

Instrukcję użytkowania

Amplifikacja metodą PCR i sekwencjonowanie loci HLA klasy I i II

Nr wersji: 1.0

Data wydania października 2017 r.

IVD



CareDx Pty Ltd
20 Collie Street
Fremantle 6160
Western Australia
Australia

EC REP

Qarad bvba
Cipalstraat 3
B-2440 Geel
Belgium

Spis treści

ZASADY	3
ZASTOSOWANIE	3
SKŁAD ZESTAWU	4
WYMAGANIA DOTYCZĄCE PRZECHOWYWANIA	8
NIE DOSTARCZONE MATERIAŁY, ODCZYNNIKI I SPRZĘT	8
WYMAGANIA DOTYCZĄCE PRÓBK I.....	9
OSTRZEŻENIA I ŚRODKI OSTROŻNOŚCI	10
SYMBOLE	10
PROCEDURA	11
1. PCR	11
2. ELEKTROFOREZA AGAROWA	12
3. OCZYSZCZANIE PRODUKTÓW REAKCJI PCR	12
4. REAKCJA SEKWENCJONOWANIA	13
5. OCZYSZCZANIE PRODUKTÓW REAKCJI SEKWENCJONOWANIA	15
6. DENATURACJA I ELEKTROFOREZA PRODUKTÓW REAKCJI SEKWENCJONOWANIA.....	16
7. EDYCJA I ANALIZA ELEKTROFEROGRAMÓW	17
CHARAKTERYSTYKA DZIAŁANIA	17
DOKŁADNOŚĆ.....	17
GRANICA WYKRYWALNOŚCI.....	19
SWOISTOŚĆ.....	19
OGRANICZENIA I PRZESTROGI	19
LICENCJA	19
BIBLIOGRAFIA	20
ROZWIĄZYWANIE PROBLEMÓW	20
SPOKREWNIONE PRODUKTY	23
INFORMACJE DOTYCZĄCE POMOCY I DANE KONTAKTOWE	25


Zasady

Opisana tu procedura bezpośredniego sekwencjonowania (SBT – sequence based typing) została pierwotnie opracowana przez D. Sayera w 2001¹, a następnie opracowana jako oznaczenie jednoprobówkowe w 2004². Procedura obejmuje początkową amplifikację sekwencji docelowej, a następnie zastosowanie obróbki enzymatycznej w celu usunięcia niewłączonych starterów i dNTPów. Następnie amplikon użyty jest jako matryca w bezpośrednim automatycznym fluorescencyjnym sekwencjonowaniu DNA przy użyciu dostosowanych do potrzeb użytkownika starterów i odczynników Big Dye[®] Terminator do sekwencjonowania, dostępnymi z firmy Applied Biosystems[™] by Life Technologies[™]. Produkty wydłużania oczyszczane są metodą wytrącania etanolem i denaturowane przy użyciu formamidu Hi-Di[™] firmy Applied Biosystems[™], by Life Technologies[™], po czym są rozdzielane i wykrywane w aparacie do automatycznego fluorescencyjnego sekwencjonowania DNA. Zalecane jest, aby zebrane w ten sposób dane były następnie analizowane przy pomocy oprogramowania ASSIGN[™] SBT do analizowania sekwencji, firmy CareDx Pty Ltd³⁻⁵.

Zastosowanie

Zestawy CareDx Pty Ltd' OLERUP SBT[™] HLA SBT używane są do typowania genów HLA klasy I (HLA-A, -B i -C) i klasy II (HLA-DRB1, -DQB1 i -DPB1) w warunkach laboratoryjnych, z genomowego DNA. Każdy zestaw zawiera odczynniki umożliwiające amplifikację metodą PCR i sekwencjonowanie DNA danego genu. Otrzymane w ten sposób dane sekwencji są następnie interpretowane przy użyciu oprogramowania CareDx Pty Ltd' ASSIGN[™] SBT. Należy nadmienić, że te zestawy SBT nie są używane do diagnozowania chorób.

Skład zestawu

Zestaw	Nr katalogowy		Zawartość odczynników do użycia przed PCR (PRE-PCR) (liczba fiolek)	Zawartość odczynników do użycia po PCR (POST-PCR) (liczba fiolek)		
Klasy I						
HLA-A	XH-PD1.1-2(20)	20 testy	<div style="border: 1px solid black; padding: 2px; display: inline-block;">DNA POL- HLA-A</div> <div style="border: 1px solid black; padding: 2px; display: inline-block;">HLA-A MIX</div>	1 x 25µL 1 x 352µL	<div style="border: 1px solid black; padding: 2px; display: inline-block;">AEX1F</div> <div style="border: 1px solid black; padding: 2px; display: inline-block;">AEX1R</div> <div style="border: 1px solid black; padding: 2px; display: inline-block;">AEX2F</div> <div style="border: 1px solid black; padding: 2px; display: inline-block;">AEX2R</div> <div style="border: 1px solid black; padding: 2px; display: inline-block;">AEX3F</div> <div style="border: 1px solid black; padding: 2px; display: inline-block;">AEX3R</div> <div style="border: 1px solid black; padding: 2px; display: inline-block;">AEX4F</div> <div style="border: 1px solid black; padding: 2px; display: inline-block;">AEX4R</div>	1 x 44µL w każdej
	XH-PD1.1-2(50)	50 testy	<div style="border: 1px solid black; padding: 2px; display: inline-block;">DNA POL- HLA-A</div> <div style="border: 1px solid black; padding: 2px; display: inline-block;">HLA-A MIX</div>	1 x 60µL 1 x 880µL	<div style="border: 1px solid black; padding: 2px; display: inline-block;">AEX1F</div> <div style="border: 1px solid black; padding: 2px; display: inline-block;">AEX1R</div> <div style="border: 1px solid black; padding: 2px; display: inline-block;">AEX2F</div> <div style="border: 1px solid black; padding: 2px; display: inline-block;">AEX2R</div> <div style="border: 1px solid black; padding: 2px; display: inline-block;">AEX3F</div> <div style="border: 1px solid black; padding: 2px; display: inline-block;">AEX3R</div> <div style="border: 1px solid black; padding: 2px; display: inline-block;">AEX4F</div> <div style="border: 1px solid black; padding: 2px; display: inline-block;">AEX4R</div>	1 x 110 µL w każdej
HLA-B	BS-PD2.1-2(20)	20 testy	<div style="border: 1px solid black; padding: 2px; display: inline-block;">DNA POL- HLA-B</div> <div style="border: 1px solid black; padding: 2px; display: inline-block;">HLA-B MIX</div>	1 x 25µL 1 x 352µL	<div style="border: 1px solid black; padding: 2px; display: inline-block;">BEX1F</div> <div style="border: 1px solid black; padding: 2px; display: inline-block;">BEX2F</div> <div style="border: 1px solid black; padding: 2px; display: inline-block;">BEX2R</div> <div style="border: 1px solid black; padding: 2px; display: inline-block;">BEX3F</div> <div style="border: 1px solid black; padding: 2px; display: inline-block;">BEX3R</div> <div style="border: 1px solid black; padding: 2px; display: inline-block;">BEX4F</div> <div style="border: 1px solid black; padding: 2px; display: inline-block;">BEX4R</div>	1 x 44µL w każdej
	BS-PD2.1-2(50)	50 testy	<div style="border: 1px solid black; padding: 2px; display: inline-block;">DNA POL- HLA-B</div> <div style="border: 1px solid black; padding: 2px; display: inline-block;">HLA-B MIX</div>	1 x 60µL 1 x 880µL	<div style="border: 1px solid black; padding: 2px; display: inline-block;">BEX1F</div> <div style="border: 1px solid black; padding: 2px; display: inline-block;">BEX2F</div> <div style="border: 1px solid black; padding: 2px; display: inline-block;">BEX2R</div> <div style="border: 1px solid black; padding: 2px; display: inline-block;">BEX3F</div> <div style="border: 1px solid black; padding: 2px; display: inline-block;">BEX3R</div> <div style="border: 1px solid black; padding: 2px; display: inline-block;">BEX4F</div> <div style="border: 1px solid black; padding: 2px; display: inline-block;">BEX4R</div>	1 x 110 µL w każdej

