



ИНСТРУКЦИЯ

по применению комплекта реагентов для типирования гена DQA1
методом ПЦР в режиме реального времени

HLA DQA1

ВНИМАНИЕ! Изучите инструкцию перед началом работы

ИНСТРУКЦИЯ

по применению комплекта реагентов для типирования гена DQA1 методом ПЦР в режиме реального времени

HLA DQA1

1. НАЗНАЧЕНИЕ

- 1.1. Комплект реагентов HLA DQA1 предназначен для одновременного определения 8 аллелей и групп аллелей гена DQA1 главного комплекса тканевой совместимости человека методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) в режиме реального времени.
- 1.2. Комплект может быть использован в клинико-диагностических лабораториях медицинских учреждений и научно-исследовательской практике.

2. ХАРАКТЕРИСТИКА КОМПЛЕКТА

2.1. Принцип действия

Принцип метода ПЦР основан на использовании процесса амплификации ДНК, заключающегося в повторяющихся циклах температурной денатурации ДНК, отжига праймеров с комплементарными последовательностями и последующей достройки полинуклеотидных цепей с этих праймеров Taq-полимеразой.

В реакционную смесь для амплификации введены ДНК-зонды, каждый из которых несёт флуоресцентную метку и гаситель флуоресценции. При образовании специфичного продукта ДНК-зонд разрушается, действие гасителя на флуоресцентную метку прекращается, что ведёт к возрастанию уровня флуоресценции. Количество разрушенных зондов (а, следовательно, и уровень флуоресценции) увеличивается пропорционально количеству образовавшихся специфических ампликонов и измеряется на каждом цикле амплификации.

В некоторые смеси для амплификации введены сигнальные зонды, содержащие флуоресцентные метки Fam и Hex. После окончания ПЦР проводится раунд температурного плавления дуплексов, образованных ампликонами и сигнальными зондами, в результате чего изменяется уровень флуоресценции, который фиксируется и представляется программным обеспечением прибора в виде графика. Если сигнальный зонд частично комплементарен

ДНК–мишени, температура плавления такого дуплекса будет ниже температуры плавления дуплекса в случае полной комплементарности зонда. На основании температуры плавления сигнальных зондов проводится интерпретация результатов анализа.

Комплект реагентов HLA DQA1 включает смеси для амплификации, специфичные для 8 аллелей (DQA1*0103, *0201) и групп аллелей гена DQA1 (DQA1*0101, *0102, *0301, *0401, *0501, *0601).

Обозначение аллеля/ группы аллелей	Аллели, входящие в группу	
	Названия аллелей согласно номенклатуре HLA, принятой до 1 апреля 2010 г.	Названия аллелей согласно номенклатуре HLA, принятой с 1 апреля 2010 г.
DQA1*0101	DQA1*0101/*0104*/ *0105/*0107	DQA1*01:01/*01:04 /*01:05/*01:07
DQA1*0102	DQA1*0102/*0106	DQA1*01:02/ *01:06
DQA1*0103	DQA1*0103	DQA1*01:03
DQA1*0201	DQA1*0201	DQA1*02:01
DQA1*0301	DQA1*0301 - *0303	DQA1*03:01 - *03:03
DQA1*0401	DQA1*0401 - *0404	DQA1*04:01 - *04:04
DQA1*0501	DQA1*0501 - *0509	DQA1*05:01 - *05:09
DQA1*0601	DQA1*0601/*0602	DQA1*06:01/ *06:02

В комплекте реагентов HLA DQA1 во все пробирки со смесью для амплификации добавлен внутренний контрольный образец (ВК), предназначенный для контроля прохождения полимеразной цепной реакции.

В состав ДНК-зондов, использующихся для детекции специфичностей гена DQA1, включены флуоресцентные метки Fam, Hex и Rox. В состав ДНК-зонда, используемого для детекции

продукта амплификации внутреннего контрольного образца (ВК), входит флуоресцентный краситель Cy5 (таблица 1).

Использование нескольких флуоресцентных красителей позволяет сократить количество пробирок, поскольку появляется возможность одновременно регистрировать результаты разных реакций амплификации, проходящих в одной пробирке.

Для проведения ПЦР используют амплификаторы детектирующие (ООО «НПО ДНК-Технология») ДТлайт¹, ДТпрайм² и ДТ-96.

