

«УТВЕРЖДАЮ»

Генеральный директор
ООО «ЛАБТРОНИКА»



И.В. Варламов

» _____ 2011г.

Инструкция по применению

Реагенты для проведения генотипирования локусов HLA методом
секвенирования

Производства: Celera Corporation, 1401 Harbor Bay Parkway, Alameda, California,
94502, United States.

«СОГЛАСОВАНО»



Главный врач ЦКБ РАН

профессор

Гончаров Н. Г.

_____ 2011г.

2011

Реагенты для проведения генотипирования локусов HLA методом секвенирования.

Производства: Celera Corporation, 1401 Harbor Bay Parkway, Alameda, California, 94502, United States / Селера Корпорейшн.

Данные реагенты позволяют использовать **стратегию гетерозиготного секвенирования**: типирование аллелей HLA-антигенов с высоким разрешением, включая ПЦР-амплификацию и секвенирование с флуоресцентной ДНК.

Особенности:

- 1 locus-специфическая ПЦР;
- типлируемые локусы: HLA-A, -B, -C, -DRB1, -DQB1, -DPB1;
- набор праймеров для «грубого» секвенирования входит в набор;
- программное обеспечение осуществляет анализ и подсказывает дальнейшие шаги для уточняющего секвенирования;
- для разрешения неопределённостей используются HARPs (Hemizygous Ambiguity Resolution Primer).

Преимущества технологии:

- Консолидированная технология для 4-х значного разрешения по всем локусам
- Оптимизированный протокол
- Полная система: все необходимые реагенты включены в набор
- Валидированная система: CE marked для клинического использования
- Уверенность в качестве интерпретации результатов
- Использование HARPs
- Уверенность в аккуратном и точном типировании

Области применения HLA-диагностики:

1. Трансплантация солидных органов (низкоразрешающее генотипирование).
2. Трансплантация костного мозга (высокоразрешающее генотипирование).
3. Диагностика HLA-ассоциированных заболеваний.
4. ЭКО диагностика совместимости родителей.
5. Фармакогенетика, выбор оптимальной химиотерапии.
6. Мониторинг предсуществующих HLA-антител.

1. Реагенты для проведения HLA - генотипирования локусов DRB1/3/4/5 методом секвенирования (AlleleSEQR HLA- DRB1/3/4/5 PCR/Sequencing Kit) в составе: ПЦР-смесь для локусов DRB1/3/4/5, 8 DRB1 праймеров для ген-специфической амплификации, DRB3, DRB4, DRB5 смесь праймеров, DRB секвенирующие смеси (прямые и обратные

праймеры для экзона 2 и кодона 86 локусов DRB1/3/4/5), Na-ацетат/ЭДТА буфер (25 тестов)

2. Реагенты для проведения HLA - генотипирования локуса A методом секвенирования (AlleleSEQR HLA-A PCR/Sequencing Kit) в составе: ПЦР-смесь для амплификации локуса A, раствор полимеразы, контрольный препарат ДНК, фосфатаза и экзонуклеаза I для очистки ПЦР продукта, секвенирующие смеси (прямые и обратные праймеры для экзонов 2, 3 и 4 локуса A), Na-ацетат/ЭДТА буфер (25, 100 тестов)

3. Реагенты для проведения HLA - генотипирования локуса B методом секвенирования (AlleleSEQR HLA-B PCR/Sequencing Kit) в составе: ПЦР-смесь для амплификации локуса B, раствор полимеразы, контрольный препарат ДНК, фосфатаза и экзонуклеаза I для очистки ПЦР продукта, секвенирующие смеси (прямые и обратные праймеры для экзонов 2, 3 и 4 локуса B), Na-ацетат/ЭДТА буфер (25, 100 тестов)

4. Реагенты для проведения HLA - генотипирования локуса C Plus методом секвенирования (AlleleSEQR HLA- C Plus PCR/Sequencing Kit) в составе: ПЦР-смесь для амплификации локуса C, раствор полимеразы, контрольный препарат ДНК, фосфатаза и экзонуклеаза I для очистки ПЦР продукта, секвенирующие смеси (прямые и обратные праймеры для экзонов 2, 3 и 4 локуса C), Na-ацетат/ЭДТА буфер (25, 100 тестов)

5. Реагенты для проведения HLA - генотипирования методом секвенирования локуса C Plus экзона 1 с обратным праймером (AlleleSEQR HLA-C Plus Exon 1 Reverse Sequencing Mix) в составе: секвенирующая смесь, содержащая обратный праймер для секвенирования экзона 1 локуса C (25 тестов)

6. Реагенты для проведения HLA - генотипирования методом секвенирования локуса C Plus экзона 5 с прямым праймером (AlleleSEQR HLA-C Plus Exon 5 Forward Sequencing Mix) в составе: секвенирующая смесь, содержащая прямой праймер для секвенирования экзона 5 локуса C (25 тестов)

7. Реагенты для проведения HLA - генотипирования методом секвенирования локуса C Plus экзона 6 с прямым праймером (AlleleSEQR HLA-C Plus Exon 6 Forward Sequencing Mix) в составе: секвенирующая смесь, содержащая прямой праймер для секвенирования экзона 6 локуса C (25 тестов)

8. Реагенты для проведения HLA - генотипирования методом секвенирования локуса C Plus экзона 7 с прямым праймером (AlleleSEQR HLA-C Plus Exon 7 Forward Sequencing Mix) в составе: секвенирующая смесь, содержащая прямой праймер для секвенирования экзона 7 локуса C (25 тестов)

9. Реагенты для проведения HLA - генотипирования методом секвенирования локуса C Plus экзона 7 с обратным праймером (AlleleSEQR HLA-C Plus Exon 7 Reverse Sequencing

Mix) в составе: секвенирующая смесь, содержащая обратный праймер для секвенирования экзона 7 локуса C (25 тестов)

10. Реагенты для проведения HLA - генотипирования локуса DRB1 методом секвенирования (AlleleSEQR HLA- DRB1 PCR/Sequencing Kit) в составе: ПЦР-смесь для амплификации локуса DRB1, раствор полимеразы, контрольный препарат ДНК, фосфатаза и экзонуклеаза I для очистки ПЦР продукта, секвенирующие смеси (прямой и обратный праймер для экзона 2 и кодона 86 локуса DRB1), Na-ацетат/ЭДТА буфер (25, 100 тестов)

11. Реагенты для проведения HLA - генотипирования локуса DQB1 методом секвенирования (AlleleSEQR HLA- DQB1 PCR/Sequencing Kit) в составе: ПЦР-смесь для амплификации 2 экзона локуса DQB1, ПЦР-смесь для амплификации 3 экзона локуса DQB1, раствор полимеразы, контрольный препарат ДНК, фосфатаза и экзонуклеаза I для очистки ПЦР продукта, секвенирующие смеси (прямые и обратные праймеры для экзонов 2 и 3 локуса DQB1), Na-ацетат/ЭДТА буфер (25, 100 тестов)