Zestaw	Nr katalogowy	Σ	Zawartość odczynników do użycia przed PCR (PRE-PCR) (liczba fiolek)	Zawartość odczynników do użycia po PCR (POST-PCR) (liczba fiolek)	
HLA-C	HH-PD 3.2-2(20)	20 testy	<div style="border: 1px solid black; padding: 2px; display: inline-block;">DNA POL- HLA-C</div> 1 x 25µL <div style="border: 1px solid black; padding: 2px; display: inline-block;">HLA-C MIX</div> 1 x 352µL	<div style="border: 1px solid black; padding: 2px; display: inline-block;">CEX1F</div> <div style="border: 1px solid black; padding: 2px; display: inline-block;">CEX1R</div> <div style="border: 1px solid black; padding: 2px; display: inline-block;">CEX2F</div> <div style="border: 1px solid black; padding: 2px; display: inline-block;">CEX2R</div> <div style="border: 1px solid black; padding: 2px; display: inline-block;">CEX3F</div> <div style="border: 1px solid black; padding: 2px; display: inline-block;">CEX3R</div> <div style="border: 1px solid black; padding: 2px; display: inline-block;">CEX4F</div> <div style="border: 1px solid black; padding: 2px; display: inline-block;">CEX4R</div> <div style="border: 1px solid black; padding: 2px; display: inline-block;">CEX5F</div> <div style="border: 1px solid black; padding: 2px; display: inline-block;">CEX5R</div> <div style="border: 1px solid black; padding: 2px; display: inline-block;">CEX6F</div> <div style="border: 1px solid black; padding: 2px; display: inline-block;">CEX6R</div> <div style="border: 1px solid black; padding: 2px; display: inline-block;">CEX7F</div>	1 x 44µL w każdej
	HH-PD 3.2-2(50)	50 testy	<div style="border: 1px solid black; padding: 2px; display: inline-block;">DNA POL- HLA-C</div> 1 x 60µL <div style="border: 1px solid black; padding: 2px; display: inline-block;">HLA-C MIX</div> 1 x 880µL	<div style="border: 1px solid black; padding: 2px; display: inline-block;">CEX1F</div> <div style="border: 1px solid black; padding: 2px; display: inline-block;">CEX1R</div> <div style="border: 1px solid black; padding: 2px; display: inline-block;">CEX2F</div> <div style="border: 1px solid black; padding: 2px; display: inline-block;">CEX2R</div> <div style="border: 1px solid black; padding: 2px; display: inline-block;">CEX3F</div> <div style="border: 1px solid black; padding: 2px; display: inline-block;">CEX3R</div> <div style="border: 1px solid black; padding: 2px; display: inline-block;">CEX4F</div> <div style="border: 1px solid black; padding: 2px; display: inline-block;">CEX4R</div> <div style="border: 1px solid black; padding: 2px; display: inline-block;">CEX5F</div> <div style="border: 1px solid black; padding: 2px; display: inline-block;">CEX5R</div> <div style="border: 1px solid black; padding: 2px; display: inline-block;">CEX6F</div> <div style="border: 1px solid black; padding: 2px; display: inline-block;">CEX6R</div> <div style="border: 1px solid black; padding: 2px; display: inline-block;">CEX7F</div>	1 x 110µL w każdej

Klasy II							
HLA-DRB1	HH-PD5.2-5(20)	20 testów	DNA POL- DRB1 HLA-DRB1 MIX	1 x 10µL 1 x 370µL	DRB1EX2F DRB1EX3R-2	DRB1EX2R-2 RB-TG344-R	1 x 44µL w każdej
	HH-PD5.2-5(50)	50 testów	DNA POL- DRB1 HLA-DRB1 MIX	1 x 20µL 1 x 920µL	DRB1EX2F DRB1EX3R-2	DRB1EX2R-2 RB-TG344-R	1 x 110µL w każdej
	LG-PD5.2-7(20)	20 testów	DNA POL – DRB1 HLA-DRB1 MIX	1 x 10µL 1 x 370µL	DRB1EX2F DRB1EX3F-7 RB-TG344-R	DRB1EX2R-2 DRB1EX3R-7	1 x 44µL w każdej
	LG-PD5.2-7(50)	50 testów	DNA POL – DRB1 HLA-DRB1 MIX	1 x 20µL 1 x 920µL	DRB1EX2F DRB1EX3F-7 RB-TG344-R	DRB1EX2R-2 DRB1EX3R-7	1 x 110µL w każdej
HLA-DQB1	PQ-PD6.2-2(20)	20 testów	DNA POL- DQB1 HLA-DQB1 MIX	1 x 10µL 1 x 370µL	DQB1EX2F DQB1EX3F	DQB1EX2R DQB1EX3R	1 x 44µL w każdej
	PQ-PD6.2-2(50)	50 testów	DNA POL- DQB1 HLA-DQB1 MIX	1 x 20µL 1 x 920µL	DQB1EX2F DQB1EX3F	DQB1EX2R DQB1EX3R	1 x 110µL w każdej
	AN-PD6.2-3(20)	20 testów	DNA POL – DQB1 HLA-DQB1 MIX	1 x 10µL 1 x 370µL	DQB1EX2F DQB1EX3F	DQB1EX2R-3 DQB1EX3R	1 x 44µL w każdej
	AN-PD6.2-3(50)	50 testów	DNA POL – DQB1 HLA-DQB1 MIX	1 x 20µL 1 x 920µL	DQB1EX2F DQB1EX3F	DQB1EX2R-3 DQB1EX3R	1 x 110µL w każdej

HLA-DPB1	HH-PD10.1(20)	20 testów	DNA POL- DPB1 HLA-DPB1 MIX	1 x 10µL 1 x 370µL	DPB1EX2F DPB1EX2R	1 x 44µL w każdej
	HH-PD10.1(50)	50 testów	DNA POL- DPB1 HLA-DPB1 MIX	1 x 20µL 1 x 920µL	DPB1EX2F DPB1EX2R	1 x 110µL w każdej
	KD-PD10.2-1(20)	20 testów	DNA POL – DPB1 HLA-DPB1 MIX	1 x 10µL 1 x 370µL	DPB1EX1F DPB1EX1R DPB1EX2F DPB1EX2R DPB1EX3F DPB1EX3R DPB1EX4F DPB1EX4R DPB1EX5F DPB1EX5R PB-AG341-R	1 x 44µL each
	KD-PD10.2-1(50)	20 testów	DNA POL – DPB1 HLA-DPB1 MIX	1 x 20µL 1 x 920µL	DPB1EX1F DPB1EX1R DPB1EX2F DPB1EX2R DPB1EX3F DPB1EX3R DPB1EX4F DPB1EX4R DPB1EX5F DPB1EX5R PB-AG341-R	1 x 110µL each

†Zestaw PRE-PCR zawiera fiolkę swoistej dla danego locus mieszaniny PCR (np. **HLA-A MIX**) składającej się z buforu PCR, trifosforanów deoksyrybonukleozydów, MgCl₂, swoistych dla danego locus starterów PCR oraz jednej fiołki polimerazy DNA (np. **DNA POL- HLA-A**). Zestaw POST-PCR zawiera startery do sekwencjonowania (np. **AEX1F**).