Каналы детекции продуктов амплификации

Название смеси для амплификации	Fam	Hex	Rox	Cy5	Cy5.5
DQA1-1	0301	0501	0201	ВК	-
DQA1-2	-	-	0401, 0601	ВК	-
DQA1-3	-	-	0101, 0102, 0103	ВК	-
DQA1-4	-	-	0103, 0102, 0101	ВК	-

2.2. Комплект рассчитан на проведение 24 определений, включая анализ неизвестных образцов и отрицательных контрольных образцов.

2.3. Состав комплекта

Комплект реагентов для типирования гена DQA1 методом ПЦР в режиме реального времени (HLA DQA1) включает:

- смесь для амплификации «DQA1-1» – 1 пробирка (480 мкл);
- смесь для амплификации «DQA1-2» – 1 пробирка (480 мкл);
- смесь для амплификации «DQA1-3» – 1 пробирка (480 мкл);

¹ – только модели 4S1, 4S2, 5S1, 5S2, 6S1, 6S2.

² – только модели 4M1, 4M3, 4M6, 5M1, 5M3, 5M6, 6M1, 6M3, 6M6.

- смесь для амплификации «DQA1-4» – 1 пробирка (480 мкл);
- ПЦР-буфер – 2 пробирки (по 480 мкл);
- Таq-АТ-полимераза – 1 пробирка (48 мкл);
- минеральное масло – 2 пробирки (по 1,92 мл).

2.4. Время проведения анализа – от 2,5 часов (без учёта пробоподготовки).

3. АНАЛИТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

3.1. Специфичность анализа

В образцах биологического материала человека после завершения реакции амплификации программное обеспечение для приборов *ДТлайт*, *ДТпрайм* и *ДТ-96* определяет генотип исследуемого образца. Интерпретация результатов анализа проводится ПО автоматически (Приложение, табл. 4, 5, 6).

3.2. Чувствительность анализа

Количество анализируемой ДНК должно быть не менее 1,0 нг на амплификационную пробирку. При использовании меньшего количества ДНК производитель не гарантирует корректную работу комплекта.

Для оценки количества выделенной ДНК рекомендуется использовать комплект реагентов для ПЦР-амплификации геномной ДНК человека в режиме реального времени (КВМ) производства ООО «НПО ДНК-Технология».

Примечание. При использовании комплекта реагентов HLA DQA1 совместно с комплектом HLA DRB1 можно учитывать результаты КВМ, полученные при использовании комплекта HLA DRB1. Ср для КВМ более 32 должно трактоваться оператором как недостаточное для анализа количество ДНК.

4. МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

Организация работы ПЦР-лаборатории, оборудование и материалы должны соответствовать Методическим указаниям МУ 1.3.2569-09 «Организация работы лабораторий, использующих методы амплификации нуклеиновых кислот при работе с материалом, содержащим микроорганизмы I–IV групп патогенности».

5. ОБОРУДОВАНИЕ И МАТЕРИАЛЫ

При работе с набором реагентов требуются следующие оборудование и материалы:

- амплификатор детектирующий;
- микроцентрифуга/вортекс;
- холодильник бытовой;
- морозильник бытовой;
- пробирки одноразовые пластиковые объёмом 1,5 мл;
- пробирки одноразовые пластиковые объёмом 0,2 мл для амплификации или стрипованные пробирки объёмом 0,2 мл для амплификации;
- штатив «рабочее место» для пробирок объёмом 1,5 мл;
- штатив «рабочее место» для пробирок объёмом 0,2 мл или для стрипованных пробирок объёмом 0,2 мл;
- пипетки полуавтоматические одноканальные с переменным объёмом, позволяющие отбирать объёмы жидкости 2–20 мкл, 20–200 мкл, 100–1000 мкл;
- одноразовые наконечники с фильтром для полуавтоматических пипеток с маркировкой «RNase-free, DNase-free» объёмом 20 мкл, 200 мкл и 1000 мкл;
- одноразовые перчатки медицинские, без талька, текстурированные;
- ёмкость для сброса использованных наконечников, пробирок и других расходных материалов;
- комплект для выделения ДНК из биологического материала (рекомендуется ПРОБА-ГС-ГЕНЕТИКА или ПРОБА-РАПИД-ГЕНЕТИКА производства ООО «НПО ДНК-Технология»).

Программное обеспечение для амплификаторов детектирующих ДТлайт, ДТпрайм и ДТ-96:

- версия ПО не ниже 7.3.6.5;
- файл с параметрами анализа «HLA.ini».