12. Реагенты для проведения HLA - генотипирования локуса DPB1 методом секвенирования (AlleleSEQR HLA- DPB1 PCR/Sequencing Kit) в составе: ПЦР-смесь для амплификации локуса DPB1, раствор полимеразы, контрольный препарат ДНК, фосфатаза и экзонуклеаза I для очистки ПЦР продукта, секвенирующие смеси (прямой и обратный праймер для экзона 2 и кодона 85 локуса DPB1), Na-ацетат/ЭДТА буфер (25, 100 тестов)

13. Реагент для уточнения гетерозиготных неоднозначностей локуса HLA-A экзона 2 позиция прямого праймера 98A (AlleleSEQR HARP A2F98A, A Exon 2 Forward 98A Sequencing Mix) (25 тестов)

14. Реагент для уточнения гетерозиготных неоднозначностей локуса HLA-A экзона 2 позиция прямого праймера 98T (AlleleSEQR HARP A2F98T, A Exon 2 Forward 98T Sequencing Mix) (25 тестов)

15. Реагент для уточнения гетерозиготных неоднозначностей локуса HLA-A экзона 2 позиция прямого праймера 144A (AlleleSEQR HARP A2F144A, A Exon 2 Forward 144A Sequencing Mix) (25 тестов)

16. Реагент для уточнения гетерозиготных неоднозначностей локуса HLA-A экзона 2 позиция прямого праймера 203G (AlleleSEQR HARP A2F203G, A Exon 2 Forward 203G Sequencing Mix) (25 тестов)

17. Реагент для уточнения гетерозиготных неоднозначностей локуса HLA-A экзона 2 позиция прямого праймера 261C (AlleleSEQR HARP A2F261C, A Exon 2 Forward 261C Sequencing Mix) (25 тестов)

18. Реагент для уточнения гетерозиготных неоднозначностей локуса HLA-A экзона 2 позиция обратного праймера 311T (AlleleSEQR HARP A2R311T, A Exon 2 Reverse 311T Sequencing Mix) (25 тестов)
19. Реагент для уточнения гетерозиготных неоднозначностей локуса HLA-A экзона 3 позиция прямого праймера 363A (AlleleSEQR HARP A3F363A, A Exon 3 Forward 363A Sequencing Mix) (25 тестов)
20. Реагент для уточнения гетерозиготных неоднозначностей локуса HLA-A экзона 3 позиция прямого праймера 363G (AlleleSEQR HARP A3F363G, A Exon 3 Forward 363G Sequencing Mix) (25 тестов)
21. Реагент для уточнения гетерозиготных неоднозначностей локуса HLA-A экзона 3 позиция прямого праймера 414C (AlleleSEQR HARP A3F414C, A Exon 3 Forward 414C Sequencing Mix) (25 тестов)
22. Реагент для уточнения гетерозиготных неоднозначностей локуса HLA-B экзона 2 позиция прямого праймера 106A (AlleleSEQR HARP B2F106A, B Exon 2 Forward 106A Sequencing Mix) (25 тестов)
23. Реагент для уточнения гетерозиготных неоднозначностей локуса HLA-B экзона 2 позиция прямого праймера 144C (AlleleSEQR HARP B2F144C, B Exon 2 Forward 144C Sequencing Mix) (25 тестов)
24. Реагент для уточнения гетерозиготных неоднозначностей локуса HLA-B экзона 2 позиция прямого праймера 206C (AlleleSEQR HARP B2F206C, B Exon 2 Forward 206C Sequencing Mix) (25 тестов)
25. Реагент для уточнения гетерозиготных неоднозначностей локуса HLA-B экзона 2 позиция обратного праймера 311T (AlleleSEQR HARP B2R311T, B Exon 2 Reverse 311T Sequencing Mix) (25 тестов)
26. Реагент для уточнения гетерозиготных неоднозначностей локуса HLA-B экзона 3 позиция прямого праймера 357C (AlleleSEQR HARP B3F357C, B Exon 3 Forward 357C Sequencing Mix) (25 тестов)
27. Реагент для уточнения гетерозиготных неоднозначностей локуса HLA-B экзона 3 позиция прямого праймера 357G (AlleleSEQR HARP B3F357G, B Exon 3 Forward 357G Sequencing Mix) (25 тестов)
28. Реагент для уточнения гетерозиготных неоднозначностей локуса HLA-B экзона 3 позиция обратного праймера 559A (AlleleSEQR HARP B3R559A, B Exon 3 Reverse 559A Sequencing Mix) (25 тестов)

29. Реагент для уточнения гетерозиготных неоднозначностей локуса HLA-B экзона 3 позиция обратного праймера 603G (AlleleSEQR HARP B3R603G, B Exon 3 Reverse 603G Sequencing Mix) (25 тестов)
30. Реагент для уточнения гетерозиготных неоднозначностей локуса HLA-C экзона 2 позиция прямого праймера 105T (AlleleSEQR HARP C2F105T, C Exon 2 Forward 105T Sequencing Mix) (25 тестов)
31. Реагент для уточнения гетерозиготных неоднозначностей локуса HLA-C экзона 2 позиция прямого праймера 142G (AlleleSEQR HARP C2F142G, C Exon 2 Forward 142G Sequencing Mix) (25 тестов)
32. Реагент для уточнения гетерозиготных неоднозначностей локуса HLA-C экзона 2 позиция прямого праймера 176G (AlleleSEQR HARP C2F176G, C Exon 2 Forward 176G Sequencing Mix) (25 тестов)
33. Реагент для уточнения гетерозиготных неоднозначностей локуса HLA-C экзона 3 позиция прямого праймера 361T (AlleleSEQR HARP C3F361T, C Exon 3 Forward 361T Sequencing Mix) (25 тестов)
34. Реагент для уточнения гетерозиготных неоднозначностей локуса HLA-C экзона 3 позиция обратного праймера 368C (AlleleSEQR HARP C3R368C, C Exon 3 Reverse 368C Sequencing Mix) (25 тестов)
35. Реагент для уточнения гетерозиготных неоднозначностей локуса HLA-C экзона 3 позиция обратного праймера 486G (AlleleSEQR HARP C3R486G, C Exon 3 Reverse 486G Sequencing Mix) (25 тестов)
36. Реагент для уточнения гетерозиготных неоднозначностей локуса HLA-C экзона 3 позиция обратного праймера 539T (AlleleSEQR HARP C3R539T, C Exon 3 Reverse 539T Sequencing Mix) (25 тестов)
37. Реагент для уточнения гетерозиготных неоднозначностей локуса HLA-C экзона 3 позиция обратного праймера 559A (AlleleSEQR HARP C3R559A, C Exon 3 Reverse 559A Sequencing Mix) (25 тестов)
38. Реагент для уточнения гетерозиготных неоднозначностей локуса HLA- DRB1 экзона 2 позиция прямого праймера 124C (AlleleSEQR HARP R2F124C, DRB1 Exon 2 Forward 124C Sequencing Mix) (25 тестов)
39. Реагент для уточнения гетерозиготных неоднозначностей локуса HLA- DRB1 экзона 2 позиция прямого праймера 124T (AlleleSEQR HARP R2F124T, DRB1 Exon 2 Forward 124T Sequencing Mix) (25 тестов)