Wymagania dotyczące przechowywania

Pudełka ze składnikami PRE-PCR i POST-PCR mogą być rozdzielone i przechowywane w przeznaczonych do PRE-PCR i POST-PCR zamrażalnikach. Składniki zestawu mogą być używane do daty upływu ważności, podanej na zewnętrznych pojemnikach zestawu, i tolerują do 25 cykli zamrażania i odmrażania, gdy przechowywane są w temperaturze -20°C (dopuszczalny jest zakres temperatur od -15°C do -25°C).

Przyspieszone testy trwałości zestawów HLA-A, -B, -C, -DRB1, -DQB1 i -DPB1 wykazały, że okres ich trwałości wynosi dwa i pół roku od daty produkcji, gdy przechowywane są w temperaturze -20°C. Podczas, gdy testowanie potwierdzające w czasie rzeczywistym jest w toku, zaleca się usilnie NIE używanie tych zestawów po upływie ich daty ważności.

Aby utrzymać optymalne działanie zestawu, należy przed użyciem wyjąć składniki zestawu z miejsca, gdzie są przechowywane w temperaturze -20°C, i szybko odmrozić w temperaturze pokojowej. Składniki zestawu, za wyjątkiem polimerazy, należy wtedy poddać łagodnemu worteksowaniu, aby się upewnić, że składniki każdej próbki zostały odpowiednio zmieszane po odmrożeniu. Po użyciu należy natychmiast przywrócić zestawy/składniki do ich miejsca przechowywania w temperaturze -20°C.

Nie dostarczone materiały, odczynniki i sprzęt

PCR

1. Sterylizowana woda
2. Pipety elektroniczne i mechaniczne i końcówki pipet z barierą dla aerozolu
3. Termocykler z dogrzewaną pokrywą
Te zestawy były poddane weryfikacji przy użyciu następujących termocyklorów:
MJ Research PTC 225 DNA Engine DYAD™, Applied Biosystems™ by Life Technologies™, termocykler Veriti™ Gene Amp® PCR System 9700 i Eppendorf Mastercycler® Pro.
Użycie innych systemów z tymi zestawami wymaga poddania tych systemów weryfikacji przez użytkownika.
4. Cienkościenne próbki reakcyjne do termocyklera o pojemności 0,2mL (paski do 8 dołków lub płytki do 96 dołków)
Należy używać próbek zalecanych dla używanego termocyklera.
5. Sterylne próbki 1,5mL
6. Sterylny obszar roboczy, np. komora biologiczna lub wyciąg laboratoryjny.
7. Wirówka stołowa z adapterami na płytki i możliwością osiągnięcia przyspieszenia 2500 x g
8. Worteks

Elektroforeza agarozowa

9. Aparat do elektroforezy agarozowej
10. 1% żel agarozowy (gatunek dla molekularnej biologii) z TBE, zawierający 0,1 □g/mL bromku etydyny.
11. Bufor obciążający
12. Marker PCR pokrywający zakres 300 – 1300 bp

13. Transiluminator UV

Oczyszczanie produktów reakcji PCR

14. ExoSAP (USB® ExoSAP-IT® nr kat 78200 na 100 reakcji lub Illustra™ ExoProStar™ nr kat. US77702 na 100 reakcji)
15. 2 mM MgCl₂ (Dostępne do nabycia w firmie CareDx Pty Ltd, kod produktu MgCl₂-1.0(50) lub MgCl₂-1.0(3000))
16. Wstrząsarka

Użycie innych metod oczyszczania metodą PCR wymaga weryfikacji przez użytkownika przed użyciem.

Reakcja sekwencjonowania

17. Zestaw do cyklicznego sekwencjonowania BigDye® Terminator v3.1 lub v1.1, Applied Biosystems™ by Life Technologies™.
18. 5x stężony bufor do sekwencjonowania (CareDx Pty Ltd, kod produktu SEQ BUF-2.0(400) lub SEQ BUF-2.0(5000)) lub BigDye® Terminator v3.1 lub v1.1 5X stężony bufor do sekwencjonowania, Applied Biosystems™ firmy Life Technologies™.

Oczyszczanie produktów reakcji sekwencjonowania

19. 125 mM EDTA, pH 8,0 (dostępny do nabycia w firmie CareDx Pty Ltd, kod produktu EDTA-3.0(200) lub EDTA-3.0(5000)).
20. Etanol absolutny i 80%. Do każdego przebiegu konieczny jest świeżo przygotowany 80% etanol składający się z absolutnego etanolu i sterylnej wody. **NIE UŻYWAĆ DENATUROWANEGO ETANOLU** (w niektórych krajach zwanego także spirytusem metylowanym).

Użycie innych metod oczyszczania produktów reakcji sekwencjonowania wymaga weryfikacji przez użytkownika przed użyciem.

Denaturacja i elektroforeza produktów reakcji sekwencjonowania

21. Formamid Hi-Di™, Applied Biosystems™ by Life Technologies™, kod produktu 4311320
22. Automatyczny sekwenator DNA i akcesoria (np. Applied Biosystems™ by Life Technologies™ ABI Prism® 3730), w tym moduł pobierania danych i oprogramowanie.

Te zestawy były testowane i weryfikowane przy pomocy sekwenatorów kapilarnych i oprogramowania Applied Biosystems™ by Life Technologies™ 3100, 3730 i 3730xl.

Użycie innych metod denaturacji i platform sekwencjonowania wymaga weryfikacji przez użytkownika przed użyciem.

23. Oprogramowanie do analizy sekwencji HLA (np. ASSIGN™ SBT, wersja 3.6+ lub wyższa, firmy CareDx Pty Ltd).

Wymagania dotyczące próbki

1. Sterylizowana woda (kontrola ujemna/bez matrycy).

2. Ludzki genomowy DNA o wysokiej masie cząsteczkowej (zakres stężeń 20-100ng/μL w buforze Tris/EDTA i o stosunku $OD_{260/280} > 1,8$), wyekstrahowany z próbek pełnej krwi, antykoagulowanych przy użyciu cytrynianu sodowego z kwasem (ACD) lub EDTA. NIE używać próbek pełnej krwi zawierających heparynę.




Ostrzeżenia i środki ostrożności

- Ten zestaw musi być używany przez wyszkolony i autoryzowany personel.
- Ze wszystkimi próbkami, sprzętem i odczynnikami należy się obchodzić zgodnie ze standardami dobrej praktyki laboratoryjnej. W szczególności, wszystkie materiały pochodzące od pacjenta należy traktować jako potencjalnie zakażone. Usilnie zalecane jest używanie rękawic i fartuchów laboratoryjnych. Przy obchodzeniu się i usuwaniu wszystkich materiałów związanych z próbką należy przestrzegać przepisów lokalnych i krajowych.
- Żaden ze składników zestawu NIE zawiera niebezpiecznych substancji.
- NIE używać odczynników po upływie daty ważności.
- Używanie składników zestawu pochodzących z różnych serii zestawu NIE jest zalecane. Używanie takich składników może wpłynąć na jakość analizy.
- Użycie odczynników nie włączonych do tego zestawu ani nie wymienionych w części „Nie dostarczone materiały, odczynniki i sprzęt” (np. alternatywnej polimerazy Taq) NIE jest zalecane. Używanie takich składników może wpłynąć na jakość analizy.
- Należy dołożyć starań, aby zapobiec krzyżowemu zanieczyszczeniu próbek DNA. Kiedykolwiek jest to możliwe, należy zmieniać końcówki do pipet między próbkami.
- Działania Pre-PCR i Post-PCR muszą być ściśle fizycznie rozdzielone. Należy używać specjalnie wyznaczonego sprzętu, odczynników i fartuchów laboratoryjnych.
- Bromek etydyny jest substancją potencjalnie rakotwórczą. Przy przygotowywaniu i obchodzeniu się z żelami należy zawsze używać rękawic ochronnych. Żeli i buforów zawierających bromek etydyny należy pozbywać się zgodnie z lokalnymi i krajowymi wytycznymi.
- Przy podglądzie i fotografowaniu żeli agarozowych pod światłem UV należy zawsze unikać bezpośredniej ekspozycji i używać odpowiedniej ochrony twarzy blokującej promienie UV, jednorazowych rękawic i fartucha laboratoryjnego.

