в течение 2 минут.
14. Поместите пробирку с библиотекой на магнитный штатив на 2 минуты.
15. Соберите библиотеку: оставив пробирку с конечной библиотекой на магнитном штативе, отберите 31 мкл надсадочной жидкости в новую 1,5 мл центрифужную пробирку с низкой адгезией.



Безопасная точка остановки. Библиотеки можно хранить при -20 °C до 3 месяцев.

Выбор размера библиотеки

16. Приведите исходный раствор с маркером К к комнатной температуре.
17. Скомбинируйте 31 мкл пула с 10 мкл маркера К.
18. Перемешайте на вихревом течении 5 секунд и центрифугируйте в течение 5 секунд (quick spin).
19. Настройте Pippin Prep для сбора фрагментов ДНК размером 650-1300 п. н. Установите референсную полосу на тот уровень, который используете.
20. Загрузите 40 мкл образца в порт для образца и запустите прибор. Время обработки 45-50 минут.
21. Соберите все содержимое (приблизительно 40 мкл) из отверстия для элюции Pippin Prep и перенесите его в новую 1,5 мл центрифужную пробирку с низкой адгезией. Это библиотека выбранного размера.



Безопасная точка остановки. Библиотеки можно хранить при -20 °C до 3 месяцев.

Программирование устройства Pippin Prep

1. Перейдите на вкладку "Protocol Editor" ("Редактировать протокол") и нажмите кнопку "New" ("Создать новый").
2. Нажмите на значок папки рядом с полем "Кассета" и выберите "1.5%DF Marker K" для Pippin Prep или "1.5%DF Marker R2" для Blue Pippin.
3. Для программирования референсной полосы:
 - a. Выделите поле "Range" ("Диапазон").
 - b. Установите значение поля "Ref Lane", чтобы оно соответствовало номеру полосы, над которой вы работаете.
 - c. Установите значение поля "Start*" ("Начало") на 650.
 - d. Установите значение поля "End*" ("Конец") на 1300.
4. В поле Reference Lane ("Референсная полоса"), выберите полосу, над которой вы работаете.
5. Нажмите кнопку "Save As" ("Сохранить как") и введите название программы.

Работа устройства Pippin Prep

1. Включите Pippin Prep кнопкой питания на задней панели устройства.
2. Осмотрите устройство Pippin Prep. Убедитесь, что все 5 светодиодов горят и что внутренняя часть устройства чистая и сухая.
3. Нажмите на логотип Sage Science в нижней правой части экрана. Это позволит вам ввести пароль. Заводской пароль по умолчанию: "pips".
4. Перейдите на вкладку "Factory Setup" ("Заводские настройки") и убедитесь, что значение "Base-to-Threshold" ("от базового до порогового значения") установлено на 0,02.

5. Поместите калибровочное приспособление внутрь устройства Pirpin Prep, убедившись, что темная полоса направлена вниз и находится над светодиодами.
6. На Главной вкладке, нажмите кнопку "Калибровка".
7. В окне калибровки убедитесь, что значение поля "Target I pH mA" установлено на 0,80 (0,60 для Blue Pirpin) и нажмите кнопку "Калибровать".
8. Перейдите на вкладку Протоколы. Нажмите кнопку "Load" ("Загрузить") и выберите программу для Holotype HLA и полосу, которую вы планируете использовать. Убедитесь, что:
 - a. Включена правильная полоса
 - b. Включен индикатор выбора широкого спектра
 - c. Референсная полоса соответствует той, с которой вы будете работать.
9. Перейдите на Главную вкладку. Убедитесь, что:
 - a. Загруженная вами программа та же, что была выбрана ранее.
 - b. Выбрана нужная референсная полоса, совпадающая с полосой обработки образца.
10. Осмотрите кассету. Перед отрыванием клейкой ленты, запечатающей лунки, посмотрите, нет ли пузырьков за портом для элюции. Если пузырьки есть, слегка похлопайте и перекатите кассету в руке, чтобы избавиться от них.
11. Поместите кассету, не отрывая закрывающую лунки клейкую ленту, внутрь Pirpin Prep.
12. Аккуратно уберите клейкую ленту, убедившись, что лента удалена с чистой стороны кассеты (линия 5) на использованную сторону (линия 1). Будьте осторожны, удаляя клейкую ленту, чтобы не расплескать жидкость во избежание контаминации.
13. Удалите весь объем буферного раствора из порта для элюции на линии, которую вы будете использовать и добавьте 40 мкл чистого электрофорезного буфера в порт для элюции.
14. Наклейте узкую полоску клейкой ленты на порт для элюции.
15. Любые емкости, наполненные менее чем на 3/4, должны быть заполнены электрофорезным буфером. Не переполняйте лунки! Край буфера должен "чуть-чуть" доставать до пластика, но не выше, чтобы избежать протаскивания во время закрытия крышки. Добавьте буфер из чистых лунок (Линия 5) в использованные лунки (Линия 1).
16. Убедитесь, что все исходные лунки (лунки с агарозным гелем) заполнены электрофорезным буфером. Буферный раствор должен быть немного выше уровня агарозного геля и выглядеть полностью плоским.
17. Медленно закройте Pirpin Prep, следя за тем, чтобы буферный раствор не касался крышки во время закрытия устройства.
18. Проведите испытание на целостность. Обычно при высыхании датчиков испытание

на целостность проводится не с первого раза. В этом случае проведите повторное испытание. После завершения испытания, медленно откройте Pippin. Убедитесь, что жидкость не распределяется по поверхности кассеты при открытии/закрытии крышки Pippin Prep.

19. Немного перемешайте исходный раствор с маркером K в вортексе и краткосрочно центрифугируйте его. Добавьте 10 мкл загрузочного раствора Marker K к вашим ~30 мкл библиотеки.
20. Кратковременно перемешайте вашу библиотеку в вортексе и центрифугируйте ее.
21. Удалите 40 мкл буферного раствора из лунки для образца, которую вы будете использовать.
22. Добавьте ~40 мкл вашей библиотеки с раствором Marker K в эту лунку.
23. Отметьте используемую вами полосу инициалами лаборанта и датой.
24. Закройте Pippin Prep и нажмите кнопку "Start" ("Начать"). Убедитесь, что была включена правильная полоса. Процесс будет занимать приблизительно 45 минут.
25. После завершения прогона аккуратно откройте Pippin Prep. Следите, чтобы крышка не распространяла жидкость по поверхности кассеты.
26. Осторожно удалите клейкую ленту с порта для элюции, не расплескав жидкость.
27. Перенесите весь объем из порта для элюции в новую 1,5 мл пробирку с низкой адгезией.
28. Закройте все открытые лунки двумя кусочками клейкой ленты для планшетов. Не забудьте оставить клейкую полосу на чистой стороне. Это позволит легко удалить клейкую ленту с чистой на использованную сторону.
29. Поместите запечатанную кассету в пакет и уберите до дальнейшего использования.
30. Возьмите промывочную кассету и наполните ее водой MiliQ. Осторожно закройте крышку Pippin Prep, следя, чтобы жидкость не распространялась по поверхности кассеты.
32. Оставьте Pippin Prep закрытым на несколько секунд.
33. Откройте Pippin Prep, следя, чтобы жидкость не распространялась по поверхности кассеты.
34. Удалите очищающую кассету, слейте из нее воду и дайте высохнуть.
35. Очистите устройство Pippin Prep от воды и осторожно закройте его.
36. В меню Pippin Prep выберите кнопку "Shut Down" ("Выключение").

Приложение 3: КОЛИЧЕСТВЕННЫЙ АНАЛИЗ БИБЛИОТЕКИ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ИНТЕРКАЛИРУЮЩЕГО ФЛУОРЕСЦЕНТНОГО КРАСИТЕЛЯ ДЛЯ ДВУХЦЕПОЧЕЧНОЙ ДНК

Длительность: ~15 минут



См. рабочую тетрадь: Таблица количественного анализа библиотеки
(Refer to Workbook: Library quantitation tab)

Концентрацию библиотеки выбранного размера можно точно измерить с помощью флуоресцентного красителя dsDNA, например, SYBR green или его эквивалент. Доступные на рынке наборы и приборы для этой цели включают флуориметр Qubit производства Thermo Fisher (использует широкодиапазонный набор Qubit для оценки dsDNA), ридер Quantus производства Promega (использует флуоресцентный краситель Quantifluor для dsDNA) и другие. Здесь описан метод оценки концентрации библиотеки на примере флуориметра Qubit как наиболее часто используемый. В случае использования других приборов и наборов, следуйте стандартным инструкциям производителя.

Список реагентов

Позиция	Хранение	Поставлено
Набор Qubit dsDNA BR Assay	комнатная температура	Thermo Fisher
Стандарты Qubit dsDNA BR	4 °C	Thermo Fisher
Библиотека	4 °C	Шаг 6

Протокол

1. Доведите стандарты Qubit до комнатной температуры. Подготовьте пробирки Qubit (500 мкл, тонкостенные) для вашей библиотеки в двух повторностях и для двух стандартов. Перемешать стандарты и библиотеку на вортке и отцентрифугируйте.
2. Добавьте 995 мкл буфера и 5 мкл красителя в 1,5 мл центрифужную пробирку. Перемешайте на вортке в течение 2 секунд и центрифугируйте в течение 5 секунд (quick spin).
3. Перенесите 190 мкл смеси реагентов в две пробирки Qubit для двух стандартов. Перенесите 198 мкл смеси реагентов в две пробирки Qubit для двух экземпляров библиотеки.
4. Добавьте 10 мкл стандарта 1 в соответствующую пробирку Qubit и перемешайте в вортке в течение 2 секунд. Повторите аналогичный шаг со стандартом 2.
5. Добавьте 2 мкл библиотеки в соответствующие пробирки Qubit и перемешайте в вортке в течение 2 секунд.

6. Инкубируйте пробирки Qubit при комнатной температуре в течение 2 минут.
7. Включите флуориметр Qubit и выберите протокол BR.
8. Поместите пробирку Qubit со стандартом 1 в прибор и нажмите GO ("Запуск"). Повторите аналогичный шаг со стандартом 2.
9. Поместите пробирку Qubit с библиотекой в прибор и нажмите GO ("Запуск"). Повторите аналогичный шаг для повторности.
10. Для перерасчета результатов, полученных на флуориметре Qubit, из нг/мкл в нМ, введите среднее значение концентрации от двух повторностей библиотеки в таблицу на вкладке количественный анализ библиотеки в рабочей тетради Omixon.
11. Используя результаты измерений на флуориметре Qubit, разведите 10 мкл библиотеки выбранного размера до концентрации 2 нМ стерильной водой в новой 1,5 мл центрифужной пробирке с низкой адгезией. Храните остаток библиотеки при -20 °С.



Безопасная точка остановки. Библиотеки можно хранить при -20 °С в течение длительного времени. В случае долгого хранения настоятельно рекомендуется провести повторный количественный анализ библиотеки перед ее запуском на платформах MiSeq.

Приложение 4: ДЕНАТУРАЦИЯ И РАЗВЕДЕНИЕ PHiX CONTROL ДЛЯ MISEQ

Длительность: ~10 минут.

Используйте протокол ниже для денатурации и разведения PhiX библиотеки для дальнейшего использования ее в качестве контроля секвенирования.

Протокол

1. Разбавьте PhiX до 4 нМ, для чего смешайте следующие объемы в микроцентрифужной пробирке:
 - 10 нМ библиотека PhiX (2 мкл)
 - 10 мМ буфера Tris-HCl, pH 8,5 с 0,1% Tween 20 (3 мкл)
2. Приготовьте свежий раствор 0,2 н гидроксида натрия NaOH.
3. Денатурация PhiX Control: смешайте следующие объемы в микроцентрифужной пробирке.
 - 4 нМ библиотека PhiX (5 мкл)
 - раствор гидроксида натрия 0,2 н NaOH (5 мкл)
4. Перемешайте на вортексе (2-3 секунды).
5. Центрифугируйте при 280×g в течение 1 минуты.
6. Инкубируйте при комнатной температуре в течение 5 минут.
7. Разбавьте денатурированный PhiX до 20 пМ в объеме 1 мл: добавьте 990 мкл предварительно охлажденного буфера HT1 к 10 мкл денатурированной библиотеки PhiX.
8. Переверните, чтобы перемешать.



Примечание: Вы можете хранить денатурированную 20 пМ библиотеку PhiX до 3 недель при температуре от -15°C до -25°C. Разделите 20 пМ библиотеку PhiX на аликвоты по 50 мкл в отдельные пробирки для предотвращения влияния циклов замораживания-оттаивания. Через 3 недели число кластеров имеет тенденцию к уменьшению.

Приложение 5: РАСШИФРОВКА СИМВОЛОВ МАРКИРОВКИ



Код партии. Указывает код партии, которым изготовитель идентифицировал партию изделия



Номер по каталогу. Указывает номер медицинского изделия по каталогу производителя



www.omixon.com

Обратитесь к инструкции по применению. Указывает на необходимость для пользователя ознакомиться с инструкцией по применению



Содержимого достаточно для использования *n*-количества тестов. Указывает общее количество тестов *in vitro* которые могут быть выполнены с использованием реагентов, содержащихся в наборе медицинского изделия для диагностики *in vitro*



Изготовитель. Указывает изготовителя медицинского изделия как это определено в директивах Европейского сообщества 90/385/ЕЕС, 93/42/ЕЕС и 98/79/ЕС



Температурный диапазон. Указывает температурный диапазон, в пределах которого медицинское изделие надежно сохраняется



Использовать до ... Указывает дату, после истечения которой изделие не должно использоваться



Медицинское изделие для диагностики *in vitro*. Указывает, что медицинское изделие является изделием для диагностики *in vitro*



European Conformity (en) или Conformité Européenne (fr). Указывает на соответствие Европейской директиве 98/79/ЕС по медицинским изделиям для диагностики *in vitro*. 2797 — идентификационный номер нотифицированного органа, проводившего оценку соответствия СЕ.

Приложение 6: СПИСОК ПРИМЕНИМЫХ МЕЖДУНАРОДНЫХ СТАНДАРТОВ И НОРМАТИВНЫХ ДОКУМЕНТОВ

Документы	Описание
Директива 98/79/ЕС	Директива для медицинских изделий для in vitro диагностики
EN ISO 9000:2015	Системы менеджмента качества — Основные положения и словарь
EN ISO 13485:2016+A11	Медицинские изделия – Система менеджмента качества – Требования для целей регулирования
EN ISO 20417:2021	Медицинское оборудование - Информация, предоставляемая производителем
ISO 20916:2019	Диагностика in vitro медицинских изделий. Исследование клинических характеристик с использованием образцов, полученных от человека. Надлежащая клиническая практика
EN ISO 10012:2003	Системы менеджмента измерений. Требования к измерительным процессам и измерительному оборудованию
EN ISO 18113-1:2011	Медицинские изделия для диагностики in vitro – Информация, указываемая изготовителем (маркировка) – Часть 1: условия, определения и общие требования (ISO 18113-1:2009)
EN ISO 18113-2:2011	Медицинские изделия для диагностики in vitro – Информация, указываемая изготовителем (маркировка) Часть 2: реагенты для профессионального использования в диагностике in vitro (ISO 18113-2:2009)
EN ISO 15223-1:2021	Медицинские изделия – Символы, используемые на ярлыках медицинских изделий, при маркировке и в предоставляемой информации – Часть 1: Общие требования
EN 13612: 2002	Оценка рабочих характеристик медицинских изделий для диагностики in vitro
EN ISO 23640:2015	Медицинские изделия для диагностики in vitro – Оценка стабильности реагентов для диагностики in vitro (ISO 23640:2011)
EN 13641:2002	Устранение или снижение риска инфицирования, связанного с реагентами для диагностики in vitro.
EN 62366-1: 2015+A1:2020	Изделия медицинские – Часть 1: Применение проектирования, ориентированного на удобство, эффективность и безопасность использования, к медицинским изделиям
PD IEC/TR 62366-	Изделия медицинские. Часть 2. Руководство по применению

Документы	Описание
2:2016	проектирования с учетом эксплуатационной пригодности к медицинским изделиям
EN ISO 14971:2019+A11:2021	Изделия медицинские – Применение менеджмента риска к медицинским изделиям
EN 62304:2006+A1:2013	Изделия медицинские – Программное обеспечение. Процессы жизненного цикла

Изделие соответствует следующим национальным стандартам РФ на продукцию:

ГОСТ Р 51088-2013 «Медицинские изделия для диагностики in vitro. Реагенты, наборы реагентов, тест-системы, контрольные материалы, питательные среды. Требования к изделиям и поддерживающей документации»;

ГОСТ Р ИСО 23640-2015 «Изделия медицинские для диагностики in vitro. Оценка стабильности реагентов для диагностики in vitro»;

ГОСТ Р ИСО 18113-1-2015 «Медицинские изделия для диагностики in vitro. Информация, предоставляемая изготовителем (маркировка). Часть 1. Термины, определения и общие требования»;

ГОСТ Р ИСО 18113-2-2015 «Медицинские изделия для диагностики in vitro. Информация, предоставляемая изготовителем (маркировка). Часть 2. Реагенты для диагностики in vitro для профессионального применения»;

ГОСТ Р ИСО 15223-1-2020 «Изделия медицинские. Символы, применяемые при маркировании на медицинских изделиях, этикетках и в сопроводительной документации. Часть 1. Основные требования»;

ГОСТ IEC 62304-2022 «Изделия медицинские. Программное обеспечение. Процессы жизненного цикла»

Omixon Biocomputing Kft.
1117 Sp., Kaposvár utca 14-18.
Adószám: 23550070-2-43

[Перевод с английского и венгерского языков на русский язык]

[На бланке «Омиксон» (Omixon)]

ИНСТРУКЦИЯ ПО ПРИМЕНЕНИЮ

для изделия

Набор реагентов Holotype HLA 24/7 для создания библиотек ДНК-генов HLA для последующего генотипирования методом высокопроизводительного секвенирования по 7 локусам: A, B, C, DRB1, DQB1, DPB1, DQA1, конфигурация A1/A2/A3/A4 в составе

Аттила Берцес (Attila Bérces)
Управляющий директор
/подпись/

Золтан Симон (Zoltan Simon)
Управляющий директор
/подпись/

[Штамп: «Омиксон Биокomпьютинг Кфт.»
(Omixon Biocomputing Kft.)
1117 Будапешт, улица Капошвар, 14-18
(1117 Вр., Karosvar utca 14-18)
Налоговый номер: 23550070-2-43]

14.06.2024 г.

[Герб Венгрии]

Д-р КАДАР ЖУЖАННА (KÁDÁR ZSUZSANNA)
Нотариальная контора
1114 Будапешт, ул. Уласло, 21 (1117 Budapest, Ulászló u. 21)
Тел.: 381-0405, 381-0407
KRID: 342479118 (MOKKIT)
drkadar@drkadar.hu

Дело № 11035/Z/1625/2024-----

Лицензия на английском языке № 3/2012-----

Настоящим я, нижеподписавшийся заместитель нотариуса города Будапешта, удостоверяю, что, насколько мне известно, этот документ является верной копией оригинального документа, представленного мне. :

г. Будапешт, 19 (девятнадцатого) июня 2024 (две тысячи двадцать четвертого) года.

/подпись/

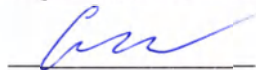
Д-р ФЁЛДИ Агнеш Фанни (FÖLDI Ágnes Fanni)
Заместитель нотариуса

[Печать: д-р Кадар Жужанна, НОТАРИУС * 6 [Герб Венгрии] БУДАПЕШТ XI.4]

[Текст документа на русском языке]

[Штамп на обороте: «Омиксон Биокомпьютинг Кфт.»
1117 Будапешт, улица Капошвар, 14-18
Налоговый номер: 23550070-2-43]

Перевод данного текста выполнен переводчиком Мочаловой Екатериной Вячеславовной



Российская Федерация
Город Москва
Двенадцатого июля две тысячи двадцать четвертого года

Я, Веремий Юлия Игоревна, нотариус города Москвы, свидетельствую подлинность подписи переводчика Мочаловой Екатерины Вячеславовны.

Подпись сделана в моем присутствии.

Личность подписавшего документ установлена.

Зарегистрировано в реестре: № 77/2194-н/77-2024-9-3137

Уплачено за совершение нотариального действия: 400 руб. 00 коп.



Ю. И. Веремий



Всего прошнуровано
пронумеровано
и скреплено печатью 73 лист(а)(ов)

Нотариус



INSTRUCTION FOR USE

Holotype HLA 96/5 reagent kit for creating DNA libraries of HLA genes for the following genotyping by the method of high-throughput sequencing at 5 locuses: A, B, C, DRB1, DQB1, configuration A/B/C in assembly

Attila Bérces

Managing Director

Attila Bérces

Zoltan Simon

Managing Director

Zoltan Simon

Omixon Biocomputing Kft.
1117 Bp., Kaposvár utca 14-18.
Adószám: 23550070-2-43

14 / 06 / 2024



Dr. KÁDÁR ZSUZSANNA
Notarial Office
1114 Budapest, Ulászló u. 21.
Tel: 381-0405, 381-0407
KRID: 342479118 (MOKKIT)
drkadar@drkadar.hu

File No.: 11035/Z/1624/2024.-----

English language licence No: 3/2012.-----

I the undersigned Deputy Notary in and for the City of Budapest hereby certify that this document is to the best of my knowledge, a true copy of the original document having been produced to me. -----

At Budapest on the 19th (nineteenth) day of June, 2024 (two thousand and twenty-four). -----



Dr. FÖLDI Ágnes Fanni
Deputy Notary



ИНСТРУКЦИЯ ПО ПРИМЕНЕНИЮ

**Набор реагентов Holotype HLA 96/5 для
создания библиотек ДНК генов HLA для
последующего генотипирования методом
высокопроизводительного секвенирования по 5
локусам: A, B, C, DRB1, DQB1
конфигурация A/B/C в составе
(КОД:Н23, КОД:Н24, КОД:Н26)**

Версия Протокола 3.0.2

Версия Документа 6.1

14.06.2024

Оглавление

ВВЕДЕНИЕ	7
ИНФОРМАЦИЯ О РАЗРАБОТЧИКЕ, ПРОИЗВОДИТЕЛЕ И МЕСТЕ ПРОИЗВОДСТВА.....	8
ИНФОРМАЦИЯ ОБ УПОЛНОМОЧЕННОМ ПРЕДСТАВИТЕЛЕ В РФ	9
НАЗНАЧЕНИЕ.....	10
ХАРАКТЕРИСТИКИ ИЗДЕЛИЯ	11
Состав набора реагентов Holotype HLA-96/5 – конфигурация A/B/C & CE v2 (КОД:Н23, КОД:Н24 И КОД:Н26).....	11
Принцип метода.....	13
ТЕХНИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ ИЗДЕЛИЯ.....	14
АНАЛИТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ ИЗДЕЛИЯ	15
ПЕРЕЧЕНЬ РИСКОВ, СВЯЗАННЫХ С ПРИМЕНЕНИЕМ НАБОРА «HOLOTYPE HLA 96/5»	16
МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ ПРИ РАБОТЕ С НАБОРОМ.....	16
ДОПОЛНИТЕЛЬНОЕ ОБОРУДОВАНИЕ, РЕАГЕНТЫ И ВСПОМОГАТЕЛЬНЫЕ МАТЕРИАЛЫ	17
ЮРИДИЧЕСКОЕ ПРЕДУПРЕЖДЕНИЕ	20
ВАЖНОЕ ЗАМЕЧАНИЕ ПЕРЕД НАЧАЛОМ РАБОТЫ	22
КРАТКОЕ ИЗЛОЖЕНИЕ ШАГОВ	23
ГЛОССАРИЙ/ОПРЕДЕЛЕНИЯ.....	24
ШАГ 0 - НОРМАЛИЗАЦИЯ ГЕНОМНОЙ ДНК.....	25
Протокол	25
ШАГ 1 - ПОДГОТОВКА МАСТЕР-МИКСА ДЛЯ АМПЛИФИКАЦИИ HLA.....	26
Список реагентов.....	26
Протокол	26
ШАГ 2 – АМПЛИФИКАЦИЯ HLA КЛАССА I и II	28
Список реагентов.....	28
Протокол	28
Шаг 3 – КОЛИЧЕСТВЕННЫЙ АНАЛИЗ И НОРМАЛИЗАЦИЯ АМПЛИКОНА (ДЛЯ ПЛАНШЕТОВ ЕМКОСТЬЮ 200 МКЛ)	30
Список реагентов.....	30
Протокол	30
ШАГ 4 – ПУЛИРОВАНИЕ И ОЧИСТКА АМПЛИКОНОВ С ПОМОЩЬЮ EXOSAP-IT EXPRESS.....	33
Список реагентов.....	33
Протокол	33
ШАГ 5 – ПОДГОТОВКА БИБЛИОТЕКИ	34
Список реагентов.....	34

Протокол	34
ШАГ 6 - ВЫБОР РАЗМЕРА БИБЛИОТЕКИ ПРИ ПОМОЩИ МИКРОНОСИТЕЛЕЙ	40
Список реагентов.....	40
Протокол	41
ШАГ 7 - КОЛИЧЕСТВЕННЫЙ АНАЛИЗ БИБЛИОТЕКИ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ПРИБОРА ДЛЯ QPCR	45
Список реагентов.....	45
Протокол	45
ШАГ 8 - СЕКВЕНИРОВАНИЕ НА ILLUMINA MISEQ.....	48
Список реагентов.....	48
Протокол	48
ШАГ 9 - АНАЛИЗ ДАННЫХ СЕКВЕНИРОВАНИЯ HLA	50
Автоматизированный протокол	50
Протокол ручного управления	50
Протокол на рабочем столе.....	50
УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ И ТРАНСПОРТИРОВКИ.....	52
УТИЛИЗАЦИЯ	52
ГАРАНТИИ	52
ТЕХНИЧЕСКАЯ ПОДДЕРЖКА.....	53
ДОПОЛНИТЕЛЬНЫЕ ИЛЛЮСТРАЦИИ.....	54
.....	54
Приложение 1: КОЛИЧЕСТВЕННЫЙ АНАЛИЗ И НОРМАЛИЗАЦИЯ АМПЛИКОНОВ (ДЛЯ ПЛАНШЕТОВ ЕМКОСТЬЮ 100 МКЛ).....	56
Список реагентов.....	56
Протокол	56
Приложение 2: ВЫБОР РАЗМЕРА БИБЛИОТЕКИ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ПРИБОРА PIPPIN PREP	58
Список реагентов.....	58
Протокол	58
Программирование устройства Pippin Prep	60
Работа устройства Pippin Prep	60
Приложение 3: КОЛИЧЕСТВЕННЫЙ АНАЛИЗ БИБЛИОТЕКИ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ИНТЕРКАЛИРУЮЩЕГО ФЛУОРЕСЦЕНТНОГО КРАСИТЕЛЯ ДЛЯ ДВУХЦЕПОЧЕЧНОЙ ДНК	63
Список реагентов.....	63
Протокол	63

Приложение 4: ДЕНАТУРАЦИЯ И РАЗВЕДЕНИЕ PHIX CONTROL ДЛЯ MISEQ.....	65
Протокол	65
Приложение 5: РАСШИФРОВКА СИМВОЛОВ МАРКИРОВКИ	66
Приложение 6: СПИСОК ПРИМЕНИМЫХ МЕЖДУНАРОДНЫХ СТАНДАРТОВ И НОРМАТИВНЫХ ДОКУМЕНТОВ	67

История изменений документа — важные замечания и обновления

Версия документа	Дата	Краткая информация об изменениях
1	22.04.2022	Первоначальная версия Документа использовалась только во время внутреннего тестирования при производстве наборов. Первоначальная версия Инструкции, которую получал пользователь, IFU версия 2. Первоначальная версия Инструкции для Протокола версии 3.0.2. Основные изменения по сравнению с версией Протокола 3.0.1: - Шаг 4 больше основан не на наборе AMPure XP, а на наборе ExoSAPiT Express. - Шаг 5 - изменяются объемы реагентов в мастер-миксе для фрагментации, а также продолжительность программы фрагментации.
2	5.05.2022	Шаг 5 – скорректирована программа лигирования.
3	10.05.2022	Шаг 5 – удалена уточняющая информация по набору AMPure XP.
4	15.06.2022	Исправлено описание рядом с символом CE в документе. Обновлено официальное уведомление.
5	24.02.2023	Из протокола удален реактив для усиления амплификации 2 (Enhancer 2).
6	31.09.2023	Приведение версии в соответствие с английской версией инструкции "Holotype HLA 24_7 CE v2 - Protocol 3.0.2 - IFUv06" – в русской версии 5 ссылка MyHolotype заменена на MyOmixon, и общий объем мастер-микса qPCR был исправлен. В российскую версию инструкции были внесены следующие изменения в соответствии с российским законодательством: - Добавлена информация о местах производства и об уполномоченном представителе Omixon на территории РФ - Введены подпункты: целевой анализ; показания к применению; противопоказания к применению; стерильность; функциональное назначение; потенциальный потребитель. Добавлен пункт «Гарантии» - В инструкцию добавлены технические характеристики изделия - Добавлена информация о рисках, сопряженных с применением изделия

		• Утилизация изделия описана в соответствии с российским законодательством и не противоречит данным производителя
6.1	14.06.2024	• Изменено назначение изделия; • Удалена информация о работе с платформой секвенирования Illumina MiniSeq; • пункт Условия хранения и транспортировки: добавлено предупреждение о недопустимости многократной заморозки/разморозки; • Характеристики изделия рабочая тетрадь Excel – название реагентов «Miseq v2» исправлено на «MiSeq»; • Характеристики изделия программное обеспечение – Omixon HLA TWIN: изменена информация по предоставлению ПО, указана версия ПО и дата выхода ПО. • Ограничения по применению продукта – валидацию нерекommenдованных материалов и оборудования должен проводить пользователь; • Технические рекомендации и рекомендации по оборудованию – добавлено требование к видеокарте компьютера; • Рекомендацию по выделению геномной ДНК: указан 1 источник геномной ДНК – периферическая кровь. • Шаг 0 - исправлены единицы измерения длин волн; • Шаг 5 – пункт 5.1 исправлен; пункт 5.24 II – добавлена единица измерения объема пробирки «мл»; • Приложение 6: добавлен список национальных стандартов РФ, которым соответствует данное изделие.

ВВЕДЕНИЕ

Настоящая инструкция по применению описывает порядок использования следующих продуктов с Протоколом версии 3.0.2 (с набором Promega LR-PCR для амплификации)

Наименование продукта	Краткое наименование далее по тексту документа	Справочный код #	Образцы
Набор реагентов Holotype HLA 96/5 для создания библиотек ДНК генов HLA для последующего генотипирования методом высокопроизводительного секвенирования по 5 локусам: A, B, C, DRB1, DQB1 конфигурация A в составе	Holotype HLA 96/5 – Конфигурация A & CE v.2	H23	96
Набор реагентов Holotype HLA 96/5 для создания библиотек ДНК генов HLA для последующего генотипирования методом высокопроизводительного секвенирования по 5 локусам: A, B, C, DRB1, DQB1 конфигурация B в составе	Holotype HLA 96/5 – Конфигурация B & CE v.2	H24	96
Набор реагентов Holotype HLA 96/5 для создания библиотек ДНК генов HLA для последующего генотипирования методом высокопроизводительного секвенирования по 5 локусам: A, B, C, DRB1, DQB1 конфигурация C в составе	Holotype HLA 96/5 – Конфигурация C & CE v.2	H26	96

Далее по тексту применяются указанные выше сокращения наименования изделия, а также – «изделие», «Набор», «Holotype HLA», «Holotype HLA 96/5».

ИНФОРМАЦИЯ О РАЗРАБОТЧИКЕ, ПРОИЗВОДИТЕЛЕ И МЕСТЕ ПРОИЗВОДСТВА

Разработчик	Omixon Biocomputing Ltd Омиксон Биокomпьютинг Лтд
Адрес (место нахождения) юридического лица	14-18. Kaposvar u., 1117 Budapest, Hungary
Номера телефонов	+ 36 21 2620413
Адрес электронной почты юридического лица	support@omixon.com
Производитель	Omixon Biocomputing Ltd Омиксон Биокomпьютинг Лтд
Адрес (место нахождения) юридического лица	14-18. Kaposvar u., 1117 Budapest, Hungary
Номера телефонов	+36 21 2620413
Адрес электронной почты юридического лица	support@omixon.com
Адрес в Интернет	www.omixon.com
Место производства	Omixon Biocomputing Ltd Омиксон Биокomпьютинг Лтд 1117 Budapest, Kaposvár utca 14-18, Hungary (Венгрия) Integrated DNA Technologies Интерэйтед ДиЭнЭй Текнолоджис 1710 Commercial Park Coralville, Iowa, 52241 USA (США) Metabion GmbH Метабион ГмбХ Ammerthalstr. 26, 85551, Kirchheim bei Munich, Germany (Германия) GSP Global Szerviz Partner Kft. ДжиЭсПи Глобал Сервис Партнер Кфт Lorinci ut 61., H – 2220 Vecses, Hungary (Венгрия)

Далее название компании производителя указывается сокращенно – Omixon.

ИНФОРМАЦИЯ ОБ УПОЛНОМОЧЕННОМ ПРЕДСТАВИТЕЛЕ В РФ

Организационно-правовая форма и полное наименование	Общество с ограниченной ответственностью «Диаэм»
Сокращенное наименование	ООО «Диаэм»
Адрес (место нахождения)	129345, Российская Федерация, г. Москва ул. Магаданская, д. 7, корпус 3, эт. 2, офис 210
Номера телефонов	(495) 745-05-08
Адрес электронной почты	info@dia-m.ru

Целевой анализ

Набор реагентов «Holotype HLA 96/5» используется для диагностики *in vitro*. Данный набор реагентов предназначен для создания библиотек ДНК генов HLA для последующего генотипирования методом высокопроизводительного секвенирования по 5 локусам - A, B, C, DRB1, DQB1.

Область применения набора реагентов

Клиническая лабораторная диагностика. Набор реагентов «Holotype HLA 96/5» является средством для диагностики *in vitro*.

Показания к применению:

Набор реагентов «Holotype HLA 96/5» рекомендуется использовать для диагностики *in vitro*. Созданные с помощью данного набора библиотеки ДНК генов HLA пригодны для проведения HLA-типирования.

Противопоказания к применению:

при использовании специально обученным персоналом и с учетом применения по назначению противопоказания не выявлены.

Стерильность:

изделие не стерильно.

НАЗНАЧЕНИЕ

Назначение:

Для диагностики *in vitro* для создания библиотек ДНК генов HLA для последующего генотипирования методом высокопроизводительного секвенирования в образцах геномной ДНК человека. Популяционные, демографические аспекты применения медицинского изделия отсутствуют.

Программное обеспечение Omixon HLA Twin, входящее в состав изделия, предназначено для интерпретации и сопоставления данных секвенирования, полученных на платформе Illumina MiSeq позволяя получить высокоточное типирование HLA на уровне аллелей за один проход с очень низким уровнем неоднозначности на уровне 2-го поля.

Функциональное назначение:

Для диагностики *in vitro*.