40. Реагент для уточнения гетерозиготных неоднозначностей локуса HLA- DRB1 экзона 2 позиция прямого праймера 197A (AlleleSEQR HARP R2F197A, DRB1 Exon 2 Forward 197A Sequencing Mix) (25 тестов)
41. Реагент для уточнения гетерозиготных неоднозначностей локуса HLA- DRB1 экзона 2 позиция обратного праймера 256A (AlleleSEQR HARP R2R256A, DRB1 Exon 2 Reverse 256A Sequencing Mix) (25 тестов)
42. Реагент для уточнения гетерозиготных неоднозначностей локуса HLA- DRB1 экзона 2 позиция обратного праймера 286A (AlleleSEQR HARP R2R286A, DRB1 Exon 2 Reverse 286A Sequencing Mix) (25 тестов)
43. Реагент для уточнения гетерозиготных неоднозначностей локуса HLA- DQB1 экзона 2 позиция прямого праймера 134C (AlleleSEQR HARP Q2F134C, DQB1 Exon 2 Forward 134C Sequencing Mix) (25 тестов)
44. Реагент для уточнения гетерозиготных неоднозначностей локуса HLA- DPB1 экзона 2 позиция прямого праймера 194C (AlleleSEQR HARP P2F194C, DPB1 Exon 2 Forward 194C Sequencing Mix) (25 тестов)
45. Реагент для уточнения гетерозиготных неоднозначностей локуса HLA- DPB1 экзона 2 позиция обратного праймера 251A (AlleleSEQR HARP P2R251A, DPB1 Exon 2 Reverse 251A Sequencing Mix) (25 тестов)
46. Реагент для уточнения гетерозиготных неоднозначностей локуса HLA- DPB1 экзона 2 позиция обратного праймера 292A (AlleleSEQR HARP P2R292A, DPB1 Exon 2 Reverse 292A Sequencing Mix) (25 тестов)
47. Реагент для уточнения гетерозиготных неоднозначностей локуса HLA- DPB1 экзона 2 позиция обратного праймера 313G (AlleleSEQR HARP P2R313G, DPB1 Exon 2 Reverse 313G Sequencing Mix) (25 тестов)

По общепринятым методикам требуется типировать основные три локуса: A, B, DRB1, но в последнее время типировать 6 локусов, так как заболевания и операции очень серьезные, и чем больше совпадений по локусам, тем успешнее исход операций. **HARPs** необходимы для уточнения результатов типирования, так как очень часто в сложном процессе секвенирования случаются неопределенности в прочтении последовательности ДНК.

Соответственно, как правило, пользователь, в зависимости от финансового положения организации, сначала заказывает наборы для типирования основных локусов (3-х или 6-и), а затем **HARPs**, если возникли проблемы с результатами типирования. Или есть множество других вариантов: типировать локусы можно другими методами и другими реагентами, и в арсенале лаборатории часто используется несколько методов

типирования. Данные реагенты дают точность высшей степени, и те локусы, которые не удастся протипировать другими методами, секвенируют с помощью данных реагентов.

По составу реагентов: отличаются только смеси ПЦР и секвенирующие смеси (выделены красным цветом, они идут для определенного локуса, для определенного участка гена, хромосомы), все остальные компоненты одинаковые.

Реагенты отличаются составом ПЦР-смеси и секвенирующих смесей.

Что касается HARPs, то все они отличаются тем, какой локус необходимо типировать.

Предполагаемое использование

Настоящие реагенты разработаны для обеспечения идентификации высокого разрешения аллелей человеческих генов HLA-A, -B, -C, -DRB1, -DQB1, и -DPB1.

Принцип метода:

Принцип метода основывается на двух главных технологиях: i) амплификация ПЦР и ii) прямое автоматизированное флуоресцентное секвенирование (метод определения). Соответствующие гены увеличиваются в смеси ПЦР с использованием полимеразы горячего запуска ДНК, AmpliTaq Gold ®. Получившийся в результате ампликон обрабатывается с помощью ExoSAP-IT ®, комбинации Экзонуклеаза I и щелочной фосфатазы Shrimp для удаления включенных праймеров ПЦР и дНТФ. Обработанный ампликон служит в качестве модели секвенирования ДНК в реакциях, которые используют особые праймеры секвенирования с терминатором BigDye™. Смеси для секвенирования высокого разрешения включают гетерозиготные праймеры разрешения неоднозначности (HARPs) с терминатором BigDye™ с тем, чтобы генерировать гемизиготные последовательности из гетерозиготного продукта ПЦР. Все последовательности ДНК определяются на автоматизированном флуоресцентном секвенаторе ДНК, а данные обрабатываются с помощью ПО для типирования (например, Assign SBT™, Conexio Genomics).

Состав набора

Общие компоненты				
Компонент	Символ	Описание	Объем	Набор
AmpliTaq Gold	Taq	Taq ДНК Полимераза	1 X 5 мкл	Наборы для испытаний локуса DRB1, DQB1, DPB1 (25 тестов или проб)
			1 X 8 мкл	Наборы для испытаний локуса DQB1 (25 тестов)
			1 X 10 мкл	Наборы для испытаний HLA-A, -B, -C (25 тестов)
			1 X 13 мкл	Наборы для испытаний DRB1, DQB1, DPB1 (100 тестов)
			1 X 23 мкл	Наборы для испытаний локуса DQB1 (100 тестов)
			1 X 34 мкл	Наборы для испытаний локусов HLA-A, -B, -C (100 тестов)
ExoSAP-IT	ExoSAP-IT	Комбинация экзонуклеаза I и щелочной фосфатазы Shrimp	1 X 86 мкл	Все наборы для испытаний содержат 25 тестов, кроме HAPs
			1 X 330 мкл	Все наборы для испытаний содержат 100 тестов, кроме HAPs
Контрольная ДНК	Control ДНК	Контрольная ДНК, 20 мкг/мкл	1 X 10 мкл	Все наборы для испытаний, кроме HAPs
NaOAc/EDT А Буфер	NaOAc/EDT TA	1.5 М NaOAc (pH > 8,0), 250	1 X 1.3 мл	Все наборы для испытаний, кроме

		мМ EDTA		HARPs
--	--	---------	--	-------

Особые компоненты

Предварительная комбинация ПЦР для определенных генов: олигонуклеотидные смеси праймеров для определенных генов в Трис-буфере ПЦР, содержащие дНТФ и $MgCl_2$.