6. АНАЛИЗИРУЕМЫЙ МАТЕРИАЛ

Для исследования используют цельную периферическую кровь человека.

Взятие, предобработку и хранение материала проводят в соответствии с инструкцией к комплекту для выделения ДНК из биологического материала.

6.1. Взятие цельной периферической крови

Взятие цельной периферической крови проводится в вакуумные пластиковые пробирки типа Vacuette объемом 2,0 или 4,0 мл с добавленной в качестве антикоагулянта динатриевой солью этилендиаминтетраацетата (ЭДТА) в конечной концентрации 2,0 мг/мл. В качестве антикоагулянта допускается также использование цитрата натрия. Для перемешивания крови с антикоагулянтом после взятия материала необходимо перевернуть пробирку 2–3 раза.

ВНИМАНИЕ! Не допускается использование гепарина в качестве антикоагулянта.

6.2. Транспортировка и хранение исследуемого материала

Допускается хранение образцов при температуре 2–8°C не более 24 ч. В случае невозможности доставки материала в лабораторию в течение суток допускается однократное замораживание материала. Допускается хранение замороженного материала при температуре минус 20°C в течение 1 месяца.

7. ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА

7.1. Выделение ДНК из биологического материала

Выделение ДНК проводят в соответствии с инструкцией к используемому комплекту реагентов. Рекомендуемые комплекты для выделения ДНК из биологического материала: ПРОБА-ГС-ГЕНЕТИКА и ПРОБА-РАПИД-ГЕНЕТИКА. Комплект ПРОБА-ГС-ГЕНЕТИКА рекомендуется использовать в случае, если предполагается длительное хранение выделенной ДНК (до 6 месяцев). ДНК, полученную с использованием комплекта ПРОБА-РАПИД-ГЕНЕТИКА, следует хранить не более 1 месяца.

Полученную ДНК также можно использовать для определения генетических полиморфизмов.

О возможности использования других комплектов реагентов для выделения ДНК из биологического материала совместно с

комплект для типирования гена DQA1 можно узнать у представителя компании.

Независимо от используемого комплекта для выделения ДНК одновременно с выделением ДНК из периферической крови необходимо провести через все этапы пробоподготовки отрицательный контрольный образец (в его качестве можно использовать физиологический раствор в объеме согласно инструкции к комплекту реагентов для выделения ДНК).

7.2. Подготовка и проведение полимеразной цепной реакции

7.2.1. Промаркируйте по 4 пробирки для амплификации объемом 0,2 мл для каждого анализируемого образца и отрицательного контрольного образца («К-»).

Например, необходимо проанализировать 5 образцов. Нужно промаркировать 20 пробирок для исследуемых образцов и 4 пробирки для «К-». Общее количество пробирок – 24.

Рекомендуется проводить исследование отрицательного контрольного образца («К-»), прошедшего пробоподготовку, не реже, чем один раз на каждую серию реактивов.

7.2.2. Встряхните пробирки со смесями для амплификации в течение 3–5 сек и центрифугируйте в течение 1–3 сек на микроцентрифуге/вортексе.

7.2.3. Внесите в промаркированные пробирки по 20 мкл соответствующей смеси для амплификации (соответственно маркировке в пробирку 1 внесите смесь DQA1-1, в пробирку 2 – смесь DQA1-2 и т.д.).

7.2.4. Встряхните пробирки с ПЦР-буфером и Taq-АТ-полимеразой в течение 3–5 сек и центрифугируйте в течение 1–3 сек на микроцентрифуге/вортексе.

ВНИМАНИЕ! Taq-АТ-полимеразу необходимо доставать из морозильной камеры непосредственно перед использованием.

7.2.5. Приготовьте в отдельной пробирке смесь ПЦР-буфера и Taq-АТ-полимеразы:

- 10 x (N+1) мкл ПЦР-буфера и
- 0,5 x (N+1) мкл Taq-АТ-полимеразы,

где N – количество промаркированных пробирок с учётом «К-».

Например, необходимо проанализировать 5 образцов и один «К-». Промаркированных пробирок – 24. Нужно приготовить смесь ПЦР-буфера и Taq-АТ-полимеразы для 25 (24+1) пробирок, т.е. 250 мкл ПЦР-буфера + 12,5 мкл Taq-АТ-полимеразы.