Потенциальный потребитель:

Набор предназначен для профессионального применения медицинскими работниками: врач клинической лабораторной диагностики, медицинский лабораторный техник

ХАРАКТЕРИСТИКИ ИЗДЕЛИЯ

Состав набора реагентов Holotype HLA-96/5 – конфигурация A/B/C & CE v2 (КОД:Н23, КОД:Н24 И КОД:Н26)

Данный раздел описывает содержимое доступных возможных конфигураций продукта HLA 96/5 следующим образом:

Тип продукта	Код	Кол-во анализируемых образцов
Holotype HLA 96/5 – Конфигурация A & CE v2	H23	96
Holotype HLA 96/5 – Конфигурация B & CE v2	H24	96
Holotype HLA 96/5 – Конфигурация C & CE v2	H26	96

Обратите внимание, что коробки с праймерами и реагентами для подготовки библиотеки во всех конфигурациях продукта одинаковы. Разные конфигурации отличаются друг от друга последовательностью индексов на 96-луночном планшете с индексированными адаптерами. Дополнительную информацию см. в разделе «96-луночный планшет с адаптерами» ниже.

Коробка с праймерами

Коробка с праймерами содержит готовые к применению растворы праймеров для целевой ПЦР-амплификации длинных фрагментов генов HLA: A, B, C, DQB1 и DRB1. Кроме того, она также содержит реактив для усиления амплификации 1 (Enhancer 1).

Смесь праймеров	Код	Кол-во анализируемых образцов	Объем пробирке	в Количество пробирок	Цветовой код
HLA-A	P012	96	220 мкл	1	Желтый
HLA-B	P022	96	220 мкл	1	Красный
HLA-C	P032	96	220 мкл	1	Оранжевый
HLA-DRB1	P042	96	220 мкл	1	Зеленый
HLA-DQB1 (Набор 3)	P122	96	220 мкл	1	Синий
Реактив для усиления амплификации 1 (Enhancer 1)	E01	96	1100 мкл	1	Прозрачный

Коробка с реагентами для подготовки библиотеки

Коробка с реагентами для подготовки библиотеки содержит реагенты для подготовки библиотеки (фрагментации, получения тупых концов и аденилирования концов ампликонов, а также лигирования к ним последовательностей адаптеров) из ампликонов HLA.

Реагент	Код	Кол-во анализируемых образцов	Объем пробирки	Количество пробирок	Цветовой код
Фермент для фрагментирования (A)	R11	96	278 мкл	1	Желтый
Буфер для фрагментирования (B)	R21	96	278 мкл	1	Красный
Фермент для обработки концов (C)	R31	96	162 мкл	1	Зеленый
Буфер для обработки концов (D)	R41	96	324 мкл	1	Оранжевый
Фермент для лигирования (E)	R51	96	324 мкл	1	Синий
Буфер для лигирования (F)	R61	96	1800 мкл	2	Черный

96-луночный планшет для адаптеров

96-луночный индексированный планшет с адаптерами содержит готовые к использованию адаптеры NGS (олигонуклеотиды двухнитевой ДНК) в растворе не менее 5 мкл для генерации отдельных NGS библиотек. На 96-луночном индексированном планшете с адаптерами имеется достаточное количество индексированных адаптеров для генерации 96 отдельных NGS библиотек и для идентификации образцов путем выделения и очистки.

Версия набора	Реагент	Код	Кол-во анализируемых образцов	Объем/лунка	Планшеты
H23	Планшет с адаптерами A (i1-96)	N1	96	≥5 мкл	1
H24	Планшет с адаптерами B (i97-192)	N2	96	≥5 мкл	1
H26	Планшет с адаптерами C (i193-288)	N3	96	≥5 мкл	1

Запасные компоненты доступны по специальному запросу пользователя. Обратите внимание, что Omixon предлагает замену коробок с компонентами, а не отдельных

флаконов. Обратитесь по адресу sales@omixon.com для получения дополнительной информации.

Рабочая тетрадь в Excel

Рабочая книга Excel предоставляется для поддержки протокола Holotype HLA 96/5 и реагентов MiSeq с расчетами объемов, схемами планшетов, прослеживаемостью реагентов и оборудования, ведением записей, а также созданием списка образцов MiSeq для всех поддерживаемых конфигураций адаптерных планшетов (A, B и C). Версия Workbook, совместимая с данным руководством пользователя, — v3.0.2. Если у вас нет копии, пожалуйста, свяжитесь с support@omixon.com.

Программное обеспечение – Omixon HLA Twin

Пожалуйста, свяжитесь с sales@omixon.com, чтобы получить лицензию на Omixon HLA Twin в связи с приобретением набора Holotype HLA 96/5.

Набор Holotype HLA используется в комплекте с ПО Omixon HLA Twin, которое поставляется на электронном носителе (USB флэш-накопителе) и по сети Интернет.

Версия ПО: Omixon HLA TWIN 4.8.1 (дата выпуска 26.06.2023г.) и выше.

Инструкция по применению

Инструкция по применению поставляется по сети Интернет и на электронном носителе.

Важное замечание:

При проведении диагностики *in vitro* с помощью набора Holotype HLA 96/5 используйте только компоненты набора, предлагаемые производителем, и программное обеспечение Omixon HLA Twin. Пожалуйста, ознакомьтесь с разделом «Ограничения по применению изделия» перед использованием наборов.

Принцип метода

Тип анализируемого образца:

Используются образцы геномной ДНК.

Принцип метода:

Создание библиотек ДНК генов состоит из следующих этапов:

На первом этапе работы проводится ПЦР-амплификация геномной ДНК с использованием специфических праймеров. Гены HLA A, B, C, DPA1, DQA1 и DQB1 амплифицируются по всей длине их кодирования, включая элементы 5'- и 3'-нетранслируемых областей, в то время как DRB1 и DRB3 амплифицируются от интрона 1 до интрона 4, DRB4 амплифицируется от конца интрона 1 до части экзона 4, а DRB5 и DPB1 амплифицируются от интрона 1 до 3'-нетранслируемой области.

Затем ампликоны фрагментируются с помощью Фермента для Фрагментирования A до размера, подходящего для секвенирования на платформе Illumina,

Далее, проводится специфическая обработка концов фрагментированных ампликонов последующим лигированием последовательностью адаптеров, которые используются на

протяжении всего процесса на MiSeq для захвата, амплификации и секвенирования ДНК. Адаптеры также включают индекс, представляющий собой короткую последовательность, уникальную для каждого адаптера, которая идентифицирует происхождение библиотеки (образец/локус).

После объединения проиндексированных библиотек, выбора размера и количественного анализа образец загружается в системы MiSeq для секвенирования. Весь процесс занимает менее 48 часов в зависимости от выбора проточной кюветы на платформе Illumina. Сгенерированные данные анализируются с использованием двух разных алгоритмов в HLA Twin (www.omixon.com). Использование двух независимых алгоритмов в HLA Twin обеспечивает высочайший уровень достоверности, так что результаты генотипирования HLA можно сообщать немедленно без дополнительной проверки. Образцы с сомнительным или неоднозначным генотипированием помечаются программным обеспечением для ручного анализа.

Ограничения по применению изделия

Набор реагентов по истечении срока годности применению не подлежит.

Набор реагентов, транспортированный или хранившийся с нарушением температурного режима, применению не подлежит.

Для наилучшей работы, пожалуйста, используйте наборы Holotype HLA и ПО Omixon HLA Twin для типирования HLA по NGS с материалами, реагентами и оборудованием, рекомендованными в разделе "Оборудование и реагенты".

Использование любых других материалов, не указанных в разделе "Оборудование и реагенты" должно быть проверено и подтверждено пользователем..

Не модифицируйте и не разводите реагенты в объемах, отличных от указанных в настоящей инструкции по применению. Не используйте объем меньше указанного в настоящей инструкции по применению. Такие действия могут привести к ошибкам в интерпретации результатов.

Не используйте продукт при наличии обнаруженных дефектов компонентов (разбитые сосуды, планшеты, не закрывающиеся колпачки, несоответствие состава указанному на упаковке).

В случае несоблюдения требований производителя компания Omixon не несет ответственности за полученные результаты.

Для получения более конкретной информации, пожалуйста, обратитесь к документу «Ограничения по применению изделия» по известным погрешностям и ограничениям ПО Omixon HLA Twin. Документ распространяется вместе с инструкцией по применению наборов Holotype HLA, и находится в общем доступе на сайте компании Omixon в разделе «MyOmixon/Support» ("Мой Omixon/Поддержка") и в разделе «Услуги/Инструкции по использованию HLA Twin». Также документ «Ограничения по использованию продукта» может быть получен через запрос на электронный адрес support@omixon.com.

ТЕХНИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ ИЗДЕЛИЯ

Компонент	Физическое состояние	Цвет	Запах
Коробка с праймерами			
Смесь праймеров HLA-A (HLA-A Primer mix)	Жидкость	Прозрачный, бесцветный	Нет
Смесь праймеров HLA-B (HLA-B Primer mix)	Жидкость	Прозрачный, бесцветный	Нет
Смесь праймеров HLA-C (HLA-C Primer mix)	Жидкость	Прозрачный, бесцветный	Нет
Смесь праймеров HLA-DRB1 (HLA-DRB1 Primer mix)	Жидкость	Прозрачный, бесцветный	Нет
Смесь праймеров HLA-DQB1 (Набор 3) (HLA-DQB1 (Set 3) Primer mix)	Жидкость	Прозрачный, бесцветный	Нет
Реактив для усиления амплификации 1 (Enhancer 1)	Жидкость	Прозрачный, бесцветный	Нет
Коробка с реагентами для подготовки библиотеки			
Фермент для фрагментирования (A) (Fragmentation Enzyme (A))	Жидкость	Прозрачный, бесцветный	Нет
Буфер для фрагментирования (B) (Fragmentation Buffer (B))	Жидкость	Прозрачный, бесцветный	Нет
Фермент для обработки концов (C) (End Repair Enzyme (C))	Жидкость	Прозрачный, бесцветный	Нет
Буфер для обработки концов (D))	Жидкость	Прозрачный, бесцветный	Нет
Фермент для лигирования (E) (Ligation Enzyme (E))	Жидкость	Прозрачный, бесцветный	Нет
Буфер для лигирования (F) (Ligation Buffer (F))	Жидкость	Прозрачный, бесцветный	Нет
96-луночный планшет с адаптерами			
Реагент в 96-луночном планшете с адаптерами	Гель	Прозрачный, бесцветный	Нет

АНАЛИТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ ИЗДЕЛИЯ

Установлены основные аналитические параметры производительности в соответствии с валидацией продукта.

	HLA-A	HLA-B	HLA-C	HLA-DRB1	HLA-DQB1
Аналитическая Чувствительность	99,4%	98,99%	98,79%	96,77%	97,38%
Аналитическая Специфичность	99,99%	99,99%	99,97%	99,95%	99,87%

Прецизионность	99,4%	98,99%	98,79%	96,77%	97,38%
Точность	99,98%	99,98%	99,95%	99,91%	99,75%

Предел обнаружения:

Рекомендуемая минимальная концентрация исходной геномной ДНК - 20 нг/мкл со следующими показателями чистоты, определенными флуоресцентным методом: коэффициент поглощения 1,7-2 для соотношений 260 нм/280 нм и 260 нм/230 нм.

Установлены основные параметры клинической эффективности в соответствии с валидацией продукта.

	HLA-A	HLA-B	HLA-C	HLA-DRB1	HLA-DQB1
Диагностическая Чувствительность	99,29%	98,83%	98,58%	97,17%	99,53%
Диагностическая Специфичность	99,98%	99,98%	99,95%	99,94%	99,98%
Прецизионность	99,29%	98,83%	98,58%	97,17%	99,53%
Точность	99,96%	99,97%	99,90%	99,89%	99,96%

ПЕРЕЧЕНЬ РИСКОВ, СВЯЗАННЫХ С ПРИМЕНЕНИЕМ НАБОРА «HOLOTYPE HLA 96/5»

Неизвестны прямые риски для здоровья пациента, когда результаты испытаний используются в качестве вспомогательного средства для диагностики определенного состояния здоровья; в то же время неспособность анализа работать в соответствии с предусмотренным применением или ошибка в интерпретации результатов могут привести к неправильному медицинскому лечению пациентов, которым требуется операция по трансплантации, поэтому может вызвать косвенный риск.

С использованием Holotype HLA обычно связаны следующие риски для здоровья:

- Неправильное медицинское ведение, связанное с данными о HLA-генотипе пациента
- Задержка, вызванная ненадлежащей работой продукта, при оказании медицинских услуг пациенту
- Ошибочный диагноз, неправильные результаты HLA-типирования
- Неправильный подбор донора и реципиента во время операции по трансплантации

МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ ПРИ РАБОТЕ С НАБОРОМ

Перед началом работы прочитайте разделы "Информация по технике безопасности" и "Важные замечания" в инструкциях всех реагентов, указанных в разделе "Дополнительное"

оборудование, реагенты и вспомогательные материалы".

- При работе с химическими лабораторными реагентами всегда надевайте подходящий лабораторный халат, одноразовые перчатки и защитные очки. Для дополнительной информации, пожалуйста, обратитесь за справкой к подходящим паспортам безопасности вещества (ПБВ). Паспорт безопасности материала предоставляется пользователю поставщиком по запросу.

Обзор химических компонентов реагентов продукта может быть найден в ПБВ или в наборе Holotype и доступен по запросу.

- При работе с химическими лабораторными реагентами соблюдайте соответствующие меры предосторожности. Не допускайте их попадания в рот и контакта с кожей и слизистыми оболочками.

- Только для диагностики *in vitro*.

- При случайном попадании химического лабораторного реагента в глаза или ротовую полость, а также на кожу немедленно обильно промойте это место водой. При необходимости обратитесь к врачу для получения медицинской помощи.

- Утилизация всех отходов должна проводиться в соответствии с местным законодательством.

- Все образцы и материалы, используемые для проведения теста, подлежат утилизации как содержащие инфекционные агенты. При обращении с лабораторными, химическими или биологически опасными отходами и их удалении необходимо соблюдать местные, региональные и национальные правила.

- К работе с изделием допускается только квалифицированный персонал, владеющий методикой лабораторных исследований и знакомый с возможными опасностями при обращении с данным набором. Необходимо использовать защитную одежду, перчатки и средства защиты глаз и лица и обращаться с набором в соответствии с требованиями надлежащей лабораторной практики.

ДОПОЛНИТЕЛЬНОЕ ОБОРУДОВАНИЕ, РЕАГЕНТЫ И ВСПОМОГАТЕЛЬНЫЕ МАТЕРИАЛЫ

Важное замечание:

Используйте только исправно работающее откалиброванное оборудование. Отсутствие этого требования может привести к неправильной интерпретации результатов.

Технические рекомендации и рекомендации по оборудованию:

- Термоциклер с форматом 96-луночного планшета (например, Термостат электрический для проведения полимеразной цепной реакции (ПЦР) ДНК Veriti Thermal Cycler, вариант исполнения Veriti 96-Well Thermal Cycle, производства «Life Technologies Corporation», США, РУ № ФСЗ 2011/09244 от 02.06.2017 г.).

- Флуориметр (или другой измерительный прибор, позволяющий определить концентрацию образцов в 96-луночных планшетах для использования с набором Promega QuantiFluor dsDNA, например «Анализатор "FluoVista" (ФлуоВиста) флуориметрический»,

производства «inno-train Diagnostik GmbH», Германия, РУ № РЗН 2022/17081 от 12.05.2022 г.).

- Система для препаративного электрофореза ДНК/РНК Pippin Prep (№ по каталогу PIP0001) или Blue Pippin (№ по каталогу BLU0001), производства Sage Science.
- Прибор для qPCR, рассчитанный на 96- или 384-луночный планшет (например, «Термоциклер для амплификации нуклеиновых кислот 1000, с принадлежностями исполнения: C1000, S1000, C1000 Touch», производства Bio-Rad Laboratories Inc., США, РУ № ФСЗ 2008/03399 от 21.06.2016 г.).
- Генетический секвенатор MiSeq, вариант исполнения MiSeq, производства «Illumina, Inc.», США (№ по каталогу SY-410-1003), РУ № РЗН 2014/1568 от 29.04.2014 г.,
- Персональный компьютер 64-битный с минимум 4 ядрами, 16 Гб оперативной памяти и видеокартой, совместимой с OpenGL 2.0
- Долговременное хранилище данных (приблизительно 2 Тб данных на один генетический секвенатор MiSeq в год).

Рекомендации по используемым расходным реагентам

- Мастер-микс GoTaq 2X Long PCR (№ по каталогу M402A), производства Promega. Каждому образцу требуется 73 мкл мастер-микса Promega GoTaq для 11 локусов.
- Набор для определения концентрации двуцепочечной ДНК QuantiFluor dsDNA System (№ по каталогу E2670), производства Promega
- Набор для очистки продуктов ПЦР ExoSAP-IT производства Thermo Fisher (№ по каталогу 75001-200, 75001-1ML, 75001-4X-1ML, 75001-10ML)
 - Для каждого образца требуется 4 мкл реагента ExoSAP-IT Express
 - №75001-200 по каталогу содержит 200 мкл реагента ExoSAP-IT Express
 - №75001-1ML по каталогу содержит 1 мл реагента ExoSAP-IT Express
 - №75001-4X-1ML по каталогу содержит 4 мл реагента ExoSAP-IT Express
 - №75001-10ML по каталогу содержит 10 мл реагента ExoSAP-IT Express
- Магнитные частицы Agencourt AMPure XP (№ по каталогу A63880, A63881 или A63882), производства Beckman Coulter.

Каждый прогон Holotype HLA требует максимум 3440 мкл магнитных частиц AMPure XP

 - №A63880 по каталогу содержит 5 мл магнитных частиц AMPure XP
 - №A63881 по каталогу содержит 60 мл магнитных частиц AMPure XP
 - №A63882 по каталогу содержит 450 мл магнитных частиц AMPure XP
- Картридж с гелем, 1,5% агарозы, без красителя, с внутренним стандартным раствором (Marker K/R2) для Pippin Prep/Blue Pippin (№ по каталогу CDF1510 для Pippin Prep и BDF1510 для Blue Pippin) (опционально)
- Набор для количественного анализа библиотеки – Illumina/Universal производства KAPA Biosystems (№ по каталогу KK4824)
- Аналитический набор Qubit dsDNA BR (№ в каталоге Q32850 или Q32853) (опционально)
 - № в каталоге Q32850 с содержанием 100 образцов
 - № в каталоге Q32853 с содержанием 500 образцов
 - 1 X Tris-EDTA (pH 8,0)

- Tween 20
- Сверхчистый свободный от примесей этанол (безводный спирт)
- Сверхчистая вода (без ДНКазы и РНКазы)
- 10 н. гидроксида натрия
- Наборы реагентов для генетических секвенаторов MiSeq от Illumina (Набор реагентов ИВД MiSeq™ Dx v3 (MiSeq™ Dx Reagent Kit v3) для секвенирования нуклеиновых кислот, производства «Illumina, Inc.», США, РУ № РЗН 2020/13097 от 30.12.2020 г.)

Рекомендованные вспомогательные материалы

- Пробирки для микроцентрифугирования объемом 1,5 мл (например, «Изделия медицинские полимерные для лабораторных исследований in vitro варианты исполнения: Микроцентрифужные пробирки, градуированные объемом 1,5 мл», РУ № ФСЗ 2009/05024 от 19.12.2022).
- Пробирки для микроцентрифугирования с низкой адгезией объемом 1,5 мл (рекомендуются Пробирки Eppendorf DNA LoBind, производства «Eppendorf AG», Германия, РУ № ФСЗ 2009/04520 от 19.06.2009 (№ в каталоге 0030108051))
- Пробирки для микроцентрифугирования с низкой адгезией объемом 2,0 мл (рекомендуются Пробирки Eppendorf DNA LoBind, производства «Eppendorf AG», Германия, РУ № ФСЗ 2009/04520 от 19.06.2009 (№ в каталоге 0030108078))
- Тонкостенные пробирки объемом 0,5 мл для прибора Qubit (например, «Изделия Eppendorf из полимерных материалов для лабораторных исследований in vitro. Пробирки Safe-Lock PCR clean с защелкой, объемом от 0,5мл до 2,0мл (Safe-Lock PCR clean tubes 0,5-2,0ml)», Германия, РУ № ФСЗ 2009/04520 от 19.06.2009 (№ в каталоге 0030124537)))
- Дозаторы с переменным объемом (емкостью 1,0-1000 мкл) (например, «Пипетки-дозаторы одноканальные и многоканальные фиксированным и регулируемым объемом доз Dlab и Apexlab» РУ № РЗН 2022/18393 от 29.09.2022)
- 8-канальные дозаторы с переменным объемом (емкостью 1,0-100 мкл) (например, «Пипетки-дозаторы одноканальные и многоканальные фиксированным и регулируемым объемом доз Dlab и Apexlab» РУ № РЗН 2022/18393 от 29.09.2022)
- 96-луночные планшеты, совместимые с термоциклером (например, «Термостат электрический для проведения полимеразной цепной реакции (ПЦР) ДНК Veriti Thermal Cycler. Плашки реакционные оптические 96-луночные MicroAmp для ПЦР», производства «Life Technologies Corporation», США, РУ № ФСЗ 2011/09244 от 02.06.2017 г)
- 96-луночные оптические планшеты, совместимые с флуориметром для планшетов или измерительным прибором для qPCR (например «Посуда из полимерных материалов для лабораторных исследований in vitro. Планшеты для проведения полимеразной цепной реакции (ПЦР-диагностики) на 96 лунки, с объемом лунки от 1,0 мкл до 2,2 мл», производства «Scientific Specialties Incorporated (SSI)», США, РУ № ФСЗ 2011/10287 от 11.04.2017 г.)
- Пленка для планшетов, совместимая с термоциклерами (проверялась на ПЦР длинных фрагментов) (например, «Термостат электрический для проведения полимеразной цепной реакции (ПЦР) ДНК Veriti Thermal Cycler. Пленка самоклеющаяся для плашек реакционных оптических 96-луночных MicroAmp для скоростной ПЦР», производства «Life Technologies Corporation», США, РУ № ФСЗ 2011/09244 от 02.06.2017 г).

- Оптически прозрачная пленка для планшетов, совместимая с измерительным прибором для qPCR (например «Посуда из полимерных материалов для лабораторных исследований in vitro. Пленки адгезивные для заклеивания ПЦР-планшетов», производства «Scientific Specialties Incorporated (SSI)», США, РУ № ФСЗ 2011/10287 от 11.04.2017 г.)
- Магнитный штатив, совместимый с пробирками для микроцентрифугирования объемом 2 мл (например, «Штатив лабораторный по ТУ 32.50.50-005-01813981-2020. Магнитный штатив для работы с пробирками объемом 1,5/2,0 мл. Артикул: МагСи», производства ООО "Компания Совтех", Россия, РУ № РЗН 2022/16856 от 19.08.2022)
- 96-луночные штативы-охладители (2 шт) (например, «Изделия медицинские лабораторные . Настольный штатив для амплификации с охлаждением Labtop Cooler», производства «Nunc A/S», Дания, РУ № ФСЗ 2012/11874 от 21.06.2016)
- Конические пробирки объемом 50 мл (например, «Пробирки медицинские полимерные по ТУ 9464-015-29508133-2014.. Пробирки конические с винтовой крышкой: 10 мл, 15 мл, 50 мл.», производства ООО "МиниМед", РУ № РЗН 2015/2596 от 13.01.2020)
- Емкости объемом 50 мл

ЮРИДИЧЕСКОЕ ПРЕДУПРЕЖДЕНИЕ

Инструкция по применению Holotype HLA 96/5 и все ее содержимое являются собственностью «Омиксон Биокомпьютинг Лтд» (Omixon) и предназначены исключительно для использования клиентом на условиях договора в отношении изделия (изделий), описанных в настоящем документе, и ни для какой другой цели. Настоящий документ и его содержание не должны использоваться или распространяться в любых других целях и/или иным образом передаваться, раскрываться или воспроизводиться каким-либо иным образом без предварительного письменного согласия компании Omixon. Компания Omixon не предоставляет посредством настоящего документа какую-либо лицензию на использование патента, товарного знака, авторских прав или прав, предоставляемых в соответствии с системой общего права, а также аналогичных прав третьих лиц.

Использование Omixon Holotype (включая программное обеспечение и анализ) регулируется условиями и положениями, которые являются частью коммерческого предложения. Условия и положения принимаются по умолчанию путем отправки заявки на заказ изделий Omixon. Лицензионное соглашение на использование продукта Omixon HLA Twin опубликовано на веб-сайте Omixon (www.omixon.com/hla-twin-eula/).

Использование только программного обеспечения Omixon HLA Twin регулируется лицензионным соглашением конечного пользователя Omixon HLA Twin (www.omixon.com/hla-twin-eula/).

Для правильного и безопасного использования продуктов Omixon все шаги, прописанные по инструкции в этом документе, должны выполняться квалифицированным и обученным персоналом. Перед использованием продуктов Omixon необходимо полностью ознакомиться с настоящим документом.

НЕСОБЛЮДЕНИЕ ИНСТРУКЦИЙ, СОДЕРЖАЩИХСЯ В ДАННОМ ДОКУМЕНТЕ МОЖЕТ ПРИВЕСТИ К ПОВРЕЖДЕНИЮ ПРОДУКТОВ, ТРАВМАМ ПЕРСОНАЛА, В ТОМ ЧИСЛЕ ПОЛЬЗОВАТЕЛЕЙ ИЛИ ТРЕТЬИХ ЛИЦ, МАТЕРИАЛЬНОМУ УЩЕРБУ.

КОМПАНИЯ ОМИХОН НЕ НЕСЕТ ОТВЕТСТВЕННОСТИ ЗА НЕПРАВИЛЬНОЕ ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ПРОДУКТОВ, ОПИСАННЫХ В ДАННОМ ДОКУМЕНТЕ (ВКЛЮЧАЯ ИХ ЧАСТЕЙ ИЛИ ПРОГРАММНОЕ ОБЕСПЕЧЕНИЕ) ИЛИ ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ТАКИХ ПРОДУКТОВ ЗА ПРЕДЕЛАМИ ДЕЙСТВИЯ ПРЯМЫХ ПИСЬМЕННЫХ ЛИЦЕНЗИЙ ИЛИ РАЗРЕШЕНИЙ, ПРЕДОСТАВЛЕННЫХ КОМПАНИЕЙ ОМИХОН, В СЛЕДСТВИЕ ПРИОБРЕТЕНИЯ КЛИЕНТОМ ТАКИХ ПРОДУКТОВ.

О любом серьезном происшествии, которое произошло в связи с использованием продукта Omixon Holotype HLA, следует немедленно сообщить в компанию Omixon по адресу support@omixon.com и в компетентный орган государства, членом которого является пострадавший пользователь и/или пациент.

ТОЛЬКО ДЛЯ ДИАГНОСТИЧЕСКОГО ПРИМЕНЕНИЯ *IN VITRO*

© 2023 «Омиксон Биокomпьютинг Лтд» Все права защищены

ВАЖНОЕ ЗАМЕЧАНИЕ ПЕРЕД НАЧАЛОМ РАБОТЫ

Рекомендации по выделению геномной ДНК

Геномная ДНК человека выделяется из периферической крови с использованием проверенных и зарекомендовавших себя наборов для выделения ДНК. Вне зависимости от выбранного подхода, для надежного проведения анализа требуется точное определение концентрации и чистоты выделенной ДНК.

ДНК не должна содержать примесей, которые могли бы повлиять на последующие операции по амплификации, подготовке библиотеки и секвенированию (например, спирта, солей, моющих средств, формальдегида и гепарина). Забор крови не следует проводить в пробирки с гепарином. Также не следует использовать образцы крови пациентов, проходящих гепариновую терапию, образцы липемичной и гемолизированной крови.

Подготовленную геномную ДНК, разведенную в воде без нуклеаз, можно использовать немедленно либо хранить в течение длительного времени при температуре -20°C и ниже. Мы рекомендуем использовать для подготовки геномной ДНК именно воду, так как ЭДТА в ТЕ-буфер могут ингибировать реакции ПЦР длинных фрагментов. Следует избегать повторных циклов замораживания и оттаивания, чтобы избежать деградации ДНК.

Для получения 80-120 нг входной геномной ДНК на амплификацию ПЦР настоятельно рекомендуется использовать концентрацию ДНК 20-30 нг/мкл. Для определения концентрации геномной ДНК мы рекомендуем использовать флуоресцентный метод.

Настоятельно рекомендуется использовать коэффициент поглощения 1,7-2 для соотношений 260 нм/280 нм и 260 нм/230 нм. Для амплификации генов HLA-A, HLA-B, HLA-C, HLA-DRB1 и HLA-DQB1 требуется 400-600 нг геномной ДНК образца.

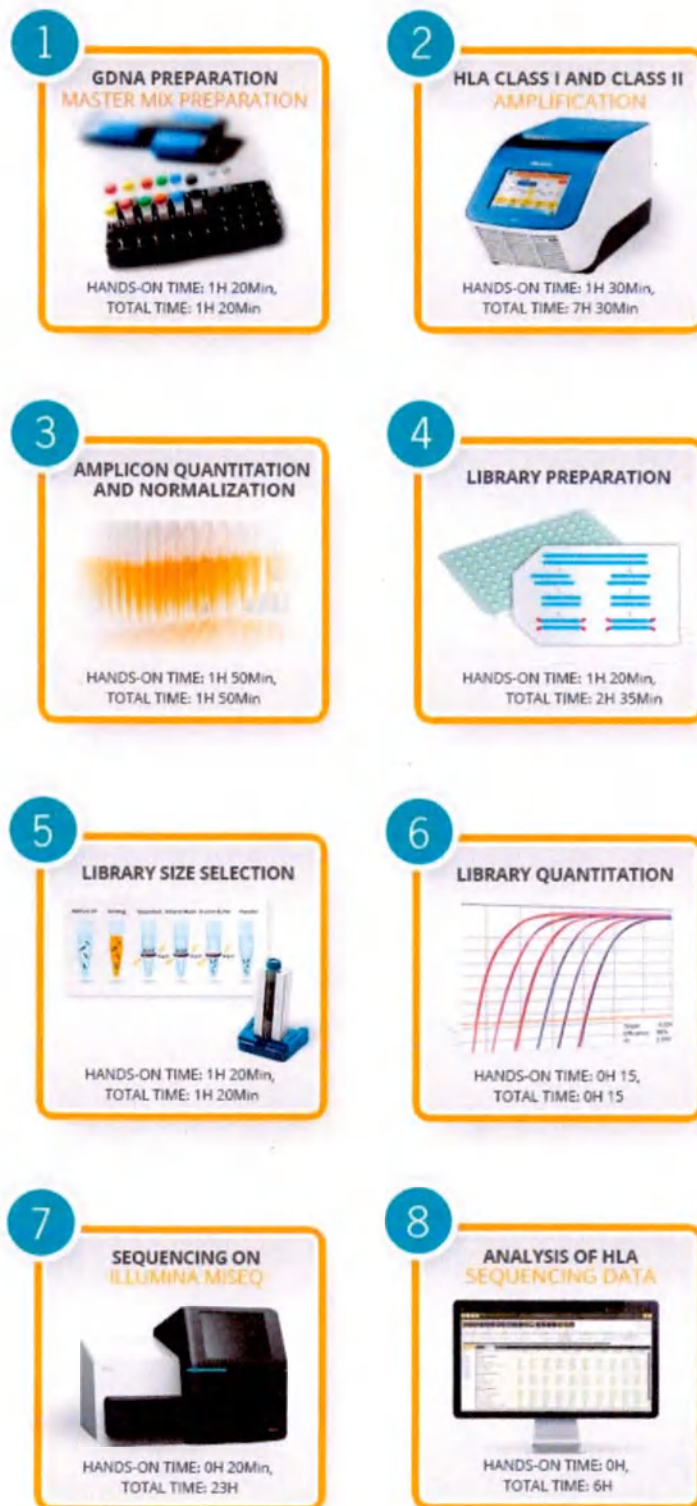
Утвержденные термоциклеры

Для всех наборов Holotype HLA 96/5, конфигураций A/B/C была проведена валидация на следующих термоциклерах:

- Термостат электрический для проведения полимеразной цепной реакции (ПЦР) ДНК Veriti Thermal Cycler, вариант исполнения Veriti 96-Well Thermal Cycle, производства «Life Technologies Corporation», США, РУ № ФСЗ 2011/09244 от 02.06.2017 г.
- Термостат электрический для проведения полимеразной цепной реакции (ПЦР) амплификации ДНК, модели GeneAmp PCR System 9700, производства «Applied Biosystems Group of The Applera Corporation», Сингапур.

Скорость линейного изменения для обоих аппаратов была максимальной.

КРАТКОЕ ИЗЛОЖЕНИЕ ШАГОВ



ГЛОССАРИЙ/ОПРЕДЕЛЕНИЯ

- Планшет для ампликонов - альтернативное название для планшета для амплификации
- Планшет для количественного анализа ампликонов - 96-луночный планшет, совместимый с флуориметром для планшетов, где производится количественный анализ разведенных ампликонов
- Планшет для амплификации - 96-луночный планшет для ПЦР, использующийся для амплификации локусов HLA
- Свободные от примесей пулы ампликонов - планшеты, содержащие все пулированные ампликоны после очистки от примесей при помощи микроносителей
- Библиотека образца — библиотека, подготовленная с помощью комбинирования (пулирования) всех локусов HLA для данного образца
- Планшет для реакции: планшет, на котором проводятся последовательные реакции с фрагментацией, обработкой концов и лигированием индексированных адаптеров к библиотекам образца
- Планшет для реагентов - планшет, используемый для разделения на аликвоты различных реагентов, используемых для приготовления библиотек образцов
- Окончательная библиотека - библиотека, включающая все библиотеки образцов, готовые к секвенированию за один сеанс обработки на MiSeq
- Планшет для количественного анализа стандартных растворов - 96-луночный планшет, совместимый с флуориметром для планшетов или устройством для qPCR, куда стандартные растворы ДНК помещаются для количественного анализа ампликонов

ШАГ 0 - НОРМАЛИЗАЦИЯ ГЕНОМНОЙ ДНК

Длительность: ~1 час



См. Рабочую тетрадь: вкладка подготовки геномной ДНК
(Refer to Workbook: gDNA preparation tab)

Выделите геномную ДНК из биологических образцов. Геномная ДНК должна быть разведена в воде без нуклеаз либо ТЕ-буфере с низким содержанием солей, поскольку высокое содержание ЭДТА в ТЕ-буфере может ингибировать ПЦР длинных фрагментов. Для определения концентрации геномной ДНК мы настоятельно рекомендуем использовать флуоресцентный метод.

Качество геномной ДНК должно соответствовать следующим показателям:

1. 260 нм/280 нм поглощающая способность между 1,7 и 1,9.
2. 260 нм/230 нм поглощающая способность 1,7 и выше.
3. Минимальный распад. Старая ДНК или ДНК, прошедшая несколько циклов заморозки/разморозки будет иметь больший распад.