Symbole

Użyto następujących niestandardowych symboli:

Symbol	Opis
HLA-X MIX	Swoista dla danego locusa mieszanina PCR
DNA POL- XXXX	Polimeraza DNA
AEX1F	Starter przedni do sekwencjonowania eksonu 1 genu HLA-A Inne

Symbol	Opis
	startery do sekwencjonowania opisane są w części „Skład zestawu” i w tabeli 4.
	Data produkcji (wymagana dla rynków poza UE).

Procedura

1. PCR

- 1.1. Dla każdego namnażanego locus i dla każdej indywidualnej badanej próbki konieczne będzie przygotowanie oddzielnej reakcji PCR. Każdy przebieg musi zawierać odpowiednie dodatnie kontrole, zawierające znany/-e genotyp/y, oraz przynajmniej jedną kontrolę ujemną dla każdego namnażanego locus.
- 1.2. Należy przygotować nowy roztwór mieszaniny amplifikacyjnej PCR (PCR master mix) za każdym razem, gdy przeprowadzana jest PCR. Prędko odmrozić swoistą dla danego locus mieszaninę PCR w temperaturze pokojowej. Po rozmrożeniu, szybko worteksować.
- 1.3. Rozdzielić do sterylnej probówki liczbę mieszanin PCR i polimerazy DNA wymaganą dla ilości próbek, które mają być badane (objętości na reakcję podane są poniżej, w tabeli 1). Worteksować ten roztwór impulsowo 3-4 razy.

Locus	A	B	C	DRB1	DQB1	DPB1
Swoista dla danego locusa mieszanina PCR	16µL	16µL	16µL	16,7µL	16,7µL	16,7µL
np. HLA-A MIX						
Polimeraza DNA	1µL	1µL	1µL	0,3µL	0,3µL	0,3µL
np. DNA POL- HLA-A						

Tabela 1: Skład mieszaniny amplifikacyjnej wymagany dla każdej próbki.

- 1.4. Rozdzielić 17µL mieszaniny amplifikacyjnej do każdego dołka reakcyjnej.
- 1.5. Dodać 3µL DNA z próbki lub odpowiednich dodatnich kontroli do każdego dołka reakcyjnego. Dodać 3µL sterylnej wody do dołka reakcyjnego ujemnej kontroli.
- 1.6. Zamknąć szczelnie dołki reakcji. Delikatnie wymieszać przez worteksowanie i krótko wirować.
- 1.7. Umieścić dołki reakcyjne w termocyklerze i przeprowadzać reakcję w niżej podanych warunkach obiegu cieplnego.

95°C - 10 minut
96°C - 20 sekund
60°C - 30 sekund
72°C - 3 minuty } 33 obiegi

15°C - wstrzymanie

1.8. Pełna amplifikacja zabiera około 2,5 godzin

1.9. Po zakończeniu PCR należy wyjąć dołki reakcyjne/płytkę z termocyklera i kontynuować do elektroforezy żelowej lub przechować w temperaturze 4°C do momentu, gdy będą potrzebne.

UWAGA: Amplikony powinny zostać oczyszczone przy użyciu ExoSAP w ciągu 24 godzin od zakończenia PCR.

2. Elektroforeza agarozowa

2.1. Pomyślną amplifikację należy potwierdzić za pomocą elektroforezy agarozowej, używając 2µL każdej reakcji PCR w połączeniu z 5µL buforu obciążającego (alternatywne objętości buforu obciążającego należy zweryfikować przed użyciem) Zalecane jest użycie 1% żeli agarozowych.

2.2. Liczba i oczekiwane wielkości powstałych ampikonów będą się różnić zależnie od locusa i genotypu próbki. W tabeli 2 podane są oczekiwane wielkości ampikonów PCR.

Locus	Oczekiwane wielkości fragmentów
HLA-A	≈ 2 kbp
HLA-B	≈ 2 kbp
HLA-C	≈ 1,1 kbp i 1,4 kbp
HLA-DRB1	≈ 450 bp - 850 bp (HH-PD5.2-5) ≈ 630 bp - 980 bp (LG-PD5.2-7) Rozłożenie fragmentów będzie się różnić zależnie od obecności określonych grup alleli
HLA-DQB1	≈ 300 bp i 500 bp (PQ-PD6.2-2) ≈ 400 bp i 500 bp (AN-PD6.2-3)
HLA-DPB1	≈ 400 bp (HH-PD10.1) ≈ 400 bp, ≈ 780 bp i ≈ 1470 bp (KD-PD10.2-1)

Tabela 2: Oczekiwane wielkości produktów każdego oznaczenia.

3. Oczyszczanie produktów reakcji PCR

UWAGA: Produkty tych reakcji PCR mogą być oczyszczane za pomocą innych systemów niż ExoSAP-IT® lub ExoProStar™ (np. Agencourt® AMPure® XP lub systemy bazowane na kolumnach). Zaleca się usilnie weryfikację tych procedur przed kontynuowaniem oczyszczania przy ich pomocy. Jeśli używana będzie obróbka ExoSAP, zalecane jest używanie niżej opisanej procedury.

3.1. Należy przygotować główną mieszaninę reakcyjną zawierającą 4µL ExoSAP-IT® lub ExoProStar™ i 8µL 2 mM MgCl₂ na każdą oczyszczaną próbkę. Łagodnie worteksować impulsowo, aby wymieszać. Rozdzielić 12µL mieszaniny reakcyjnej do dołka reakcyjnego każdej reaktywnej próbki. Zamknąć szczelnie dołki, worteksować, po czym umieścić na wstrząsarce lub delikatnie worteksować przez 2 minuty. Krótco wirować przed umieszczeniem w termocyklerze. Nastawić przebieg w termocyklerze według następującego profilu:

37°C – 30 minut
 80°C – 15 minut
 4°C - wstrzymanie

3.2. Po zakończeniu rozcieńczenia oczyszczony produkt 1:4 sterylną wodą. Ten etap rozcieńczenia zapewni wystarczającą ilość matrycy, aby móc wykonać sekwencjonowanie i zapewni wystarczająco wysokie stężenie matrycy, aby dane z sekwencjonowania były dobrej jakości.

UWAGA: Jeśli obserwowane są konsekwentnie wysokie sygnały i związane z tym wysokie szумы i artefakty, może być wymagane zwiększenie czynnika rozcieńczenia (np. 1:8). Słabsze produkty reakcji PCR mogą wymagać niższego czynnika rozcieńczenia.

3.3. Próbkę poddane działaniu ExoSAP można przechowywać w temperaturze 4°C do czasu, gdy będą gotowe do użycia. Próbkę tę można przed użyciem przechowywać w temperaturze 4°C przez okres do tygodnia, ale długoterminowo należy je przechowywać w temperaturze -20°C.

4. Reakcja sekwencjonowania

UWAGA: W przypadkach, gdy jest potrzeba rozwiązania heterozygotycznych niejednoznaczności przy pomocy hemizygotycznych starterów do sekwencjonowania, takich jak HARPS®, należy się zapoznać z instrukcją użycia starterów OLERUP SBT™ HARPS®.