Смесь для секвенирования определенных экзонов: терминатор BigDye™ и олигонуклеотидные праймеры для особых экзонов.

Смеси для секвенирования (гетерозиготные праймеры для разрешения неоднозначности, HARP): терминатор BigDye™ и определенные олигонуклеотидные праймеры для установленного мотива последовательности.

Аллель SEQR HLA-A		
HLA-A Комбинация для предварительной ПЦР	АПЦР	1 x 465 мкл (25 проб) 1 x 1680 мкл (100 проб)
А Ехон 2 Комбинация для прямого секвенирования	A2F	1 x 220 мкл (25 проб) 1 x 840 мкл (100 проб)
А Ехон 2 Комбинация для обратного секвенирования	A2R	1 x 220 мкл (25 проб) 1 x 840 мкл (100 проб)
А Ехон 3 Комбинация для прямого секвенирования	A3F	1 x 220 мкл (25 проб) 1 x 840 мкл (100 проб)
А Ехон 3 Комбинация для обратного секвенирования	A3R	1 x 220 мкл (25 проб) 1 x 840 мкл (100 проб)
А Ехон 4 Комбинация для прямого секвенирования	A4F	1 x 220 мкл (25 проб) 1 x 840 мкл (100 проб)
А Ехон 4 Комбинация для обратного секвенирования	A4R	1 x 220 мкл (25 проб) 1 x 840 мкл (100 проб)
Аллель SEQR HLA-B		
HLA-B Комбинация для предварительной ПЦР	В ПЦР	1 x 465 мкл (25 проб) 1 x 1680 мкл (100 проб)
В Ехон 2 Комбинация для установления прямого секвенирования	B2F	1 x 220 мкл (25 проб) 1 x 840 мкл (100 проб)
В Ехон 2 Комбинация для обратного секвенирования	B2R	1 x 220 мкл (25 проб) 1 x 840 мкл (100 проб)

В Эхон 3 Комбинация для прямого секвенирования	B3F	1 x 220 мкл (25 проб) 1 x 840 мкл (100 проб)
В Эхон 3 Комбинация для обратного секвенирования	B3R	1 x 220 мкл (25 проб) 1 x 840 мкл (100 проб)
В Эхон 4 Комбинация для прямого секвенирования	B4F	1 x 220 мкл (25 проб) 1 x 840 мкл (100 проб)
В Эхон 4 Комбинация для установления обратного секвенирования	B4R	1 x 220 мкл (25 проб) 1 x 840 мкл (100 проб)
Аллель SEQR HLA-C плюс		
HLA-C Комбинация для предварительной ПЦР	СПЦР	1 x 465 мкл (25 проб) 1 x 1680 мкл (100 проб)
С Экзон 2 Комбинация для прямого секвенирования	C2F	1 x 220 мкл (25 проб) 1 x 840 мкл (100 проб)
С Экзон 2 Комбинация для обратного секвенирования	C2R	1 x 220 мкл (25 проб) 1 x 840 мкл (100 проб)
С Экзон 3 Комбинация для прямого секвенирования	C3F	1 x 220 мкл (25 проб) 1 x 840 мкл (100 проб)
С Экзон 3 Комбинация для обратного секвенирования	C3R	1 x 220 мкл (25 проб) 1 x 840 мкл (100 проб)
С Экзон 4 Комбинация для прямого секвенирования	C4F	1 x 220 мкл (25 проб) 1 x 840 мкл (100 проб)
С Экзон 4 Комбинация для обратного секвенирования	C4R	1 x 220 мкл (25 проб) 1 x 840 мкл (100 проб)
Аллель SEQR HLA-DRB1		
DRB1 Комбинация для предварительной ПЦР	DRB1 ПЦР	1 x 220 мкл (25 проб) 1 x 875 мкл (100 проб)
DRB1 Комбинация для прямого секвенирования	R2F	1 x 220 мкл (25 проб) 1 x 840 мкл (100 проб)
DRB1 Комбинация для обратного секвенирования	R2R	1 x 220 мкл (25 проб) 1 x 840 мкл (100 проб)
DRB1 Codon 86 Комбинация для секвенирования (GTG)	R86	1 x 220 мкл (25 проб) 1 x 840 мкл (100 проб)

Аллель SEQR HLA-DPB1		
DPB1 Предварительная комбинация ПЦР	DPB1ПЦР	1 x 220 мкл (25 проб) 1 x 875 мкл (100 проб)
DPB1 Комбинация для прямого секвенирования	P2F	1 x 220 мкл (25 проб) 1 x 840 мкл (100 проб)
DPB1 Комбинация для обратного секвенирования	P2R	1 x 220 мкл (25 проб) 1 x 840 мкл (100 проб)
DPB1 Codon 85 Комбинация для секвенирования (GAG)	P85	1 x 220 мкл (25 проб) 1 x 840 мкл (100 проб)
HLA-C плюс Комбинация для секвенирования дополнительных экзонов		
C Экзон 1 Комбинация для обратного секвенирования	C1R	1 x 220 мкл (25 проб) 1 x 875 мкл (100 проб)
C Экзон 5 Комбинация для прямого секвенирования	C5F	1 x 220 мкл (25 проб) 1 x 840 мкл (100 проб)
C Экзон 6 Комбинация для прямого секвенирования	C6F	1 x 220 мкл (25 проб) 1 x 840 мкл (100 проб)
C Экзон 7 Комбинация для прямого секвенирования	C7F	1 x 220 мкл (25 проб) 1 x 840 мкл (100 проб)
C Экзон 7 Комбинация для обратного секвенирования	C7R	1 x 220 мкл (25 проб) 1 x 840 мкл (100 проб)
Аллель SEQR HLA-DQB1		
DQB1 Экзон 2 Комбинация для предварительной ПЦР	QX2 ПЦР	1 x 220 мкл (25 проб) 1 x 875 мкл (100 проб)
DQB1 Экзон 3 Комбинация для предварительной ПЦР	QX3 ПЦР	1 x 220 мкл (25 проб) 1 x 875 мкл (100 проб)
DQB1 Экзон 2 Комбинация для прямого секвенирования	Q2F	1 x 220 мкл (25 проб) 1 x 840 мкл (100 проб)
DQB1 Экзон 2 Комбинация для обратного секвенирования	Q2R	1 x 220 мкл (25 проб) 1 x 840 мкл (100 проб)
DQB1 Экзон 3 Комбинация для прямого секвенирования	Q3F	1 x 220 мкл (25 проб) 1 x 840 мкл (100 проб)