Для амплификации генов HLA-A, HLA-B, HLA-C, HLA-DRB1 и HLA-DQB1 требуется 400-600 нг геномной ДНК для каждого образца.

Протокол

1. Разведите геномную ДНК до концентрации 20-30 нг/мкл (минимальный объем 44 мкл) в 96-луночном ПЦР-планшете или 8-луночных стрипах. Обратитесь к рабочей тетради, чтобы рассчитать необходимые объемы.
2. Закройте планшет/стрипы и отложите нормализованные образцы геномной ДНК до Шага 2.

ШАГ 1 - ПОДГОТОВКА МАСТЕР-МИКСА ДЛЯ АМПЛИФИКАЦИИ HLA

Длительность: ~20 минут



См. рабочую тетрадь: Вкладка подготовки ПЦР
(Refer to Workbook: PCR preparation tab)

Данный шаг предназначен для подготовки мастер-миксов для каждого локуса HLA с целью индивидуальной амплификации этого локуса. Локусы, подвергающиеся амплификации по данному протоколу: HLA-A, HLA-B, HLA-C, HLA-DRB1 и HLA-DQB1.

Список реагентов

Позиция	Хранение	Поставлено
Смесь праймеров HLA-A	-20 °C	Omixon
Смесь праймеров HLA-B	-20 °C	Omixon
Смесь праймеров HLA-C	-20 °C	Omixon
Смесь праймеров HLA-DRB1	-20 °C	Omixon
Смесь праймеров HLA-DQB1 (Набор 3)	-20 °C	Omixon
Реактив для усиления амплификации 1 (Enhancer 1)	-20 °C	Omixon
Мастер-микс Promega GoTaq 2X Long PCR	-20°C	Promega
Вода для молекулярной биологии (без ДНКазы и РНКазы)	-20°C	Пользователь

Протокол

1.1 Вытащите все смеси праймеров, реактив для усиления амплификации 1 (Enhancer 1) и мастер-миксы Promega GoTaq 2X Long PCR из морозильника и дайте оттаять при комнатной температуре.



Примечание: Мастер-микс Promega GoTaq 2X Long PCR содержит термостабильную ДНК-полимеразу с горячим стартом, поэтому он не требует хранения на льду.

1.2 Тщательно перемешайте все пробирки со смесью праймеров и мастер-миксами Promega GoTaq 2X PCR на вортексе в течение 5 секунд, а затем центрифугируйте их в течение 5 секунд с помощью функции быстрого центрифугирования (quick spin). Подготовьте мастер-микс для каждой смеси праймеров в соответствии с таблицами ниже (для количества менее 96 образцов используйте рабочую тетрадь Excel для расчета объемов):

Мастер-микс: HLA-A, B, C, DRB1

Реагент	Объем/образец/локус	Объем/96 образцов/локус
Вода для молекулярной биологии (без ДНКазы и РНКазы)	7,5 мкл	750 мкл
Мастер-микс Promega GoTaq 2X Long PCR	7 мкл	700 мкл
Смесь праймеров	1,5 мкл	150 мкл
Общий объем	16 мкл	1600 мкл

Мастер-микс: HLA-DQB1 Набор 3

Реагент	Объем/образец/локус	Объем/96 образцов/локус
Вода для молекулярной биологии (без ДНКазы и РНКазы)	5,5 мкл	550 мкл
Мастер-микс Promega GoTaq 2X Long PCR	7 мкл	700 мкл
Реактив для усиления амплификации 1 (Enhancer 1)	2 мкл	200 мкл
Смесь праймеров	1,5 мкл	150 мкл
Общий объем	16 мкл	1600 мкл

- 1.3 Перемешайте каждую пробирку с мастер-миксом на вортексе в течение 5 секунд и центрифугируйте их в течение 5 секунд с помощью функции быстрого центрифугирования (quick spin).



Примечание: Набор Holotype HLA содержит достаточный объем реагентов для 96 реакций плюс дополнительный объем, предусматривающий потери при пипетировании и неудачной амплификации.

ШАГ 2 – АМПЛИФИКАЦИЯ HLA КЛАССА I и II

Длительность: ~ 7 часов 30 минут



См. рабочую тетрадь: Вкладка с разметкой планшетов
(Refer to Workbook: Plate maps tab)

Шаг 2 предназначен для амплификации локусов HLA. Для амплификации локусов HLA класса I и II оптимизированы разные условия для проведения ПЦР. После выполнения реакций ПЦР амплификация подтверждается электрофорезом в агарозном геле (опционально).



Подсказка – хотя и рекомендуется проводить электрофорез в агарозном геле, он не является необходимым условием для успешного выполнения протокола Holotype HLA. Амплификация считается успешной, если при подсчете ампликонов (шаг 3) концентрация выше 50 нг/мкл.

Список реагентов

Позиция	Хранение	Поставлен о
Мастер-микс HLA-A	-20 °C	Шаг 1
Мастер-микс HLA-B	-20 °C	Шаг 1
Мастер-микс HLA-C	-20 °C	Шаг 1
Мастер-микс HLA-DRB1	-20 °C	Шаг 1
Мастер-микс HLA-DQB1 (Набор 3)	-20 °C	Шаг 1
геномная ДНК	4 °C	Пользователь

Протокол

- Внесите аликвоты от каждого мастер-микса в размере 16 мкл в отдельные лунки 96-луночного планшета для ПЦР.



Примечание: Для амплификации локусов HLA класса I и II были оптимизированы разные условия ПЦР, поэтому мастер-миксы отдельных классов I и II не должны присутствовать на одном планшете.

- Добавьте 4 мкл каждого образца разведенной геномной ДНК в соответствующую лунку на планшетах, подготовленных в предыдущем шаге. Аккуратно перемешайте пипетированием.
- Закройте планшет термической пленкой и осмотрите каждую лунку. Центрифугируйте все планшеты для амплификации в течение 5 секунд с помощью функции быстрого центрифугирования (quick spin).

2.4 Поместите планшеты для амплификации в термоциклеры и запустите программы амплификации класса I и II согласно следующим таблицам:

Амплификация класса I (HLA-A, B и C)

Количество циклов	Температура	Время
1	95 °C	2 минуты
40	95 °C	15 секунд
	65 °C	30 секунд
	68 °C	4 минуты
	68 °C	10 минут
1	4 °C	∞

Амплификация класса II (HLA-DRB1 и DQB1)

Количество циклов	Температура	Время
1	95 °C	2 минуты
40	95 °C	15 секунд
	65 °C	30 секунд
	68 °C	8 минут
	68 °C	10 минут
1	4 °C	∞

Ожидаемые размеры ампликонов

Локус HLA	Ожидаемый размер ампликона (т.н.)
HLA-A, B и C	~3
HLA-DRB1	~4,3
HLA-DQB (Набор 3)	~6,5



Примечание: Успешность амплификации можно проверить, прогнав каждый ампликон через стандартный 2% агарозный гель при 250 В на протяжении 30 минут (опционально).



Безопасная точка остановки. Ампликоны можно хранить при 4 °C одну ночь или при -20 °C на протяжении 3 месяцев.

Шаг 3 – КОЛИЧЕСТВЕННЫЙ АНАЛИЗ И НОРМАЛИЗАЦИЯ АМПЛИКОНА (ДЛЯ ПЛАНШЕТОВ ЕМКОСТЬЮ 200 МКЛ)

Длительность: ~1 час 10 минут



См. рабочую тетрадь: Вкладка количественного анализа ампликонов
(Refer to Workbook: Amplicon quantitation tab)

Концентрация ампликона измеряется с помощью системы QuantiFluor dsDNA, которая содержит флуоресцентный ДНК-связывающий краситель и стандарт ДНК для точного количественного анализа малых объемов двухцепочечной ДНК (dsDNA).

Инструкцию по количественному анализу ампликонов в планшетах емкостью 100 мкл см в Приложении 1.

Примечание: Количественное определение ампликонов не является обязательным шагом, но мы рекомендуем его для оптимальной подготовки последующей библиотеки. Оценка концентрации ампликонов также может быть проведена после тщательной внутренней проверки с помощью электрофореза в агарозном геле. Шаг количественной оценки ампликонов не стоит пропускать при отсутствии опыта работы с протоколами Holotype HLA.

Список реагентов

Позиция	Хранение	Поставлено
Планшет для амплификации класса I	4 °C	Шаг 2
Планшеты для амплификации класса II	4 °C	Шаг 2
Lambda DNA Standard (100 нг/мкл)	4 °C	Promega
Краситель QuantiFluor dsDNA (200x)	4 °C	Promega
буфер 20x TE (pH 7.5)	4 °C	Promega
Вода для молекулярной биологии (без ДНКазы и РНКазы)	от 20 °C до 25 °C	Пользователь

Протокол

- 3.1 Подготовьте стандарты ДНК путем серийного разведения реагента Lambda DNA standard (100 нг/мкл), входящего в состав набора QuantiFluor, согласно таблице ниже:

Этикетка на пробирке	Исходная ДНК	Объем ДНК (мкл)	Объем 1х ТЕ (мкл)	Конеч. конц. (нг/мкл)
Стандарт 1	Lambda DNA	7,5 мкл	492,5 мкл	1,5 нг/мкл
Стандарт 2	Стандарт 1	250 мкл	250 мкл	0,75 нг/мкл
Стандарт 3	Стандарт 2	250 мкл	250 мкл	0,38 нг/мкл
Стандарт 4	Стандарт 3	250 мкл	250 мкл	0,19 нг/мкл
Стандарт 5	Стандарт 4	250 мкл	250 мкл	0,09 нг/мкл
Стандарт 6	Стандарт 5	250 мкл	250 мкл	0,05 нг/мкл
Холостая проба	Холостая проба	0 мкл	250 мкл	0 нг/мкл

- 3.2 Подготовьте планшеты для количественного анализа ампликонов (см. дополнительные иллюстрации). Добавьте 99 мкл 1х буфера ТЕ в лунки 96-луночного оптически прозрачного планшета.
- 3.3 Добавьте 1 мкл ампликонов из соответствующих лунок планшета для ампликонов в отдельные лунки на планшетах для количественного анализа ампликонов. Аккуратно перемешайте пипетированием.
- 3.4 Подготовьте раствор 1х рабочего красителя QuantiFluor Dye по следующей формуле: 0,5 мкл QuantiFluor Dye (200X) + 99,5 мкл 1х буфера ТЕ. Подготовленного раствора 1х QuantiFluor должно хватать на каждый образец в планшетах с ампликонами и стандарты (всего 14) из расчета 100 мкл на образец.
- 3.5 Подготовьте планшеты для количественного анализа стандартных растворов и ампликонов. Добавьте 100 мкл рабочего раствора 1х QuantiFluor Dye из шага 3.2 в лунки 96-луночного оптического планшета (планшет для количественного анализа стандартов) и в планшеты для количественного анализа ампликонов.
- 3.6 Добавьте 100 мкл каждого стандарта, подготовленных выше, в двух повторностях в отдельные лунки планшета для количественного анализа стандартов (всего 14 лунок). Аккуратно перемешайте пипетированием.
- 3.7 Перемешайте в вортексе в течение 5 секунд и осадите методом центрифугирования (на высокой скорости).
- 3.8 Инкубируйте пробы в течение 5 минут при комнатной температуре в защищенном от света месте.
- 3.9 Проверьте концентрацию стандартов в планшете с помощью флуориметра или qPCR амплификатора, аналогично проверьте концентрацию ампликонов. Используйте следующий режим на qPCR амплификаторе (в зависимости от модели анализатора может потребоваться настройка параметров):

Количество циклов	Температура	Время
1	25 °C	10 секунд
2	25 °C	15 секунд
	25 °C	30 секунд (операции сбора данных)

- 3.10 Рассчитайте концентрацию ДНК в планшетах для количественного анализа

ампликонов, используя технические возможности флуориметра или qPCR амплификатора. Для помощи в расчетах см. вкладку "Разведение" (Dilution) в предоставленной рабочей тетради.

3.11 Разведите ДНК в планшетах с ампликонами водой для молекулярной биологии (без ДНКазы и РНКазы), чтобы конечная концентрация ДНК находилась в пределах 50-120 нг/мкл.

- Если концентрация ДНК составляет 180 нг/мкл или выше: добавьте 20 мкл H₂O
- Если концентрация ДНК составляет 115-180 нг/мкл или выше: добавьте 10 мкл H₂O
- Если концентрация ДНК составляет 115 нг/мкл или выше: не добавляйте H₂O



Безопасная точка остановки. Ампликоны можно хранить при 4 °C одну ночь или при -20 °C на протяжении 3 месяцев.

ШАГ 4 – ПУЛИРОВАНИЕ И ОЧИСТКА АМПЛИКОНОВ С ПОМОЩЬЮ EXOSAP-IT EXPRESS

Длительность: ~40 минут



См. рабочую тетрадь: Вкладка подготовки библиотеки
(Refer to Workbook: Library preparation tab)

Список реагентов

Позиция	Хранение	Поставлено
Планшеты для нормализованной амплификации класса I	4° C	Шаг 3
Планшеты для нормализованной амплификации класса II	4° C	Шаг 3
Набор для очистки продуктов ПЦР ExoSAP-IT	20° C	Affymetrix

Протокол

- 4.1 Объедините все локусы для каждого образца в лунки одного планшета с ампликонами. Смешайте объемы, указанные для каждого локуса, согласно следующей таблице, чтобы получить окончательный объем в 38 мкл:

Локус HLA	Пулированный объем
A	5 мкл
B	5 мкл
C	5 мкл
DQB1 набор 3	10 мкл
DRB1	13 мкл

- 4.2 Добавьте 4 мкл реагента из набора для очистки продуктов ПЦР ExoSAP-IT в каждую библиотеку образцов. Аккуратно промойте наконечник от остатков путем пипетирования. Запечатайте планшет пленкой. Центрифугируйте планшет в течение 10 секунд с помощью функции быстрого центрифугирования (quick spin).
- 4.3 Поместите планшет с объединенными ампликонами в термоциклер и запустите следующую программу:

Количество циклов	Температура	Время
1	37 °C	4 минуты
1	80 °C	1 минута
1	4 °C	∞



Безопасная точка остановки. Пулы очищенных ампликонов можно хранить при 4°C одну ночь или при -20°C на протяжении 3 месяцев.

ШАГ 5 – ПОДГОТОВКА БИБЛИОТЕКИ

Длительность: ~2 часа 35 минут



См. рабочую тетрадь: Вкладка подготовки библиотеки
(Refer to Workbook: Library preparation tab)

На этой стадии пулированные ампликоны подготавливаются к секвенированию на платформе Illumina MiSeq. Ампликоны ферментативно фрагментируются, концы репарируются и аденилируются и к ним присоединяются индексированные адаптеры.



Примечание: Omixon рекомендует использовать объемы больше чем необходимо для анализа 96 образцов, потому что многие ферменты и буферы имеют вязкую структуру, что приводит к излишним потерям при пипетировании. Также рекомендуется использовать планшет с реагентами на более чем 8 лунок. 96-луночный планшет с реагентами помещается в 96-луночный штатив-охладитель, где каждый мастер-микс разделяется на аликвоты в чистую колонку для дозирования многоканальной пипеткой.

Список реагентов

Позиция	Хранение	Поставлено
Пулы очищенных ампликонов	4 °C	Шаг 4
Вода для молекулярной биологии (без ДНКазы и РНКазы)	от 20 °C до 25 °C	Пользователь
Фермент для фрагментирования (A)	-20 °C	Omixon
Буфер для фрагментирования (B)	-20 °C	Omixon
Фермент для обработки концов (C)	-20 °C	Omixon
Буфер для обработки концов (D)	-20 °C	Omixon
Фермент для лигирования (E)	-20 °C	Omixon
Буфер для лигирования (F)	-20 °C	Omixon
Планшет с адаптерами	-20 °C	Omixon

Протокол

- Включите термоциклер. Убедитесь, что крышка нагревается. Запустите программу фрагментации из пункта 10 и продолжайте подготовку реакции фрагментации.
- Разморозьте буфер для фрагментации до комнатной температуры и оставьте его на льду.



Примечание: Тщательно перемешайте фермент для фрагментирования (A) в вихре (30 секунд) перед использованием. Центрифугируйте на протяжении 5

секунд с помощью функции быстрого центрифугирования (quick spin) и положите на лед.

- 5.3 Подготовьте мастер-микс для фрагментации согласно таблице ниже (если образцов меньше 96, см. в рабочей тетради Excel информацию по расчету объемов):

Мастер-микс для фрагментации

Реагент	Объем на библиотек у (мкл)	Рекомендованные объемы для библиотек на 96 образцов (мкл)	Цветовой код
Вода для молекулярной биологии (без ДНКазы и РНКазы)	2 мкл	220 мкл	
Буфер для фрагментирования (В)	2 мкл	220 мкл	Красный
Фермент для фрагментирования (А)	1 мкл	110 мкл	Желтый
Общий объем	5 мкл	550 мкл	



Примечание: Реакция фрагментации была разработана для получения ДНК идеального размера для секвенирования на платформе Illumina. Важно, чтобы реагенты оставались холодными до начала реакции в термоциклере во избежание излишней фрагментации. Для минимизации излишней фрагментации рекомендуется использовать многоканальные пипетки.

- 5.4 Тщательно перемешайте мастер-микс для фрагментации в вортексе (5 секунд) и осадите посредством центрифугирования 5 секунд (quick spin). Поместите мастер-микс для фрагментации на лед. Запустите программу фрагментации в термоциклере и поддерживайте предварительный нагрев блока при подготовке реакции.
- 5.5 Центрифугируйте пулы очищенных ампликонов 5 секунд (quick spin) и поместите их на лед или на штатив-охладитель.
- 5.6 Подготовьте планшет для реакции: поместите новый 96-луночный планшет для ПЦР на штатив-охладитель.
- 5.7 Добавить 5 мкл мастер-микса для фрагментации в пустые лунки планшета для реакции в соответствии с образцами в планшете пулированных ампликонов. Рекомендуется использовать многоканальные пипетки.
- 5.8 Перенесите 15 мкл каждого пула ампликонов из планшета с пулами очищенных ампликонов в соответствующие лунки на планшет для реакции с помощью многоканальной пипетки. Смешайте посредством пипетирования. Оставьте планшет для реакции на штативе-охладителе.
- 5.9 Закройте планшет для реакции термической пленкой и центрифугируйте его на протяжении 5 секунд (quick spin).
- 5.10 Перенесите планшет для реакции в термоциклер, затем нажмите <Пропустить шаг>.

чтобы немедленно возобновить программу фрагментации::

Программа фрагментации

Количество циклов	Температура	Время
1	37 °C	∞
1	37 °C	10 минут
1	70 °C	15 минут
1	4 °C	∞



Безопасная точка остановки. Библиотеки можно хранить при 4 °C одну ночь или при -20 °C более длительное время.

- 5.11 Разморозьте Буфер для обработки концов и подготовьте мастер-микс для обработки концов согласно таблице ниже (если образцов меньше 96, см. в рабочей тетради Excel информацию по расчету объемов):

Мастер-микс для обработки концов

Реагент	Объем на библиотек у (мкл)	Рекомендованные объемы для библиотек на 96 образцов (мкл)	Цветовой код
Вода для молекулярной биологии (без ДНКазы и РНКазы)	1,25 мкл	150 мкл	
Буфер для обработки концов (D)	2,5 мкл	300 мкл	Оранжевый
Фермент для обработки концов (C)	1,25 мкл	150 мкл	Зеленый
Общий объем	5 мкл	600 мкл	

- 5.12 Перемешайте мастер-микс для обработки концов в вортексе и осадите посредством центрифугирования на протяжении 5 секунд (quick spin). Держите мастер-микс на льду до использования.
- 5.13 Центрифугируйте планшет (содержащий фрагментированные образцы) для реакции на протяжении 5 секунд. Добавьте 5 мкл мастер-микса для обработки концов в каждую лунку планшета для реакции и перемешайте посредством пипетирования. Рекомендуется использовать многоканальные пипетки.
- 5.14 Закройте планшет для реакции термической пленкой и центрифугируйте его на протяжении 5 секунд (quick spin).
- 5.15 Инкубируйте планшет для реакции в термоциклере по следующей программе:

Программа обработки концов

Количество циклов	Температура	Время
1	20 °C	30 минут
1	70 °C	5 минут
1	4 °C	∞



Безопасная точка остановки. Библиотеки можно хранить при 4 °C одну ночь или при -20 °C более длительное время.

- 5.16 Извлеките планшет с индексированными адаптерами и дайте ему разморозиться до комнатной температуры после запуска программы обработки концов в термоциклере. После того как планшет с адаптерами нагреется до комнатной температуры, центрифугируйте его на протяжении 1 минуты на скорости 3000 об/мин.
- 5.17 Аккуратно снимите пленку с планшета с адаптерами. После снятия пленки не встряхивайте планшет во избежание перекрестного загрязнения.
- 5.18 Перенесите 5 мкл из каждой лунки планшета с адаптерами в соответствующие лунки на планшета для реакции. Перемешайте посредством пипетирования. Для остальных шагов данного протокола используйте планшет для реакции.



Примечание: Если вы НЕ собираетесь использовать планшет с адаптерами целиком, можно использовать только необходимое количество адаптеров. Разрежьте пленку между теми лунками, которые вы собираетесь использовать, и теми, которые хотите оставить. Аккуратно снимите пленку с планшета с адаптерами, оставив ее только на тех лунках, которые не предполагается использовать.

- a. Перенесите 5 мкл из каждой лунки планшета с адаптерами в соответствующие лунки на планшета для реакции и перемешайте посредством пипетирования.
 - b. Закройте планшет с адаптерами и верните его на хранение при -20°C. Для остальных шагов, описанных в руководстве, используйте планшет для реакции.
- 5.19 Разморозьте буфер для лигирования и подготовьте мастер-микс для лигирования согласно таблице ниже (если образцов меньше 96, см. в рабочей тетради Excel информацию по расчету объемов):

Мастер-микс для лигирования

Реагент	Объем на библиотеку (мкл)	Рекомендованные объемы для библиотек на 96 образцов (мкл)	Цветовой код
Буфер для лигирования (F)	30 мкл	3300 мкл	Черный
Фермент для лигирования (E)	2,5 мкл	275 мкл	Синий
Общий объем	32,5 мкл	3575 мкл	

- 5.20 Тщательно перемешайте мастер-микс для лигирования в вортке (5 секунд) и осадите посредством центрифугирования 5 секунд (quick spin).
- 5.21 Добавить 32,5 мкл мастер-микса для лигирования в каждую лунку в планшете для реакции. Рекомендуется использовать многоканальные пипетки. Смешайте посредством пипетирования.
- 5.22 Закройте планшет для реакции термической пленкой и центрифугируйте его на протяжении 5 секунд (quick spin).
- 5.23 Инкубируйте планшет для реакции в термоциклере по следующей программе:

Программа лигирования

Количество циклов	Температура	Время
1	25 °C	30 минут
1	70 °C	10 минут
1	4 °C	∞



Безопасная точка остановки. Библиотеки можно хранить при 4 °C одну ночь или при -20 °C более длительное время.

Пулирование библиотеки

- 5.24 Создайте окончательную библиотеку, совместив аликвоту из каждого пулированного ампликона и библиотеку отдельного образца в 2 мл центрифужной пробирке с низкой адгезией.
- При количестве образцов 16 и более** – рассчитайте объем библиотеки каждого образца для пулирования их в одну **Библиотеку** общим объемом 900 мкл. Разделите 900 мкл на количество библиотек образцов. Это объем аликвоты, который необходимо взять из каждой библиотеки образцов и пипетировать в Библиотеку.
 - При количестве образцов менее 16** – перенесите 60 мкл из библиотеки каждого образца в пробирку со слабой адгезией объемом 2,0 мл, которая будет содержать пулированную Библиотеку.

Для выбора размера Библиотеки с использованием магнитных частиц AMPure XP

перейдите к шагу 6. Для выбора размера Библиотеки с использованием Pippin Prep перейдите к Приложению 2.

ШАГ 6 - ВЫБОР РАЗМЕРА БИБЛИОТЕКИ ПРИ ПОМОЩИ МИКРОНОСИТЕЛЕЙ

Длительность: ~1 час 20 минут



См. рабочую тетрадь: Вкладка подготовки библиотеки
(Refer to Workbook: Library preparation tab)

В шаге 6 описывается протокол выбора размера одного пула индексированных библиотек образцов с использованием магнитных частиц AMPure XP. Микроносители Agencourt AMPure XP используют технологию обратимой твердофазной иммобилизации для связывания ДНК определенного размера к магнитным частицам в пропорции частица/образец (об./об.). При меньших соотношениях частиц (0.2X- 0.8X) привязываются более крупные фрагменты ДНК, оставляя в растворе фрагменты меньшего размера. При увеличении соотношения частица/образец (1X – 2X) микроносители могут привязывать к себе также и фрагменты меньшего размера.

Список реагентов

Позиция	Хранение	Поставлено
Общая библиотека	4° С	Шаг 5
Реагент для очистки продуктов ПЦР AMPure XP	4° С	производства Beckman Coulter
1X Tris-EDTA	от 20°С до 25°С	Пользователь
Tween 20	от 20°С до 25°С	Пользователь
80% этанол (свежеприготовленный)	от 20°С до 25°С	Пользователь
Вода для молекулярной биологии (без ДНКазы и РНКазы)	от 20°С до 25°С	Пользователь



Примечание: Следующий протокол написан для библиотек, содержащих минимум 12 образцов, где объем пула составляет 700 мкл. Если ваша пулированная библиотека составляет менее 700 мкл, см. в рабочей тетради Excel инструкции по расчету объемов, либо используйте следующие пропорции:

Библиотека: Соотношение частиц	
Первый отбор	1 : 0,2
Второй отбор	1 : 1
Третий отбор	Всегда фиксировано

Протокол

Подготовка реагента:

6.1 Подготовьте буфер для очистки частиц согласно следующей таблице:

Реагент	Объем
1X Tris-EDTA	40 мл
Tween 20	20 мкл
Общий объем	40,02 мл



Примечание: Буфер для очистки частиц может храниться при комнатной температуре до 3 месяцев.

- 6.2 Подготовьте 5 мл свежего 80%-го этанола (4 мл EtOH + 1 мл H₂O).
- 6.3 **Тщательно** перемешайте магнитные частицы AMPure XP в вортексе (30 секунд).
- 6.4 Разделите магнитные частицы AMPure XP на аликвоты по 840 мкл в пробирки со слабой адгезией объемом 2 мл и **нагрейте их до комнатной температуры**. Для использования в третьем отборе, описанном ниже, частицы AMPure должны быть комнатной температуры.
- 6.5 Добавьте 840 мкл буфера очистки к магнитным частицам, разделенным на аликвоты. Тщательно перемешайте в вортексе 10 секунд. Осадите посредством центрифугирования на протяжении 5 секунд (quick spin).
- 6.6 Инкубируйте на протяжении 1 минуты при комнатной температуре.
- 6.7 Установите пробирку на магнитный штатив на 2 минуты или до момента, пока раствор не станет прозрачным (обычно не более 4 минут).
- 6.8 Аккуратно удалите и выбросьте надосадочную жидкость. Будьте аккуратны и не заденьте частицы.
- 6.9 Добавьте 840 мкл буфера очистки частиц к частицам. Тщательно перемешайте в вортексе в течение 10 секунд. Осадите посредством центрифугирования на протяжении 5 секунд (quick spin).
- 6.10 Инкубируйте на протяжении 1 минуты при комнатной температуре.
- 6.11 Перемешайте частицы в вортексе в течение 10 секунду до перерастворения и разделите их на аликвоты по 140 мкл в чистые пробирки с низкой адгезией объемом 2 мл. *При использовании менее 12 образцов см. используемый объем частиц в рабочей тетради Excel.*
- 6.12 **ОСТАВЬТЕ** остальные 700 мкл частиц в буфере очистки для второго отбора.

Первый отбор:

- 6.13 Поместите пробирку с 140 мкл частиц в буфере очистки на магнитный штатив на 2

минуты. При использовании менее 12 образцов см. используемый объем частиц в рабочей тетради Excel.

- 6.14 Аккуратно удалите и выбросьте надосадочную жидкость. Снимите пробирку со штатива.
- 6.15 Добавьте к частицам **700 мкл** пулированной библиотеки. – Перемешайте в вортексе в течение 5 секунд и осадите посредством центрифугирования на протяжении 5 секунд (quick spin). При использовании менее 12 образцов см. используемый объем пулируемой библиотеки в рабочей тетради Excel.
- 6.16 Инкубируйте при комнатной температуре в течение 5 минут.
- 6.17 Снова установите пробирку на магнитный штатив на 4 минуты, чтобы частицы осели.
- 6.18 **СОБЕРИТЕ надосадочную жидкость (библиотека)** в чистую пробирку с низкой адгезией объемом 2 мл.

Второй отбор:

- 6.19 Поместите пробирку с 700 мкл магнитных частиц в буфере очистки на магнитный штатив на 2 минуты, чтобы частицы осели. Аккуратно удалите и выбросьте надосадочную жидкость. При использовании менее 12 образцов см. используемый объем частиц в рабочей тетради Excel.
- 6.20 Снимите пробирку с частицами со штатива.
- 6.21 Добавьте надосадочную жидкость из библиотеки, собранную в первом отборе, шаг 5.18, к частицам.
- 6.22 Тщательно перемешать в вортексе в течение 10 секунд до перерастворения частиц. Осадите посредством центрифугирования на протяжении 5 секунд (quick spin).
- 6.23 Инкубируйте при комнатной температуре в течение 5 минут.
- 6.24 Снова установите пробирку на магнитный штатив на 4 минуты, чтобы частицы осели.
- 6.25 Аккуратно удалите и выбросьте надосадочную жидкость.
- 6.26 Добавьте ~0,7-1 мл только что подготовленного 80%-го этанола в пробирку, пока она находится на магнитном штативе. Объем должен быть таким, чтобы покрыть частицы.
- 6.27 Инкубируйте пробирку на магнитном штативе при комнатной температуре на протяжении 30 секунд, затем аккуратно удалите и выбросьте надосадочную жидкость.
- 6.28 Повторите шаги 6.26 и 6.27.
- 6.29 Центрифугируйте пробирку на протяжении 3 секунд (quick spin), после чего быстро поставьте ее обратно на магнитный штатив и удалите пипеткой остатки этанола.
- 6.30 Оставьте пробирку на магнитном штативе с открытой крышкой на 5 минут, чтобы высушить осевшие частицы.

- 6.31 Снимите пробирку с магнитного штатива и элюируйте ДНК, добавив 200 мкл воды (без ДНКазы и РНКазы) к частицам.
- 6.32 Тщательно перемешайте в вортексе в течение 10 секунд до перерастворения частиц. Осадите посредством центрифугирования в течение 5 секунд (quick spin).
- 6.33 Инкубируйте при комнатной температуре в течение 2 минут.
- 6.34 Поместите пробирку с библиотекой на магнитный штатив на 2 минуты.
- 6.35 ПЕРЕНЕСИТЕ 200 мкл элюата (библиотека) в чистую пробирку с низкой адгезией объемом 2 мл.

Третий отбор:

- 6.36 **Тщательно перемешайте вортексом** (в течение 30 секунд) сток магнитных частиц AMPure XP комнатной температуры. Добавьте 160мкл аликвоты частиц к 200 мкл библиотеки из шага 6.35 второго отбора.
- 6.37 Тщательно перемешайте в вортексе в течение 5 секунд до перерастворения частиц в библиотеке. Осадите посредством центрифугирования на протяжении 5 секунд (quick spin).
- 6.38 Инкубируйте при комнатной температуре в течение 5 минут.
- 6.39 Снова установите пробирку на магнитный штатив на 4 минуты, чтобы частицы осели.
- 6.40 Аккуратно удалите и выбросьте надосадочную жидкость.
- 6.41 Добавьте ~0,5-1 мл только что подготовленного 80%-го этанола в пробирку, пока она находится на магнитном штативе. Объем должен быть таким, чтобы покрыть частицы.
- 6.42 Инкубируйте пробирку на магнитном штативе при комнатной температуре на протяжении 30 секунд, затем аккуратно удалите и выбросьте надосадочную жидкость.
- 6.43 Повторите шаги 6.41 и 6.42.
- 6.44 Центрифугируйте пробирку в течение 5 секунд (quick spin), быстро перенесите ее обратно на магнитный штатив и удалите пипеткой остатки этанола.
- 6.45 Оставьте пробирку на магнитном штативе с открытой крышкой на 5 минут, чтобы высушить микроносители.
- 6.46 Снимите пробирку с магнитного штатива и элюируйте библиотеку, добавив 25 мкл воды (без ДНКазы и РНКазы) к частицам.
- 6.47 Тщательно перемешать в вихревой мешалке на протяжении 10 секунд до перерастворения микроносителей. Осадите посредством центрифугирования в течение 5 секунд (quick spin).
- 6.48 Инкубируйте при комнатной температуре в течение 2 минут.
- 6.49 Поместите пробирку с библиотекой на магнитный штатив на 2 минуты.

6.50 ПЕРЕНЕСИТЕ 25 мкл элюата (библиотека) в чистую пробирку с низкой адгезией объемом 1,5 мл.



Безопасная точка остановки. Библиотеки можно хранить при -20 °C в течение длительного времени.

ШАГ 7 - КОЛИЧЕСТВЕННЫЙ АНАЛИЗ БИБЛИОТЕКИ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ПРИБОРА ДЛЯ QPCR

Длительность: ~1 час 15 минут



См. рабочую тетрадь: Таблица количественного анализа библиотеки
(Refer to Workbook: Library quantitation tab)

Необходимо провести количественную оценку библиотеки выбранного размера для оптимального использования секвенатора Illumina MiSeq. Концентрацию выбранной по размеру библиотеки можно точно определить с помощью qPCR.

По желанию можно использовать набор Qubit dsDNA BR и флуориметр Qubit для измерения концентрации библиотеки. Для этого протокола см. Приложение 3.



Примечание. флуорометрический метод количественной оценки библиотеки является быстрым, однако, как заявляет Illumina, с этим методом связан риск переоценить концентрацию библиотеки, поскольку он измеряет концентрацию всей двухцепочечной ДНК в пуле. Сюда входят частично сконструированные фрагменты (неполные фрагменты библиотеки) и остаточные димеры праймеров из ПЦР. Поэтому мы рекомендуем метод на основе qPCR для количественного определения библиотеки, однако при использовании флуорометрического метода мы настоятельно рекомендуем выполнять собственную внутреннюю проверку перед рутинным использованием.