4.1. W tabeli 3 wymienione są startery do sekwencjonowania, które należy użyć dla każdego locusa.

HLA-A		HLA-B		HLA-C	
AEX1F	AEX1R	BEX1F	BEX2F	CEX1F	CEX1R
AEX2F	AEX2R	BEX2R	BEX3F	CEX2F	CEX2R
AEX3F	AEX3R	BEX3R	BEX4F	CEX3F	CEX3R
AEX4F	AEX4R	BEX4R		CEX4F	CEX4R
				CEX5F	CEX5R
				CEX6F	CEX6R
				CEX7F	
HLA-DRB1†		HLA-DQB1		HLA-DPB1	
DRB1EX2F	DRB1EX2R-2	DQB1EX2F	DQB1EX2R	DPB1EX2F	DPB1EX2R
DRB1EX3R-2^	RB-TG344-R†	DQB1EX3F	DQB1EX3R		
Lub		Lub		Lub	

DRB1EX2F	DRB1EX2R-2	DQB1EX2F	DQB1EX2R-3	DPB1EX1F	DPB1EX1R
DRB1EX3F-7	DRB1EX3R-7	DQB1EX3F	DQB1EX3R	DPB1EX2F	DPB1EX2R
RB-TG344-R†				DPB1EX3F	DPB1EX3R
				DPB1EX4F	DPB1EX4R
				DPB1EX5F	DPB1EX5R
				PB-AG341-R*	

Tabela 3: Startery do sekwencjonowania dostarczone dla każdego locusa.

†RB-TG344-R to starter HARP® skierowany na dymorfizm kodonu 86. Użycie go jest opcjonalne.

*PB-AG341-R to starter HARP® skierowany na dymorfizm kodonu 85 w DPB1. Użycie go jest opcjonalne.

^DRB1EX3R-2 to starter sekwencjonowania DRB1 w zestawach HH-PD5.2-5, który zachowuje się podobnie jak HARP i jest przeznaczony do sekwencjonowania następujących grup alleli: *03, *08, *11, *12, *13, *14, *15 oraz *16. W zależności od sekwencjonowanego rodzaju próbki starter ten będzie dawał dane heterozygotyczne, hemizygotyczne lub brak danych sekwencjonowania. Podczas analizowania danych DRB1EX3R-2 w ASSIGN™ wobec odniesienia DRB1-FullX2, uzyskane dane eksonu 3 będą analizowane na oddzielnej warstwie i umożliwią rozdzielanie szeregu niejednoznaczności w eksonie 3, takich jak niejednoznaczność DRB1*14:01 wobec *14:54. Jej zastosowanie jest opcjonalne zależnie od stosowanej przez laboratorium strategii typowania. Nie dotyczy to zestawów LG-PD5.2-7, ponieważ dla eksonu 3 dostępne jest sekwencjonowanie dwukierunkowe.

4.2. Do każdej reakcji sekwencjonowania należy przygotować świeżą mieszaninę starterów do sekwencjonowania i trzymać ją na lodzie. Skład i objętość mieszaniny podane są **na każdą próbkę**.

Składnik	Objętość
Starter do sekwencjonowania	2μL
Sterylna woda	11,5μL
Terminatory BigDye®	1μL
5X bufor do sekwencjonowania	3,5μL

4.3. Wymieszać delikatnie każdą mieszaninę reakcyjną, worteksując impulsowo.

4.4. Rozdzielić po 18μL mieszaniny reakcyjnej do każdej reakcyjnej probówki/dołka.

UWAGA! W przypadkach, gdy w przebiegu reakcji uczestniczy mała liczba próbek z wieloma starterami do sekwencjonowania, dopuszczalne jest dozowanie startera do sekwencjonowania (2μL) bezpośrednio do poszczególnych dołków reakcyjnych. Można wtedy stworzyć główną mieszaninę reakcyjną złożoną ze sterylnej wody, terminatorów BigDye® oraz 5x stężonego buforu reakcyjnego do sekwencjonowania, z czego 16μL będzie rozdzielane do każdego dołka reakcyjnego. Zaleca się usilnie, aby użycie innych procedur zostało zweryfikowane przez użytkownika przed ich zastosowaniem.

4.5. Dodać 2μL oczyszczonego produktu reakcji PCR do każdego odpowiedniego dołka.

UWAGA: Należy dołożyć starań, aby zapobiec krzyżowemu zanieczyszczeniu reakcji sekwencjonowania.

- 4.6. Zamknąć szczelnie dołki reakcyjne, wymieszać delikatnie i krótko wirować, aby się upewnić, że zawartość znajduje się na dnie każdego dołka.
- 4.7. Umieścić probówki reakcyjne w termocyklerze i przeprowadzić reakcje w niżej podanych warunkach obiegu cieplnego.

Liczba obiegów	Temperatura i czas
25	96°C – 10 sekund 50°C – 5 sekund 60°C – 2 minuty
1	4°C - wstrzymanie

- 4.8. Po zakończeniu programu wyjąć dołki reakcyjne/płytki z termocyklera i przejść bezpośrednio do oczyszczania produktów reakcji lub przechowywać w ciemności w temperaturze 4°C do momentu, gdy będą potrzebne. Zaleca się aby oczyszczenie próbek i reakcje w sekwenatorze DNA wykonane zostały w ciągu 24 godzin

5. Oczyszczanie produktów reakcji sekwencjonowania

UWAGA: Oczyszczanie produktów reakcji może być przeprowadzane w inny sposób, niż opisane poniżej wytrącanie etanolem. Zaleca się usilnie weryfikację tych procedur przed kontynuowaniem oczyszczania przy ich pomocy.

- 5.1. Probówki/płytki krótko wirować przed kontynuowaniem procedury. Jeśli w czasie obiegu cieplnego używane były wielorazowe pokrywki/kapturki, należy je oznakować, aby uniknąć krzyżowego zanieczyszczenia.
- 5.2. Ostrożnie zdjąć uszczelnienie.
- 5.3. Do każdej probówki reakcyjnej dodać 5µL 125mM EDTA, pH8,0. Upewnić się, że EDTA dociera do dna probówki.
- 5.4. Dodać 60µL 100% etanolu do każdego dołka reakcyjnego. Zamknąć szczelnie dołki/płytkę i worteksować krótko, ale dokładnie, aby osiągnąć dokładne wymieszanie.
- 5.5. Odwirować produkty wydłużania wirując przy przyspieszeniu 2000g przez 45 minut. **NATYCHMIAST PRZEJŚĆ DO NASTĘPNEGO ETAPU.** Jeśli to nie jest możliwe, przed kontynuacją do następnego etapu powtórzyć wirowanie przez dodatkowe 10 minut.
- 5.6. Zdjąć nakrywki dołków reakcyjnych i wylać supernatant odwracając probówki na ręcznik papierowy lub serwetkę.
- 5.7. Umieścić te odwrócone probówki oraz ręcznik papierowy lub serwetkę w wirówce. Wirować przy 350g przez 1 minutę, aby usunąć wszelki pozostały supernatant.
- 5.8. Wyjąć dołki reakcyjne z wirówki i umieścić dnem do dołu na stole. Wyrzucić papierowy ręcznik lub serwetkę.
- 5.9. Przygotować świeży 80% roztwór etanolu używając absolutnego etanolu i sterylizowanej wody.
- 5.10. Dodać do każdego dołka 60µL 80% etanolu. Zamknąć szczelnie dołki i krótko worteksować.
- 5.11. Wirować przy 2000g przez 5 minut.

5.12. Powtórzyć etapy 5.6 i 5.7.

5.13. Wyjąć probówki z wirówki i wyrzucić papierowy ręcznik. Zakryć ponownie szczelnie probówki i przejść do etapu denaturacji, lub przechować w ciemności w temperaturze -20°C. Zalecane jest, żeby rozdzielanie produktów w sekwenatorze DNA przeprowadzane było w ciągu 24 godzin od rozpoczęcia reakcji sekwencjonowania.