секвенирования		
DQB1 Exon 3 Комбинация для обратного секвенирования	Q3R	1 x 220 мкл (25 проб) 1 x 840 мкл (100 проб)
Аллель SEQR HLA-A Комбинация для секвенирования с разрешением неоднозначности		
A Exon 2 Forward 98A Комбинация для прямого секвенирования	A2f98A	1 x 220 мкл (25 проб) или 1 x 840 л (100 проб)
A Экзон 2 Forward 98T Комбинация для прямого секвенирования	A2F98T	1 x 220 мкл (25 проб) или 1 x 840 мкл (100 проб)
A Экзон 2 Forward 144A Комбинация для прямого секвенирования	A2F144A	1 x 220 мкл (25 проб) или 1 x 840 мкл (100 проб)
A Экзон 2 Forward 203G Комбинация для прямого секвенирования	A2F203G	1 x 220 мкл (25 проб) или 1 x 840 мкл (100 проб)
A Exon 2 Forward 261C Комбинация для прямого секвенирования	A2F261C	1 x 220 мкл (25 проб) или 1 x 840 мкл (100 проб)
A Exon 2 Reverse 311T Комбинация для обратного секвенирования	A2R311T	1 x 220 мкл (25 проб) или 1 x 840 мкл (100 проб)
A Exon 3 Forward 363A Комбинация для обратного секвенирования	A3F363A	1 x 220 мкл (25 проб) или 1 x 840 мкл (100 проб)
A Exon 3 Forward 363G Комбинация для обратного секвенирования	A3F363G	1 x 220 мкл (25 проб) или 1 x 840 мкл (100 проб)
A Exon 3 Forward 414C Комбинация для обратного секвенирования	A3F414C	1 x 220 мкл (25 проб) или 1 x 840 мкл (100 проб)
Аллель SEQR HLA-B Комбинация для секвенирования с разрешением		

неоднозначности		
В Exon 2 Forward 106A Комбинация для прямого секвенирования	B2f106A	1 x 220 мкл (25 проб) или 1 x 840 мкл (100 проб)
В Exon 2 Forward 144C Комбинация для прямого секвенирования	B2f144C	1 x 220 мкл (25 проб) или 1 x 840 мкл (100 проб)
В Exon 2 Forward 206C Комбинация для прямого секвенирования	B2f206C	1 x 220 мкл (25 проб) или 1 x 840 мкл (100 проб)
В Exon 2 Reverse 311T Комбинация для обратного секвенирования	B2R311T	1 x 220 мкл (25 проб) или 1 x 840 мкл (100 проб)
В Экзон 3 Forward 357C Комбинация для прямого секвенирования	B3F357C	1 x 220 мкл (25 проб) или 1 x 840 мкл (100 проб)
В Экзон 3 Forward 357G Комбинация для прямого секвенирования	B3F357G	1 x 220 мкл (25 проб) or 1 x 840 мкл (100 проб)
В Exon 3 Reverse 559A Комбинация для обратного секвенирования	B3R559A	1 x 220 мкл (25 проб) or 1 x 840 мкл (100 проб)
В Exon 3 Reverse 603G Комбинация для обратного секвенирования	B3R603G	1 x 220 мкл (25 проб) или 1 x 840 мкл (100 проб)
Аллель SEQR HLA-C Комбинация для секвенирования с разрешением неоднозначности		
С Exon 2 Forward 105T Комбинация для прямого секвенирования	C2F105T	1 x 220 мкл (25 проб) или 1 x 840 мкл (100 проб)
С Exon 2 Forward 142G Комбинация для прямого секвенирования	C2F142G	1 x 220 μ L (25 проб) или 1 x 840 μ L (100 проб)
С Exon 2 Forward 176G Комбинация для прямого секвенирования	C2F176G	1 x 220 мкл (25 проб) или 1 x 840 мкл (100 проб)

Комбинация для прямого секвенирования		840 мкл (100 проб)
С Exon 3 Forward 361T Комбинация для прямого секвенирования	C3F361T	1 x 220 мкл (25 проб) или 1 x 840 мкл (100 проб)
С Exon 3 Reverse 368C Комбинация для обратного секвенирования	C3R368C	1 x 220 мкл (25 проб) или 1 x 840 мкл (100 проб)
С Exon 3 Reverse 486G Комбинация для обратного секвенирования	C3R486G	1 x 220 мкл (25 проб) или 1 x 840 мкл (100 проб)
С Exon 3 Reverse 539T Комбинация для обратного секвенирования	C3R539T	1 x 220 мкл (25 проб) или 1 x 840 мкл (100 проб)
С Exon 3 Reverse 559A Комбинация для обратного секвенирования	C3R559A	1 x 220 мкл (25 проб) или 1 x 840 мкл (100 проб)
Аллель SEQR HLA-DRB1 Комбинация для установления секвенирования с разрешением многозначности		
DRB1 Exon 2 Forward 124C Комбинация для установления прямого секвенирования (Codon 13)	R2F124C	1 x 220 мкл (25 проб) или 1 x 840 мкл (100 проб)
DRB1 Exon 2 Forward 124T Комбинация для установления прямого секвенирования (Codon 13)	R2F124T	1 x 220 мкл (25 проб) или 1 x 840 мкл (100 проб)
DRB1 Exon 2 Forward 197A Комбинация для установления прямого секвенирования (Codon 37)	R2F197A	1 x 220 мкл (25 проб) или 1 x 840 мкл (100 проб)
DRB1 Exon 2 Reverse 256A Комбинация для установления обратного	R2R256A	1 x 220 мкл (25 проб) или 1 x 840 мкл (100 проб)

секвенирования (Codon 57)		
DRB1 Exon 2 Reverse 286A Комбинация для установления обратного секвенирования (Codon 67)	R2R286A	1 x 220 мкл (25 проб) или 1 x 840 мкл (100 проб)
Аллель SEQR HLA-DPB1 Комбинация для секвенирования с разрешением неоднозначности		
DPB1 Exon 2 Forward 194C Комбинация для прямого секвенирования (Codon 36)	P2f194C	1 x 220 мкл (25 проб) или 1 x 840 мкл (100 проб)
DPB1 Exon 2 Reverse 251A Комбинация для обратного секвенирования (Codon 55)	P2R251A	1 x 220 мкл (25 проб) или 1 x 840 мкл 100 проб)
DPB1 Exon 2 Reverse 292A Комбинация для обратного секвенирования (Codon 69)	P2R292A	1 x 220 мкл (25 проб) или 1 x 840 л (100 проб)
DPB1 Exon 2 Reverse 313G Комбинация для обратного секвенирования (Codon 76)	P2R313G	1 x 220 мкл (25 проб) или 1 x 840 мкл (100 проб)
Аллель SEQR HLA-DQB1 Комбинация для установления секвенирования с разрешением неоднозначности		
DQB1 Exon 2 Forward 134C Комбинация для прямого секвенирования (Codon 13)	Q2f134C	1 x 220 мкл (25 проб) или 1 x 840 мкл (100 проб)

Характерные символы CE

Символ	Толкование	Символ	Толкование
CE	Сертификация CE	IVD	Медицинское устройство для диагностики в лабораторном сосуде
LOT	Код партии	REF	Номер по каталогу
	Производителе	•	См. инструкцию по

	ль
25	Содержит 25 проб
	Использовать согласно дате
ЕС REP	Уполномоченный представитель Европейского сообщества
1 EA	Содержит одну пробирку в кажд.