Список реагентов

Позиция	Хранение	Поставлено
10x готовая смесь праймеров Illumina	-20 °C	KAPA Biosystems
Мастер-микс 2x KAPA SYBR FAST qPCR	-20 °C	KAPA Biosystems
Стандартный раствор 1 (20,00 пМ)	-20 °C	KAPA Biosystems
Стандартный раствор 2 (2,00 пМ)	-20 °C	KAPA Biosystems
Стандартный раствор 3 (0,20 пМ)	-20 °C	KAPA Biosystems
Стандартный раствор 4 (0,02 пМ)	-20 °C	KAPA Biosystems
Стандартные растворы Illumina для ДНК	-20 °C	KAPA Biosystems
Вода для молекулярной биологии (без ДНКазы и РНКазы)	от 20 °C до 25 °C	Пользователь
1x TE буфер (pH 8,0)	от 20 °C до 25 °C	Пользователь
Выбранная по размеру библиотека	4 °C	Шаг 6

Протокол

- 7.1 Подготовьте смесь праймеров для qPCR с использованием 10х готовой смеси праймеров Illumina и мастер-микса 2х KAPA SYBR FAST qPCR:



Примечание: Реагенты набора KAPA SYBR FAST qPCR (qPCR мастер-микс, готовая смесь праймеров и референсный краситель) смешиваются во время первого использования набора. Полученный раствор устойчив в течение минимум 30 циклов заморозания-оттаивания. Следуйте документации KAPA для определения, рекомендован ли референсный краситель для вашего устройства для qPCR.

Смесь праймеров для qPCR

Реагент	Объем (мл)
10х готовая смесь праймеров Illumina	1 мл
Мастер-микс 2х KAPA SYBR FAST qPCR	5 мл
Общий объем	6 мл

- 7.2 Подготовьте мастер-микс для qPCR.

Мастер-микс для qPCR

Реагент	Объем на лунку (мкл)	Объем на 1 библиотеку и стандартные растворы (мкл)
Смесь праймеров для qPCR	12 мкл	276 мкл
Вода для молекулярной биологии (без ДНКазы и РНКазы)	4 мкл	92 мкл
Общий объем	16 мкл	368 мкл

- 7.3 Подготовьте серийное разведение библиотеки выбранного размера.
- Подготовьте разведение 1:1000 путем добавления 1 мкл библиотеки к 999 мкл 1х ТЕ буфера (pH 8,0), аккуратно перемешивая пипетированием. Перемешайте в вортексе и осадите путем центрифугирования.
 - Подготовьте разведение 1:2000 путем добавления 100 мкл разведения 1:1000 к 100 мкл 1х ТЕ буфера (pH 8,0). Перемешайте в вортексе и осадите путем центрифугирования.
 - Подготовьте разведение 1:4000 путем добавления 20 мкл разведения 1:2000 к 20 мкл 1х ТЕ буфера (pH 8,0). Перемешайте в течение 5 секунд в вортексе и центрифугируйте в течение 5 секунд (quick spin).
- 7.4 Подготовьте планшет количественного подсчета для qPCR на новом ПЦР-планшете, совместимом с вашей системой для qPCR.
- 7.5 Внесите в лунки планшета аликвоты мастер-микс для qPCR в трех экземплярах по 16 мкл для стандартных растворов 1-4, разведений 1:1000, 1:2000 и 1:4000 (см. вспомогательные иллюстрации).

- 7.6 Внесите в соответствующие лунки аликвоты по 4 мкл стандартных растворов 1-4, разведений 1:1000, 1:2000 и 1:4000.
- 7.7 Закройте планшет пленкой совместимой с qPCR и центрифугируйте в течение 5 секунд.



Примечание: Избегайте появления пузырьков в лунках планшета. Центрифугируйте по мере необходимости для устранения пузырьков.

- 7.8 Установите тройные повторы разведений 1:1000, 1:2000 и 1:4000 как целевые образцы и определите стандартные растворы (точки: 4, исходная концентрация: 20 пМ, разведение: 1:10). Запустите следующую программу на qPCR амплификаторе для определения концентрации ДНК в библиотеке выбранного размера:

Количество циклов	Температура	Время
1	95 °C	5 минут
25	95 °C	30 секунд
	60 °C	90 секунд (операции сбора данных)

- 7.9 Для преобразования результатов qPCR из концентрации пМ в концентрацию нМ, введите полученные значения в таблицу рабочей тетради Omixon под названием "Количественный анализ библиотеки".
- 7.10 **Реагенты Illumina MiSeq v2:** Используя объемы из рабочей тетради, разведите 10 мкл библиотеки выбранного размера до концентрации **2 нМ** стерильной водой в новой 1,5 мл центрифужной пробирке с низкой адгезией. Храните остатки библиотеки при -20 °C.
- Реагенты Illumina MiSeq v3:** см. оригинальную документацию Illumina для разбавления библиотеки.



Безопасная точка остановки. Библиотеки можно хранить при -20 °C в течение длительного времени. В случае длительного хранения, строго рекомендуется провести повторный количественный анализ библиотеки перед ее запуском на платформах MiSeq.

ШАГ 8 - СЕКВЕНИРОВАНИЕ НА ILLUMINA MISEQ

Длительность: ~23 часа



См. рабочую тетрадь: Вкладка секвенирования и вкладка шаблон протокола исследования MiSeq

(Refer to Workbook: Sequencing tab and MiSeq Sample Sheet tab)

Секвенатор Illumina MiSeq - универсальная NGS система, способная секвенировать библиотеки выбранного размера, подготовленные на предыдущих этапах. Демультиплексирование индексированных образцов выполняется автоматически после завершения цикла секвенирования. **Следующие шаги описывают разведение и загрузку библиотеки с использованием реагентов MiSeq v2. При использовании реагентов MiSeq v3 следуйте документации Illumina.**

Список реагентов

Позиция	Хранение	Поставлен
Набор реагентов MiSeq 1	-20 °C	Illumina
Набор реагентов MiSeq 2	4 °C	Illumina
Набор Phix Control v3 (опционально)	-20 °C	Illumina
Библиотека концентрацией 2 нМ	4 °C	Шаг 7
Гидроксид натрия NaOH 0,2 Н	от 20 °C до 25 °C	Пользователь
Вода для молекулярной биологии (без ДНКазы и РНКазы)	от 20 °C до 25 °C	Пользователь

Протокол

- 8.1 Подготовьте систему секвенирования MiSeq согласно стандартным протоколам Illumina.
- 8.2 *Подготовка денатурированной библиотеки 2 нМ:* Смешайте 10 мкл свежеприготовленного 0,2 Н гидроксида натрия NaOH и 10 мкл 2 нМ разведенной библиотеки выбранного размера в новой 1,5 мл центрифужной пробирке с низкой адгезией. Перемешайте на вортексе в течение 5 секунд и центрифугируйте в течение 5 секунд (quick spin). Инкубируйте эту 1 нМ денатурированную библиотеку при комнатной температуре в течение 5 минут.
- 8.3 *Подготовка денатурированной библиотеки 20 пМ:* Добавьте 980 мкл охлажденного гибридизационного буфера HT1 к 20 мкл 1 нМ денатурированной библиотеки. – Перемешайте в вортексе в течение 5 секунд и центрифугируйте в течение 5 секунд (quick spin).
- 8.4 *Подготовка денатурированной библиотеки 9 пМ:* Смешайте 550 мкл

охлажденного гибридационного буфера HT1 и 450 мкл 20 пМ денатурированной библиотеки в новой 1,5 мл центрифужной пробирке с низкой адгезией. Перемешайте в вортексе в течение 5 секунд и центрифугируйте в течение 5 секунд (quick spin). В результате должно получиться 1000 мкл 9 пМ денатурированной библиотеки.

- 8.5 Отложите все на лед до того момента как будете готовы загрузить библиотеки в картридж.



Рекомендация – Настоятельно рекомендуется добавлять в библиотеки 1% PhiX в качестве дополнительного контроля для мониторинга реакции секвенирования. Использование PhiX поможет отслеживать качество секвенирования между запусками и устранять неполадки. Дополнительную информацию см. в инструкциях к Illumina по работе с PhiX.

Для секвенирования **без добавления 1% PhiX** перейдите к **шагу 8.9**.

Для секвенирования с **добавлением 1% PhiX** подготовьте реагент в соответствии с Приложением 5 — Денатурация и разведение Phix Control до секвенирования на MiSeq, затем перейдите к **шагу 8.6**.

- 8.6 Разведите денатурированный PhiX до загрузочной концентрации (9 пМ): объедините 12,2 мкл предварительно охлажденного буфера HT1 и 10 мкл денатурированной библиотеки PhiX. Переверните пробирку для смешивания.
- 8.7 Смешайте 643,5 мкл 9 пМ денатурированной библиотеки и 6,5 мкл 9 пМ денатурированной библиотеки PhiX. Переверните пробирку для смешивания. В результате получается 650 мкл 9 пМ библиотеки с добавлением 1% Phix Spike-In.
- 8.8 Отложите все на лед до того момента как будете готовы загрузить библиотеки в картридж.
- 8.9 Перенесите 600 мкл 9 пМ денатурированной библиотеки в резервуар для загрузки образцов картриджа с реагентами MiSeq.



Совет – Рекомендуется использовать предоставленную рабочую тетрадь для создания Листа с образцами, необходимых для Miseq.



Примечание – Загрузочная концентрация 9 пМ показала наилучшие результаты, однако из-за различий между приборами MiSeq может потребоваться небольшая корректировка загрузочных концентраций для достижения наилучших результатов реакции секвенирования. Требуется внутренняя проверка.



Примечание – Фактический процент PhiX зависит от качества и количества библиотечного пула.

ШАГ 9 - АНАЛИЗ ДАННЫХ СЕКВЕНИРОВАНИЯ HLA

Длительность: ~6 часов

Приборы Illumina MiSeq обрабатывают библиотеку и сгенерируют данные секвенирования в виде файлов "fastq". Пожалуйста, обратитесь к руководству пользователя приложения HLA Twin для правильной установки программного обеспечения HLA Twin и получения информации об интерпретации результатов генотипирования. По вопросам запуска автоматического протокола и анализу данных, свяжитесь с support@omixon.com.

Автоматизированный протокол

Настройка и конфигурация IT

- Установите сервер приложения HLA Twin на ваш сервер.
- Установите пользовательское приложение HLA Twin на ваш компьютер - к серверу можно подключить несколько пользователей HLA Twin.
- Обратитесь в Службу поддержки Omixon (support@omixon.com) за инструкцией для пользовательской инсталляции автоматизированного протокола.

Протоколы анализа

1. Запустите приложение HLA Twin и войдите в систему.
2. Данные уже обработаны или находятся в процессе обработки. Просмотрите результаты, используя систему Traffic Light System ("Светофор") в приложении HLA Twin.
3. При необходимости, экспортируйте результаты генотипирования и/или полученные последовательности.

Протокол ручного управления

Настройка и конфигурация IT

- Установите сервер приложения HLA Twin на ваш сервер.
- Установите пользовательское приложение HLA Twin на ваш компьютер.

Протоколы анализа

1. Запустите приложение HLA Twin и войдите в систему.
2. Выберите данные секвенирования в формате "fastq" или "fastq.gz" и запустите цикл типирования Holotype HLA.
3. После окончания цикла типирования Holotype HLA просмотрите результаты с использованием системы "Светофор" приложения HLA Twin.
4. При необходимости, экспортируйте результаты генотипирования и/или полученные последовательности.

Протокол на рабочем столе

Настройка и конфигурация IT

- Установите приложение HLA Twin.

Протоколы анализа

- 1 Запустите HLA Twin и войдите в систему.
- 2 Выберите данные секвенирования в формате "fastq" или "fastq.gz" и начните цикл

типирования Holotype HLA.

- 3 После окончания сеанса типирования Holotype HLA, просмотрите результаты с использованием системы "Светофора" приложения HLA Twin.
- 4 По необходимости, экспортируйте результаты генотипирования и/или полученные последовательности.

УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ И ТРАНСПОРТИРОВКИ

Срок годности набора реагентов составляет 17 месяцев с даты изготовления при хранении при рекомендованных условиях и невскрытой упаковке.

Наборы поставляются в пакетах с сухим льдом в пенопластовых коробках для транспортировки и по прибытии должны храниться при температуре от -15 °C до -20 °C. Пожалуйста, проверьте установленную температуру в вашем морозильнике, регулярно проводите мониторинг температуры в камере и плановое техническое обслуживание морозильника.

Нераспечатанные наборы остаются стабильными до истечения срока годности набора (указан на этикетке набора) при хранении от -15 °C до -20 °C.

Открытые наборы остаются устойчивыми до 3 месяцев при хранении с температурным режимом от -15 °C до -20 °C.

Не замораживайте/размораживайте продукт более четырех (4) раз после его открытия. Многократная заморозка/разморозка приводит к потере стабильности реагентов, входящих в состав набора.

УТИЛИЗАЦИЯ

Все части данного медицинского изделия, в том числе реагенты с истекшим сроком годности, не имеющие контакта с биологическими жидкостями пациентов, инфекционными больными, следует классифицировать как эпидемиологически безопасные отходы, по составу приближенные к ТКО (далее - класс А), и утилизировать в соответствии с пунктом 170 СанПин 2.1.3684-21:

Сбор медицинских отходов класса А должен осуществляться в многоразовые емкости или одноразовые пакеты. Цвет пакетов может быть любой, за исключением желтого и красного.

Одноразовые пакеты располагаются на специальных тележках или внутри многоразовых контейнеров.

Емкости для сбора медицинских отходов и тележки должны быть промаркированы "Отходы. Класс А".

Заполненные многоразовые емкости или одноразовые пакеты перегружаются в маркированные контейнеры, предназначенные для сбора медицинских отходов данного класса, установленные на специальной площадке (в помещении).

Многоразовая тара после удаления из нее отходов подлежит мойке и дезинфекции.

Транспортирование отходов класса А организуется с учетом схемы санитарной очистки, принятой для данной территории, в соответствии с требованиями санитарного законодательства к содержанию территорий населенных мест и обращению с отходами производства и потребления.

ГАРАНТИИ

Производитель гарантирует соответствие характеристик медицинского изделия

заявленным в эксплуатационной документации при условии применения изделия в соответствии с инструкцией и по назначению, предусмотренному производителем.

По всем вопросам, для получения консультаций и поддержки следует обращаться к уполномоченному представителю производителя на территории РФ:

ООО «Диаэм»

129345, Российская Федерация, г. Москва ул. Магаданская, д. 7, корпус 3, эт. 2, офис 210,

Тел.: +7 (495) 745-05-08

info@dia-m.ru

При возникновении претензий по качеству наборов, нежелательных событий, которые имеют признаки неблагоприятного события (инцидента), следует направлять информацию Производителю по адресу:

Omixon Biocomputing Ltd.

14-18. Kaposvar u., 1117 Budapest, Hungary

Tel: + 36 21 2620413

support@omixon.com

ТЕХНИЧЕСКАЯ ПОДДЕРЖКА

Для получения поддержки по этому протоколу обращайтесь по адресу support@omixon.com.

Запрос инструкции

- Этот документ можно загрузить с веб-сайта MyOmixon,
- запросить по электронной почте support@omixon.com
- по телефону +36 21 2620413.

ДОПОЛНИТЕЛЬНЫЕ ИЛЛЮСТРАЦИИ

Образец планшета для ампликонов, планшет для амплификации, планшет для разведения, планшет для количественного анализа ампликонов (для отдельного локуса) и планшет для реакций

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	#1	#9	#17									
B	#2	#10	#18									
C	#3	#11	#19									
D	#4	#12	#20									
E	#5	#13	#21									
F	#6	#14	#22									
G	#7	#15	#23									
H	#8	#16	#24									

Пример планшета для количественного анализа стандартных растворов

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	#1	#1										
B	#2	#2										
C	#3	#3										
D	#4	#4										
E	#5	#5										
F	#6	#6										
G	#7	#7										
H												

Пример планшета для количественного анализа библиотеки КАРА

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	#1	#1	#1	#2	#2	#2	#3	#3	#3	#4	#4	#4
B	1:1000	1:1000	1:1000	1:2000	1:2000	1:2000	1:4000	1:4000	1:4000			
C												
D												
E												
F												
G												
H												

Приложение 1: КОЛИЧЕСТВЕННЫЙ АНАЛИЗ И НОРМАЛИЗАЦИЯ АМПЛИКОНОВ (ДЛЯ ПЛАНШЕТОВ ЕМКОСТЬЮ 100 МКЛ)

Длительность: ~1 час 10 минут



См. рабочую тетрадь: Вкладка количественного анализа ампликонов
(Refer to Workbook: Amplicon quantitation tab)

Список реагентов

Позиция	Хранение	Поставлено
20x TE буфер (pH 7.5)	4 °C	Promega
Стандарт Lambda DNA (100 нг/мкл)	4 °C	Promega
Краситель 200x QuantiFluor dsDNA	4 °C	Promega
Вода для молекулярной биологии (без ДНКазы и РНКазы)	от 20 °C до 25 °C	Пользователь
Планшет(ы) для амплификации класса I	4 °C	Шаг 2
Планшет(ы) для амплификации класса II	4 °C	Шаг 2

Протокол

1. Подготовьте стандарты ДНК путем серийного разведения стандарта Lambda DNA (100 нг/мкл), входящего в набор QuantiFluor, в соответствии с приведенной ниже таблицей:

Этикетка на пробирке	Входящая ДНК	Объем ДНК (мкл)	Объем 1x TE (мкл)	Конечная концентрация (нг/мкл)
Стандарт 1	Lambda DNA	7,5 мкл	492,5 мкл	1,5 нг/мкл
Стандарт 2	Стандарт 1	250 мкл	250 мкл	0,75 нг/мкл
Стандарт 3	Стандарт 2	250 мкл	250 мкл	0,38 нг/мкл
Стандарт 4	Стандарт 3	250 мкл	250 мкл	0,19 нг/мкл
Стандарт 5	Стандарт 4	250 мкл	250 мкл	0,09 нг/мкл
Стандарт 6	Стандарт 5	250 мкл	250 мкл	0,05 нг/мкл
Холостая проба	Холостая проба	0 мкл	250 мкл	0 нг/мкл

2. Подготовьте планшеты для количественного анализа ампликонов (см. дополнительные иллюстрации). Добавьте по 49,5 мкл 1x буфера TE в лунки нового 96-луночного планшета.
3. Добавьте 0,5 мкл ампликонов из соответствующих лунок планшетов для ампликонов

в отдельные лунки на планшетах для количественного анализа ампликонов. Аккуратно перемешайте пипетированием.

4. Подготовьте раствор 1х рабочего красителя QuantiFluor Dye по следующей формуле: 0,25 мкл QuantiFluor Dye (200X) + 49,75 мкл 1х буфера TE. Подготовленного раствора 1х QuantiFluor должно хватать на каждый образец в планшетах с ампликонами и стандарты (всего 14) из расчета 50 мкл на образец.
5. Подготовьте планшеты для количественного анализа стандартных растворов и ампликонов. Добавьте 50 мкл 1х рабочего раствора QuantiFluor Dye в лунки 96-луночных оптически прозрачных планшетов, используя формат планшетов для количественного анализа стандартных растворов и количественного анализа ампликонов (см. вспомогательные иллюстрации).
6. Используя стандарты, подготовленные выше, добавьте 50 мкл стандарта в двух повторностях в отдельные лунки планшета для количественного анализа стандартных растворов (всего 14 лунок). Перемешайте пипетированием.
7. Перемешайте в течение 5 секунд на вортексе и центрифугируйте в течение 5 секунд.
8. Инкубируйте пробы при комнатной температуре в течение 5 минут в защищенном от света месте.
9. Поместите каждый из планшетов для количественного анализа в флуориметр или qPCR амплификатор, по одному за раз, и запустите следующую программу (вам может потребоваться отрегулировать настройки в зависимости от модели qPCR амплификатора):

Количество циклов	Температура	Время
1	25 °C	10 секунд
2	25 °C	15 секунд
	25 °C	30 секунд (операции сбора данных)

10. Рассчитайте концентрацию ДНК в планшетах для количественного анализа ампликонов, используя инструкцию к флуориметру или qPCR амплификатору. Обратитесь ко вкладке «Разведение» в прилагаемой рабочей тетради для помощи в расчетах.
11. Разведите ДНК в планшетах с ампликонами водой (без ДНКаз и РНКаз), чтобы конечная концентрация ДНК находилась в пределах 50-120 нг/мкл.
 - Если концентрация ДНК составляет 180 нг/мкл или выше: добавьте 20 мкл H₂O
 - Если концентрация ДНК составляет 115-180 нг/мкл или выше: добавьте 10 мкл H₂O
 - Если концентрация ДНК составляет 115 нг/мкл и ниже: не добавляйте H₂O.



Безопасная точка остановки. Ампликоны можно хранить при 4 °C одну ночь или при -20 °C на протяжении 3 месяцев.

Приложение 2: ВЫБОР РАЗМЕРА БИБЛИОТЕКИ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ПРИБОРА PIPPIN PREP

Длительность: ~1 час 20 минут



См. рабочую тетрадь: Вкладка подготовки библиотеки
(Refer to Workbook: Library preparation tab)

В настоящем шаге используется библиотека из шага 5, очистка осуществляется с помощью магнитных частиц AMPure XP, а выбор размеров проводится при помощи устройства Pippin Prep. Устройство Pippin Prep способно автоматически выбирать диапазон размеров фрагментов ДНК и отбирать их в отдельные емкости. Примечание: Вместо Pippin Prep может быть использовано устройство Blue Pippin.



Совет – Инструкции по настройке Pippin Prep см. на стр. 59

Список реагентов

Позиция	Хранение	УПоставлено
Пулированная библиотека	4° C	Шаг 5
Реагент для очистки продуктов ПЦР AMPure XP	4° C	производства Beckman Coulter
80% этанол (свежеприготовленный)	от 20°С до 25°С	Пользователь
Вода для молекулярной биологии (без ДНКазы и РНКазы)	от 20°С до 25°С	Пользователь
Кассета 1,5 % бесцветного агарозного геля	от 20°С до 25°С	Sage Science
Вводимый раствор/смесь маркеров для Pippin (маркер K)	4° C	Sage Science



Примечание: Для Pippin Prep используется маркер K. Для Blue Pippin используется маркер R2.

Протокол

Очистка библиотеки

1. Дайте магнитным частицам AMPure XP нагреться до комнатной температуры. Убедитесь, что они однородны (отсутствие кусочков и частиц) путем перемешивания в вортексе в течение 30 секунд.
2. Подготовьте 5 мл свежеприготовленного 80% этанола (4 мл EtOH + 1 мл H₂O).
3. Добавьте 900 мкл частиц AMPure XP в пробирку, содержащую 900 мкл библиотеки. Тщательно перемешайте в вортексе в течение 10 секунд и центрифугируйте в течение 5 секунд (quick spin). Не допускайте отделения частиц. Инкубируйте библиотеку при

комнатной температуре в течение 10 минут.



Примечание: Если в конечном пуле находится менее 900 мкл библиотеки, добавьте к ней эквивалентное количество частиц AMPure XP. Следует соблюдать соотношение 1:1 конечного пула и частиц AMPure XP.

4. Поместите пробирку с библиотекой на магнитный штатив и инкубируйте в течение 10 минут.
5. Не вынимая пробирку из магнитного штатива, аккуратно отберите и выбросьте надосадочную жидкость, не потревожив частицы.
6. Не вынимая пробирку из магнитного штатива, добавьте ~1,5-2 мл свежеприготовленного 80% этанола к библиотеке с частицами. Объем добавленного этанола должен быть достаточно для покрытия частиц.



Примечание: Вносите этанол по стороне пробирки без частиц.

7. Инкубируйте пробирку с библиотекой при комнатной температуре в течение 30 секунд; затем аккуратно отберите и выбросьте надосадочную жидкость.
8. Повторите шаги 6 и 7.
9. Быстро осадите (в течение 3 секунд) пробирку с библиотекой и поместите ее обратно на магнитный штатив с открытой крышкой. Удалите оставшийся этанол при помощи пипетки. Не тревожьте частицы.



Примечание: Убедитесь, что частицы не содержат остаточного этанола. Для этого может потребоваться вращение пробирки на магнитном штативе для удаления этанола без касания частиц.

10. Позвольте частицам подсохнуть на воздухе в течение 5-8 минут на магнитном штативе до полного высыхания.
11. Уберите пробирку с библиотекой с магнитного штатива. Добавьте 31 мкл воды (без ДНКаз и РНКаз). Не допускайте касания частиц кончиком наконечника, так как они прилипнут к нему.
12. Перемешайте библиотеку на вортексе в течение 20 секунд для полного ресуспендирования частиц. Центрифугируйте в течение 5 секунд (quick spin), если на боковых стенках останутся капли. Убедитесь, что частицы остаются во взвешенном состоянии.
13. Инкубируйте библиотеку при комнатной температуре в течение 2 минут.
14. Поместите пробирку с библиотекой на магнитный штатив на 2 минуты.
15. Соберите библиотеку: оставив пробирку с конечной библиотекой на магнитном штативе, отберите 31 мкл надосадочной жидкости в новую 1,5 мл центрифужную пробирку с низкой адгезией.



Безопасная точка остановки. Библиотеки можно хранить при -20 °C до 3 месяцев.

Выбор размера библиотеки

16. Приведите исходный раствор с маркером К к комнатной температуре.
17. Скомбинируйте 31 мкл пула с 10 мкл маркера К.
18. Перемешайте на вихревое течение 5 секунд и центрифугируйте в течение 5 секунд (quick spin).
19. Настройте Pippin Prep для сбора фрагментов ДНК размером 650-1300 п. н. Установите референсную полосу на тот уровень, который используете.
20. Загрузите 40 мкл образца в порт для образца и запустите прибор. Время обработки 45-50 минут.
21. Соберите все содержимое (приблизительно 40 мкл) из отверстия для элюции Pippin Prep и перенесите его в новую 1,5 мл центрифужную пробирку с низкой адгезией. Это библиотека выбранного размера.



Безопасная точка остановки. Библиотеки можно хранить при -20 °C до 3 месяцев.

Программирование устройства Pippin Prep

1. Перейдите на вкладку "Protocol Editor" ("Редактировать протокол") и нажмите кнопку "New" ("Создать новый").
2. Нажмите на значок папки рядом с полем "Кассета" и выберите "1.5%DF Marker K" для Pippin Prep или "1.5%DF Marker R2" для Blue Pippin.
3. Для программирования референсной полосы:
 - a. Выделите поле "Range" ("Диапазон").
 - b. Установите значение поля "Ref Lane", чтобы оно соответствовало номеру полосы, над которой вы работаете.
 - c. Установите значение поля "Start*" ("Начало") на 650.
 - d. Установите значение поля "End*" ("Конец") на 1300.
4. В поле Reference Lane ("Референсная полоса"), выберите полосу, над которой вы работаете.
5. Нажмите кнопку "Save As" ("Сохранить как") и введите название программы.

Работа устройства Pippin Prep

1. Включите Pippin Prep кнопкой питания на задней панели устройства.
2. Осмотрите устройство Pippin Prep. Убедитесь, что все 5 светодиодов горят и что внутренняя часть устройства чистая и сухая.
3. Нажмите на логотип Sage Science в нижней правой части экрана. Это позволит вам ввести пароль. Заводской пароль по умолчанию: "pips".
4. Перейдите на вкладку "Factory Setup" ("Заводские настройки") и убедитесь, что значение "Base-to-Threshold" ("от базового до порогового значения") установлено на 0,02.
5. Поместите калибровочное приспособление внутрь устройства Pippin Prep,

- убедившись, что темная полоса направлена вниз и находится над светодиодами.
6. На Главной вкладке, нажмите кнопку "Калибровка".
 7. В окне калибровки убедитесь, что значение поля "Target I pH mA" установлено на 0,80 (0,60 для Blue Pirpin) и нажмите кнопку "Калибровать".
 8. Перейдите на вкладку Протоколы. Нажмите кнопку "Load" ("Загрузить") и выберите программу для Holotype HLA и полосу, которую вы планируете использовать. Убедитесь, что:
 - a. Включена правильная полоса
 - b. Включен индикатор выбора широкого спектра
 - c. Референсная полоса соответствует той, с которой вы будете работать.
 9. Перейдите на Главную вкладку. Убедитесь, что:
 - a. Загруженная вами программа та же, что была выбрана ранее.
 - b. Выбрана нужная референсная полоса, совпадающая с полосой обработки образца.
 10. Осмотрите кассету. Перед отрыванием клейкой ленты, запечатавающей лунки, посмотрите, нет ли пузырьков за портом для элюции. Если пузырьки есть, слегка похлопайте и перекатите кассету в руке, чтобы избавиться от них.
 11. Поместите кассету, не отрывая закрывающую лунки клейкую ленту, внутрь Pirpin Prep.
 12. Аккуратно уберите клейкую ленту, убедившись, что лента удалена с чистой стороны кассеты (линия 5) на использованную сторону (линия 1). Будьте осторожны, удаляя клейкую ленту, чтобы не расплескать жидкость во избежание контаминации.
 13. Удалите весь объем буферного раствора из порта для элюции на линии, которую вы будете использовать и добавьте 40 мкл чистого электрофорезного буфера в порт для элюции.
 14. Наклейте узкую полоску клейкой ленты на порт для элюции.
 15. Любые емкости, наполненные менее чем на 3/4, должны быть заполнены электрофорезным буфером. Не переполняйте лунки! Край буфера должен "чуть-чуть" доставать до пластика, но не выше, чтобы избежать протаскивания во время закрытия крышки. Добавьте буфер из чистых лунок (Линия 5) в использованные лунки (Линия 1).
 16. Убедитесь, что все исходные лунки (лунки с агарозным гелем) заполнены электрофорезным буфером. Буферный раствор должен быть немного выше уровня агарозного геля и выглядеть полностью плоским.
 17. Медленно закройте Pirpin Prep, следя за тем, чтобы буферный раствор не касался крышки во время закрытия устройства.
 18. Проведите испытание на целостность. Обычно при высыхании датчиков испытание на целостность проводится не с первого раза. В этом случае проведите повторное

испытание. После завершения испытания, медленно откройте Pippin. Убедитесь, что жидкость не распределяется по поверхности кассеты при открытии/закрытии крышки Pippin Prep.

19. Немного перемешайте исходный раствор с маркером K в вортексе и краткосрочно центрифугируйте его. Добавьте 10 мкл загрузочного раствора Marker K к вашим ~30 мкл библиотеки.
20. Кратковременно перемешайте вашу библиотеку в вортексе и центрифугируйте ее.
21. Удалите 40 мкл буферного раствора из лунки для образца, которую вы будете использовать.
22. Добавьте ~40 мкл вашей библиотеки с раствором Marker K в эту лунку.
23. Отметьте используемую вами полосу инициалами лаборанта и датой.
24. Закройте Pippin Prep и нажмите кнопку "Start" ("Начать"). Убедитесь, что была включена правильная полоса. Процесс будет занимать приблизительно 45 минут.
25. После завершения прогона аккуратно откройте Pippin Prep. Следите, чтобы крышка не распространяла жидкость по поверхности кассеты.
26. Осторожно удалите клейкую ленту с порта для элюции, не расплескав жидкость.
27. Перенесите весь объем из порта для элюции в новую 1,5 мл пробирку с низкой адгезией.
28. Закройте все открытые лунки двумя кусочками клейкой ленты для планшетов. Не забудьте оставить клейкую полоску на чистой стороне. Это позволит легко удалить клейкую ленту с чистой на использованную сторону.
29. Поместите запечатанную кассету в пакет и уберите до дальнейшего использования.
30. Возьмите промывочную кассету и наполните ее водой MiliQ. Осторожно закройте крышку Pippin Prep, следя, чтобы жидкость не распространялась по поверхности кассеты.
32. Оставьте Pippin Prep закрытым на несколько секунд.
33. Откройте Pippin Prep, следя, чтобы жидкость не распространялась по поверхности кассеты.
34. Удалите очищающую кассету, слейте из нее воду и дайте высохнуть.
35. Очистите устройство Pippin Prep от воды и осторожно закройте его.
36. В меню Pippin Prep выберите кнопку "Shut Down" ("Выключение").

Приложение 3: КОЛИЧЕСТВЕННЫЙ АНАЛИЗ БИБЛИОТЕКИ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ИНТЕРКАЛИРУЮЩЕГО ФЛУОРЕСЦЕНТНОГО КРАСИТЕЛЯ ДЛЯ ДВУХЦЕПОЧЕЧНОЙ ДНК

Длительность: ~15 минут



См. рабочую тетрадь: Таблица количественного анализа библиотеки
(Refer to Workbook: Library quantitation tab)

Концентрацию библиотеки выбранного размера можно точно измерить с помощью флуоресцентного красителя dsDNA, например, SYBR green или его эквивалент. Доступные на рынке наборы и приборы для этой цели включают флуориметр Qubit производства Thermo Fisher (использует широкодиапазонный набор Qubit для оценки dsDNA), ридер Quantus производства Promega (использует флуоресцентный краситель Quantifluor для dsDNA) и другие. Здесь описан метод оценки концентрации библиотеки на примере флуориметра Qubit как наиболее часто используемый. В случае использования других приборов и наборов, следуйте стандартным инструкциям производителя.

Список реагентов

Позиция	Хранение	Поставлено
Набор Qubit dsDNA BR Assay	комнатная температура	Thermo Fisher
Стандарты Qubit dsDNA BR	4 °C	Thermo Fisher
Библиотека	4 °C	Шар 6

Протокол

1. Доведите стандарты Qubit до комнатной температуры. Подготовьте пробирки Qubit (500 мкл, тонкостенные) для вашей библиотеки в двух повторностях и для двух стандартов. Перемешать стандарты и библиотеку на вортексе и отцентрифугируйте.
2. Добавьте 995 мкл буфера и 5 мкл красителя в 1,5 мл центрифужную пробирку. Перемешайте на вортексе в течение 2 секунд и центрифугируйте в течение 5 секунд (quick spin).
3. Перенесите 190 мкл смеси реагентов в две пробирки Qubit для двух стандартов. Перенесите 198 мкл смеси реагентов в две пробирки Qubit для двух экземпляров библиотеки.
4. Добавьте 10 мкл стандарта 1 в соответствующую пробирку Qubit и перемешайте в вортексе в течение 2 секунд. Повторите аналогичный шаг со стандартом 2.
5. Добавьте 2 мкл библиотеки в соответствующие пробирки Qubit и перемешайте в

вортексе в течение 2 секунд.

6. Инкубируйте пробирки Qubit при комнатной температуре в течение 2 минут.
7. Включите флуориметр Qubit и выберите протокол BR.
8. Поместите пробирку Qubit со стандартом 1 в прибор и нажмите GO ("Запуск"). Повторите аналогичный шаг со стандартом 2.
9. Поместите пробирку Qubit с библиотекой в прибор и нажмите GO ("Запуск"). Повторите аналогичный шаг для повторности.
10. Для перерасчета результатов, полученных на флуориметре Qubit, из нг/мкл в нМ, введите среднее значение концентрации от двух повторностей библиотеки в таблицу на вкладке количественный анализ библиотеки в рабочей тетради Omixon.
11. Используя результаты измерений на флуориметре Qubit, разведите 10 мкл библиотеки выбранного размера до концентрации 2 нМ стерильной водой в новой 1,5 мл центрифужной пробирке с низкой адгезией. Храните остаток библиотеки при -20 °C.



Безопасная точка остановки. Библиотеки можно хранить при -20 °C в течение длительного времени. В случае долгого хранения настоятельно рекомендуется провести повторный количественный анализ библиотеки перед ее запуском на платформах MiSeq.

Приложение 4: ДЕНАТУРАЦИЯ И РАЗВЕДЕНИЕ PHiX CONTROL ДЛЯ MISEQ

Длительность: ~10 минут.