6. Denaturacja i elektroforeza produktów reakcji sekwencjonowania

UWAGA! Przeprowadzenie opisanej tu procedury denaturacji produktów wydłużania w Hi-Di™ Formamide może nie być konieczne, jeśli użyto procedur oczyszczania innych niż wytrącanie etanolem. Zaleca się usilnie, aby użytkownicy weryfikowali inne procedury przed kontynuacją.

6.1. Dodać do każdej probówki 12µL formamidu Hi-Di™. Worteksować dołki/płytki i krótko wirować.

6.2. Inkubować dołki reakcyjne przez 5 minut w temperaturze 98°C. Po inkubacji należy zadbać o to, żeby dołki reakcyjne zostały szybko ochłodzone do temperatury pokojowej (np. przez umieszczenie ich na lodzie lub przeprowadzenie etapów denaturacji i chłodzenia w termocyklerze) zanim zostaną umieszczone w sekwenatorze. Jeśli nie jest możliwe przeprowadzenie natychmiast dalszego przebiegu płytek, należy je przechować w temperaturze 4°C do momentu, gdy będą potrzebne.

UWAGA: Należy zadbać o to, aby w dołkach reakcyjnych nie było żadnych bąbelków powietrza. mogą one bowiem wnikać do kapilarów i uszkodzić je.

6.3. Załadować płytkę reakcyjną do automatycznego sekwenatora i przygotować plik kolekcji danych zgodnie z zaleceniami jego producenta.

6.4. Następujące parametry instrumentu zostały zweryfikowane przez producenta przy użyciu zestawu do sekwencjonowania Big Dye® Terminator v3.1 i polimeru POP-7™. Parametry te mogą wymagać weryfikacji przez użytkownika, gdy używane są inne polimery, inne systemy chemiczne do sekwencjonowania i inne instrumenty. Dokładne instrukcje i pomoc można otrzymać po zapoznaniu się z Podręcznikiem użytkownika odpowiedniego instrumentu (np. należy się upewnić, że zestawienie zestawu barwników jest prawidłowe w odniesieniu do stosowanych reakcji chemicznych; na przykład reakcje chemiczne wykonywane z użyciem zestawu v1.1 Big Dye® Terminator będą wymagały innego zestawu barwników).

Parametr	Ustawienie
Dye set (Zestaw odczynników Dye)	Z_BigDyeV3
Mobility file (Plik Mobility)	KB_3730_POP7_BDTV3
Basecaller	KB.bcp
Run Module (Moduł operacji)	Regular FastSeq50_POP7
Injection time (Czas iniekcji)	15 sekund
Run time (Czas działania)	3000 sekund

6.5. Należy używać oprogramowania pobierania danych w celu przetworzenia zebranych surowych danych i stworzenia plików sekwencji. Dokładne instrukcje i pomoc można otrzymać po zapoznaniu się z Podręcznikiem użytkownika odpowiedniego instrumentu.

7. Edycja i analiza elektroferogramów

Zestawy OLERUP SBT™ zostały opracowane i zweryfikowane przy użyciu oprogramowania OLERUP ASSIGN™ SBT, opracowanego przez firmę CareDx Pty Ltd. Zaleca się, aby użytkownicy posługiwali się oprogramowaniem ASSIGN™ SBT wersji 3.6+ i wyższych, gdyż ustawienia i pliki referencyjne stosowane w tych wersjach oprogramowania opracowane zostały specjalnie dla zestawów do typowania OLERUP SBT™ i HARPS®. Bardziej szczegółowe informacje dotyczące działania tych oprogramowań można uzyskać zapoznając się z odpowiednimi podręcznikami użytkownika, które są dostępne do pobrania w witrynie internetowej firmy Olerup (<http://www.olerup.com>).

Oparte na sekwencjonowaniu dane typowania wygenerowane przy użyciu zestawów do typowania OLERUP SBT™ powinny być analizowane wobec następujących plików referencyjnych ASSIGN™, które są dostarczone przez firmę CareDx Pty Ltd:

Oznaczenie	Kod produktu	Plik referencyjny ASSIGN
OLERUP SBT™ HLA-A	XH-PD1.1-2	A.xml
OLERUP SBT™ HLA-B	BS-PD2.1-2	B.xml
OLERUP SBT™ HLA-C	HH-PD3.2-2	C.xml lub Cw.xml
OLERUP SBT™ HLA-DRB1	HH-PD5.2-5	DRB1-FullX2.xml
	LG-PD5.2-7	527_DRB1.xml
OLERUP SBT™ HLA-DQB1	PQ-PD6.2-2	DQB1.xml
	AN-PD6.2-3	623_DQB1.xml
OLERUP SBT™ HLA-DPB1	HH-PD10.1	DPB1.xml
	KD-PD10.2-1	DPB1.xml

Charakterystyka działania

Dokładność

Panele do 93 próbek pochodzących z programu badania sprawności (proficiency testing program) (2008- 2010) UCLA International DNA Exchange (Centrum Międzynarodowej Wymiany DNA Uniwersytetu Kalifornijskiego w Los Angeles), używane do lokalnego testu zestawów OLERUP SBT™ dały następujące wyniki:

Locus	Liczba testowanych próbek	Czułość diagnostyczna (% pomyślnych reakcji PCR)	Swoistość diagnostyczna (% uzyskanych genotypów)	Liczba niezgodnych próbek	Liczba heterozygotycznych próbek	Liczba unikalnych alleli
HLA-A	81	100%	100%	0	74	20
HLA-B	82	100%	98,8%	0	79	81
HLA-C	39	97,5%	97,5%	0	35	21
HLA-DRB1	93	96,7%	96,7%	0	84	39

Locus	Liczba testowanych próbek	Czułość diagnostyczna (% pomyślnych reakcji PCR)	Swoistość diagnostyczna (% uzyskanych genotypów)	Liczba niezgodnych próbek	Liczba heterozygotycznych próbek	Liczba unikalnych alleli
HLA-DQB1 (PQ-PD6.2-2)	42	100%	100%	0	36	14
HLA-DQB1 (AN-PD6.2-3)	38	100%	100%	0	34	15
HLA-DPB1 (HH-PD10.1)	77	100%	100%	0	60	18
HLA-DPB1 (KD-PD10.2-1)	16	100%	100%	2*	14	13

* Dwie niezgodne próbki zawierały dodatkowe informacje sekwencyjne poza eksonem 2, które nie zostały zgłoszone przez program badania sprawności (proficiency testing program) UCLA International DNA Exchange (Centrum Międzynarodowej Wymiany DNA Uniwersytetu Kalifornijskiego w Los Angeles). Jedna próbka zawierała 131:01, ale została zgłoszona jako 13:01 przez program badania sprawności Centrum Międzynarodowej Wymiany DNA UCLA. Allele różniły się eksonami 3 i 4. Inna próbka zawierała 107:01, ale została zgłoszona jako 13:01 przez program badania sprawności Centrum Międzynarodowej Wymiany DNA UCLA. Allele te różniły się w eksonie 1.

W przypadku zestawów OLERUP SBT™ HLA-DRB1 (kod produktu LG-PD5.2-7) do testów wewnętrznych typowano także panel 23 dobrze scharakteryzowanych próbek obejmujących szeroki zakres alleli. Ponadto typowano także panel 293 pochodzących z zewnątrz próbek bez wcześniejszej wiedzy na temat innych danych typowania HLA. Próbki te badano także za pomocą oznaczenia OLERUP SBT™ HLA-DQB1 (PQ-PD6.2-2). W tych przypadkach, gdzie uzyskano wynik homozygotyczny, powiązania DQB1/ DRB1 dla tych próbek badano w celu potwierdzenia wyniku oraz wykrywania przypadków możliwego występowania niewykrycia allelu.