7.2.6. Встряхните пробирку в течение 3–5 сек и центрифугируйте в течение 1–3 сек на микроцентрифуге/вортексе.

ВНИМАНИЕ! Смесь ПЦР-буфера и Taq-АТ-полимеразы необходимо готовить непосредственно перед использованием.

7.2.7. Добавьте в каждую пробирку со смесью для амплификации по 10 мкл смеси ПЦР-буфера и Taq-АТ-полимеразы.

ВНИМАНИЕ! После добавления смеси ПЦР-буфера и Taq-АТ-полимеразы в пробирки со смесями для амплификации необходимо в течение двух часов выполнить пп. 7.2.8. – 7.2.13.

7.2.8. Добавьте в каждую пробирку по 1 капле (около 20 мкл) минерального масла. Закройте крышки пробирок.

ВНИМАНИЕ! Количество анализируемой ДНК должно быть не менее 1,0 нг на амплификационную пробирку. При использовании меньшего количества ДНК производитель не гарантирует корректную работу набора.

При использовании комплекта реагентов HLA DQA1 совместно с комплектом HLA DRB1 можно учитывать результаты KBM, полученные при использовании комплекта HLA DRB1. Ср для KBM более 32 трактуется оператором как недостаточное для анализа количество ДНК.

7.2.9. Для предотвращения контаминации следует перед внесением ДНК открывать крышки только тех пробирок, в которые будет вноситься данный образец, и закрывать их перед внесением следующего. Препараты ДНК следует вносить наконечниками с аэрозольным барьером.

Внесите в соответствующие пробирки для исследуемых образцов по 5,0 мкл выделенного из образцов препарата ДНК.

7.2.10. Внесите в пробирки, маркированные «К-», по 5,0 мкл отрицательного контрольного образца, прошедшего этап выделения ДНК.

- 7.2.11. Центрифугируйте пробирки на микроцентрифуге/вортексе в течение 1–3 сек.
- 7.2.12. Установите все пробирки в блок амплификатора детектирующего.
- 7.2.13. Запустите программное обеспечение RealTime_PCR, выберите оператора, выберите режим «Работа с прибором». При первом проведении ПЦР загрузите файл «HLA.ini». При последующих постановках добавьте в протокол тест «DQA1» (п.7.4), укажите количество и идентификаторы образцов, в том числе отрицательных контрольных образцов, отметьте расположение пробирок на матрице термоблока в соответствии с их установкой (п. 7.4.6) и проведите ПЦР.
- 7.2.14. При выборе теста в окне «Запуск программы амплификации» должна отображаться программа, приведённая в таблице 2.

Таблица 2

Программа амплификации

№ блока	Температура, °С	мин	сек	Число циклов	Режим оптических измерений	Δt, °С	Тип блока
1	80,0	2	00	1			Цикл
	94,0	5	00				
2	94,0	0	30	5			Цикл
	64,0	0	15		√		
3	94,0	0	10	45			Цикл
	64,0	0	15		√		
4	94,0	0	5	1			Цикл
5	25,0	0	30	1			Цикл
6	25,0	0	15	50	√	1,0°С	«Кривая плавления», Δt=1°С; T _{кон} =75°С
7	10,0	Хранение			Хранение

7.3. Загрузка теста «DQA1» для амплификаторов детектирующих при первой постановке на данном компьютере

Версия ПО не ниже 7.3.6.5.

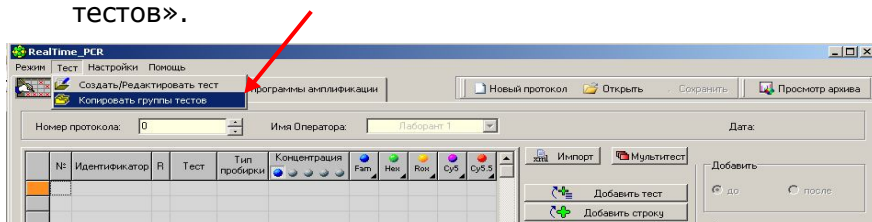
Примечание. Для иллюстраций настоящей инструкции использованы скриншоты версии 7.3.4.31.

Тест «DQA1» для приборов ДТлайт, ДТпрайм и ДТ-96 предоставляется производителем комплекта (файл «HLA.ini»). Его установку в программу RealTime_PCR необходимо производить в режиме «Работа с прибором» в следующем порядке:

7.3.1. Откройте программное обеспечение RealTime_PCR, выберите оператора, который будет работать с комплектом реагентов HLA DQA1, выберите режим «Работа с прибором».