Используйте протокол ниже для денатурации и разведения PhiX библиотеки для дальнейшего использования ее в качестве контроля секвенирования.

Протокол

1. Разбавьте PhiX до 4 нМ, для чего смешайте следующие объемы в микроцентрифужной пробирке:
 - 10 нМ библиотека PhiX (2 мкл)
 - 10 мМ буфера Tris-HCl, pH 8,5 с 0,1% Tween 20 (3 мкл)
2. Приготовьте свежий раствор 0,2 н гидроксида натрия NaOH.
3. Денатурация PhiX Control: смешайте следующие объемы в микроцентрифужной пробирке.
 - 4 нМ библиотека PhiX (5 мкл)
 - раствор гидроксида натрия 0,2 н NaOH (5 мкл)
4. Перемешайте на вортексе (2-3 секунды).
5. Центрифугируйте при 280×g в течение 1 минуты.
6. Инкубируйте при комнатной температуре в течение 5 минут.
7. Разбавьте денатурированный PhiX до 20 пМ в объеме 1 мл: добавьте 990 мкл предварительно охлажденного буфера HT1 к 10 мкл денатурированной библиотеки PhiX.
8. Переверните, чтобы перемешать.



Примечание: Вы можете хранить денатурированную 20 пМ библиотеку PhiX до 3 недель при температуре от -15°C до -25°C. Разделите 20 пМ библиотеку PhiX на аликвоты по 50 мкл в отдельные пробирки для предотвращения влияния циклов замораживания-оттаивания. Через 3 недели число кластеров имеет тенденцию к уменьшению.

Приложение 5: РАСШИФРОВКА СИМВОЛОВ МАРКИРОВКИ



Код партии. Указывает код партии, которым изготовитель идентифицировал партию изделия



Номер по каталогу. Указывает номер медицинского изделия по каталогу производителя



Обратитесь к инструкции по применению. Указывает на необходимость для пользователя ознакомиться с инструкцией по применению



Содержимого достаточно для использования *n*-количества тестов. Указывает общее количество тестов *in vitro* которые могут быть выполнены с использованием реагентов, содержащихся в наборе медицинского изделия для диагностики *in vitro*



Изготовитель. Указывает изготовителя медицинского изделия как это определено в директивах Европейского сообщества 90/385/ЕЕС, 93/42/ЕЕС и 98/79/ЕС



Температурный диапазон. Указывает температурный диапазон, в пределах которого медицинское изделие надежно сохраняется



Использовать до ... Указывает дату, после истечения которой изделие не должно использоваться



Медицинское изделие для диагностики *in vitro*. Указывает, что медицинское изделие является изделием для диагностики *in vitro*



European Conformity (en) или Conformité Européenne (fr). Указывает на соответствие Европейской директиве 98/79/ЕС по медицинским изделиям для диагностики *in vitro*. 2797 — идентификационный номер нотифицированного органа, проводившего оценку соответствия CE.

Приложение 6: СПИСОК ПРИМЕНИМЫХ МЕЖДУНАРОДНЫХ СТАНДАРТОВ И НОРМАТИВНЫХ ДОКУМЕНТОВ

Документы	Описание
Директива 98/79/ЕС	Директива для медицинских изделий для in vitro диагностики
EN ISO 9000:2015	Системы менеджмента качества — Основные положения и словарь
EN ISO 13485:2016+A11	Медицинские изделия – Система менеджмента качества – Требования для целей регулирования
EN ISO 20417:2021	Медицинское оборудование - Информация, предоставляемая производителем
ISO 20916:2019	Диагностика in vitro медицинских изделий. Исследование клинических характеристик с использованием образцов, полученных от человека. Надлежащая клиническая практика
EN ISO 10012:2003	Системы менеджмента измерений. Требования к измерительным процессам и измерительному оборудованию
EN ISO 18113-1:2011	Медицинские изделия для диагностики in vitro – Информация, указываемая изготовителем (маркировка) – Часть 1: условия, определения и общие требования (ISO 18113-1:2009)
EN ISO 18113-2:2011	Медицинские изделия для диагностики in vitro – Информация, указываемая изготовителем (маркировка) Часть 2: реагенты для профессионального использования в диагностике in vitro (ISO 18113-2:2009)
EN ISO 15223-1:2021	Медицинские изделия – Символы, используемые на ярлыках медицинских изделий, при маркировке и в предоставляемой информации – Часть 1: Общие требования
EN 13612: 2002	Оценка рабочих характеристик медицинских изделий для диагностики in vitro
EN ISO 23640:2015	Медицинские изделия для диагностики in vitro – Оценка стабильности реагентов для диагностики in vitro (ISO 23640:2011)
EN 13641:2002	Устранение или снижение риска инфицирования, связанного с реагентами для диагностики in vitro.
EN 62366-1: 2015+A1:2020	Изделия медицинские – Часть 1: Применение проектирования, ориентированного на удобство, эффективность и безопасность использования, к медицинским изделиям
PD IEC/TR 62366-	Изделия медицинские. Часть 2. Руководство по применению

Документы	Описание
2:2016	проектирования с учетом эксплуатационной пригодности к медицинским изделиям
EN ISO 14971:2019+A11:2021	Изделия медицинские – Применение менеджмента риска к медицинским изделиям
EN 62304:2006+A1:2013	Изделия медицинские – Программное обеспечение. Процессы жизненного цикла

Изделие соответствует следующим национальным стандартам РФ на продукцию:

ГОСТ Р 51088-2013 «Медицинские изделия для диагностики ин витро. Реагенты, наборы реагентов, тест-системы, контрольные материалы, питательные среды. Требования к изделиям и поддерживающей документации»;

ГОСТ Р ИСО 23640-2015 «Изделия медицинские для диагностики in vitro. Оценка стабильности реагентов для диагностики in vitro»;

ГОСТ Р ИСО 18113-1-2015 «Медицинские изделия для диагностики in vitro. Информация, предоставляемая изготовителем (маркировка). Часть 1. Термины, определения и общие требования»;

ГОСТ Р ИСО 18113-2-2015 «Медицинские изделия для диагностики in vitro. Информация, предоставляемая изготовителем (маркировка). Часть 2. Реагенты для диагностики in vitro для профессионального применения»;

ГОСТ Р ИСО 15223-1-2020 «Изделия медицинские. Символы, применяемые при маркировании на медицинских изделиях, этикетках и в сопроводительной документации. Часть 1. Основные требования»;

ГОСТ ИЕС 62304-2022 «Изделия медицинские. Программное обеспечение. Процессы жизненного цикла»

Omixon Biocomputing Kft.
1117 Bp., Kaposvár utca 14-18.
Adószám: 23550070-2-43

[Перевод с английского и венгерского языков на русский язык]

[На бланке «Омиксон» (Omixon)]

ИНСТРУКЦИЯ ПО ПРИМЕНЕНИЮ

для изделия

Набор реагентов Holotype HLA 96/5 для создания библиотек ДНК-генов HLA для последующего генотипирования методом высокопроизводительного секвенирования по 5 локусам: A, B, C, DRB1, DQB1, конфигурация A/B/C в составе

Аттила Берцес (Attila Bérces)
Управляющий директор
/подпись/

Золтан Симон (Zoltan Simon)
Управляющий директор
/подпись/

[Штамп: «Омиксон Биокomпьютинг Кфт.»
(Omixon Biocomputing Kft.)
1117 Будапешт, улица Капошвар, 14-18
(1117 Bp., Karosvar utca 14-18)
Налоговый номер: 23550070-2-43]

14.06.2024 г.

[Герб Венгрии]

Д-р КАДАР ЖУЖАННА (KÁDÁR ZSUZSANNA)
Нотариальная контора
1114 Будапешт, ул. Уласло, 21 (1117 Budapest, Ulászló u. 21)
Тел.: 381-0405, 381-0407
KRID: 342479118 (MOKKIT)
drkadar@drkadar.hu

Дело № 11035/Z/1624/2024-----

Лицензия на английском языке № 3/2012-----

Настоящим я, нижеподписавшийся заместитель нотариуса города Будапешта, удостоверяю, что, насколько мне известно, этот документ является верной копией оригинального документа, представленного мне.

г. Будапешт, 19 (девятнадцатого) июня 2024 (две тысячи двадцать четвертого) года.

/подпись/

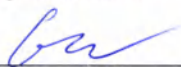
Д-р ФЁЛДИ Агнеш Фанни (FÖLDI Ágnes Fanni)
Заместитель нотариуса

[Печать: д-р Кадар Жужанна, НОТАРИУС * 6 [Герб Венгрии] БУДАПЕШТ XI.4]

[Текст документа на русском языке]

[Штамп на обороте: «Омиксон Биокомпьютинг Кфт.»
1117 Будапешт, улица Капошвар, 14-18
Налоговый номер: 23550070-2-43]

Перевод данного текста выполнен переводчиком Мочаловой Екатериной Вячеславовной



**Российская Федерация
Город Москва
Двенадцатого июля две тысячи двадцать четвертого года**

Я, Веремий Юлия Игоревна, нотариус города Москвы, свидетельствую подлинность подписи переводчика Мочаловой Екатерины Вячеславовны.

Подпись сделана в моем присутствии.

Личность подписавшего документ установлена.

Зарегистрировано в реестре: № 77/2194-п/77-2024-8-3136

Уплачено за совершение нотариального действия: 400 руб. 00 коп.



В... прошнур...,
пронум...,
и скреплен печатью 72 лист(а)(ов)

Нотариус



INSTRUCTION FOR USE

Holotype HLA 96/7 reagent kit for creating DNA libraries of HLA genes for the following genotyping by the method of high-throughput sequencing at 7 locuses: A, B, C, DRB1, DQB1, DPB1, DQA1, configuration A/B/C in assembly

Attila Bérces
Managing Director
Attila Bérces

Zoltan Simon
Managing Director
Zoltan Simon

Omixon Biocomputing Kft.
1117 Bp., Kaposvár utca 14-18.
Adószám: 23550070-2-43

14/06/2024



Dr. KÁDÁR ZSUZSANNA

Notarial Office

1114 Budapest, Ulászló u. 21.

Tel: 381-0405, 381-0407

KRID: 342479118 (MOKKIT)

drkadar@drkadar.hu

File No.: 11035/Z/1626/2024.-----

English language licence No: 3/2012.-----

I the undersigned Deputy Notary in and for the City of Budapest hereby certify that this document is to the best of my knowledge, a true copy of the original document having been produced to me. -----

At Budapest on the 19th (nineteenth) day of June, 2024 (two thousand and twenty-four). -----



Dr. FÖLDI Ágnes Fanni
Deputy Notary



ИНСТРУКЦИЯ ПО ПРИМЕНЕНИЮ

**Набор реагентов Holotype HLA 96/7 для
создания библиотек ДНК генов HLA для
последующего генотипирования методом
высокопроизводительного секвенирования по 7
локусам: A, B, C, DRB1, DQB1, DPB1, DQA1,
конфигурация A/B/C в составе
(КОД: Н32.1, КОД: Н34.1, КОД: Н38)**

Версия Протокола 3.0.2

Версия Документа 6.1

14.06.2024

Оглавление

ВВЕДЕНИЕ	7
ИНФОРМАЦИЯ О РАЗРАБОТЧИКЕ, ПРОИЗВОДИТЕЛЕ И МЕСТЕ ПРОИЗВОДСТВА.....	8
ИНФОРМАЦИЯ ОБ УПОЛНОМОЧЕННОМ ПРЕДСТАВИТЕЛЕ В РФ	9
НАЗНАЧЕНИЕ.....	10
ХАРАКТЕРИСТИКИ ИЗДЕЛИЯ	11
Состав набора реагентов Holotype HLA-96/7 – конфигурация A/B/C & CE v2 (КОД:Н32.1, КОД:Н34.1 и КОД:Н38)	11
Принцип метода.....	13
ТЕХНИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ ИЗДЕЛИЯ.....	14
АНАЛИТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ ИЗДЕЛИЯ	15
ПЕРЕЧЕНЬ РИСКОВ, СВЯЗАННЫХ С ПРИМЕНЕНИЕМ НАБОРА «HOLOTYPE HLA».....	16
МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ ПРИ РАБОТЕ С НАБОРОМ.....	17
ДОПОЛНИТЕЛЬНОЕ ОБОРУДОВАНИЕ, РЕАГЕНТЫ И ВСПОМОГАТЕЛЬНЫЕ МАТЕРИАЛЫ	17
ЮРИДИЧЕСКОЕ ПРЕДУПРЕЖДЕНИЕ	20
ВАЖНОЕ ЗАМЕЧАНИЕ ПЕРЕД НАЧАЛОМ РАБОТЫ	22
КРАТКОЕ ИЗЛОЖЕНИЕ ШАГОВ	23
ГЛОССАРИЙ/ОПРЕДЕЛЕНИЯ	24
ШАГ 0 - НОРМАЛИЗАЦИЯ ГЕНОМНОЙ ДНК.....	25
Протокол	25
ШАГ 1 - ПОДГОТОВКА МАСТЕР-МИКСА ДЛЯ АМПЛИФИКАЦИИ HLA.....	26
Список реагентов.....	26
Протокол	26
ШАГ 2 – АМПЛИФИКАЦИЯ HLA КЛАССА I и II	28
Список реагентов.....	28
Протокол	28
Шаг 3 – КОЛИЧЕСТВЕННЫЙ АНАЛИЗ И НОРМАЛИЗАЦИЯ АМПЛИКОНА (ДЛЯ ПЛАНШЕТОВ ЕМКОСТЬЮ 200 МКЛ)	30
Список реагентов.....	30
Протокол	30
ШАГ 4 – ПУЛИРОВАНИЕ И ОЧИСТКА АМПЛИКОНОВ С ПОМОЩЬЮ EXOSAP-IT EXPRESS.....	33
Список реагентов.....	33
Протокол	33
ШАГ 5 – ПОДГОТОВКА БИБЛИОТЕКИ	35
Список реагентов.....	35

Протокол	35
ШАГ 6 - ВЫБОР РАЗМЕРА БИБЛИОТЕКИ ПРИ ПОМОЩИ МИКРОНОСИТЕЛЕЙ	41
Список реагентов	41
Протокол	42
ШАГ 7 - КОЛИЧЕСТВЕННЫЙ АНАЛИЗ БИБЛИОТЕКИ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ПРИБОРА ДЛЯ QPCR	46
Список реагентов	46
Протокол	46
ШАГ 8 - СЕКВЕНИРОВАНИЕ НА ILLUMINA MISEQ	49
Список реагентов	49
Протокол	49
ШАГ 9 - АНАЛИЗ ДАННЫХ СЕКВЕНИРОВАНИЯ HLA	51
Автоматизированный протокол	51
Протокол ручного управления	51
Протокол на рабочем столе	51
УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ И ТРАНСПОРТИРОВКИ	53
УТИЛИЗАЦИЯ	53
ГАРАНТИИ	53
ТЕХНИЧЕСКАЯ ПОДДЕРЖКА	54
ДОПОЛНИТЕЛЬНЫЕ ИЛЛЮСТРАЦИИ	55
.....	55
Приложение 1: КОЛИЧЕСТВЕННЫЙ АНАЛИЗ И НОРМАЛИЗАЦИЯ АМПЛИКОНОВ (для ПЛАНШЕТОВ ЕМКОСТЬЮ 100 МКЛ)	57
Список реагентов	57
Протокол	57
Приложение 2: ВЫБОР РАЗМЕРА БИБЛИОТЕКИ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ПРИБОРА PIPPIN PREP	59
Список реагентов	59
Протокол	59
Программирование устройства Pippin Prep	61
Работа устройства Pippin Prep	61
Приложение 3: КОЛИЧЕСТВЕННЫЙ АНАЛИЗ БИБЛИОТЕКИ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ИНТЕРКАЛИРУЮЩЕГО ФЛУОРЕСЦЕНТНОГО КРАСИТЕЛЯ ДЛЯ ДВУХЦЕПОЧЕЧНОЙ ДНК	64
Список реагентов	64
Протокол	64

Приложение 4: ДЕНАТУРАЦИЯ И РАЗВЕДЕНИЕ PHIX CONTROL ДЛЯ MISEQ.....	66
Протокол	66
Приложение 5: РАСШИФРОВКА СИМВОЛОВ МАРКИРОВКИ	67
Приложение 6: СПИСОК ПРИМЕНИМЫХ МЕЖДУНАРОДНЫХ СТАНДАРТОВ И НОРМАТИВНЫХ ДОКУМЕНТОВ	68

История изменений документа — важные замечания и обновления

Версия документа	Дата	Краткая информация об изменениях
1	22.04.2022	Первоначальная версия Документа использовалась только во время внутреннего тестирования при производстве наборов. Первоначальная версия Инструкции, которую получал пользователь, IFU версия 2. Первоначальная версия Инструкции для Протокола версии 3.0.2. Основные изменения по сравнению с версией Протокола 3.0.1: - Шаг 4 больше основан не на наборе AMPure XP, а на наборе ExoSAPiT Express. - Шаг 5 - изменяются объемы реагентов в мастер-миксе для фрагментации, а также продолжительность программы фрагментации.
2	5.05.2022	Шаг 5 – скорректирована программа лигирования.
3	10.05.2022	Шаг 5 – удалена уточняющая информация по набору AMPure XP.
4	15.06.2022	Исправлено описание рядом с символом CE в документе. Обновлено официальное уведомление.
5	24.02.2023	Из протокола удален реактив для усиления амплификации 2 (Enhancer 2).
6	30.09.2023	Приведение версии в соответствие с английской версией инструкции "Holotype HLA 24_7 CE v2 - Protocol 3.0.2 - IFUv06" – в русской версии 5 ссылка MyHolotype заменена на MyOmixon, и общий объем мастер-микса qPCR был исправлен. В российскую версию инструкции были внесены следующие изменения в соответствии с российским законодательством: - Добавлена информация о местах производства и об уполномоченном представителе Omixon на территории РФ - Введены подпункты: целевой анализ; показания к применению; противопоказания к применению; стерильность; функциональное назначение; потенциальный потребитель. Добавлен пункт «Гарантии» - В инструкцию добавлены технические характеристики изделия - Добавлена информация о рисках, сопряженных с применением изделия

		• Утилизация изделия описана в соответствии с российским законодательством и не противоречит данным производителя
6.1	14.06.2024	• Исправлен код на титульной странице; • Изменено назначение изделия; • Удалена информация о работе с платформой секвенирования Illumina MiniSeq; • пункт Условия хранения и транспортировки: добавлено предупреждение о недопустимости многократной заморозки/разморозки; • Характеристики изделия рабочая тетрадь Excel – название реагентов «MiSeq v2» исправлено на «MiSeq»; • Характеристики изделия программное обеспечение – Omixon HLA TWIN: изменена информация по предоставлению ПО, указана версия ПО и дата выхода ПО. • Ограничения по применению продукта – валидацию нерекommenдованных материалов и оборудования должен проводить пользователь; • Технические рекомендации и рекомендации по оборудованию – добавлено требование к видеокарте компьютера; • Рекомендацию по выделению геномной ДНК: указан 1 источник геномной ДНК – периферическая кровь. • Шаг 0 - исправлены единицы измерения длин волн; • Шаг 5 – пункт 5.1 исправлен; пункт 5.24 II добавлена единица измерения объема пробирки «мл»; • Приложение 6: добавлен список национальных стандартов РФ, которым соответствует данное изделие.

ВВЕДЕНИЕ

Настоящая инструкция по применению описывает порядок использования следующих продуктов с Протоколом версии 3.0.2 (с набором Promega LR-PCR для амплификации)

Наименование продукта	Краткое наименование далее по тексту документа	Справочный код #	Образцы
Набор реагентов Holotype HLA 96/7 для создания библиотек ДНК генов HLA для последующего генотипирования методом высокопроизводительного секвенирования по 7 локусам: A, B, C, DRB1, DQB1, DPB1, DQA1, конфигурация A в составе	Holotype HLA 96/7 Конфигурация A & CE v2	– H32.1	96
Набор реагентов Holotype HLA 96/7 для создания библиотек ДНК генов HLA для последующего генотипирования методом высокопроизводительного секвенирования по 7 локусам: A, B, C, DRB1, DQB1, DPB1, DQA1, конфигурация B в составе	Holotype HLA 96/7 Конфигурация B & CE v2	– H34.1	96
Набор реагентов Holotype HLA 96/7 для создания библиотек ДНК генов HLA для последующего генотипирования методом высокопроизводительного секвенирования по 7 локусам: A, B, C, DRB1, DQB1, DPB1, DQA1, конфигурация C в составе	Holotype HLA 96/7 Конфигурация C & CE v2	– H38	96

Далее по тексту применяются указанные выше сокращения наименования изделия, а также – «изделие», «Набор», «Holotype HLA», «Holotype HLA 96/7».

ИНФОРМАЦИЯ О РАЗРАБОТЧИКЕ, ПРОИЗВОДИТЕЛЕ И МЕСТЕ ПРОИЗВОДСТВА

Разработчик	Omixon Biocomputing Ltd Омиксон Биокomпьютинг Лтд
Адрес (место нахождения) юридического лица	14-18. Kaposvar u., 1117 Budapest, Hungary
Номера телефонов	+ 36 21 2620413
Адрес электронной почты юридического лица	support@omixon.com
Производитель	Omixon Biocomputing Ltd Омиксон Биокomпьютинг Лтд
Адрес (место нахождения) юридического лица	14-18. Kaposvar u., 1117 Budapest, Hungary
Номера телефонов	+36 21 2620413
Адрес электронной почты юридического лица	support@omixon.com
Адрес в Интернет	www.omixon.com
Место производства	Omixon Biocomputing Ltd Омиксон Биокomпьютинг Лтд 1117 Budapest, Kaposvár utca 14-18, Hungary (Венгрия) Integrated DNA Technologies Интегрэйтед ДиЭнЭй Текнолоджис 1710 Commercial Park Coralville, Iowa, 52241 USA (США) Metabion GmbH Метабион ГмбХ Ammerthalstr. 26, 85551, Kirchheim bei Munich, Germany (Германия) GSP Global Szerviz Partner Kft. ДжиЭсПи Глобал Сервис Партнер Кфт Lorinci ut 61., H – 2220 Vecses, Hungary (Венгрия)

Далее название компании производителя указывается сокращенно – Omixon.

ИНФОРМАЦИЯ ОБ УПОЛНОМОЧЕННОМ ПРЕДСТАВИТЕЛЕ В РФ

Организационно-правовая форма и полное наименование	Общество с ограниченной ответственностью «Диаэм»
Сокращенное наименование	ООО «Диаэм»
Адрес (место нахождения)	129345, Российская Федерация, г. Москва ул. Магаданская, д. 7, корпус 3, эт. 2, офис 210
Номера телефонов	(495) 745-05-08
Адрес электронной почты	info@dia-m.ru

Целевой анализ

Набор реагентов «Holotype HLA» используется для диагностики *in vitro*. Данный набор реагентов предназначен для создания библиотек. ДНК генов HLA для последующего генотипирования методом высокопроизводительного секвенирования по 7 локусам - A, B, C, DRB1, DQB1, DPB1, DQA1.

Область применения набора реагентов

Клиническая лабораторная диагностика. Набор реагентов «Holotype HLA 96/7» является средством для диагностики *in vitro*.

Показания к применению:

Набор реагентов «Holotype HLA 96/7» рекомендуется использовать для диагностики *in vitro*. Созданные с помощью данного набора библиотеки ДНК генов HLA пригодны для проведения HLA-типирования.

Противопоказания к применению:

при использовании специально обученным персоналом и с учетом применения по назначению противопоказания не выявлены.

Стерильность:

изделие не стерильно.

НАЗНАЧЕНИЕ

Назначение:

Для диагностики *in vitro* для создания библиотек ДНК генов HLA для последующего генотипирования методом высокопроизводительного секвенирования в образцах геномной ДНК человека. Популяционные, демографические аспекты применения медицинского изделия отсутствуют.

Программное обеспечение Omixon HLA Twin, входящее в состав изделия, предназначено для интерпретации и сопоставления данных секвенирования, полученных на платформе Illumina MiSeq позволяя получить высокоточное типирование HLA на уровне аллелей за один проход с очень низким уровнем неоднозначности на уровне 2-го поля.

Функциональное назначение:

Для диагностики *in vitro*.

Потенциальный потребитель:

Набор предназначен для профессионального применения медицинскими работниками: врач клинической лабораторной диагностики, медицинский лабораторный техник

ХАРАКТЕРИСТИКИ ИЗДЕЛИЯ

Состав набора реагентов Holotype HLA-96/7 – конфигурация A/B/C & CE v2 (КОД:Н32.1, КОД:Н34.1 и КОД:Н38)

Данный раздел описывает содержимое доступных возможных конфигураций продукта Holotype HLA 96/7 следующим образом:

Тип продукта	Код	Кол-во анализируемых образцов
Holotype HLA 96/7 – Конфигурация A & CE v2	Н32.1	96
Holotype HLA 96/7 – Конфигурация B & CE v2	Н34.1	96
Holotype HLA 96/7 – Конфигурация C & CE v2	Н38	96

Обратите внимание, что коробки с праймерами и реагентами для подготовки библиотеки во всех конфигурациях продукта одинаковы. Разные конфигурации отличаются друг от друга последовательностью индексов на 96-луночном планшете с индексированными адаптерами. Дополнительную информацию см. в разделе «96-луночный планшет с адаптерами» ниже.

Коробка с праймерами

Коробка с праймерами содержит готовые к применению растворы праймеров для целевой ПЦР-амплификации длинных фрагментов генов HLA: A, B, C, DPB1, DQA1, DQB1 и DRB1. Кроме того, она также содержит реактив для усиления амплификации 1 (Enhancer 1).

Смесь праймеров	Код	Кол-во анализируемых образцов	Объем в пробирке	Количество пробирок	Цветовой код
HLA-A	P012	96	220 мкл	1	Желтый
HLA-B	P022	96	220 мкл	1	Красный
HLA-C	P032	96	220 мкл	1	Оранжевый
HLA-DRB1	P042	96	220 мкл	1	Зеленый
HLA-DQB1 (Набор 3)	P122	96	220 мкл	1	Синий
HLA-DQA1	P072	96	220 мкл	1	Коричневый
HLA-DPB1	P082	96	220 мкл	1	Фиолетовый
Реактив для усиления амплификации 1 (Enhancer 1)	E01	96	1100 мкл	1	Прозрачный

Коробка с реагентами для подготовки библиотеки

Коробка с реагентами для подготовки библиотеки содержит реагенты для подготовки библиотеки (фрагментации, получения тупых концов и аденилирования концов ампликонов, а также лигирования к ним последовательностей адаптеров) из ампликонов HLA.

Реагент	Код	Кол-во анализируемых образцов	Объем пробирки	Количество пробирок	Цветовой код
Фермент для фрагментирования (A)	R11	96	278 мкл	1	Желтый
Буфер для фрагментирования (B)	R21	96	278 мкл	1	Красный
Фермент для обработки концов (C)	R31	96	162 мкл	1	Зеленый
Буфер для обработки концов (D)	R41	96	324 мкл	1	Оранжевый
Фермент для лигирования (E)	R51	96	324 мкл	1	Синий
Буфер для лигирования (F)	R61	96	1800 мкл	2	Черный

96-луночный планшет для адаптеров

96-луночный индексированный планшет с адаптерами содержит готовые к использованию адаптеры NGS (олигонуклеотиды двухнитевой ДНК) в растворе не менее 5 мкл для генерации отдельных NGS библиотек. На 96-луночном индексированном планшете с адаптерами имеется достаточное количество индексированных адаптеров для генерации 96 отдельных NGS библиотек и для идентификации образцов путем выделения и очистки.

Версия набора	Реагент	Код	Кол-во анализируемых образцов	Объем/лунка	Планшеты
H32.1	Планшет с адаптерами A (i1-96)	N1	96	≥5 мкл	1
H34.1	Планшет с адаптерами B (i97-192)	N2	96	≥5 мкл	1
H38	Планшет с адаптерами C (i193-288)	N3	96	≥5 мкл	1

Запасные компоненты доступны по специальному запросу пользователя. Обратите

внимание, что Omixon предлагает замену коробок с компонентами, а не отдельных флаконов. Обратитесь по адресу sales@omixon.com для получения дополнительной информации.

Рабочая тетрадь в Excel

Рабочая книга Excel предоставляется для поддержки протокола Holotype HLA 96/7 и реагентов MiSeq с расчетами объемов, схемами планшетов, прослеживаемостью реагентов и оборудования, ведением записей, а также созданием списка образцов MiSeq для всех поддерживаемых конфигураций адаптерных планшетов (A, B и C). Версия Workbook, совместимая с данным руководством пользователя, — v3.0.2. Если у вас нет копии, пожалуйста, свяжитесь с support@omixon.com.

Программное обеспечение – Omixon HLA Twin

Пожалуйста, свяжитесь с sales@omixon.com, чтобы получить лицензию на Omixon HLA Twin в связи с приобретением набора Holotype HLA 96/7.

Набор Holotype HLA используется в комплекте с ПО Omixon HLA Twin, которое поставляется на электронном носителе (USB флэш-накопителе) или по сети Интернет.

Версия ПО: Omixon HLA TWIN 4.8.1 (дата выпуска 26.06.2023г.) и выше.

Инструкция по применению

Инструкция по применению поставляется по сети Интернет и на электронном носителе.

Важное замечание:

При проведении диагностики in vitro с помощью набора Holotype HLA 96/7 используйте только компоненты набора, предлагаемые производителем, и программное обеспечение Omixon HLA Twin. Пожалуйста, ознакомьтесь с разделом «Ограничения по применению изделия» перед использованием наборов.

Принцип метода

Тип анализируемого образца:

Используются образцы геномной ДНК.

Принцип метода:

Создание библиотек ДНК генов состоит из следующих этапов:

На первом этапе работы проводится ПЦР-амплификация геномной ДНК с использованием специфических праймеров. Гены HLA A, B, C, DPA1, DQA1 и DQB1 амплифицируются по всей длине их кодирования, включая элементы 5'- и 3'-нетранслируемых областей, в то время как DRB1 и DRB3 амплифицируются от интрона 1 до интрона 4, DRB4 амплифицируется от конца интрона 1 до части экзона 4, а DRB5 и DPB1 амплифицируются от интрона 1 до 3'-нетранслируемой области.

Затем ампликоны фрагментируются с помощью Фермента для Фрагментирования A до размера, подходящего для секвенирования на платформе Illumina,

Далее, проводится специфическая обработка концов фрагментированных ампликонов

последующим лигированием последовательностью адаптеров, которые используются на протяжении всего процесса на MiSeq для захвата, амплификации и секвенирования ДНК. Адаптеры также включают индекс, представляющий собой короткую последовательность, уникальную для каждого адаптера, которая идентифицирует происхождение библиотеки (образец/локус).

После объединения проиндексированных библиотек, выбора размера и количественного анализа образец загружается в системы MiSeq для секвенирования. Весь процесс занимает менее 48 часов в зависимости от выбора проточной кюветы на платформе Illumina. Сгенерированные данные анализируются с использованием двух разных алгоритмов в HLA Twin (www.omixon.com). Использование двух независимых алгоритмов в HLA Twin обеспечивает высочайший уровень достоверности, так что результаты генотипирования HLA можно сообщать немедленно без дополнительной проверки. Образцы с сомнительным или неоднозначным генотипированием помечаются программным обеспечением для ручного анализа.

Ограничения по применению изделия

Набор реагентов по истечении срока годности применению не подлежит.

Набор реагентов, транспортированный или хранившийся с нарушением температурного режима, применению не подлежит.

Для наилучшей работы, пожалуйста, используйте наборы Holotype HLA и ПО Omixon HLA Twin для типирования HLA по NGS с материалами, реагентами и оборудованием, рекомендованными в разделе "Оборудование и реагенты".

Использование любых других материалов, не указанных в разделе "Оборудование и реагенты" должно быть проверено и подтверждено пользователем.

Не модифицируйте и не разводите реагенты в объемах, отличных от указанных в настоящей инструкции по применению. Не используйте объем меньше указанного в настоящей инструкции по применению. Такие действия могут привести к ошибкам в интерпретации результатов.

Не используйте продукт при наличии обнаруженных дефектов компонентов (разбитые сосуды, планшеты, не закрывающиеся колпачки, несоответствие состава, указанному на упаковке).

В случае несоблюдения требований производителя компания Omixon не несет ответственности за полученные результаты.

Для получения более конкретной информации, пожалуйста, обратитесь к документу «Ограничения по применению изделия» по известным погрешностям и ограничениям ПО Omixon HLA Twin. Документ распространяется вместе с инструкцией по применению наборов Holotype HLA, и находится в общем доступе на сайте компании Omixon в разделе «MyOmixon/Support» ("Мой Omixon/Поддержка") и в разделе «Услуги/Инструкции по использованию HLA Twin». Также документ «Ограничения по использованию продукта» может быть получен через запрос на электронный адрес support@omixon.com.

ТЕХНИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ ИЗДЕЛИЯ

Компонент	Физическое состояние	Цвет	Запах
Коробка с праймерами			
Смесь праймеров HLA-A (HLA-A Primer mix)	Жидкость	Прозрачный, бесцветный	Нет
Смесь праймеров HLA-B (HLA-B Primer mix)	Жидкость	Прозрачный, бесцветный	Нет
Смесь праймеров HLA-C (HLA-C Primer mix)	Жидкость	Прозрачный, бесцветный	Нет
Смесь праймеров HLA-DRB1 (HLA-DRB1 Primer mix)	Жидкость	Прозрачный, бесцветный	Нет
Смесь праймеров HLA-DQB1 (Набор 3) (HLA-DQB1 (Set 3) Primer mix)	Жидкость	Прозрачный, бесцветный	Нет
Смесь праймеров HLA-DQA1 (HLA-DQA1 Primer mix)	Жидкость	Прозрачный, бесцветный	Нет
Смесь праймеров HLA-DPB1 (HLA-DPB1 Primer mix)	Жидкость	Прозрачный, бесцветный	Нет
Реактив для усиления амплификации 1 (Enhancer 1)	Жидкость	Прозрачный, бесцветный	Нет
Коробка с реагентами для подготовки библиотеки			
Фермент для фрагментирования (A) (Fragmentation Enzyme (A))	Жидкость	Прозрачный, бесцветный	Нет
Буфер для фрагментирования (B) (Fragmentation Buffer (B))	Жидкость	Прозрачный, бесцветный	Нет
Фермент для обработки концов (C) (End Repair Enzyme (C))	Жидкость	Прозрачный, бесцветный	Нет
Буфер для обработки концов (D))	Жидкость	Прозрачный, бесцветный	Нет
Фермент для лигирования (E) (Ligation Enzyme (E))	Жидкость	Прозрачный, бесцветный	Нет
Буфер для лигирования (F) (Ligation Buffer (F))	Жидкость	Прозрачный, бесцветный	Нет
96-луночный планшет с адаптерами			
Реагент в 96-луночном планшете с адаптерами	Гель	Прозрачный, бесцветный	Нет

АНАЛИТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ ИЗДЕЛИЯ

Установлены основные аналитические параметры производительности в соответствии с валидацией продукта:

	HLA-A	HLA-B	HLA-C	HLA-	HLA-	HLA-	HLA-
--	-------	-------	-------	------	------	------	------

				DRB1	DPB1	DQA1	DQB1
Аналитическая Чувствительность	99,4%	98,99%	98,79%	96,77%	95,16%	96,57%	97,38%
Аналитическая Специфичность	99,99%	99,99%	99,97%	99,95%	99,9%	99,85%	99,87%
Прецизионность	99,4%	98,99%	98,79%	96,77%	95,16%	96,57%	97,38%
Точность	99,98%	99,98%	99,95%	99,91%	99,8%	99,71%	99,75%

Предел обнаружения:

Рекомендуемая минимальная концентрация исходной геномной ДНК - 20 нг/мкл со следующими показателями чистоты, определенными флуоресцентным методом: коэффициент поглощения 1,7-2 для соотношений 260 нм/280 нм и 260 нм/230 нм.