Badanie dało następujące wyniki:

Locus	Liczba próbek	Czułość diagnostyczna	Swoistość diagnostyczna	Liczba niezgodnych próbek	Liczba heterozygotycznych próbek	Liczba unikalnych alleli
HLA-DRB1	23	100%	100%	0	23	12
	286*	97,9%	99,6%	0	253	33

* Amplifikacja sześciu próbek nie powiodła się ze względu na niską jakość próbek DNA. Stwierdzono, że jedna próbka zawiera zanieczyszczające DNA, którego źródło wystąpiło w laboratorium, z którego uzyskano próbki. W wyniku zanieczyszczenia dla tej próbki nie mógł być uzyskany genotyp.

Analiza sekwencji odcinków starterów użytych do PCR i sekwencjonowania oraz badania oceny działania nie zidentyfikowały żadnych powszechnych i dobrze udokumentowanych alleli, które nie są amplifikowane przy użyciu tych zestawów w zalecany sposób. Dalsze informacje można uzyskać z dokumentu OLERUP SBT™ Primer Analysis, dostępnego do pobrania wraz z każdym wydaniem bibliografii oprogramowania OLERUP ASSIGN™ SBT w witrynie internetowej firmy Olerup (<http://www.olerup.com>).

Granica wykrywalności

Zalecany stężeniem ludzkiego genomowego DNA o wysokiej masie cząsteczkowej jest 20-100ng/μL. Wewnętrzne próby wykazały, że nawet próbki o stężeniu tak niskim jak 5ng/μL też mogą być używane. Prawidłowe genotypy otrzymano również z DNA o niskiej jakości lub z popękanego DNA.

Swoistość

Zestawy CareDx Pty Ltd's OLERUP SBT™ są swoistymi oznaczeniami dla danego locusa. Użycie tych zestawów zgodnie z instrukcją powinno amplifikować tylko jeden locus. W większości przypadków użycie starterów do sekwencjonowania zawartych w każdym z zestawów doprowadzi do typowania HLA bez potrzeby dalszego uściślenia. W przypadkach, gdy pozostają heterozygotyczne niejednoznaczności, zalecane jest użycie uściślających starterów (np. OLERUP SBT™ HARPS®).

Należy nadmienić, że mutacje na odcinkach starterów amplifikacji lub sekwencjonowania są możliwe i mogą spowodować niewykrycie allela. Próbki, których rezultaty typowania sugerują homozygotyczność muszą być zweryfikowane przy użyciu innych procedur.

Ograniczenia i przestrogi

- Zaleca się usilnie, aby użytkownicy zweryfikowali te zestawy przed użyciem ich w laboratorium, używając próbek, których typ HLA został określony za pomocą innych procedur bazowanych na molekularnych metodach. W szczególności, użytkownik musi przeprowadzić weryfikację przed zastosowaniem w przypadku wszelkich odchyień od tej procedury (np. użycie innych procedur przeprowadzania PCR lub oczyszczania produktów reakcji sekwencjonowania).
- Te zestawy zostały zweryfikowane przy użyciu paneli próbek, których genotypy reprezentują szeroki zakres alleli. Należy jednak zauważyć, że mogą być obecne rzadkie allele, i allele polimorficzne na odcinkach starterów używanych do PCR i sekwencjonowania, których amplifikacja lub sekwencjonowanie może nie być możliwe.
- Typowanie HLA na podstawie sekwencji ma właściwości, które umożliwiają czynnikom innym niż mieszanina reakcyjna PCR spowodować wybiórczą amplifikację lub niewykrycie allela. Dlatego rezultaty typowania wskazujące na homozygotyczność powinny być potwierdzone przy użyciu innych metod i/lub genotypowania członków rodziny.
- Każdy przebieg PCR musi obejmować kontrolę dodatnią (ludzki DNA) i kontrolę ujemną (sterylną wodę). Kontrola dodatnia musi wytworzyć produkt reakcji PCR o odpowiedniej wielkości, zależnie od poddanego amplifikacji locusa i wynikająca z tej reakcji sekwencja musi odpowiadać genotypowi próbki. W ujemnej kontroli matrycy żadnego eksperymentu nie powinien być obecny żaden produkt reakcji PCR. Jeśli widoczny jest pasek, na którymś poziomie musiało zaistnieć zanieczyszczenie i trzeba powtórzyć przebieg.
- Czasem mogą być widoczne większe, niewyraźne produkty PCR. Te dodatkowe paski nie mają wpływu na rezultaty ani jakość sekwencji.

Licencja

Zestawy OLERUP SBT™ zawierają polimerazę Hot Start (DNA POL) GoTaq®, której producentem jest Promega do dystrybucji przez CareDx Pty Ltd. Licencjonowana do firmy

Promega i objęta Patentami Stanów Zjednoczonych Nr 5.338.671 i 5.587.287 i odpowiadającym im patentom zagranicznym.

Bibliografia

1. Sayer D, Whidborne R, Brestovac B, Trimboli F, Witt C, Christiansen F (2001): *HLA-DRB1 DNA sequencing based typing: an approach suitable for high throughput typing including unrelated bone marrow registry donors*. Tissue Antigens **57**: 46-54.
2. Sayer D, Whidborne R, DeSantis D, Rozemuller EH, Christiansen F, Tilanus MG (2004). *A multicentre international evaluation of single-tube amplification protocols for sequencing-based typing of HLA-DRB1 and HLA-DRB3, 4, 5*. Tissue Antigens **63**: 412-423.
3. *ASSIGN™ SBT v3.6+ Operator Manual*, CareDx Pty Ltd
4. *ASSIGN™ SBT v4.7 Operator Manual*, CareDx Pty Ltd
5. *OLERUP ASSIGN™ SBT v471 Operator Manual*, CareDx Pty Ltd
6. Więcej informacji dotyczących Program Wymiany DNA UCLA można znaleźć pod adresem: <http://www.hla.ucla.edu/cellDNA/DNA/programInfo.htm>.
7. Aktualne allele HLA można znaleźć pod adresem <http://www.ebi.ac.uk/imgt/hla>.

Rozwiązywanie problemów

Problem	Możliwa przyczyna (przyczyny)	Rozwiązanie
Brak produktu reakcji PCR lub jest słaby.	Niska jakość DNA	Należy ocenić jakość DNA za pomocą żelowej elektroforezy. Nienaruszony DNA powinien mierzyć około 3kb nie rozmyte na żelu, lub tylko z niewielkim rozmyciem. Należy ponownie wyekstrahować DNA i powtórzyć PCR, jeśli to możliwe.
	Niedostateczna ilość DNA użyta do PCR	Należy sprawdzić, czy stężenie DNA wynosi 20 - 100 ng/μL. Należy ponownie wyekstrahować DNA i powtórzyć PCR, jeśli to możliwe.
	Obecność inhibitorów PCR w genomowym DNA.	Należy unikać używania próbek pełnej krwi zawierających heparynę. Należy ponownie wyekstrahować DNA i powtórzyć PCR, jeśli to możliwe.
	Nie dodano polimerazy DNA do mieszaniny reakcyjnej lub mieszanina reakcyjna nie została dostatecznie wymieszana przed dodaniem	Powtórzyć PCR. Należy zadbać o to, aby składniki mieszaniny reakcyjnej zostały dodane i dostatecznie wymieszane przez