	эксплуатации
100	Содержит 100 проб
	Высший предел температуры хранения
500	Содержит 500 проб

НЕОБХОДИМЫЕ, НО НЕ ВКЛЮЧЕННЫЕ В ОБЪЕМ ПОСТАВКИ МАТЕРИАЛЫ:

- Термоциклер. Реактивы подготовлены для использования их в термоциклере ABI 9700
- Секвенатор ДНК: хорошие результаты получают при использовании генетического анализатора ABI, модели 310, 3100, 3130 и 3730.
- Центрифуга со скоростью вращения 96-луночного планшета 2000 X g.
- Программное обеспечение для типирования аллельных вариантов, например Assign SBT компании Conexio Genomics.
- Пипетки и одноразовые наконечники с объемами в диапазоне 1 мкл - 800 мкл.
- Реакционные пробирки для циклической термообработки для ПЦР и секвенирования, предлагаемые для использования, поставляются ABI.
(например, пробирки, 96-и луночные планшеты, колпачки, крышки для заполненных контейнеров).
- Чистый этанол.
- Деионизированная или дистиллированная вода.
- Буфер TE (10 mM Tris, 0.1 м EDTA, pH 8.0)
- Реагенты для электрофореза в агарозном геле (агароза, бромистый этидий, 10X TBE)
- Формальдегид HiDi (ABI)

- Буфер (10X) cEDTA (ABI) для капиллярных секвенаторов ДНК
- POP-6 или POP-7 полимер (ABI)

УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ И СТАБИЛЬНОСТЬ

Не используйте реагенты с истекшим сроком годности. Срок годности указан на этикетке. Храните все реагенты при температуре -15°C или ниже.

После вскрытия все компоненты сохраняют стабильность до истечения срока действия при условии хранения при температуре -15°C .

Реагенты можно успешно использовать после 25 циклов заморозки/оттаивания.

Предварительно подготовленные смеси ПЦР с AmpliTaq Gold могут храниться до трех месяцев при температуре -15°C или $+4^{\circ}\text{C}$.

Храните ExoSAP-IT® при температуре ниже -15°C , так как реагент чувствителен к температуре; ограничивайте время пребывания реагента при комнатной температуре.

Возвращайте реагентны немедленно после использования в температурный режим -15°C .

Изменения физического внешнего вида реактивов из набора может свидетельствовать об ухудшении их качества, что может отразиться на характеристиках растворов.

Средний срок годности 1 год.

МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

Не смешивайте реагенты из разных партий, за исключением секвенирующих смесей для уточнения неоднозначностей и HLA-C плюс секвенирующих смесей для дополнительных экзонов, которые планируется использовать во многих партиях реактивов ПЦР.

Предварительные и последующие процедуры ПЦР должны быть разделены в соответствии с правильной лабораторной практикой ПЦР.

Контрольная ДНК. Контроль содержит ДНК, которая извлечена из стандартизированной эталонной лимфобластной В-клеточной линии из запасов Международного рабочего комитета по гистосовместимости. Извлеченные ДНК проходят ряд ферментных шагов для снижения воздействия потенциально инфекционного материала.

Для сведения к минимуму воздействия на реактивы и возможности загрязнения реактивов, соблюдайте лабораторные методики; надевайте перчатки, лабораторные халаты и т.д.

ПРОБА

Проба должна представлять собой геномную ДНК человека концентрацией 20 нг/μл в буфере Tris/EDTA, очищенную любым методом, который дает ДНК высокомолекулярного веса, согласно определяемому электрофорезом в агарозном геле. Рекомендуемая вводимая проба составляет 40-80 нг геномной ДНК, но испытания показали надежную работу как при 10 нг ДНК, так и 500 нг. Для секвенирующих реактивов проба растворяется в

гетерозиготных продуктах ПЦР, обработанных ExoSAP-IT, полученных при помощи основного комплекта реагентов ПЦР.

ПРОТОКОЛ ИСПЫТАНИЙ

Следующая процедура применяется ко всем наборам реагентов Allele SEQR I и II класса.

ПЦР

Приготовьте раствор ПЦР/Смесь Таq. Для этого добавьте в предварительно подготовленную смесь ПЦР AmpliTaq Gold в соответствии с таблицей ниже. Раствор AmpliTaq Gold – вязкий, поэтому проверьте, чтобы было подготовлено для реакций с тем, чтобы не потребовались объемы AmpliTaq Gold менее 1 мкл.

Примечание: Предварительно подготовленная смесь ПЦР с AmpliTaq Gold может храниться до 3 месяцев при температуре -15°C или +4°C.

КЛАСС I (HLA-A, -B, -C)			КЛАСС II (DRB1, DPB1, DQB1)		
Количество реакций	Предварительная комбинация ПЦР	AmpliTaq Gold	Количество реакций	Предварительная комбинация ПЦР	AmpliTaq Gold
1	16 мкл	0,3 мкл	1	8 мкл	0,1 мкл
10	160 мкл	3,0 мкл	10	80 мкл	1,0 мкл
25	400 мкл	7,5 мкл	25	200 мкл	2,5 мкл
100	1600 мкл	30,0 мкл	100	800 мкл	10 мкл

1. Добавьте смесь ПЦР/Таq в каждую реакционную пробирку:

Класс I – 16 мкл

Класс II – 8 мкл

Примечание: для DQB1 подготовьте как Exon 2, так и Exon 3 смеси ПЦР/Таq в соответствии с таблицей ниже.

2. Добавьте геномную ДНК (20 нг/мкл) или стерильную воду (отрицательный контроль) в реакционные пробирки, содержащие смесь ПЦР/Таq:

Класс I – 4 мкл ДНК

Класс II – 2 мкл ДНК

Примечание: Для DQB1 подготовьте два ПЦР на одну пробу, один для Exon 2 и один для Exon 3.

3. Кратко открутите на центрифуге для перемешивания содержимого пробирок.

4. Выполните следующую циклическую термообработку:

Количество циклов	Температура	Время
1	95° C	10 минут
36	96° C	20 секунд
	60° C	30 секунд
	72° C	3 минуты
1	4° C	бесконечно

5. После амплификации раскапайте по 3 мкл продукта ПЦР на 1% агарозном геле, содержащем 0.1 мкг/мл бромистого этидия для оценки качества ПЦР. Положительные ампликоны появляются в виде дискретных полос, а отрицательный контроль не должен показывать никакой продукт амплификации.