Установлены основные параметры клинической эффективности в соответствии с валидацией продукта:

	HLA-A	HLA-B	HLA-C	HLA-DRB1	HLA-DPB1	HLA-DQA1	HLA-DQB1
Диагностическая Чувствительность	99,29%	98,83%	98,58%	97,17%	97,88%	98,58%	99,53%
Диагностическая Специфичность	99,98%	99,98%	99,95%	99,94%	99,95%	99,93%	99,98%
Прецизионность	99,29%	98,83%	98,58%	97,17%	97,88%	98,58%	99,53%
Точность	99,96%	99,97%	99,90%	99,89%	99,90%	99,87%	99,96%

ПЕРЕЧЕНЬ РИСКОВ, СВЯЗАННЫХ С ПРИМЕНЕНИЕМ НАБОРА «HOLOTYPE HLA»

Неизвестны прямые риски для здоровья пациента, когда результаты испытаний используются в качестве вспомогательного средства для диагностики определенного состояния здоровья; в то же время неспособность анализа работать в соответствии с предусмотренным применением или ошибка в интерпретации результатов могут привести к неправильному медицинскому лечению пациентов, которым требуется операция по трансплантации, поэтому может вызвать косвенный риск.

С использованием Holotype HLA обычно связаны следующие риски для здоровья:

- Неправильное медицинское ведение, связанное с данными о HLA-генотипе пациента
- Задержка, вызванная ненадлежащей работой продукта, при оказании медицинских услуг пациенту
- Ошибочный диагноз, неправильные результаты HLA-типирования
- Неправильный подбор донора или реципиента во время операции по трансплантации

МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ ПРИ РАБОТЕ С НАБОРОМ

Перед началом работы прочитайте разделы "Информация по технике безопасности" и "Важные замечания" в инструкциях всех реагентов, указанных в разделе "Дополнительное оборудование, реагенты и вспомогательные материалы".

- При работе с химическими лабораторными реагентами всегда надевайте подходящий лабораторный халат, одноразовые перчатки и защитные очки. Для дополнительной информации, пожалуйста, обратитесь за справкой к подходящим паспортам безопасности вещества (ПБВ). Паспорт безопасности материала предоставляется пользователю поставщиком по запросу.

Обзор химических компонентов реагентов продукта может быть найден в ПБВ или в наборе Holotype и доступен по запросу.

- При работе с химическими лабораторными реагентами соблюдайте соответствующие меры предосторожности. Не допускайте их попадания в рот и контакта с кожей и слизистыми оболочками.

- Только для диагностики *in vitro*.

- При случайном попадании химического лабораторного реагента в глаза или ротовую полость, а также на кожу немедленно обильно промойте это место водой. При необходимости обратитесь к врачу для получения медицинской помощи.

- Утилизация всех отходов должна проводиться в соответствии с местным законодательством.

- Все образцы и материалы, используемые для проведения теста, подлежат утилизации как содержащие инфекционные агенты. При обращении с лабораторными, химическими или биологически опасными отходами и их удалении необходимо соблюдать местные, региональные и национальные правила.

- К работе с изделием допускается только квалифицированный персонал, владеющий методикой лабораторных исследований и знакомый с возможными опасностями при обращении с данным набором. Необходимо использовать защитную одежду, перчатки и средства защиты глаз и лица и обращаться с набором в соответствии с требованиями надлежащей лабораторной практики.

ДОПОЛНИТЕЛЬНОЕ ОБОРУДОВАНИЕ, РЕАГЕНТЫ И ВСПОМОГАТЕЛЬНЫЕ МАТЕРИАЛЫ

Важное замечание:

Используйте только исправно работающее откалиброванное оборудование. Отсутствие этого требования может привести к неправильной интерпретации результатов.

Технические рекомендации и рекомендации по оборудованию:

- Термоциклер с форматом 96-луночного планшета (например, Термостат электрический для проведения полимеразной цепной реакции (ПЦР) ДНК Veriti Thermal

Cycler, вариант исполнения Veriti 96-Well Thermal Cycle, производства «Life Technologies Corporation», США, РУ № ФСЗ 2011/09244 от 02.06.2017 г.).

- Флуориметр (или другой измерительный прибор, позволяющий определить концентрацию образцов в 96-луночных планшетах для использования с набором Promega QuantiFluor dsDNA, например «Анализатор "FluoVista" (ФлуоВиста) флуориметрический», производства «inno-train Diagnostik GmbH», Германия, РУ № РЗН 2022/17081 от 12.05.2022 г.).
- Система для препаративного электрофореза ДНК/РНК Pippin Prep (№ по каталогу PIP0001) или Blue Pippin (№ по каталогу BLU0001), производства Sage Science.
- Прибор для qPCR, рассчитанный на 96- или 384-луночный планшет (например, например, «Термоциклер для амплификации нуклеиновых кислот 1000, с принадлежностями исполнения: C1000, S1000, C1000 Touch», производства Bio-Rad Laboratories Inc., США, РУ № ФСЗ 2008/03399 от 21.06.2016 г.)
- Генетический секвенатор MiSeq, вариант исполнения MiSeq, производства «Illumina, Inc.», США (№ по каталогу SY-410-1003), РУ № РЗН 2014/1568 от 29.04.2014 г.,
- Персональный компьютер 64-битный с минимум 4 ядрами, 16 Гб оперативной памяти и видеокартой, совместимой с OpenGL 2.0
- Долговременное хранилище данных (приблизительно 2 ТБ данных на один генетический секвенатор MiSeq в год).

Рекомендации по используемым расходным реагентам

- Мастер-микс GoTaq 2X Long PCR (№ по каталогу M402A), производства Promega. Каждому образцу требуется 73 мкл мастер-микса Promega GoTaq для 11 локусов.
- Набор для определения концентрации двуцепочечной ДНК QuantiFluor dsDNA System (№ по каталогу E2670), производства Promega
- Набор для очистки продуктов ПЦР ExoSAP-IT производства Thermo Fisher (№ по каталогу 75001-200, 75001-1ML, 75001-4X-1ML, 75001-10ML)
 - Для каждого образца требуется 4 мкл реагента ExoSAP-IT Express
 - №75001-200 по каталогу содержит 200 мкл реагента ExoSAP-IT Express
 - №75001-1ML по каталогу содержит 1 мл реагента ExoSAP-IT Express
 - №75001-4X-1ML по каталогу содержит 4 мл реагента ExoSAP-IT Express
 - №75001-10ML по каталогу содержит 10 мл реагента ExoSAP-IT Express
- Магнитные частицы Agencourt AMPure XP (№ по каталогу A63880, A63881 или A63882), производства Beckman Coulter.

Каждый прогон Hologate HLA требует максимум 3440 мкл магнитных частиц AMPure XP

 - №A63880 по каталогу содержит 5 мл магнитных частиц AMPure XP
 - №A63881 по каталогу содержит 60 мл магнитных частиц AMPure XP
 - №A63882 по каталогу содержит 450 мл магнитных частиц AMPure XP
- Картридж с гелем, 1,5% агарозы, без красителя, с внутренним стандартным раствором (Marker K/R2) для Pippin Prep/Blue Pippin (№ по каталогу CDF1510 для Pippin Prep и BDF1510 для Blue Pippin) (опционально)
- Набор для количественного анализа библиотеки – Illumina/Universal производства KAPA Biosystems (№ по каталогу KK4824)

- Аналитический набор Qubit dsDNA BR (№ в каталоге Q32850 или Q32853) (опционально)
 - № в каталоге Q32850 с содержанием 100 образцов
 - № в каталоге Q32853 с содержанием 500 образцов
 - 1 X Tris-EDTA (pH 8,0)
 - Tween 20
 - Сверхчистый свободный от примесей этанол (безводный спирт)
 - Сверхчистая вода (без ДНКазы и РНКазы)
 - 10 н. гидроксида натрия
- Наборы реагентов для генетических секвенаторов MiSeq от Illumina (Набор реагентов ИВД MiSeq™ Dx v3 (MiSeq™ Dx Reagent Kit v3) для секвенирования нуклеиновых кислот, производства «Illumina, Inc.», США, РУ № РЗН 2020/13097 от 30.12.2020 г.)

Рекомендованные вспомогательные материалы

- Пробирки для микроцентрифугирования объемом 1,5 мл (например, «Изделия медицинские полимерные для лабораторных исследований in vitro варианты исполнения: Микроцентрифужные пробирки, градуированные объемом 1,5 мл», РУ № ФСЗ 2009/05024 от 19.12.2022).
- Пробирки для микроцентрифугирования с низкой адгезией объемом 1,5 мл (рекомендуются Пробирки Eppendorf DNA LoBind, производства «Eppendorf AG», Германия, РУ № ФСЗ 2009/04520 от 19.06.2009 (№ в каталоге 0030108051))
- Пробирки для микроцентрифугирования с низкой адгезией объемом 2,0 мл (рекомендуются Пробирки Eppendorf DNA LoBind, производства «Eppendorf AG», Германия, РУ № ФСЗ 2009/04520 от 19.06.2009 (№ в каталоге 0030108078))
- Тонкостенные пробирки объемом 0,5 мл для прибора Qubit (например, «Изделия Eppendorf из полимерных материалов для лабораторных исследований in vitro. Пробирки Safe-Lock PCR clean с защелкой, объемом от 0,5мл до 2,0мл (Safe-Lock PCR clean tubes 0,5-2,0ml)», Германия, РУ № ФСЗ 2009/04520 от 19.06.2009 (№ в каталоге 0030124537)))
- Дозаторы с переменным объемом (емкостью 1,0-1000 мкл) (например, «Пипетки-дозаторы одноканальные и многоканальные фиксированным и регулируемым объемом доз Dlab и Apexlab» РУ № РЗН 2022/18393 от 29.09.2022)
- 8-канальные дозаторы с переменным объемом (емкостью 1,0-100 мкл) (например, «Пипетки-дозаторы одноканальные и многоканальные фиксированным и регулируемым объемом доз Dlab и Apexlab» РУ № РЗН 2022/18393 от 29.09.2022)
- 96-луночные планшеты, совместимые с термоциклером (например, «Термостат электрический для проведения полимеразной цепной реакции (ПЦР) ДНК Veriti Thermal Cycler. Плашки реакционные оптические 96-луночные MicroAmp для ПЦР», производства «Life Technologies Corporation», США, РУ № ФСЗ 2011/09244 от 02.06.2017 г)
- 96-луночные оптические планшеты, совместимые с флуориметром для планшетов или измерительным прибором для qPCR (например «Посуда из полимерных материалов для лабораторных исследований in vitro. Планшеты для проведения полимеразной цепной реакции (ПЦР-диагностики) на 96 лунки, с объемом лунки от 1,0 мкл до 2,2 мл», производства «Scientific Specialties Incorporated (SSI)», США, РУ № ФСЗ 2011/10287 от 11.04.2017 г.)

- Пленка для планшетов, совместимая с термоциклерами (проверялась на ПЦР длинных фрагментов) (например, «Термостат электрический для проведения полимеразной цепной реакции (ПЦР) ДНК Veriti Thermal Cyclер. Пленка самоклеющаяся для плашек реакционных оптических 96-луночных MicroAmp для скоростной ПЦР», производства «Life Technologies Corporation», США, РУ № ФСЗ 2011/09244 от 02.06.2017 г.).
- Оптически прозрачная пленка для планшетов, совместимая с измерительным прибором для qPCR (например «Посуда из полимерных материалов для лабораторных исследований in vitro. Пленки адгезивные для заклеивания ПЦР-планшетов», производства «Scientific Specialties Incorporated (SSI)», США, РУ № ФСЗ 2011/10287 от 11.04.2017 г.)
- Магнитный штатив, совместимый с пробирками для микроцентрифугирования объемом 2 мл (например, «Штатив лабораторный по ТУ 32.50.50-005-01813981-2020. Магнитный штатив для работы с пробирками объемом 1,5/2,0 мл. Артикул: МагСи», производства ООО "Компания Совтех", Россия, РУ № РЗН 2022/16856 от 19.08.2022)
- 96-луночные штативы-охладители (2 шт) (например, «Изделия медицинские лабораторные . Настольный штатив для амплификации с охлаждением Labtop Cooler», производства «Nunc A/S», Дания, РУ № ФСЗ 2012/11874 от 21.06.2016)
- Конические пробирки объемом 50 мл (например, «Пробирки медицинские полимерные по ТУ 9464-015-29508133-2014.. Пробирки конические с винтовой крышкой: 10 мл, 15 мл, 50 мл.», производства ООО "МиниМед", РУ № РЗН 2015/2596 от 13.01.2020)
- Емкости объемом 50 мл

ЮРИДИЧЕСКОЕ ПРЕДУПРЕЖДЕНИЕ

Инструкция по применению Holotype HLA 96/7 и все ее содержимое являются собственностью «Омиксон Биокомпьютинг Лтд» (Omixon) и предназначены исключительно для использования клиентом на условиях договора в отношении изделия (изделий), описанных в настоящем документе, и ни для какой другой цели. Настоящий документ и его содержание не должны использоваться или распространяться в любых других целях и/или иным образом передаваться, раскрываться или воспроизводиться каким-либо иным образом без предварительного письменного согласия компании Omixon. Компания Omixon не предоставляет посредством настоящего документа какую-либо лицензию на использование патента, товарного знака, авторских прав или прав, предоставляемых в соответствии с системой общего права, а также аналогичных прав третьих лиц.

Использование Omixon Holotype (включая программное обеспечение и анализ) регулируется условиями и положениями, которые являются частью коммерческого предложения. Условия и положения принимаются по умолчанию путем отправки заявки на заказ изделий Omixon. Лицензионное соглашение на использование продукта Omixon HLA Twin опубликовано на веб-сайте Omixon (www.omixon.com/hla-twin-eula/).

Использование только программного обеспечения Omixon HLA Twin регулируется лицензионным соглашением конечного пользователя Omixon HLA Twin (www.omixon.com/hla-twin-eula/).

Для правильного и безопасного использования продуктов Omixon все шаги, прописанные по инструкции в этом документе, должны выполняться квалифицированным и обученным персоналом. Перед использованием продуктов Omixon необходимо полностью ознакомиться с настоящим документом.

НЕСОБЛЮДЕНИЕ ИНСТРУКЦИЙ, СОДЕРЖАЩИХСЯ В ДАННОМ ДОКУМЕНТЕ МОЖЕТ ПРИВЕСТИ К ПОВРЕЖДЕНИЮ ПРОДУКТОВ, ТРАВМАМ ПЕРСОНАЛА, В ТОМ ЧИСЛЕ ПОЛЬЗОВАТЕЛЕЙ ИЛИ ТРЕТЬИХ ЛИЦ, МАТЕРИАЛЬНОМУ УЩЕРБУ.

КОМПАНИЯ ОМИХОН НЕ НЕСЕТ ОТВЕТСТВЕННОСТИ ЗА НЕПРАВИЛЬНОЕ ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ПРОДУКТОВ, ОПИСАННЫХ В ДАННОМ ДОКУМЕНТЕ (ВКЛЮЧАЯ ИХ ЧАСТЕЙ ИЛИ ПРОГРАММНОЕ ОБЕСПЕЧЕНИЕ) ИЛИ ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ТАКИХ ПРОДУКТОВ ЗА ПРЕДЕЛАМИ ДЕЙСТВИЯ ПРЯМЫХ ПИСЬМЕННЫХ ЛИЦЕНЗИЙ ИЛИ РАЗРЕШЕНИЙ, ПРЕДОСТАВЛЕННЫХ КОМПАНИЕЙ ОМИХОН, В СЛЕДСТВИЕ ПРИОБРЕТЕНИЯ КЛИЕНТОМ ТАКИХ ПРОДУКТОВ.

О любом серьезном происшествии, которое произошло в связи с использованием продукта Omixon Holotype HLA, следует немедленно сообщить в компанию Omixon по адресу support@omixon.com и в компетентный орган государства, членом которого является пострадавший пользователь и/или пациент.

ТОЛЬКО ДЛЯ ДИАГНОСТИЧЕСКОГО ПРИМЕНЕНИЯ *IN VITRO*

© 2023 «Омиксон Биокomпьютинг Лтд» Все права защищены

ВАЖНОЕ ЗАМЕЧАНИЕ ПЕРЕД НАЧАЛОМ РАБОТЫ

Рекомендации по выделению геномной ДНК

Геномная ДНК человека выделяется из периферической крови с использованием проверенных и зарекомендовавших себя наборов для выделения ДНК. Вне зависимости от выбранного подхода, для надежного проведения анализа требуется точное определение концентрации и чистоты выделенной ДНК.

ДНК не должна содержать примесей, которые могли бы повлиять на последующие операции по амплификации, подготовке библиотеки и секвенированию (например, спирта, солей, моющих средств, формальдегида и гепарина). Забор крови не следует проводить в пробирки с гепарином. Также не следует использовать образцы крови пациентов, проходящих гепариновую терапию, образцы липемичной и гемолизированной крови.

Подготовленную геномную ДНК, разведенную в воде без нуклеаз, можно использовать немедленно либо хранить в течение длительного времени при температуре -20°C и ниже. Мы рекомендуем использовать для подготовки геномной ДНК именно воду, так как ЭДТА в ТЕ-буфер могут ингибировать реакции ПЦР длинных фрагментов. Следует избегать повторных циклов замораживания и оттаивания, чтобы избежать деградации ДНК.

Для получения 80-120 нг входной геномной ДНК на амплификацию ПЦР настоятельно рекомендуется использовать концентрацию ДНК 20-30 нг/мкл. Для определения концентрации геномной ДНК мы рекомендуем использовать флуоресцентный метод.

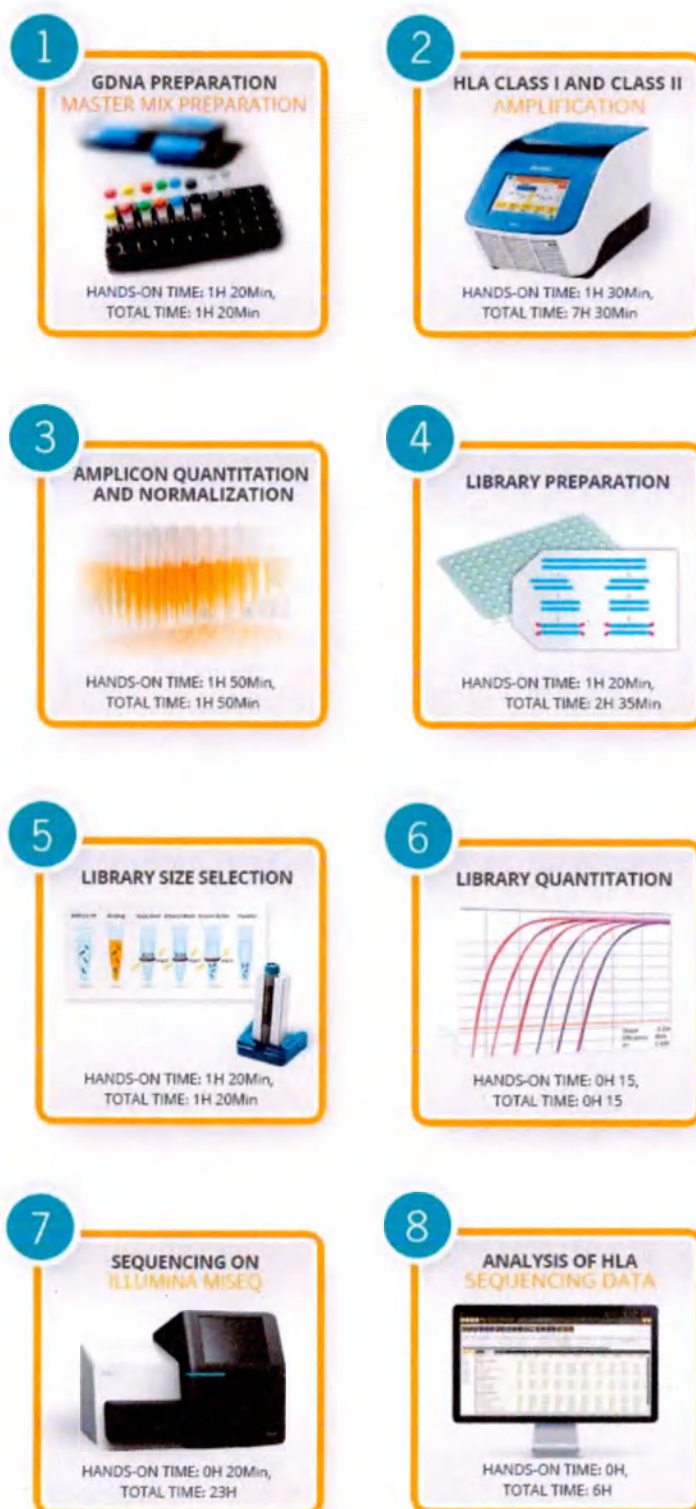
Настоятельно рекомендуется использовать коэффициент поглощения 1,7-2 для соотношений 260 нм/280 нм и 260 нм/230 нм. Для амплификации генов HLA-A, HLA-B, HLA-C, HLA-DRB1, HLA-DPB1, HLA-DQA1 и HLA-DQB1 требуется 560-840 нг геномной ДНК образца.

Утвержденные термоциклеры

Для всех наборов Hologate HLA 96/7, конфигураций A/B/C была проведена валидация на следующих термоциклерах:

- Термостат электрический для проведения полимеразной цепной реакции (ПЦР) ДНК Veriti Thermal Cycler, вариант исполнения Veriti 96-Well Thermal Cycle, производства «Life Technologies Corporation», США, РУ № ФСЗ 2011/09244 от 02.06.2017 г.
 - Термостат электрический для проведения полимеразной цепной реакции (ПЦР) амплификации ДНК, модели GeneAmp PCR System 9700, производства «Applied Biosystems Group of The Applied Biosystems Corporation», Сингапур.
- Скорость линейного изменения для обоих аппаратов была максимальной.

КРАТКОЕ ИЗЛОЖЕНИЕ ШАГОВ



ГЛОССАРИЙ/ОПРЕДЕЛЕНИЯ

- Планшет для ампликонов - альтернативное название для планшета для амплификации
- Планшет для количественного анализа ампликонов - 96-луночный планшет, совместимый с флуориметром для планшетов, где производится количественный анализ разведенных ампликонов
- Планшет для амплификации - 96-луночный планшет для ПЦР, использующийся для амплификации локусов HLA
- Свободные от примесей пулы ампликонов - планшеты, содержащие все пулированные ампликоны после очистки от примесей при помощи микроносителей
- Библиотека образца — библиотека, подготовленная с помощью комбинирования (пулирования) всех локусов HLA для данного образца
- Планшет для реакции: планшет, на котором проводятся последовательные реакции с фрагментацией, обработкой концов и лигированием индексированных адаптеров к библиотекам образца
- Планшет для реагентов - планшет, используемый для разделения на аликвоты различных реагентов, используемых для приготовления библиотек образцов
- Окончательная библиотека - библиотека, включающая все библиотеки образцов, готовые к секвенированию за один сеанс обработки на MiSeq
- Планшет для количественного анализа стандартных растворов - 96-луночный планшет, совместимый с флуориметром для планшетов или устройством для qPCR, куда стандартные растворы ДНК помещаются для количественного анализа ампликонов

ШАГ 0 - НОРМАЛИЗАЦИЯ ГЕНОМНОЙ ДНК

Длительность: ~1 час



См. Рабочую тетрадь: вкладка подготовки геномной ДНК
(Refer to Workbook: gDNA preparation tab)

Выделите геномную ДНК из биологических образцов. Геномная ДНК должна быть разведена в воде без нуклеаз либо ТЕ-буфере с низким содержанием солей, поскольку высокое содержание ЭДТА в ТЕ-буфере может ингибировать ПЦР длинных фрагментов. Для определения концентрации геномной ДНК мы настоятельно рекомендуем использовать флуоресцентный метод.

Качество геномной ДНК должно соответствовать следующим показателям:

1. 260 нм/280 нм поглощающая способность между 1,7 и 1,9.
2. 260 нм/230 нм поглощающая способность 1,7 и выше.
3. Минимальный распад. Старая ДНК или ДНК, прошедшая несколько циклов заморозки/разморозки будет иметь больший распад.

Для амплификации генов HLA-A, HLA-B, HLA-C, HLA-DRB1, HLA-DPB1, HLA-DQA1 и HLA-DQB1 требуется 560-840 нг геномной ДНК для каждого образца.

Протокол

1. Разведите геномную ДНК до концентрации 20-30 нг/мкл (минимальный объем 44 мкл) в 96-луночном ПЦР-планшете или 8-луночных стрипах. Обратитесь к рабочей тетради, чтобы рассчитать необходимые объемы.
2. Закройте планшет/стрипы и отложите нормализованные образцы геномной ДНК до Шага 2.

ШАГ 1 - ПОДГОТОВКА МАСТЕР-МИКСА ДЛЯ АМПЛИФИКАЦИИ HLA

Длительность: ~35 минут



См. рабочую тетрадь: Вкладка подготовки ПЦР
(Refer to Workbook: PCR preparation tab)

Данный шаг предназначен для подготовки мастер-миксов для каждого локуса HLA с целью индивидуальной амплификации этого локуса. Локусы, подвергающиеся амплификации по данному протоколу: HLA-A, HLA-B, HLA-C, HLA-DRB1, HLA-DPB1, HLA-DQA1 и HLA-DQB1.

Список реагентов

Позиция	Хранение	Поставлено
Смесь праймеров HLA-A	-20 °C	Omixon
Смесь праймеров HLA-B	-20 °C	Omixon
Смесь праймеров HLA-C	-20 °C	Omixon
Смесь праймеров HLA-DRB1	-20 °C	Omixon
Смесь праймеров HLA-DPB1	-20 °C	Omixon
Смесь праймеров HLA-DQA1	-20 °C	Omixon
Смесь праймеров HLA-DQB1 (Набор 3)	-20 °C	Omixon
Реактив для усиления амплификации 1 (Enhancer 1)	-20 °C	Omixon
Мастер-микс Promega GoTaq 2X Long PCR	-20°C	Promega
Вода для молекулярной биологии (без ДНКазы и РНКазы)	-20°C	Пользователь

Протокол

1.1 Вытащите все смеси праймеров, реактив для усиления амплификации 1 (Enhancer 1) и мастер-миксы Promega GoTaq 2X Long PCR из морозильника и дайте оттаять при комнатной температуре.



Примечание: Мастер-микс Promega GoTaq 2X Long PCR содержит термостабильную ДНК-полимеразу с горячим стартом, поэтому он не требует хранения на льду.

1.2 Тщательно перемешайте все пробирки со смесью праймеров и мастер-миксами Promega GoTaq 2X PCR на вортке в течение 5 секунд, а затем центрифугируйте их в течение 5 секунд с помощью функции быстрого центрифугирования (quick spin). Подготовьте мастер-микс для каждой смеси праймеров в соответствии с таблицами ниже (для количества менее 96 образцов используйте рабочую тетрадь Excel для расчета объемов):

Мастер-микс: HLA-A, B, C, DRB1, DPB1 и DQA1

Реагент	Объем/образец/лок ус	Объем/96 образцов/локус
Вода для молекулярной биологии (без ДНКазы и РНКазы)	7,5 мкл	750 мкл
Мастер-микс Promega GoTaq 2X Long PCR	7 мкл	700 мкл
Смесь праймеров	1,5 мкл	150 мкл
Общий объем	16 мкл	1600 мкл

Мастер-микс: HLA-DQB1 Набор 3

Реагент	Объем/образец/локус	Объем/96 образцов/локус
Вода для молекулярной биологии (без ДНКазы и РНКазы)	5,5 мкл	550 мкл
Мастер-микс Promega GoTaq 2X Long PCR	7 мкл	700 мкл
Реактив для усиления амплификации 1 (Enhancer 1)	2 мкл	200 мкл
Смесь праймеров	1,5 мкл	150 мкл
Общий объем	16 мкл	1600 мкл

- 1.3 Перемешайте каждую пробирку с мастер-миксом на вортексе в течение 5 секунд и центрифугируйте их в течение 5 секунд с помощью функции быстрого центрифугирования (quick spin).



Примечание: Набор Hologtype HLA содержит достаточный объем реагентов для 96 реакций плюс дополнительный объем, предусматривающий потери при пипетировании и неудачной амплификации.

ШАГ 2 – АМПЛИФИКАЦИЯ HLA КЛАССА I и II

Длительность: ~ 7 часов 45 минут



См. рабочую тетрадь: Вкладка с разметкой планшетов
(Refer to Workbook: Plate maps tab)

Шаг 2 предназначен для амплификации локусов HLA. Для амплификации локусов HLA класса I и II оптимизированы разные условия для проведения ПЦР. После выполнения реакций ПЦР амплификация подтверждается электрофорезом в агарозном геле (опционально).



Подсказка – хотя и рекомендуется проводить электрофорез в агарозном геле, он не является необходимым условием для успешного выполнения протокола Holotype HLA. Амплификация считается успешной, если при подсчете ампликонов (шаг 3) концентрация выше 50 нг/мкл.

Список реагентов

Позиция	Хранение	Поставлено
Мастер-микс HLA-A	-20 °C	Шаг 1
Мастер-микс HLA-B	-20 °C	Шаг 1
Мастер-микс HLA-C	-20 °C	Шаг 1
Мастер-микс HLA-DRB1	-20 °C	Шаг 1
Мастер-микс HLA-DPB1	-20 °C	Шаг 1
Мастер-микс HLA-DQA1	-20 °C	Шаг 1
Мастер-микс HLA-DQB1 (Набор 3)	-20 °C	Шаг 1
геномная ДНК	4 °C	Пользователь

Протокол

- 2.1 Внесите аликвоты от каждого мастер-микса в размере 16 мкл в отдельные лунки 96-луночного планшета для ПЦР.



Примечание: Для амплификации локусов HLA класса I и II были оптимизированы разные условия ПЦР, поэтому мастер-миксы отдельных классов I и II не должны присутствовать на одном планшете.

- 2.2 Добавьте 4 мкл каждого образца разведенной геномной ДНК в соответствующую лунку на планшетах, подготовленных в предыдущем шаге. Аккуратно перемешайте пипетированием.
- 2.3 Закройте планшет термической пленкой и осмотрите каждую лунку. Центрифугируйте все планшеты для амплификации в течение 5 секунд с помощью

функции быстрого центрифугирования (quick spin).

- 2.4 Поместите планшеты для амплификации в термоциклеры и запустите программы амплификации класса I и II согласно следующим таблицам:

Амплификация класса I (HLA-A, B и C)

Количество циклов	Температура	Время
1	95 °C	2 минуты
40	95 °C	15 секунд
	65 °C	30 секунд
	68 °C	4 минуты
	68 °C	10 минут
1	4 °C	∞

Амплификация класса II (HLA-DRB1, DPB1, DQA1 и DQB1)

Количество циклов	Температура	Время
1	95 °C	2 минуты
40	95 °C	15 секунд
	65 °C	30 секунд
	68 °C	8 минут
	68 °C	10 минут
1	4 °C	∞

Ожидаемые размеры ампликонов

Локус HLA	Ожидаемый размер ампликона (т.н.)
HLA-A, B и C	~3
HLA-DRB1	~4,3
HLA-DPB1	~6,6
HLA-DQA1	~5,5
HLA-DQB (Набор 3)	~6,5



Примечание: Успешность амплификации можно проверить, прогнав каждый ампликон через стандартный 2% агарозный гель при 250 В на протяжении 30 минут (опционально).



Безопасная точка остановки. Ампликоны можно хранить при 4 °C одну ночь или при -20 °C на протяжении 3 месяцев.

Шаг 3 – КОЛИЧЕСТВЕННЫЙ АНАЛИЗ И НОРМАЛИЗАЦИЯ АМПЛИКОНА (ДЛЯ ПЛАНШЕТОВ ЕМКОСТЬЮ 200 МКЛ)

Длительность: ~1 час 20 минуты



См. рабочую тетрадь: Вкладка количественного анализа ампликонов (Refer to Workbook: Amplicon quantitation tab)

Концентрация ампликона измеряется с помощью системы QuantiFluor dsDNA, которая содержит флуоресцентный ДНК-связывающий краситель и стандарт ДНК для точного количественного анализа малых объемов двухцепочечной ДНК (dsDNA).

Инструкцию по количественному анализу ампликонов в планшетах емкостью 100 мкл см в Приложении 1.

Примечание: Количественное определение ампликонов не является обязательным шагом, но мы рекомендуем его для оптимальной подготовки последующей библиотеки. Оценка концентрации ампликонов также может быть проведена после тщательной внутренней проверки с помощью электрофореза в агарозном геле. Шаг количественной оценки ампликонов не стоит пропускать при отсутствии опыта работы с протоколами Hologate HLA.