Problem	Możliwa przyczyna (przyczyny)	Rozwiązanie
	próbek.	worteksowanie.
	Problemy z obiegiem cieplnym	Sprawdzić parametry przebiegu obiegu cieplnego. Sprawdzić historię przebiegu, aby się upewnić, że nie został przedwcześnie zakończony. Zadbaj o to, aby termocykler działał zgodnie ze specyfikacjami producenta i żeby był regularnie konserwowany.
	Do żelu nie dodano bromku etydyny.	Zanurzyć żel w roztworze barwiącym zawierającym 1X TBE z 0,5 mg/mL bromku etydyny. Odbarwić w roztworze 1X TBE przed sfotografowaniem żelu. Upewnić się, że przed rozpoczęciem wylewania żelu został do niego dodany bromek etydyny.
	Próbki DNA są wymywane lub rozcieńczane w wodzie, która może mieć lekko kwaśne pH.	W miarę możliwości użyć sterylnej wody o obojętnym pH.
Brak lub słaby produkt reakcji PCR dla prążka eksonu 3-5 dla oznaczenia KD-PD10.2-1	Niska jakość DNA	Amplifikacja próbek bardzo niskiej jakości może spowodować słabą amplifikację ampliconu eksonu 3-5. Typowanie można nadal osiągnąć, wykorzystując dane sekwencjonowania eksonu 1 i 2. Alternatywnie ponownie ekstrahować DNA i w miarę możliwości powtórzyć reakcję PCR.
Nieprawidłowe wielkości pasków	Użyto nieodpowiedniego zestawu	Sprawdzić, czy użyto odpowiedniego zestawu.
	Zastosowano nieodpowiedni program obiegu cieplnego.	Sprawdzić parametry obiegu cieplnego.
	Zanieczyszczenie reakcji PCR	Sprawdzić, czy ujemna kontrola wskazuje na zanieczyszczenie. Odkazić obszar roboczy i powtórzyć PCR. Powtórzyć PCR w celu zidentyfikowania źródła zanieczyszczenia. Rozważyć użycie nowego zestawu. Jeśli wygląda na to, że genomowy DNA próbki jest zanieczyszczony, należy

Problem	Możliwa przyczyna (przyczyny)	Rozwiązanie
		ponownie wyekstrahować DNA lub użyć innego źródła DNA.
Słaba intensywność sygnału na elektroferogramie.	Słaby produkt PCR	Sprawdzić zdjęcie żelu. Sekwencjonowanie słabych pasków PCR NIE jest zalecane, ponieważ jakość sekwencji może nie być dostateczna dla SBT. Należy rozważyć użycie niższego czynnika rozcieńczenia (np. 1:2, 1:3) po oczyszczeniu reakcji PCR.
	Niewystarczająca ilość produktu reakcji została przeniesiona do sekwenatora.	Sprawdzić parametry sekwenatora. Może być konieczne zwiększenie czasu wstrzykiwania i napięcia.
	Problemy z oczyszczaniem produktów reakcji z sekwenatora.	Supernatant należy usuwać bardzo ostrożnie, bo może to przemieścić osad.
Intensywność sygnału jest za wysoka (obecność wysokich szczytów fluorescencyjnych – artefakty)	Za dużo produktu reakcji PCR	Sprawdzić zdjęcie żelu. Należy rozważyć użycie wyższego czynnika rozcieńczenia po oczyszczeniu reakcji PCR. Sprawdzić ilość polimerazy DNA użytej w reakcji PCR.
	Za duża ilość produktu reakcji została przeniesiona do sekwenatora.	Sprawdzić parametry instrumentu. Należy rozważyć zmniejszenie czasu wstrzykiwania i napięcia.
Zakłócona linia zerowa (szum tła)	Zanieczyszczony produkt reakcji PCR	Patrz działanie korekcyjne podane powyżej.
	Amplifikacja bardzo podobnych genów HLA.	Sprawdzić parametry obiegu cieplnego.
	Słabe oczyszczanie rezultatów PCR	Upewnić się, że procedura ExoSAP wykonywana jest według instrukcji użycia. Upewnić się, że mieszanina PCR jest dokładnie wymieszana z ExoSAP. Należy rozważyć użycie ExoSAP według procedury zalecanej przez producenta (zwiększając ilość enzymu) lub innej metody oczyszczania.
	Zanieczyszczone reakcje sekwencjonowania	Upewnić się, że powzięte zostały wszystkie kroki, aby zapobiec krzyżowemu zanieczyszczeniu. Zmieniać końcówki pipet gdy tylko jest

Problem	Możliwa przyczyna (przyczyny)	Rozwiązanie
		to możliwe. Dodawać płyny w górnej części dołka reakcyjnego. Zapobiegać powstawaniu aerozoli.
	Zanieczyszczony starter do sekwencjonowania	Sprawdzić jakość sekwencji innych starterów do sekwencjonowania i innych próbek sekwencjonowanych przy użyciu tego samego startera. Należy rozważyć użycie świeżej porcji starterów do sekwencjonowania.
	Zanieczyszczona mieszanina barwionych terminatorów lub bufor do sekwencjonowania	Powtórzyć sekwencjonowanie używając świeżych alikwot odczynników.
	Słabe oczyszczenie produktów sekwencjonowania	Powtórzyć sekwencjonowanie i upewnić się, że oczyszczanie przeprowadzane jest zgodnie z instrukcjami producenta.
Obecność szczytów barwnika	Słabe oczyszczenie produktów sekwencjonowania	Oczyszczanie produktów należy wykonywać zgodnie z instrukcją dostarczoną z zestawem. Należy się upewnić, że produkty są dostatecznie myte 80% etanolem.

Spokrewnione Produkty

Zestawy diagnostyczne in vitro (IVD) z oznakowaniem CE

ASSIGN™ SBT V3.6+

Kod produktu: CGX0036+

ASSIGN™ SBT V4.7

Kod produktu: CGX00470

OLERUP ASSIGN™ SBT V471

Kod produktu: CGX00471

OLERUP SBT™ HARPS^(R)

Instrukcję użytkowania – OLERUP SBT™ HARPS®

Tylko do użytku w celach naukowych:

OLERUP SBT™

AN-PD11.0-0(20) Zestaw OLERUP SBT™ HLA-DRB3 (20 i 50 testów)
AN-PD11.0-0(50)

AN-PD12.0-0(20) Zestaw OLERUP SBT™ HLA-DRB4 (20 i 50 testów)
AN-PD12.0-0(50)

AN-PD13.0-0(20) Zestaw OLERUP SBT™ HLA-DRB5 (20 i 50 testów)
AN-PD13.0-0(50)

LC-PD2.9(20) Zestaw OLERUP SBT™ HLA-B57 (20 i 50 testów)
LC-PD2.9(50)

Uwaga: wymienione wyżej produkty są licencjonowane w Australii jako wyroby do diagnostyki *in vitro*.

Odczynniki laboratoryjne ogólnego zastosowania

MgCl₂ – 1.0(50) 2mM MgCl₂
MgCl₂ - 1.0(3000))

SEQ BUF – 2.0(400) 5x Seq Rxn Buffer
SEQ BUF – 2.0(5000)

EDTA – 3.0(200) 125mM EDTA, pH8.0
EDTA – 3.0(5000)

W celu uzyskania bardziej szczegółowych informacji należy się skontaktować z miejscowym dystrybutorem.



Zestawy z własnym zaświadczeniem:

HH-PD3.2-2(20)	Zestaw OLERUP SBT™ HLA-C (20 i 50 testów)
HH-PD3.2-2(50)	
PQ-PD6.2-2(20)	Zestaw OLERUP SBT™ HLA-DQB1 (20 i 50
PQ-PD6.2-2(50)	testów)
AN-PD6.2-3(20)	
AN-PD6.2-3(50)	
HH-PD10.1(20)	Zestaw OLERUP SBT™ HLA-DPB1 (20 i 50
HH-PD10.1(50)	testów)
KD-PD10.2-1(20)	
KD-PD10.2-1(50)	

Informacje dotyczące pomocy i dane kontaktowe

CareDx Pty Ltd
PO Box 1294
Fremantle 6959
Western Australia
Australia
Tel.: +61-08-9336-4212
email: olerup-aus@caredx.com
Strona internetowa: www.olerup.com

Aby poznać szczegóły dotyczące zamówień, należy odwiedzić stronę Olerup (<http://www.olerup.com>).