ОЧИСТКА ПЦР

Добавьте в каждую реакцию 3 мкл ExoSAP-IT во избежание остаточных праймеров ПЦР и дНТФ. Для достижения однородности кратко обработайте в центрифуге. Выполните следующую циклическую термообработку.

Примечание: Для DQB1 соедините продукты ПЦР Exon 2 и Exon 3 для каждой пробы перед обработкой ExoSAP-IT.

Примечание: Храните ExoSAP-IT при температуре ниже -15°C, так как реактив является чувствительным к температуре.

Количество циклов	Температура	Время
1	37° C	(см. примечание ниже) 15 – 30 минут
1	80° C	15 минут
	4° C	бесконечно

Примечание: Если активность ExoSAP-IT уменьшилась, о чем будет свидетельствовать повышенный флуктуационный шум, а также недостаточное разрешение пика в данных секвенирования, увеличение времени инкубации при 37°C до 30 минут может значительно улучшить качество данных секвенирования.

Разбавление ПЦР (Примечание: Данный шаг важен для обеспечения достаточной матрицы ПЦР, как для реакций секвенирования основных локусов, так и для

секвенирования с дополнительными праймерами (HARPs) и секвенирующих смесей HLA-C плюс для дополнительных экзонов) Класс I. Разбавьте продукт ПЦР класса I в соотношении 1:1 с буфером TE или стерильной или деионизированной водой. Хорошо перемешайте. Класс II. Разбавьте продукт ЦПР класса II в соотношении 2:1 с буфером TE или стерильной деионизированной водой. Хорошо перемешайте.

Реакции секвенирования

Реакции секвенирования для всех наборов Класса I и Класса II подготавливаются следующим образом.

1. Добавьте 8 мкл каждой секвенирующей смеси в отдельные реакционные пробирки.
2. Добавьте 2 мкл продукта ПЦР, обработанного ExoSAP-IT, в каждую реакционную трубку. Обработайте на центрифуге в течение непродолжительного времени.
3. Выполните следующую циклическую термообработку:

Количество циклов	Температура	Время
25	96° C	20 секунд
	50° C	30 секунд
	60° C	2 минуты
1	4° C	Бесконечно

Подготовка этанола для реакций секвенирования

Следующие шаги выполняйте непосредственно в 0.2 мл реакционных пробирках для секвенирования:

1. Добавьте 2 мкл буфера NaOAc/EDTA в каждую реакцию секвенирования.
2. Обработайте на центрифуге в течение непродолжительного времени, чтобы обеспечить соответствующее присоединение буфера NaOAc/EDTA с реакциями секвенирования (5 секунд на скорости вращения 500 об/мин).
3. Добавьте 25 мкл чистого EtOH в каждую реакцию секвенирования.
4. Встряхивайте реакционные пробирки в течение непродолжительного времени, но энергично. Примечание: Данный шаг очень важен, так как незавершенное смешивание может снизить качество данных секвенирования.
5. Обработайте в центрифуге на скорости 2000 об/мин в течение 30 минут.
6. Удалите надосадочную жидкость перевернув пробирку/планшет на бумажное полотенце. Обработайте на центрифуге перевернутые пробирки/ планшеты на скорости 50-100 об/мин в течение 10 секунд.
7. Добавьте 50 мкл 80 % EtOH в каждую реакцию секвенирования.
8. Обработайте в центрифуге на скорости 2000 об/мин в течение 5 минут.

9. Повторите шаг 6.

Подготовьте пробы для электрофореза

1. Подготовьте реакции секвенирования для загрузки в капиллярный секвенатор ДНК путем добавления 15 μ л одной из следующих реакционных пробирок секвенирования:

а) Формальдегид HiDi

б) 0.3 мМ EDTA в воде

2. Обработайте на центрифуге в течение непродолжительного времени, чтобы собрать раствор на дне пробирок.

3. При растворении в формальдегиде HiDi, денатурируйте реакции секвенирования в устройстве циклической термообработки в течение 2 минут при температуре 95°C.

4. При растворении с 0.3 мМ EDTA, НЕ ДЕНАТУРИРУЙТЕ ПРИ ПОВЫШЕННОЙ ТЕМПЕРАТУРЕ, просто загрузите реакции непосредственно в прибор.

Сбор данных

Выполните сбор данных в соответствии с параметрами конкретного прибора, указанными ниже.

Мобильные файлы и рабочие модули				
Инструмент	Мобильный файл	Рабочий модуль	Параметры впрыска ^а	Параметры сбора
ABI 310	DT POP6 {Комплект BD, любой герметик}	Seq POP-6 Rapid {1mL} E	2.0KV 10 секунд	15KV 28 минут
ABI 3100	DT3100POP6{BD}v2	RapidSeq36 POP6 Default	1.0-1.5KV 5-10 секунд	Собрать за 1800 секунд
ABI 3130	DT3130POP6{BD}.mob	RapidSeq36 POP6 1	1.0-1.5KV 5-10 секунд	Собрать за 1800 секунд
ABI 3730	DT3730POP7{BD}.mob	RapidSeq36 POP7 1	1.0-1.5KV 5-10 секунд	Собрать за 1800 секунд

а. Модули работы по умолчанию можно отрегулировать в соответствии с рекомендуемыми параметрами ввода и сбора данных. Детальные протоколы смотрите в руководстве для пользователя прибора для секвенирования.

Обработка данных теста

Данные секвенирования обрабатываются при помощи программного обеспечения по типированию аллельных вариантов для идентификации аллелей HLA. Программное

обеспечение с CE-marked, которое совместимо с данными реактивами, - *Assign SBT* (Conexio Genomics, Западная Австралия).

Анализ данных и назначение установок SBT

Следует обратить внимание, что разрешающее секвенирование предназначено для анализа одновременно с секвенированием типичных экзонов для однозначных результатов типирования. Для получения точных результатов типирования должны быть совместимы библиотека секвенирования и настройки AssignSBT. Чтобы обеспечить данную совместимость, вы должны загрузить библиотеки/настройки с веб-сайта Conexio Genomics: www.conexio.iinet.net.au, кликнув на кнопку "Downloads".

Примечание: Чтобы Assign SBT мог точно идентифицировать секвенирование уточнения неоднозначности, необходимо использовать альтернативное имя в составе имени файла пробы. Например, 98A выбирается в качестве альтернативных имен для секвенирования A2F98A, соответствующее преобразование имени будет `Samplename_ A2F_98A`. Воспользуйтесь следующей таблицей для присваивания имени.

КЛАСС I АЛЬТЕРНАТИВНЫЕ ИМЕНА.