Список реагентов

Позиция	Хранение	Поставлено
Планшет для амплификации класса I	4 °C	Шаг 2
Планшеты для амплификации класса II	4 °C	Шаг 2
Lambda DNA Standard (100 нг/мкл)	4 °C	Promega
Краситель QuantiFluor dsDNA (200x)	4 °C	Promega
буфер 20x TE (pH 7.5)	4 °C	Promega
Вода для молекулярной биологии (без ДНКазы и РНКазы)	от 20 °C до 25 °C	Пользователь

Протокол

- 3.1 Подготовьте стандарты ДНК путем серийного разведения реагента Lambda DNA standard (100 нг/мкл), входящего в состав набора QuantiFluor, согласно таблице ниже:

Этикетка на пробирке	Исходная ДНК	Объем ДНК (мкл)	Объем 1х ТЕ (мкл)	Конеч. конц. (нг/мкл)
Стандарт 1	Lambda DNA	7,5 мкл	492,5 мкл	1,5 нг/мкл
Стандарт 2	Стандарт 1	250 мкл	250 мкл	0,75 нг/мкл
Стандарт 3	Стандарт 2	250 мкл	250 мкл	0,38 нг/мкл
Стандарт 4	Стандарт 3	250 мкл	250 мкл	0,19 нг/мкл
Стандарт 5	Стандарт 4	250 мкл	250 мкл	0,09 нг/мкл
Стандарт 6	Стандарт 5	250 мкл	250 мкл	0,05 нг/мкл
Холостая проба	Холостая проба	0 мкл	250 мкл	0 нг/мкл

- 3.2 Подготовьте планшеты для количественного анализа ампликонов (см. дополнительные иллюстрации). Добавьте 99 мкл 1х буфера ТЕ в лунки 96-луночного оптически прозрачного планшета.
- 3.3 Добавьте 1 мкл ампликонов из соответствующих лунок планшета для ампликонов в отдельные лунки на планшетах для количественного анализа ампликонов. Аккуратно перемешайте пипетированием.
- 3.4 Подготовьте раствор 1х рабочего красителя QuantiFluor Dye по следующей формуле: 0,5 мкл QuantiFluor Dye (200X) + 99,5 мкл 1х буфера ТЕ. Подготовленного раствора 1х QuantiFluor должно хватать на каждый образец в планшетах с ампликонами и стандарты (всего 14) из расчета 100 мкл на образец.
- 3.5 Подготовьте планшеты для количественного анализа стандартных растворов и ампликонов. Добавьте 100 мкл рабочего раствора 1х QuantiFluor Dye из шага 3.2 в лунки 96-луночного оптического планшета (планшет для количественного анализа стандартов) и в планшеты для количественного анализа ампликонов.
- 3.6 Добавьте 100 мкл каждого стандарта, подготовленных выше, в двух повторностях в отдельные лунки планшета для количественного анализа стандартов (всего 14 лунок). Аккуратно перемешайте пипетированием.
- 3.7 Перемешайте в вортексе в течение 5 секунд и осадите методом центрифугирования (на высокой скорости).
- 3.8 Инкубируйте пробы в течение 5 минут при комнатной температуре в защищенном от света месте.
- 3.9 Проверьте концентрацию стандартов в планшете с помощью флуориметра или qPCR амплификатора, аналогично проверьте концентрацию ампликонов. Используйте следующий режим на qPCR амплификаторе (в зависимости от модели анализатора может потребоваться настройка параметров):

Количество циклов	Температура	Время
1	25 °C	10 секунд
2	25 °C	15 секунд
	25 °C	30 секунд (операции сбора данных)

- 3.10 Рассчитайте концентрацию ДНК в планшетах для количественного анализа

ампликонов, используя технические возможности флуориметра или qPCR амплификатора. Для помощи в расчетах см. вкладку "Разведение" (Dilution) в предоставленной рабочей тетради.

3.11 Разведите ДНК в планшетах с ампликонами водой для молекулярной биологии (без ДНКазы и РНКазы), чтобы конечная концентрация ДНК находилась в пределах 50-120 нг/мкл.

- Если концентрация ДНК составляет 180 нг/мкл или выше: добавьте 20 мкл H₂O
- Если концентрация ДНК составляет 115-180 нг/мкл или выше: добавьте 10 мкл H₂O
- Если концентрация ДНК составляет 115 нг/мкл или выше: не добавляйте H₂O



Безопасная точка остановки. Ампликоны можно хранить при 4 °C одну ночь или при -20 °C на протяжении 3 месяцев.

ШАГ 4 – ПУЛИРОВАНИЕ И ОЧИСТКА АМПЛИКОНОВ С ПОМОЩЬЮ EXOSAP-IT EXPRESS

Длительность: ~40 минут



См. рабочую тетрадь: Вкладка подготовки библиотеки
(Refer to Workbook: Library preparation tab)

Список реагентов

Позиция	Хранение	Поставлено
Планшеты для нормализованной амплификации класса I	4° C	Шаг 3
Планшеты для нормализованной амплификации класса II	4° C	Шаг 3
Набор для очистки продуктов ПЦР ExoSAP-IT	20° C	Affymetrix

Протокол

- 4.1 Объедините все локусы для каждого образца в лунки одного планшета с ампликонами. Смешайте объемы, указанные для каждого локуса, согласно следующей таблице, чтобы получить окончательный объем в 38 мкл:

Локус HLA	Пулированный объем
A	3 мкл
B	3 мкл
C	3 мкл
DQA1	6 мкл
DPB1	7 мкл
DQB1	7 мкл
набор 3	
DRB1	9 мкл

- 4.2 Добавьте 4 мкл реагента из набора для очистки продуктов ПЦР ExoSAP-IT в каждую библиотеку образцов. Аккуратно промойте наконечник от остатков путем пипетирования. Запечатайте планшет пленкой. Центрифугируйте планшет в течение 10 секунд с помощью функции быстрого центрифугирования (quick spin).
- 4.3 Поместите планшет с объединенными ампликонами в термоциклер и запустите следующую программу:

Количество циклов	Температура	Время
1	37 °C	4 минуты
1	80 °C	1 минута
1	4 °C	∞



Безопасная точка остановки. Пулы очищенных ампликонов можно хранить при 4°C одну ночь или при -20°C на протяжении 3 месяцев.

ШАГ 5 – ПОДГОТОВКА БИБЛИОТЕКИ

Длительность: ~2 час 35 минут



См. рабочую тетрадь: Вкладка подготовки библиотеки
(Refer to Workbook: Library preparation tab)

На этой стадии пулированные ампликоны подготавливаются к секвенированию на платформе Illumina MiSeq. Ампликоны ферментативно фрагментируются, концы репарируются и аденилируются и к ним присоединяются индексированные адаптеры.



Примечание: Omixon рекомендует использовать объемы больше чем необходимо для анализа 96 образцов, потому что многие ферменты и буферы имеют вязкую структуру, что приводит к излишним потерям при пипетировании. Также рекомендуется использовать планшет с реагентами на более чем 8 лунок. 96-луночный планшет с реагентами помещается в 96-луночный штатив-охладитель, где каждый мастер-микс разделяется на аликвоты в чистую колонку для дозирования многоканальной пипеткой.

Список реагентов

Позиция	Хранение	Поставлено
Пулы очищенных ампликонов	4 °C	Шаг 4
Вода для молекулярной биологии (без ДНКазы и РНКазы)	от 20 °C до 25 °C	Пользователь
Фермент для фрагментирования (A)	-20 °C	Omixon
Буфер для фрагментирования (B)	-20 °C	Omixon
Фермент для обработки концов (C)	-20 °C	Omixon
Буфер для обработки концов (D)	-20 °C	Omixon
Фермент для лигирования (E)	-20 °C	Omixon
Буфер для лигирования (F)	-20 °C	Omixon
Планшет с адаптерами	-20 °C	Omixon

Протокол

- Включите термоциклер. Убедитесь, что крышка нагревается. Запустите программу фрагментации из пункта 10 и продолжайте подготовку реакции фрагментации.
- Разморозьте буфер для фрагментации до комнатной температуры и оставьте его на льду.



Примечание: Тщательно перемешайте фермент для фрагментирования (A) в вортексе (30 секунд) перед использованием. Центрифугируйте на протяжении 5

секунд с помощью функции быстрого центрифугирования (quick spin) и положите на лед.

- 5.3 Подготовьте мастер-микс для фрагментации согласно таблице ниже (если образцов меньше 96, см. в рабочей тетради Excel информацию по расчету объемов):

Мастер-микс для фрагментации

Реагент	Объем на библиотек у (мкл)	Рекомендованные объемы для библиотек на 96 образцов (мкл)	Цветовой код
Вода для молекулярной биологии (без ДНКазы и РНКазы)	2 мкл	220 мкл	
Буфер для фрагментирования (B)	2 мкл	220 мкл	Красный
Фермент для фрагментирования (A)	1 мкл	110 мкл	Желтый
Общий объем	5 мкл	550 мкл	



Примечание: Реакция фрагментации была разработана для получения ДНК идеального размера для секвенирования на платформе Illumina. Важно, чтобы реагенты оставались холодными до начала реакции в термоциклере во избежание излишней фрагментации. Для минимизации излишней фрагментации рекомендуется использовать многоканальные пипетки.

- 5.4 Тщательно перемешайте мастер-микс для фрагментации в вортексе (5 секунд) и осадите посредством центрифугирования 5 секунд (quick spin). Поместите мастер-микс для фрагментации на лед. Запустите программу фрагментации в термоциклере и поддерживайте предварительный нагрев блока при подготовке реакции.
- 5.5 Центрифугируйте пулы очищенных ампликонов 5 секунд (quick spin) и поместите их на лед или на штатив-охладитель.
- 5.6 Подготовьте планшет для реакции: поместите новый 96-луночный планшет для ПЦР на штатив-охладитель.
- 5.7 Добавить 5 мкл мастер-микса для фрагментации в пустые лунки планшета для реакции в соответствии с образцами в планшете пулированных ампликонов. Рекомендуется использовать многоканальные пипетки.
- 5.8 Перенесите 15 мкл каждого пула ампликонов из планшета с пулами очищенных ампликонов в соответствующие лунки на планшет для реакции с помощью многоканальной пипетки. Смешайте посредством пипетирования. Оставьте планшет для реакции на штативе-охладителе.
- 5.9 Закройте планшет для реакции термической пленкой и центрифугируйте его на протяжении 5 секунд (quick spin).
- 5.10 Перенесите планшет для реакции в термоциклер, затем нажмите <Пропустить шаг>.

чтобы немедленно возобновить программу фрагментации::

Программа фрагментации

Количество циклов	Температура	Время
1	37 °C	∞
1	37 °C	10 минут
1	70 °C	15 минут
1	4 °C	∞



Безопасная точка остановки. Библиотеки можно хранить при 4 °C одну ночь или при -20 °C более длительное время.

- 5.11 Разморозьте Буфер для обработки концов и подготовьте мастер-микс для обработки концов согласно таблице ниже (если образцов меньше 96, см. в рабочей тетради Excel информацию по расчету объемов):

Мастер-микс для обработки концов

Реагент	Объем на библиотек у (мкл)	Рекомендованные объемы для библиотек на 96 образцов (мкл)	Цветовой код
Вода для молекулярной биологии (без ДНКазы и РНКазы)	1,25 мкл	150 мкл	
Буфер для обработки концов (D)	2,5 мкл	300 мкл	Оранжевый
Фермент для обработки концов (C)	1,25 мкл	150 мкл	Зеленый
Общий объем	5 мкл	600 мкл	

- 5.12 Перемешайте мастер-микс для обработки концов в вортексе и осадите посредством центрифугирования на протяжении 5 секунд (quick spin). Держите мастер-микс на льду до использования.
- 5.13 Центрифугируйте планшет (содержащий фрагментированные образцы) для реакции на протяжении 5 секунд. Добавьте 5 мкл мастер-микса для обработки концов в каждую лунку планшета для реакции и перемешайте посредством пипетирования. Рекомендуется использовать многоканальные пипетки.
- 5.14 Закройте планшет для реакции термической пленкой и центрифугируйте его на протяжении 5 секунд (quick spin).
- 5.15 Инкубируйте планшет для реакции в термоциклере по следующей программе:

Программа обработки концов

Количество циклов	Температура	Время
1	20 °C	30 минут
1	70 °C	5 минут
1	4 °C	∞



Безопасная точка остановки. Библиотеки можно хранить при 4 °C одну ночь или при -20 °C более длительное время.

- 5.16 Извлеките планшет с индексированными адаптерами и дайте ему разморозиться до комнатной температуры после запуска программы обработки концов в термоциклере. После того как планшет с адаптерами нагреется до комнатной температуры, центрифугируйте его на протяжении 1 минуты на скорости 3000 об/мин.
- 5.17 Аккуратно снимите пленку с планшета с адаптерами. После снятия пленки не встряхивайте планшет во избежание перекрестного загрязнения.
- 5.18 Перенесите 5 мкл из каждой лунки планшета с адаптерами в соответствующие лунки на планшета для реакции. Перемешайте посредством пипетирования. Для остальных шагов данного протокола используйте планшет для реакции.



Примечание: Если вы НЕ собираетесь использовать планшет с адаптерами целиком, можно использовать только необходимое количество адаптеров. Разрежьте пленку между теми лунками, которые вы собираетесь использовать, и теми, которые хотите оставить. Аккуратно снимите пленку с планшета с адаптерами, оставив ее только на тех лунках, которые не предполагается использовать.

- а. Перенесите 5 мкл из каждой лунки планшета с адаптерами в соответствующие лунки на планшета для реакции и перемешайте посредством пипетирования.
 - б. Закройте планшет с адаптерами и верните его на хранение при -20°C. Для остальных шагов, описанных в руководстве, используйте планшет для реакции.
- 5.19 Разморозьте буфер для лигирования и подготовьте мастер-микс для лигирования согласно таблице ниже (если образцов меньше 96, см. в рабочей тетради Excel информацию по расчету объемов):

Мастер-микс для лигирования

Реагент	Объем на библиотеку (мкл)	Рекомендованные объемы для библиотек на 96 образцов (мкл)	Цветовой код
Буфер для лигирования (F)	30 мкл	3300 мкл	Черный
Фермент для лигирования (E)	2,5 мкл	275 мкл	Синий
Общий объем	32,5 мкл	3575 мкл	

- 5.20 Тщательно перемешайте мастер-микс для лигирования в вортексе (5 секунд) и осадите посредством центрифугирования 5 секунд (quick spin).
- 5.21 Добавить 32,5 мкл мастер-микса для лигирования в каждую лунку в планшете для реакции. Рекомендуется использовать многоканальные пипетки. Смешайте посредством пипетирования.
- 5.22 Закройте планшет для реакции термической пленкой и центрифугируйте его на протяжении 5 секунд (quick spin).
- 5.23 Инкубируйте планшет для реакции в термоциклере по следующей программе:

Программа лигирования

Количество циклов	Температура	Время
1	25 °C	30 минут
1	70 °C	10 минут
1	4 °C	∞



Безопасная точка остановки. Библиотеки можно хранить при 4 °C одну ночь или при -20 °C более длительное время.

Пулирование библиотеки

- 5.24 Создайте окончательную библиотеку, совместив аликвоту из каждого пулированного ампликона и библиотеку отдельного образца в 2 мл центрифужной пробирке с низкой адгезией.
- При количестве образцов 16 и более** – рассчитайте объем библиотеки каждого образца для пулирования их в одну **Библиотеку** общим объемом 900 мкл. Разделите 900 мкл на количество библиотек образцов. Это объем аликвоты, который необходимо взять из каждой библиотеки образцов и пипетировать в Библиотеку.
 - При количестве образцов менее 16** – перенесите 60 мкл из библиотеки каждого образца в пробирку со слабой адгезией объемом 2,0 мл, которая будет содержать пулированную Библиотеку.

Для выбора размера Библиотеки с использованием магнитных частиц AMPure XP

перейдите к шагу 6. Для выбора размера Библиотеки с использованием Pirpin Prep перейдите к Приложению 2.

ШАГ 6 - ВЫБОР РАЗМЕРА БИБЛИОТЕКИ ПРИ ПОМОЩИ МИКРОНОСИТЕЛЕЙ

Длительность: ~1 час 20 минут



См. рабочую тетрадь: Вкладка подготовки библиотеки
(Refer to Workbook: Library preparation tab)

В шаге 6 описывается протокол выбора размера одного пула индексированных библиотек образцов с использованием магнитных частиц AMPure XP. Микроносители Agencourt AMPure XP используют технологию обратимой твердофазной иммобилизации для связывания ДНК определенного размера к магнитным частицам в пропорции частица/образец (об./об.). При меньших соотношениях частиц (0.2X- 0.8X) привязываются более крупные фрагменты ДНК, оставляя в растворе фрагменты меньшего размера. При увеличении соотношения частица/образец (1X – 2X) микроносители могут привязывать к себе также и фрагменты меньшего размера.

Список реагентов

Позиция	Хранение	Поставлено
Общая библиотека	4° С	Шаг 5
Реагент для очистки продуктов ПЦР AMPure XP	4° С	производства Beckman Coulter
1X Tris-EDTA	от 20°С до 25°С	Пользователь
Tween 20	от 20°С до 25°С	Пользователь
80% этанол (свежеприготовленный)	от 20°С до 25°С	Пользователь
Вода для молекулярной биологии (без ДНКазы и РНКазы)	от 20°С до 25°С	Пользователь



Примечание: Следующий протокол написан для библиотек, содержащих минимум 12 образцов, где объем пула составляет 700 мкл. Если ваша пулированная библиотека составляет менее 700 мкл, см. в рабочей тетради Excel инструкции по расчету объемов, либо используйте следующие пропорции:

Библиотека: Соотношение частиц	
Первый отбор	1 : 0,2
Второй отбор	1 : 1
Третий отбор	Всегда фиксировано

Протокол

Подготовка реагента:

6.1 Подготовьте буфер для очистки частиц согласно следующей таблице:

Реагент	Объем
1X Tris-EDTA	40 мл
Tween 20	20 мкл
Общий объем	40,02 мл



Примечание: Буфер для очистки частиц может храниться при комнатной температуре до 3 месяцев.

- 6.2 Подготовьте 5 мл свежего 80%-го этанола (4 мл EtOH + 1 мл H₂O).
- 6.3 **Тщательно** перемешайте магнитные частицы AMPure XP в вортексе (30 секунд).
- 6.4 Разделите магнитные частицы AMPure XP на аликвоты по 840 мкл в пробирки со слабой адгезией объемом 2 мл и **нагрейте их до комнатной температуры**. Для использования в третьем отборе, описанном ниже, частицы AMPure должны быть комнатной температуры.
- 6.5 Добавьте 840 мкл буфера очистки к магнитным частицам, разделенным на аликвоты. Тщательно перемешайте в вортексе 10 секунд. Осадите посредством центрифугирования на протяжении 5 секунд (quick spin).
- 6.6 Инкубируйте на протяжении 1 минуты при комнатной температуре.
- 6.7 Установите пробирку на магнитный штатив на 2 минуты или до момента, пока раствор не станет прозрачным (обычно не более 4 минут).
- 6.8 Аккуратно удалите и выбросьте надосадочную жидкость. Будьте аккуратны и не заденьте частицы.
- 6.9 Добавьте 840 мкл буфера очистки частиц к частицам. Тщательно перемешайте в вортексе в течение 10 секунд. Осадите посредством центрифугирования на протяжении 5 секунд (quick spin).
- 6.10 Инкубируйте на протяжении 1 минуты при комнатной температуре.
- 6.11 Перемешайте частицы в вортексе в течение 10 секунд до перерастворения и разделите их на аликвоты по 140 мкл в чистые пробирки с низкой адгезией объемом 2 мл. *При использовании менее 12 образцов см. используемый объем частиц в рабочей тетради Excel.*
- 6.12 **ОСТАВЬТЕ** остальные 700 мкл частиц в буфере очистки для второго отбора.

Первый отбор:

- 6.13 Поместите пробирку с 140 мкл частиц в буфере очистки на магнитный штатив на 2 минуты. *При использовании менее 12 образцов см. используемый объем частиц в рабочей тетради Excel.*
- 6.14 Аккуратно удалите и выбросьте надосадочную жидкость. Снимите пробирку со штатива.
- 6.15 Добавьте к частицам **700 мкл** пулированной библиотеки. – Перемешайте в вортексе в течение 5 секунд и осадите посредством центрифугирования на протяжении 5 секунд (quick spin). *При использовании менее 12 образцов см. используемый объем пулируемой библиотеки в рабочей тетради Excel.*
- 6.16 Инкубируйте при комнатной температуре в течение 5 минут.
- 6.17 Снова установите пробирку на магнитный штатив на 4 минуты, чтобы частицы осели.
- 6.18 **СОБЕРИТЕ надосадочную жидкость (библиотека)** в чистую пробирку с низкой адгезией объемом 2 мл.

Второй отбор:

- 6.19 Поместите пробирку с 700 мкл магнитных частиц в буфере очистки на магнитный штатив на 2 минуты, чтобы частицы осели. Аккуратно удалите и выбросьте надосадочную жидкость. *При использовании менее 12 образцов см. используемый объем частиц в рабочей тетради Excel.*
- 6.20 Снимите пробирку с частицами со штатива.
- 6.21 Добавьте надосадочную жидкость из библиотеки, собранную в первом отборе, шаг 5.18, к частицам.
- 6.22 Тщательно перемешать в вортексе в течение 10 секунд до перерастворения частиц. Осадите посредством центрифугирования на протяжении 5 секунд (quick spin).
- 6.23 Инкубируйте при комнатной температуре в течение 5 минут.
- 6.24 Снова установите пробирку на магнитный штатив на 4 минуты, чтобы частицы осели.
- 6.25 Аккуратно удалите и выбросьте надосадочную жидкость.
- 6.26 Добавьте ~0,7-1 мл только что подготовленного 80%-го этанола в пробирку, пока она находится на магнитном штативе. Объем должен быть таким, чтобы покрыть частицы.
- 6.27 Инкубируйте пробирку на магнитном штативе при комнатной температуре на протяжении 30 секунд, затем аккуратно удалите и выбросьте надосадочную жидкость.
- 6.28 Повторите шаги 6.26 и 6.27.
- 6.29 Центрифугируйте пробирку на протяжении 3 секунд (quick spin), после чего быстро поставьте ее обратно на магнитный штатив и удалите пипеткой остатки этанола.

- 6.30 Оставьте пробирку на магнитном штативе с открытой крышкой на 5 минут, чтобы высушить осевшие частицы.
- 6.31 Снимите пробирку с магнитного штатива и элюируйте ДНК, добавив 200 мкл воды (без ДНКазы и РНКазы) к частицам.
- 6.32 Тщательно перемешайте в вортексе в течение 10 секунд до перерастворения частиц. Осадите посредством центрифугирования в течение 5 секунд (quick spin).
- 6.33 Инкубируйте при комнатной температуре в течение 2 минут.
- 6.34 Поместите пробирку с библиотекой на магнитный штатив на 2 минуты.
- 6.35 ПЕРЕНЕСИТЕ 200 мкл элюата (библиотека) в чистую пробирку с низкой адгезией объемом 2 мл.

Третий отбор:

- 6.36 **Тщательно перемешайте вортексом** (в течение 30 секунд) сток магнитных частиц AMPure XP комнатной температуры. Добавьте 160мкл аликвоты частиц к 200 мкл библиотеки из шага 6.35 второго отбора.
- 6.37 Тщательно перемешайте в вортексе в течение 5 секунд до перерастворения частиц в библиотеке. Осадите посредством центрифугирования на протяжении 5 секунд (quick spin).
- 6.38 Инкубируйте при комнатной температуре в течение 5 минут.
- 6.39 Снова установите пробирку на магнитный штатив на 4 минуты, чтобы частицы осели.
- 6.40 Аккуратно удалите и выбросьте надосадочную жидкость.
- 6.41 Добавьте ~0,5-1 мл только что подготовленного 80%-го этанола в пробирку, пока она находится на магнитном штативе. Объем должен быть таким, чтобы покрыть частицы.
- 6.42 Инкубируйте пробирку на магнитном штативе при комнатной температуре на протяжении 30 секунд, затем аккуратно удалите и выбросьте надосадочную жидкость.
- 6.43 Повторите шаги 6.41 и 6.42.
- 6.44 Центрифугируйте пробирку в течение 5 секунд (quick spin), быстро перенесите ее обратно на магнитный штатив и удалите пипеткой остатки этанола.
- 6.45 Оставьте пробирку на магнитном штативе с открытой крышкой на 5 минут, чтобы высушить микроносители.
- 6.46 Снимите пробирку с магнитного штатива и элюируйте библиотеку, добавив 25 мкл воды (без ДНКазы и РНКазы) к частицам.
- 6.47 Тщательно перемешать в вихревой мешалке на протяжении 10 секунд до перерастворения микроносителей. Осадите посредством центрифугирования в течение 5 секунд (quick spin).

- 6.48 Инкубируйте при комнатной температуре в течение 2 минут.
- 6.49 Поместите пробирку с библиотекой на магнитный штатив на 2 минуты.
- 6.50 ПЕРЕНЕСИТЕ 25 мкл элюата (библиотека) в чистую пробирку с низкой адгезией объемом 1,5 мл.



Безопасная точка остановки. Библиотеки можно хранить при -20 °C в течение длительного времени.

ШАГ 7 - КОЛИЧЕСТВЕННЫЙ АНАЛИЗ БИБЛИОТЕКИ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ПРИБОРА ДЛЯ qPCR

Длительность: ~1 час 15 минут



См. рабочую тетрадь: Таблица количественного анализа библиотеки
(Refer to Workbook: Library quantitation tab)

Необходимо провести количественную оценку библиотеки выбранного размера для оптимального использования секвенатора Illumina MiSeq. Концентрацию выбранной по размеру библиотеки можно точно определить с помощью qPCR.

По желанию можно использовать набор Qubit dsDNA BR и флуориметр Qubit для измерения концентрации библиотеки. Для этого протокола см. Приложение 3.



Примечание. флуориметрический метод количественной оценки библиотеки является быстрым, однако, как заявляет Illumina, с этим методом связан риск переоценить концентрацию библиотеки, поскольку он измеряет концентрацию всей двухцепочечной ДНК в пуле. Сюда входят частично сконструированные фрагменты (неполные фрагменты библиотеки) и остаточные димеры праймеров из ПЦР. Поэтому мы рекомендуем метод на основе qPCR для количественного определения библиотеки, однако при использовании флуориметрического метода мы настоятельно рекомендуем выполнять собственную внутреннюю проверку перед рутинным использованием.

Список реагентов

Позиция	Хранение	Поставлено
10x готовая смесь праймеров Illumina	-20 °C	KAPA Biosystems
Мастер-микс 2x KAPA SYBR FAST qPCR	-20 °C	KAPA Biosystems
Стандартный раствор 1 (20,00 пМ)	-20 °C	KAPA Biosystems
Стандартный раствор 2 (2,00 пМ)	-20 °C	KAPA Biosystems
Стандартный раствор 3 (0,20 пМ)	-20 °C	KAPA Biosystems
Стандартный раствор 4 (0,02 пМ)	-20 °C	KAPA Biosystems
Стандартные растворы Illumina для ДНК	-20 °C	KAPA Biosystems
Вода для молекулярной биологии (без ДНКазы и РНКазы)	от 20 °C до 25 °C	Пользователь
1x TE буфер (pH 8,0)	от 20 °C до 25 °C	Пользователь
Выбранная по размеру библиотека	4 °C	Шаг 6

Протокол

- 7.1 Подготовьте смесь праймеров для qPCR с использованием 10х готовой смеси праймеров Illumina и мастер-микса 2х KAPA SYBR FAST qPCR:



Примечание: Реагенты набора KAPA SYBR FAST qPCR (qPCR мастер-микс, готовая смесь праймеров и референсный краситель) смешиваются во время первого использования набора. Полученный раствор устойчив в течение минимум 30 циклов заморозания-оттаивания. Следуйте документации KAPA для определения, рекомендован ли референсный краситель для вашего устройства для qPCR.

Смесь праймеров для qPCR

Реагент	Объем (мл)
10х готовая смесь праймеров Illumina	1 мл
Мастер-микс 2х KAPA SYBR FAST qPCR	5 мл
Общий объем	6 мл

- 7.2 Подготовьте мастер-микс для qPCR.

Мастер-микс для qPCR

Реагент	Объем на лунку (мкл)	Объем на 1 библиотеку и стандартные растворы (мкл)
Смесь праймеров для qPCR	12 мкл	276 мкл
Вода для молекулярной биологии (без ДНКазы и РНКазы)	4 мкл	92 мкл
Общий объем	16 мкл	368 мкл

- 7.3 Подготовьте серийное разведение библиотеки выбранного размера.
- Подготовьте разведение 1:1000 путем добавления 1 мкл библиотеки к 999 мкл 1х ТЕ буфера (pH 8,0), аккуратно перемешивая пипетированием. Перемешайте в вортексе и осадите путем центрифугирования.
 - Подготовьте разведение 1:2000 путем добавления 100 мкл разведения 1:1000 к 100 мкл 1х ТЕ буфера (pH 8,0). Перемешайте в вортексе и осадите путем центрифугирования.
 - Подготовьте разведение 1:4000 путем добавления 20 мкл разведения 1:2000 к 20 мкл 1х ТЕ буфера (pH 8,0). Перемешайте в течение 5 секунд в вортексе и центрифугируйте в течение 5 секунд (quick spin).
- 7.4 Подготовьте планшет количественного подсчета для qPCR на новом ПЦР-планшете, совместимом с вашей системой для qPCR.
- 7.5 Внесите в лунки планшета аликвоты мастер-микс для qPCR в трех экземплярах по 16 мкл для стандартных растворов 1-4, разведений 1:1000, 1:2000 и 1:4000 (см. вспомогательные иллюстрации).

- 7.6 Внесите в соответствующие лунки аликвоты по 4 мкл стандартных растворов 1-4, разведений 1:1000, 1:2000 и 1:4000.
- 7.7 Закройте планшет пленкой совместимой с qPCR и центрифугируйте в течение 5 секунд.



Примечание: Избегайте появления пузырьков в лунках планшета. Центрифугируйте по мере необходимости для устранения пузырьков.

- 7.8 Установите тройные повторы разведений 1:1000, 1:2000 и 1:4000 как целевые образцы и определите стандартные растворы (точки: 4, исходная концентрация: 20 пМ, разведение: 1:10). Запустите следующую программу на qPCR амплификаторе для определения концентрации ДНК в библиотеке выбранного размера:

Количество циклов	Температура	Время
1	95 °C	5 минут
25	95 °C	30 секунд
	60 °C	90 секунд (операции сбора данных)

- 7.9 Для преобразования результатов qPCR из концентрации пМ в концентрацию нМ, введите полученные значения в таблицу рабочей тетради Omixon под названием "Количественный анализ библиотеки".
- 7.10 **Реагенты Illumina MiSeq v2:** Используя объемы из рабочей тетради, разведите 10 мкл библиотеки выбранного размера до концентрации **2 нМ** стерильной водой в новой 1,5 мл центрифужной пробирке с низкой адгезией. Храните остатки библиотеки при -20 °C.
- Реагенты Illumina MiSeq v3:** см. оригинальную документацию Illumina для разбавления библиотеки.



Безопасная точка остановки. Библиотеки можно хранить при -20 °C в течение длительного времени. В случае длительного хранения, строго рекомендуется провести повторный количественный анализ библиотеки перед ее запуском на платформах MiSeq.

ШАГ 8 - СЕКВЕНИРОВАНИЕ НА ILLUMINA MISEQ

Длительность: ~23 часа



См. рабочую тетрадь: Вкладка секвенирования и вкладка шаблон протокола исследования MiSeq

(Refer to Workbook: Sequencing tab and MiSeq Sample Sheet tab)

Секвенатор Illumina MiSeq - универсальная NGS система, способная секвенировать библиотеки выбранного размера, подготовленные на предыдущих этапах. Демультиплексирование индексированных образцов выполняется автоматически после завершения цикла секвенирования. **Следующие шаги описывают разведение и загрузку библиотеки с использованием реагентов MiSeq v2. При использовании реагентов MiSeq v3 следуйте документации Illumina.**

Список реагентов

Позиция	Хранение	Поставлено
Набор реагентов MiSeq 1	-20 °C	Illumina
Набор реагентов MiSeq 2	4 °C	Illumina
Набор Phix Control v3 (опционально)	-20 °C	Illumina
Библиотека концентрацией 2 нМ	4 °C	Шаг 7
Гидроксид натрия NaOH 0,2 Н	от 20 °C до 25 °C	Пользователь
Вода для молекулярной биологии (без ДНКазы и РНКазы)	от 20 °C до 25 °C	Пользователь

Протокол

- 8.1 Подготовьте систему секвенирования MiSeq согласно стандартным протоколам Illumina.
- 8.2 *Подготовка денатурированной библиотеки 2 нМ:* Смешайте 10 мкл свежеприготовленного 0,2 Н гидроксида натрия NaOH и 10 мкл 2 нМ разведенной библиотеки выбранного размера в новой 1,5 мл центрифужной пробирке с низкой адгезией. Перемешайте на вортексе в течение 5 секунд и центрифугируйте в течение 5 секунд (quick spin). Инкубируйте эту 1 нМ денатурированную библиотеку при комнатной температуре в течение 5 минут.
- 8.3 *Подготовка денатурированной библиотеки 20 пМ:* Добавьте 980 мкл охлажденного гибридизационного буфера HT1 к 20 мкл 1 нМ денатурированной библиотеки. – Перемешайте в вортексе в течение 5 секунд и центрифугируйте в течение 5 секунд (quick spin).
- 8.4 *Подготовка денатурированной библиотеки 9 пМ:* Смешайте 550 мкл

охлажденного гибридизационного буфера HT1 и 450 мкл 20 пМ денатурированной библиотеки в новой 1,5 мл центрифужной пробирке с низкой адгезией. Перемешайте в вортексе в течение 5 секунд и центрифугируйте в течение 5 секунд (quick spin). В результате должно получиться 1000 мкл 9 пМ денатурированной библиотеки.

- 8.5 Отложите все на лед до того момента как будете готовы загрузить библиотеки в картридж.



Рекомендация – Настоятельно рекомендуется добавлять в библиотеки 1% PhiX в качестве дополнительного контроля для мониторинга реакции секвенирования. Использование PhiX поможет отслеживать качество секвенирования между запусками и устранять неполадки. Дополнительную информацию см. в инструкциях к Illumina по работе с PhiX.

Для секвенирования **без добавления 1% PhiX** перейдите к **шагу 8.9**.

Для секвенирования **с добавлением 1% PhiX** подготовьте реагент в соответствии с Приложением 5 — Денатурация и разведение Phix Control до секвенирования на MiSeq, затем перейдите к **шагу 8.6**.

- 8.6 Разведите денатурированный PhiX до загрузочной концентрации (9 пМ): объедините 12,2 мкл предварительно охлажденного буфера HT1 и 10 мкл денатурированной библиотеки PhiX. Переверните пробирку для смешивания.
- 8.7 Смешайте 643,5 мкл 9 пМ денатурированной библиотеки и 6,5 мкл 9 пМ денатурированной библиотеки PhiX. Переверните пробирку для смешивания. В результате получается 650 мкл 9 пМ библиотеки с добавлением 1% Phix Spike-In.
- 8.8 Отложите все на лед до того момента как будете готовы загрузить библиотеки в картридж.
- 8.9 Перенесите 600 мкл 9 пМ денатурированной библиотеки в резервуар для загрузки образцов картриджа с реагентами MiSeq.



Совет – Рекомендуется использовать предоставленную рабочую тетрадь для создания Листа с образцами, необходимых для Miseq.



Примечание – Загрузочная концентрация 9 пМ показала наилучшие результаты, однако из-за различий между приборами MiSeq может потребоваться небольшая корректировка загрузочных концентраций для достижения наилучших результатов реакции секвенирования. Требуется внутренняя проверка.



Примечание – Фактический процент PhiX зависит от качества и количества библиотечного пула.

ШАГ 9 - АНАЛИЗ ДАННЫХ СЕКВЕНИРОВАНИЯ HLA

Длительность: ~6 часов

Приборы Illumina MiSeq обработают библиотеку и сгенерируют данные секвенирования в виде файлов "fastq". Пожалуйста, обратитесь к руководству пользователя приложения HLA Twin для правильной установки программного обеспечения HLA Twin и получения информации об интерпретации результатов генотипирования. По вопросам запуска автоматического протокола и анализу данных, свяжитесь с support@omixon.com.

Автоматизированный протокол

Настройка и конфигурация IT

- Установите сервер приложения HLA Twin на ваш сервер.
- Установите пользовательское приложение HLA Twin на ваш компьютер - к серверу можно подключить несколько пользователей HLA Twin.
- Обратитесь в Службу поддержки Omixon (support@omixon.com) за инструкцией для пользовательской инсталляции автоматизированного протокола.

Протоколы анализа

1. Запустите приложение HLA Twin и войдите в систему.
2. Данные уже обработаны или находятся в процессе обработки. Просмотрите результаты, используя систему Traffic Light System ("Светофор") в приложении HLA Twin.
3. При необходимости, экспортируйте результаты генотипирования и/или полученные последовательности.

Протокол ручного управления

Настройка и конфигурация IT

- Установите сервер приложения HLA Twin на ваш сервер.
- Установите пользовательское приложение HLA Twin на ваш компьютер.

Протоколы анализа

1. Запустите приложение HLA Twin и войдите в систему.
2. Выберите данные секвенирования в формате "fastq" или "fastq.gz" и запустите цикл типирования Holotype HLA.
3. После окончания цикла типирования Holotype HLA просмотрите результаты с использованием системы "Светофор" приложения HLA Twin.
4. При необходимости, экспортируйте результаты генотипирования и/или полученные последовательности.

Протокол на рабочем столе

Настройка и конфигурация IT

- Установите приложение HLA Twin.

Протоколы анализа

- 1 Запустите HLA Twin и войдите в систему.
- 2 Выберите данные секвенирования в формате "fastq" или "fastq.gz" и начните цикл

типирования Holotype HLA.

- 3 После окончания сеанса типирования Holotype HLA, просмотрите результаты с использованием системы "Светофора" приложения HLA Twin.
- 4 По необходимости, экспортируйте результаты генотипирования и/или полученные последовательности.

УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ И ТРАНСПОРТИРОВКИ

Срок годности набора реагентов составляет 17 месяцев с даты изготовления при хранении при рекомендованных условиях и невскрытой упаковке.

Наборы поставляются в пакетах с сухим льдом в пенопластовых коробках для транспортировки и по прибытии должны храниться при температуре от -15 °C до -20 °C. Пожалуйста, проверьте установленную температуру в вашем морозильнике, регулярно проводите мониторинг температуры в камере и плановое техническое обслуживание морозильника.

Нераспечатанные наборы остаются стабильными до истечения срока годности набора (указан на этикетке набора) при хранении от -15 °C до -20 °C.

Открытые наборы остаются устойчивыми до 3 месяцев при хранении с температурным режимом от -15 °C до -20 °C.

Не замораживайте/размораживайте продукт более четырех (4) раз после его открытия. Многократная заморозка/разморозка приводит к потере стабильности реагентов, входящих в состав набора.

УТИЛИЗАЦИЯ

Все части данного медицинского изделия, в том числе реагенты с истекшим сроком годности, не имеющие контакта с биологическими жидкостями пациентов, инфекционными больными, следует классифицировать как эпидемиологически безопасные отходы, по составу приближенные к ТКО (далее - класс А), и утилизировать в соответствии с пунктом 170 СанПин 2.1.3684-21:

Сбор медицинских отходов класса А должен осуществляться в многоразовые емкости или одноразовые пакеты. Цвет пакетов может быть любой, за исключением желтого и красного.

Одноразовые пакеты располагаются на специальных тележках или внутри многоразовых контейнеров.

Емкости для сбора медицинских отходов и тележки должны быть промаркированы "Отходы. Класс А".

Заполненные многоразовые емкости или одноразовые пакеты перегружаются в маркированные контейнеры, предназначенные для сбора медицинских отходов данного класса, установленные на специальной площадке (в помещении).

Многоразовая тара после удаления из нее отходов подлежит мойке и дезинфекции.

Транспортирование отходов класса А организуется с учетом схемы санитарной очистки, принятой для данной территории, в соответствии с требованиями санитарного законодательства к содержанию территорий населенных мест и обращению с отходами производства и потребления.

ГАРАНТИИ

Производитель гарантирует соответствие характеристик медицинского изделия заявленным в эксплуатационной документации при условии применения изделия в

соответствии с инструкцией и по назначению, предусмотренному производителем.

По всем вопросам, для получения консультаций и поддержки следует обращаться к уполномоченному представителю производителя на территории РФ:

ООО «Диаэм»

129345, Российская Федерация, г. Москва ул. Магаданская, д. 7, корпус 3, эт. 2, офис 210,

Тел.: +7 (495) 745-05-08

info@dia-m.ru

При возникновении претензий по качеству наборов, нежелательных событий, которые имеют признаки неблагоприятного события (инцидента), следует направлять информацию Производителю по адресу:

Omixon Biocomputing Ltd.

14-18. Kaposvar u., 1117 Budapest, Hungary

Tel: + 36 21 2620413

support@omixon.com

ТЕХНИЧЕСКАЯ ПОДДЕРЖКА

Для получения поддержки по этому протоколу обращайтесь по адресу support@omixon.com.

Запрос инструкции

- Этот документ можно загрузить с веб-сайта MyOmixon website,
- запросить по электронной почте support@omixon.com
- по телефону +36 21 2620413.

ДОПОЛНИТЕЛЬНЫЕ ИЛЛЮСТРАЦИИ

Образец планшета для ампликонов, планшет для амплификации, планшет для разведения, планшет для количественного анализа ампликонов (для отдельного локуса) и планшет для реакций

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	#1	#9	#17									
B	#2	#10	#18									
C	#3	#11	#19									
D	#4	#12	#20									
E	#5	#13	#21									
F	#6	#14	#22									
G	#7	#15	#23									
H	#8	#16	#24									

Пример планшета для количественного анализа стандартных растворов

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	#1	#1										
B	#2	#2										
C	#3	#3										
D	#4	#4										
E	#5	#5										
F	#6	#6										
G	#7	#7										
H												

Пример планшета для количественного анализа библиотеки КАРА

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	#1	#1	#1	#2	#2	#2	#3	#3	#3	#4	#4	#4
B	1:1000	1:1000	1:1000	1:2000	1:2000	1:2000	1:4000	1:4000	1:4000			
C												
D												
E												
F												
G												
H												

Приложение 1: КОЛИЧЕСТВЕННЫЙ АНАЛИЗ И НОРМАЛИЗАЦИЯ АМПЛИКОНОВ (ДЛЯ ПЛАНШЕТОВ ЕМКОСТЬЮ 100 МКЛ)

Длительность: ~1 час 20 минут



См. рабочую тетрадь: Вкладка количественного анализа ампликонов
(Refer to Workbook: Amplicon quantitation tab)

Список реагентов

Позиция	Хранение	Поставлено
20x TE буфер (pH 7.5)	4 °C	Promega
Стандарт Lambda DNA (100 нг/мкл)	4 °C	Promega
Краситель 200x QuantiFluor dsDNA	4 °C	Promega
Вода для молекулярной биологии (без ДНКазы и РНКазы)	от 20 °C до 25 °C	Пользователь
Планшет(ы) для амплификации класса I	4 °C	Шаг 2
Планшет(ы) для амплификации класса II	4 °C	Шаг 2

Протокол

1. Подготовьте стандарты ДНК путем серийного разведения стандарта Lambda DNA (100 нг/мкл), входящего в набор QuantiFluor, в соответствии с приведенной ниже таблицей:

Этикетка на пробирке	Входящая ДНК	Объем ДНК (мкл)	Объем 1x TE (мкл)	Конечная концентрация (нг/мкл)
Стандарт 1	Lambda DNA	7,5 мкл	492,5 мкл	1,5 нг/мкл
Стандарт 2	Стандарт 1	250 мкл	250 мкл	0,75 нг/мкл
Стандарт 3	Стандарт 2	250 мкл	250 мкл	0,38 нг/мкл
Стандарт 4	Стандарт 3	250 мкл	250 мкл	0,19 нг/мкл
Стандарт 5	Стандарт 4	250 мкл	250 мкл	0,09 нг/мкл
Стандарт 6	Стандарт 5	250 мкл	250 мкл	0,05 нг/мкл
Холостая проба	Холостая проба	0 мкл	250 мкл	0 нг/мкл

2. Подготовьте планшеты для количественного анализа ампликонов (см. дополнительные иллюстрации). Добавьте по 49,5 мкл 1x буфера TE в лунки нового 96-луночного планшета.
3. Добавьте 0,5 мкл ампликонов из соответствующих лунок планшетов для ампликонов

в отдельные лунки на планшетах для количественного анализа ампликонов. Аккуратно перемешайте пипетированием.

4. Подготовьте раствор 1х рабочего красителя QuantiFluor Dye по следующей формуле: 0,25 мкл QuantiFluor Dye (200X) + 49,75 мкл 1х буфера TE. Подготовленного раствора 1х QuantiFluor должно хватать на каждый образец в планшетах с ампликонами и стандарты (всего 14) из расчета 50 мкл на образец.
5. Подготовьте планшеты для количественного анализа стандартных растворов и ампликонов. Добавьте 50 мкл 1х рабочего раствора QuantiFluor Dye в лунки 96-луночных оптически прозрачных планшетов, используя формат планшетов для количественного анализа стандартных растворов и количественного анализа ампликонов (см. вспомогательные иллюстрации).
6. Используя стандарты, подготовленные выше, добавьте 50 мкл стандарта в двух повторностях в отдельные лунки планшета для количественного анализа стандартных растворов (всего 14 лунок). Перемешайте пипетированием.
7. Перемешайте в течение 5 секунд на вортексе и центрифугируйте в течение 5 секунд.
8. Инкубируйте пробы при комнатной температуре в течение 5 минут в защищенном от света месте.
9. Поместите каждый из планшетов для количественного анализа в флуориметр или qPCR амплификатор, по одному за раз, и запустите следующую программу (вам может потребоваться отрегулировать настройки в зависимости от модели qPCR амплификатора):

Количество циклов	Температура	Время
1	25 °C	10 секунд
2	25 °C	15 секунд
	25 °C	30 секунд (операции сбора данных)

10. Рассчитайте концентрацию ДНК в планшетах для количественного анализа ампликонов, используя инструкцию к флуориметру или qPCR амплификатору. Обратитесь ко вкладке «Разведение» в прилагаемой рабочей тетради для помощи в расчетах.
11. Разведите ДНК в планшетах с ампликонами водой (без ДНКаз и РНКаз), чтобы конечная концентрация ДНК находилась в пределах 50-120 нг/мкл.
 - Если концентрация ДНК составляет 180 нг/мкл или выше: добавьте 20 мкл H₂O
 - Если концентрация ДНК составляет 115-180 нг/мкл или выше: добавьте 10 мкл H₂O
 - Если концентрация ДНК составляет 115 нг/мкл и ниже: не добавляйте H₂O.



Безопасная точка остановки. Ампликоны можно хранить при 4 °C одну ночь или при -20 °C на протяжении 3 месяцев.

Приложение 2: ВЫБОР РАЗМЕРА БИБЛИОТЕКИ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ПРИБОРА PIPPIN PREP

Длительность: ~1 час 20 минут



См. рабочую тетрадь: Вкладка подготовки библиотеки
(Refer to Workbook: Library preparation tab)

В настоящем шаге используется библиотека из шага 5, очистка осуществляется с помощью магнитных частиц AMPure XP, а выбор размеров проводится при помощи устройства Pippin Prep. Устройство Pippin Prep способно автоматически выбирать диапазон размеров фрагментов ДНК и отбирать их в отдельные емкости. Примечание: Вместо Pippin Prep может быть использовано устройство Blue Pippin.



Совет – Инструкции по настройке Pippin Prep см. на стр. 60

Список реагентов

Позиция	Хранение	Поставлено
Пулированная библиотека	4° C	Шаг 5
Реагент для очистки продуктов ПЦР AMPure XP	4° C	производства Beckman Coulter
80% этанол (свежеприготовленный)	от 20°С до 25°С	Пользователь
Вода для молекулярной биологии (без ДНКазы и РНКазы)	от 20°С до 25°С	Пользователь
Кассета 1,5 % бесцветного агарозного геля	от 20°С до 25°С	Sage Science
Вводимый раствор/смесь маркеров для Pippin (маркер K)	4° C	Sage Science



Примечание: Для Pippin Prep используется маркер K. Для Blue Pippin используется маркер R2.

Протокол

Очистка библиотеки

1. Дайте магнитным частицам AMPure XP нагреться до комнатной температуры. Убедитесь, что они однородны (отсутствие кусочков и частиц) путем перемешивания в вортексе в течение 30 секунд.
2. Подготовьте 5 мл свежеприготовленного 80% этанола (4 мл EtOH + 1 мл H₂O).
3. Добавьте 900 мкл частиц AMPure XP в пробирку, содержащую 900 мкл библиотеки. Тщательно перемешайте в вортексе в течение 10 секунд и центрифугируйте в течение 5 секунд (quick spin). Не допускайте отделения частиц. Инкубируйте библиотеку при

комнатной температуре в течение 10 минут.



Примечание: Если в конечном пуле находится менее 900 мкл библиотеки, добавьте к ней эквивалентное количество частиц AMPure XP. Следует соблюдать соотношение 1:1 конечного пула и частиц AMPure XP.

4. Поместите пробирку с библиотекой на магнитный штатив и инкубируйте в течение 10 минут.
5. Не вынимая пробирку из магнитного штатива, аккуратно отберите и выбросьте надосадочную жидкость, не потревожив частицы.
6. Не вынимая пробирку из магнитного штатива, добавьте ~1,5-2 мл свежеприготовленного 80% этанола к библиотеке с частицами. Объема добавленного этанола должно быть достаточно для покрытия частиц.



Примечание: Вносите этанол по стороне пробирки без частиц.

7. Инкубируйте пробирку с библиотекой при комнатной температуре в течение 30 секунд; затем аккуратно отберите и выбросьте надосадочную жидкость.
8. Повторите шаги 6 и 7.
9. Быстро осадите (в течение 3 секунд) пробирку с библиотекой и поместите ее обратно на магнитный штатив с открытой крышкой. Удалите оставшийся этанол при помощи пипетки. Не тревожьте частицы.



Примечание: Убедитесь, что частицы не содержат остаточного этанола. Для этого может потребоваться вращение пробирки на магнитном штативе для удаления этанола без касания частиц.

10. Позвольте частицам подсохнуть на воздухе в течение 5-8 минут на магнитном штативе до полного высыхания.
11. Уберите пробирку с библиотекой с магнитного штатива. Добавьте 31 мкл воды (без ДНКаз и РНКаз). Не допускайте касания частиц кончиком наконечника, так как они прилипнут к нему.
12. Перемешайте библиотеку на вортексе в течение 20 секунд для полного ресуспендирования частиц. Центрифугируйте в течение 5 секунд (quick spin), если на боковых стенках останутся капли. Убедитесь, что частицы остаются во взвешенном состоянии.
13. Инкубируйте библиотеку при комнатной температуре в течение 2 минут.
14. Поместите пробирку с библиотекой на магнитный штатив на 2 минуты.
15. Соберите библиотеку: оставив пробирку с конечной библиотекой на магнитном штативе, отберите 31 мкл надосадочной жидкости в новую 1,5 мл центрифужную пробирку с низкой адгезией.



Безопасная точка остановки. Библиотеки можно хранить при -20 °C до 3 месяцев.

Выбор размера библиотеки

16. Приведите исходный раствор с маркером К к комнатной температуре.
17. Скомбинируйте 31 мкл пула с 10 мкл маркера К.
18. Перемешайте на вихревом течение 5 секунд и центрифугируйте в течение 5 секунд (quick spin).
19. Настройте Pippin Prep для сбора фрагментов ДНК размером 650-1300 п. н. Установите референсную полосу на тот уровень, который используете.
20. Загрузите 40 мкл образца в порт для образца и запустите прибор. Время обработки 45-50 минут.
21. Соберите все содержимое (приблизительно 40 мкл) из отверстия для элюции Pippin Prep и перенесите его в новую 1,5 мл центрифужную пробирку с низкой адгезией. Это библиотека выбранного размера.



Безопасная точка остановки. Библиотеки можно хранить при -20 °C до 3 месяцев.

Программирование устройства Pippin Prep

1. Перейдите на вкладку "Protocol Editor" ("Редактировать протокол") и нажмите кнопку "New" ("Создать новый").
2. Нажмите на значок папки рядом с полем "Кассета" и выберите "1.5%DF Marker K" для Pippin Prep или "1.5%DF Marker R2" для Blue Pippin.
3. Для программирования референсной полосы:
 - a. Выделите поле "Range" ("Диапазон").
 - b. Установите значение поля "Ref Lane", чтобы оно соответствовало номеру полосы, над которой вы работаете.
 - c. Установите значение поля "Start*" ("Начало") на 650.
 - d. Установите значение поля "End*" ("Конец") на 1300.
4. В поле Reference Lane ("Референсная полоса"), выберите полосу, над которой вы работаете.
5. Нажмите кнопку "Save As" ("Сохранить как") и введите название программы.

Работа устройства Pippin Prep

1. Включите Pippin Prep кнопкой питания на задней панели устройства.
2. Осмотрите устройство Pippin Prep. Убедитесь, что все 5 светодиодов горят и что внутренняя часть устройства чистая и сухая.
3. Нажмите на логотип Sage Science в нижней правой части экрана. Это позволит вам ввести пароль. Заводской пароль по умолчанию: "pips".
4. Перейдите на вкладку "Factory Setup" ("Заводские настройки") и убедитесь, что значение "Base-to-Threshold" ("от базового до порогового значения") установлено на 0,02.

5. Поместите калибровочное приспособление внутрь устройства Pippin Prep, убедившись, что темная полоса направлена вниз и находится над светодиодами.
6. На Главной вкладке, нажмите кнопку "Калибровка".
7. В окне калибровки убедитесь, что значение поля "Target I pH mA" установлено на 0,80 (0,60 для Blue Pippin) и нажмите кнопку "Калибровать".
8. Перейдите на вкладку Протоколы. Нажмите кнопку "Load" ("Загрузить") и выберите программу для Hologate HLA и полосу, которую вы планируете использовать. Убедитесь, что:
 - a. Включена правильная полоса
 - b. Включен индикатор выбора широкого спектра
 - c. Референсная полоса соответствует той, с которой вы будете работать.
9. Перейдите на Главную вкладку. Убедитесь, что:
 - a. Загруженная вами программа та же, что была выбрана ранее.
 - b. Выбрана нужная референсная полоса, совпадающая с полосой обработки образца.
10. Осмотрите кассету. Перед отрыванием клейкой ленты, запечатающей лунки, посмотрите, нет ли пузырьков за портом для элюции. Если пузырьки есть, слегка похлопайте и перекатите кассету в руке, чтобы избавиться от них.
11. Поместите кассету, не отрывая закрывающую лунки клейкую ленту, внутрь Pippin Prep.
12. Аккуратно уберите клейкую ленту, убедившись, что лента удалена с чистой стороны кассеты (линия 5) на использованную сторону (линия 1). Будьте осторожны, удаляя клейкую ленту, чтобы не расплескать жидкость во избежание контаминации.
13. Удалите весь объем буферного раствора из порта для элюции на линии, которую вы будете использовать и добавьте 40 мкл чистого электрофорезного буфера в порт для элюции.
14. Наклейте узкую полоску клейкой ленты на порт для элюции.
15. Любые емкости, наполненные менее чем на 3/4, должны быть заполнены электрофорезным буфером. Не переполняйте лунки! Край буфера должен "чуть-чуть" доставать до пластика, но не выше, чтобы избежать протаскивания во время закрытия крышки. Добавьте буфер из чистых лунок (Линия 5) в использованные лунки (Линия 1).
16. Убедитесь, что все исходные лунки (лунки с агарозным гелем) заполнены электрофорезным буфером. Буферный раствор должен быть немного выше уровня агарозного геля и выглядеть полностью плоским.
17. Медленно закройте Pippin Prep, следя за тем, чтобы буферный раствор не касался крышки во время закрытия устройства.
18. Проведите испытание на целостность. Обычно при высыхании датчиков испытание

на целостность проводится не с первого раза. В этом случае проведите повторное испытание. После завершения испытания, медленно откройте Pippin. Убедитесь, что жидкость не распределяется по поверхности кассеты при открытии/закрытии крышки Pippin Prep.

19. Немного перемешайте исходный раствор с маркером K в вортексе и краткосрочно центрифугируйте его. Добавьте 10 мкл загрузочного раствора Marker K к вашим ~30 мкл библиотеки.
20. Кратковременно перемешайте вашу библиотеку в вортексе и центрифугируйте ее.
21. Удалите 40 мкл буферного раствора из лунки для образца, которую вы будете использовать.
22. Добавьте ~40 мкл вашей библиотеки с раствором Marker K в эту лунку.
23. Отметьте используемую вами полосу инициалами лаборанта и датой.
24. Закройте Pippin Prep и нажмите кнопку "Start" ("Начать"). Убедитесь, что была включена правильная полоса. Процесс будет занимать приблизительно 45 минут.
25. После завершения прогона аккуратно откройте Pippin Prep. Следите, чтобы крышка не распространяла жидкость по поверхности кассеты.
26. Осторожно удалите клейкую ленту с порта для элюции, не расплескав жидкость.
27. Перенесите весь объем из порта для элюции в новую 1,5 мл пробирку с низкой адгезией.
28. Закройте все открытые лунки двумя кусочками клейкой ленты для планшетов. Не забудьте оставить клейкую полоску на чистой стороне. Это позволит легко удалить клейкую ленту с чистой на использованную сторону.
29. Поместите запечатанную кассету в пакет и уберите до дальнейшего использования.
30. Возьмите промывочную кассету и наполните ее водой MiliQ. Осторожно закройте крышку Pippin Prep, следя, чтобы жидкость не распространялась по поверхности кассеты.
32. Оставьте Pippin Prep закрытым на несколько секунд.
33. Откройте Pippin Prep, следя, чтобы жидкость не распространялась по поверхности кассеты.
34. Удалите очищающую кассету, слейте из нее воду и дайте высохнуть.
35. Очистите устройство Pippin Prep от воды и осторожно закройте его.
36. В меню Pippin Prep выберите кнопку "Shut Down" ("Выключение").

Приложение 3: КОЛИЧЕСТВЕННЫЙ АНАЛИЗ БИБЛИОТЕКИ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ИНТЕРКАЛИРУЮЩЕГО ФЛУОРЕСЦЕНТНОГО КРАСИТЕЛЯ ДЛЯ ДВУХЦЕПОЧЕЧНОЙ ДНК

Длительность: ~15 минут



См. рабочую тетрадь: Таблица количественного анализа библиотеки
(Refer to Workbook: Library quantitation tab)

Концентрацию библиотеки выбранного размера можно точно измерить с помощью флуоресцентного красителя dsDNA, например, SYBR green или его эквивалент. Доступные на рынке наборы и приборы для этой цели включают флуориметр Qubit производства Thermo Fisher (использует широкодиапазонный набор Qubit для оценки dsDNA), ридер Quantus производства Promega (использует флуоресцентный краситель Quantifluor для dsDNA) и другие. Здесь описан метод оценки концентрации библиотеки на примере флуориметра Qubit как наиболее часто используемый. В случае использования других приборов и наборов, следуйте стандартным инструкциям производителя.

Список реагентов

Позиция	Хранение	Поставлено
Набор Qubit dsDNA BR Assay	комнатная температура	Thermo Fisher
Стандарты Qubit dsDNA BR	4 °C	Thermo Fisher
Библиотека	4 °C	Шаг 6

Протокол

1. Доведите стандарты Qubit до комнатной температуры. Подготовьте пробирки Qubit (500 мкл, тонкостенные) для вашей библиотеки в двух повторностях и для двух стандартов. Перемешать стандарты и библиотеку на вортексе и отцентрифугируйте.
2. Добавьте 995 мкл буфера и 5 мкл красителя в 1,5 мл центрифужную пробирку. Перемешайте на вортексе в течение 2 секунд и центрифугируйте в течение 5 секунд (quick spin).
3. Перенесите 190 мкл смеси реагентов в две пробирки Qubit для двух стандартов. Перенесите 198 мкл смеси реагентов в две пробирки Qubit для двух экземпляров библиотеки.
4. Добавьте 10 мкл стандарта 1 в соответствующую пробирку Qubit и перемешайте в вортексе в течение 2 секунд. Повторите аналогичный шаг со стандартом 2.
5. Добавьте 2 мкл библиотеки в соответствующие пробирки Qubit и перемешайте в

вortexe в течение 2 секунд.

6. Инкубируйте пробирки Qubit при комнатной температуре в течение 2 минут.
7. Включите флуориметр Qubit и выберите протокол BR.
8. Поместите пробирку Qubit со стандартом 1 в прибор и нажмите GO ("Запуск"). Повторите аналогичный шаг со стандартом 2.
9. Поместите пробирку Qubit с библиотекой в прибор и нажмите GO ("Запуск"). Повторите аналогичный шаг для повторности.
10. Для перерасчета результатов, полученных на флуориметре Qubit, из нг/мкл в нМ, введите среднее значение концентрации от двух повторностей библиотеки в таблицу на вкладке количественный анализ библиотеки в рабочей тетради Omixon.
11. Используя результаты измерений на флуориметре Qubit, разведите 10 мкл библиотеки выбранного размера до концентрации 2 нМ стерильной водой в новой 1,5 мл центрифужной пробирке с низкой адгезией. Храните остаток библиотеки при -20 °C.



Безопасная точка остановки. Библиотеки можно хранить при -20 °C в течение длительного времени. В случае долгого хранения настоятельно рекомендуется провести повторный количественный анализ библиотеки перед ее запуском на платформах MiSeq.

Приложение 4: ДЕНАТУРАЦИЯ И РАЗВЕДЕНИЕ PHiX CONTROL ДЛЯ MISEQ

Длительность: ~10 минут.

Используйте протокол ниже для денатурации и разведения PhiX библиотеки для дальнейшего использования ее в качестве контроля секвенирования.

Протокол

1. Разбавьте PhiX до 4 нМ, для чего смешайте следующие объемы в микроцентрифужной пробирке:
 - 10 нМ библиотека PhiX (2 мкл)
 - 10 мМ буфера Tris-HCl, pH 8,5 с 0,1% Tween 20 (3 мкл)
2. Приготовьте свежий раствор 0,2 н гидроксида натрия NaOH.
3. Денатурация PhiX Control: смешайте следующие объемы в микроцентрифужной пробирке.
 - 4 нМ библиотека PhiX (5 мкл)
 - раствор гидроксида натрия 0,2 н NaOH (5 мкл)
4. Перемешайте на вортексе (2-3 секунды).
5. Центрифугируйте при 280×g в течение 1 минуты.
6. Инкубируйте при комнатной температуре в течение 5 минут.
7. Разбавьте денатурированный PhiX до 20 пМ в объеме 1 мл: добавьте 990 мкл предварительно охлажденного буфера HT1 к 10 мкл денатурированной библиотеки PhiX.
8. Переверните, чтобы перемешать.



Примечание: Вы можете хранить денатурированную 20 пМ библиотеку PhiX до 3 недель при температуре от -15°C до -25°C. Разделите 20 пМ библиотеку PhiX на аликвоты по 50 мкл в отдельные пробирки для предотвращения влияния циклов замораживания-оттаивания. Через 3 недели число кластеров имеет тенденцию к уменьшению

Приложение 5: РАСШИФРОВКА СИМВОЛОВ МАРКИРОВКИ



Код партии. Указывает код партии, которым изготовитель идентифицировал партию изделия



Номер по каталогу. Указывает номер медицинского изделия по каталогу производителя



Обратитесь к инструкции по применению. Указывает на необходимость для пользователя ознакомиться с инструкцией по применению



Содержимого достаточно для использования *n*-количества тестов. Указывает общее количество тестов *in vitro* которые могут быть выполнены с использованием реагентов, содержащихся в наборе медицинского изделия для диагностики *in vitro*



Изготовитель. Указывает изготовителя медицинского изделия как это определено в директивах Европейского сообщества 90/385/ЕЕС, 93/42/ЕЕС и 98/79/ЕС



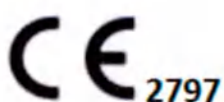
Температурный диапазон. Указывает температурный диапазон, в пределах которого медицинское изделие надежно сохраняется



Использовать до ... Указывает дату, после истечения которой изделие не должно использоваться



Медицинское изделие для диагностики *in vitro*. Указывает, что медицинское изделие является изделием для диагностики *in vitro*



European Conformity (en) или Conformité Européenne (fr). Указывает на соответствие Европейской директиве 98/79/ЕС по медицинским изделиям для диагностики *in vitro*. 2797 — идентификационный номер нотифицированного органа, проводившего оценку соответствия СЕ.

Приложение 6: СПИСОК ПРИМЕНИМЫХ МЕЖДУНАРОДНЫХ СТАНДАРТОВ И НОРМАТИВНЫХ ДОКУМЕНТОВ

Документы	Описание
Директива 98/79/ЕС	Директива для медицинских изделий для in vitro диагностики
EN ISO 9000:2015	Системы менеджмента качества — Основные положения и словарь
EN ISO 13485:2016+A11	Медицинские изделия – Система менеджмента качества – Требования для целей регулирования
EN ISO 20417:2021	Медицинское оборудование - Информация, предоставляемая производителем
ISO 20916:2019	Диагностика in vitro медицинских изделий. Исследование клинических характеристик с использованием образцов, полученных от человека. Надлежащая клиническая практика
EN ISO 10012:2003	Системы менеджмента измерений. Требования к измерительным процессам и измерительному оборудованию
EN ISO 18113-1:2011	Медицинские изделия для диагностики in vitro – Информация, указываемая изготовителем (маркировка) – Часть 1: условия, определения и общие требования (ISO 18113-1:2009)
EN ISO 18113-2:2011	Медицинские изделия для диагностики in vitro – Информация, указываемая изготовителем (маркировка) Часть 2: реагенты для профессионального использования в диагностике in vitro (ISO 18113-2:2009)
EN ISO 15223-1:2021	Медицинские изделия – Символы, используемые на ярлыках медицинских изделий, при маркировке и в предоставляемой информации – Часть 1: Общие требования
EN 13612: 2002	Оценка рабочих характеристик медицинских изделий для диагностики in vitro
EN ISO 23640:2015	Медицинские изделия для диагностики in vitro – Оценка стабильности реагентов для диагностики in vitro (ISO 23640:2011)
EN 13641:2002	Устранение или снижение риска инфицирования, связанного с реагентами для диагностики in vitro.
EN 62366-1: 2015+A1:2020	Изделия медицинские – Часть 1: Применение проектирования, ориентированного на удобство, эффективность и безопасность использования, к медицинским изделиям
PD IEC/TR 62366-	Изделия медицинские. Часть 2. Руководство по применению

Документы	Описание
2:2016	проектирования с учетом эксплуатационной пригодности к медицинским изделиям
EN ISO 14971:2019+A11:2021	Изделия медицинские – Применение менеджмента риска к медицинским изделиям
EN 62304:2006+A1:2013	Изделия медицинские – Программное обеспечение. Процессы жизненного цикла

Изделие соответствует следующим национальным стандартам РФ на продукцию:

ГОСТ Р 51088-2013 «Медицинские изделия для диагностики in vitro. Реагенты, наборы реагентов, тест-системы, контрольные материалы, питательные среды. Требования к изделиям и поддерживающей документации»;

ГОСТ Р ИСО 23640-2015 «Изделия медицинские для диагностики in vitro. Оценка стабильности реагентов для диагностики in vitro»;

ГОСТ Р ИСО 18113-1-2015 «Медицинские изделия для диагностики in vitro. Информация, предоставляемая изготовителем (маркировка). Часть 1. Термины, определения и общие требования»;

ГОСТ Р ИСО 18113-2-2015 «Медицинские изделия для диагностики in vitro. Информация, предоставляемая изготовителем (маркировка). Часть 2. Реагенты для диагностики in vitro для профессионального применения»;

ГОСТ Р ИСО 15223-1-2020 «Изделия медицинские. Символы, применяемые при маркировании на медицинских изделиях, этикетках и в сопроводительной документации. Часть 1. Основные требования»;

ГОСТ IEC 62304-2022 «Изделия медицинские. Программное обеспечение. Процессы жизненного цикла»

Omixon Biocomputing Kft.
1117 Bp., Kaposvár utca 14-18.
Adószám: 23550070-2-43

[Перевод с английского и венгерского языков на русский язык]

[На бланке «Омиксон» (Omixon)]

ИНСТРУКЦИЯ ПО ПРИМЕНЕНИЮ

для изделия

Набор реагентов HoloType HLA 96/7 для создания библиотек ДНК-генов HLA для последующего генотипирования методом высокопроизводительного секвенирования по 7 локусам: A, B, C, DRB1, DQB1, DPB1, DQA1, конфигурация A/B/C в составе

Аттила Берцес (Attila Bérces)
Управляющий директор
/подпись/

Золтан Симон (Zoltan Simon)
Управляющий директор
/подпись/

[Штамп: «Омиксон Биокomпьютинг Кфт.»
(Omixon Biocomputing Kft.)
1117 Будапешт, улица Капошвар, 14-18
(1117 Bp., Kaposvar utca 14-18)
Налоговый номер: 23550070-2-43]

14.06.2024 г.

[Герб Венгрии]

Д-р КАДАР ЖУЖАННА (KÁDÁR ZSUZSANNA)
Нотариальная контора
1114 Будапешт, ул. Уласло, 21 (1117 Budapest, Ulászló u. 21)
Тел.: 381-0405, 381-0407
KRID: 342479118 (MOKKIT)
drkadar@drkadar.hu

Дело № 11035/Z/1626/2024-----

Лицензия на английском языке № 3/2012-----

Настоящим я, нижеподписавшийся заместитель нотариуса города Будапешта, удостоверяю, что, насколько мне известно, этот документ является верной копией оригинального документа, представленного мне.

г. Будапешт, 19 (девятнадцатого) июня 2024 (две тысячи двадцать четвертого) года.

/подпись/

Д-р ФЁЛДИ Агнеш Фанни (FÖLDI Ágnes Fanni)
Заместитель нотариуса

[Печать: д-р Кадар Жужанна, НОТАРИУС * 6 [Герб Венгрии] БУДАПЕШТ XI.4]

[Текст документа на русском языке]

[Штамп на обороте: «Омиксон Биокомпьютинг Кфт.»
1117 Будапешт, улица Капошвар, 14-18
Налоговый номер: 23550070-2-43]

Перевод данного текста выполнен переводчиком Мочаловой Екатериной Вячеславовной



Российская Федерация
Город Москва
Двенадцатого июля две тысячи двадцать четвертого года

Я, Веремий Юлия Игоревна, нотариус города Москвы, свидетельствую подлинность подписи переводчика Мочаловой Екатерины Вячеславовны.

Подпись сделана в моем присутствии.

Личность подписавшего документ установлена.

Зарегистрировано в реестре: № ~~77/2194-н/77-2024-8-3134~~

Уплачено за совершение нотариального действия: 400 руб. 00 коп.



Всего пронумеровано,
пронумеровано
и заверено печатью 73 лист(а)(ов)

Нотариус