Название герметика	Альтернативное название	Название герметика	Альтернативное название	Название герметика	Альтернативное название
A2F98A	98A	B2F106A	106A	C2F105T	105T
A2F98T	98T	B2F144C	144C	C2F142G	142G
A2F144A	144A	B2F206C	206C	C2F176G	176G
A2F261C	261C	B2R311T	311T	C3F361T	361T
A2R311T	311T	B3F357C	357C	C3R368C	368C
A3F363A	363A	B3F357G	357G	C3R486G	486G
A3F363G	363G	B3R559A	559A	C3R539T	539T
A3F414C	414C	B3R603G	603G	C3R559A	559A
A2F203G	203G				

АЛЬТЕРНАТИВНЫЕ НАЗВАНИЯ КЛАСС II

Название герметика	Альтернативное название	Название герметика	Альтернативное название	Название герметика	Альтернативное название
R2F124C	124C	P2F194C	194C	Q2F134C	134C

R2F124T	124T	P2R251A	251A		
R2F197A	197A	P2R292A	292A		
R2R256A	256A	P2R313G	313G		
R2R286A	286A				

Валидация теста

Соответствующие характеристики реактивов с позитивным регулированием ДНК обеспечат сильную реакцию амплификации ПЦР и правильное типирование аллельных вариантов, как указано в таблице ниже. Если в результате получается другое типирование, необходимо пересмотреть типирование всех других образцов, так как это может свидетельствовать о смешивании образцов и недействительных результатов испытаний.

Типы HLA для контрольной ДНК (P/N C2000)		
Ген	Аллель 1	Аллель 2
HLA-A	0206	3002
HLA-B	1801	3908
HLA-C	0501	0702
DRB1	0315	0407
DQB1	0201	0302
DPB1	0202	0402

Предполагаемые результаты по негативной регуляции заключаются в недостаточной амплификации в ПЦР. Если получен положительный результат, может существовать проблема загрязнения, а также необходимо тщательно проверить остальные типирования. Результаты типирования HLA посредством секвенирования ДНК являются по определению данными, контролируемые внутри. Примерно 80 % генных секвенирований HLA сохраняются по всем аллелям. Поэтому в любом секвенировании HLA большая часть результатов обработки данных (а именно, нуклеотидные основания) являются неизменными.

ТОЧНОСТЬ РАБОЧИХ ХАРАКТЕРИСТИК

В международной программе испытания эффективности обмена ДНК, в период с июня 2000 до августа 2003, внутренние результаты с основными комплектами AlleleSEQR показали данные, представленные в таблице ниже. Сводка комбинаций для установления секвенирования HARP в следующем разделе относится к отдельному исследованию, используемому только для определения точности реагентов HARP.

Примечание: Эти данные были генерированы на секвенаторе ДНК и генетическом анализаторе ABI 3100 с использованием сбора данных ABI v1.1 и анализа

последовательности ABI v3.7. Задания по типированию HLA были выполнены с помощью Assign-SBT v3.2.7 компании Conexio Genomics.

Ген	Кол-во проверенных проб	Количество Mistyped
HLA-A	100	0
HLA-B	100	0
HLA-C	100	0
DRB1	120	0
DRB1 GSA	100	0
DQB1	100	0
DPB1	100	0

Смесь для установления секвенирования HARP

Все смеси для установления секвенирования HARP были проверены по 36 образцам ДНК, представляющими собой в общей сложности 1224 последовательности. Контрольные панели для HLA-A, -B, -C, -DRB1, -DPB1 и -DQB1 были разработаны с тем, чтобы включить ДНК, имеющие 0, 1, или 2 аллели, которые соответствуют специфике каждого праймера; возможные результаты последовательностей включали гемизиготу, гетерозиготу или отсутствие последовательности. В 100 % протестированных проб были получены верные данные последовательности и результаты типирования.

Тестирование на точность показало, что все 34 смеси для установления секвенирования HARP генерируют последовательность для тех аллелей, которые содержатся в последовательном мотиве в соответствии со спецификой разрешающего праймера. В отдельных комбинациях аллелей на более низком уровне, относящихся к истинной гетерозиготной последовательности, может быть обнаружена вторая аллель.

ТОЧНОСТЬ

В номере обмена ДНК UCLA 60, 6 проб ДНК протипированы 6-ю различными лабораториями для HLA-A, -B, -C и DRB1 со 100% соответствием. Внутренняя воспроизводимость лота была установлена на контрольных панелях из 6-12 проб ДНК, в зависимости от комплекта, с использованием 3 лотов из каждого комплекта. Результаты продемонстрировали 100% соответствие в аллельном типировании.

Все смеси для установления секвенирования HARP были протестированы по трем ДНК. Каждая ДНК содержала последовательный мотив, который соответствовал специфике праймера HARP. В 100 % протестированных проб были получены правильные результаты

гемизиготного типирования. Воспроизводимость от лота к лоту была проверена с использованием соответствующей панели проб ДНК. В 100 % протестированных проб были получены правильные результаты гемизиготного типирования, и все последовательности соответствовали установленным спецификациям контроля качества.

ПОРОГ ОБНАРУЖЕНИЯ

Рекомендуемое количество входящей ДНК – 40-80 нг, однако ПЦР-амплификация продемонстрировала возможность достаточно точной работы, начиная с 10 нг входящей ДНК и заканчивая 500 нг.

СПЕЦИФИЧНОСТЬ

Анализ специфичности показал, что каждый тест устанавливает только аллели, характеризующиеся геноспецифической предварительной комбинацией ПЦР. Например, HLA-A.

Предварительная комбинация ПЦР дополняет только аллели HLA-A и не распространяется на другие гены или псевдогены HLA.

При определенных гетерозиготных комбинациях аллелей можно получить результат с реагентами ядра, в которых определяется более одного вида аллелей. Эту неопределенность можно устранить, используя реагенты HARP.

Анализ специфичности комбинации для установления последовательности HARP показал, что каждый тест распознает аллели, обозначенные праймером с определенной последовательностью мотива. Например, комбинация для установления последовательности HLA-A Exon 2 Forward 98A эффективно упорядочивает аллели HLA-A, которые содержат A на позиции 98. Если в образцах содержится не определенная ранее аллель, может быть получен неточный результат.

Данный тест является качественным методом для определения генетической изменчивости, свойственной генам HLA-A, -B, -C, -DRB1, -DQB1 и -DPB1.

Комбинация для установления последовательности HARP – это качественные реагенты, используемые для проведения теста на аллелизм для генов HLA-A, -B, -C, -DRB1, -DPB1 и -DQB1. В определенном сочетании аллелей вторую аллель можно обнаружить уровнем ниже по отношению к настоящей гетерозиготной последовательности.

После вскрытия все компоненты сохраняют стабильность до истечения срока действия при условии хранения при температуре -15°C.

Средний срок годности 1 год.