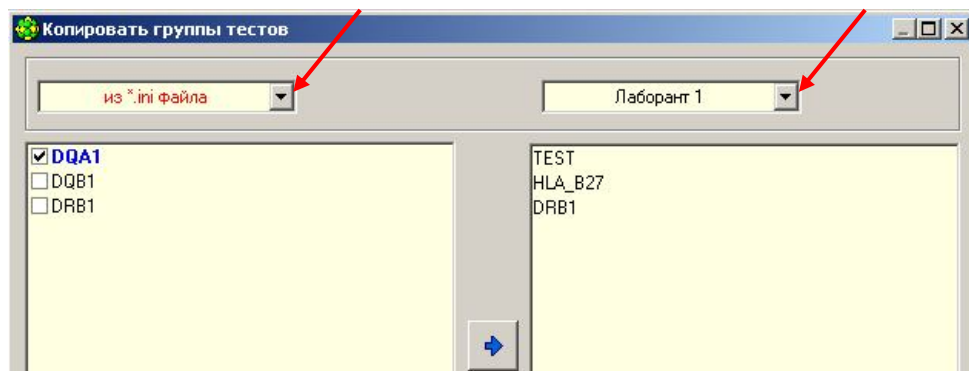
При добавлении нового оператора необходимо создать или выбрать рабочую директорию для сохранения файла с результатами.


7.3.2. В меню «Тест» выберите закладку «Копировать группы тестов».

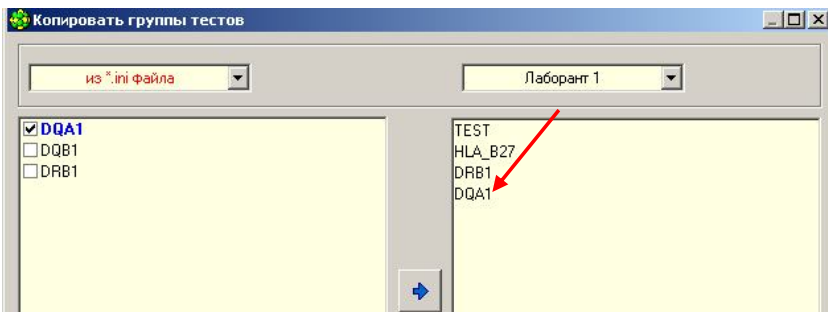


7.3.3. В левой половине окна «Копировать группы тестов» выберите строку «из *.ini файла», откройте ini файл «HLA».

7.3.4. В правой половине окна «Копировать группы тестов» выберите оператора, в директорию которому необходимо скопировать тест «DQA1».



7.3.5. Нажмите кнопку , после чего выбранный тест появится в правой половине окна.

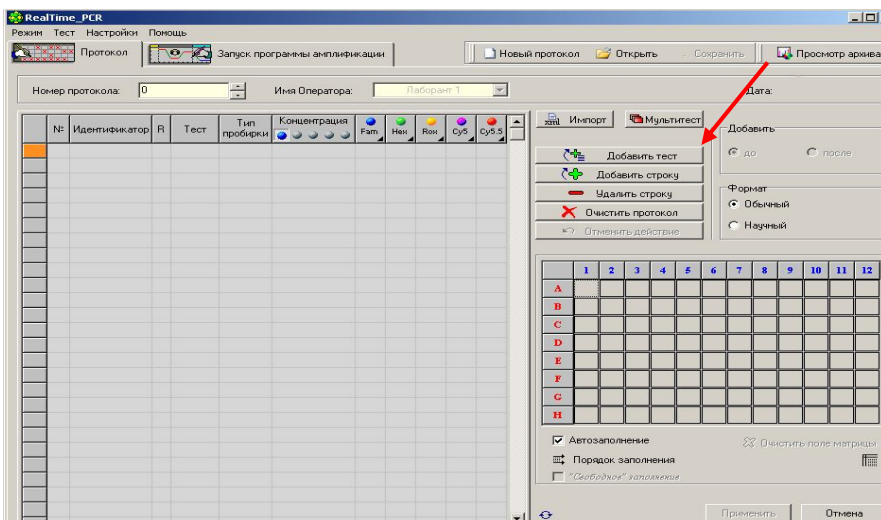


Теперь с тестом «DQA1» может работать оператор, для которого был скопирован тест.

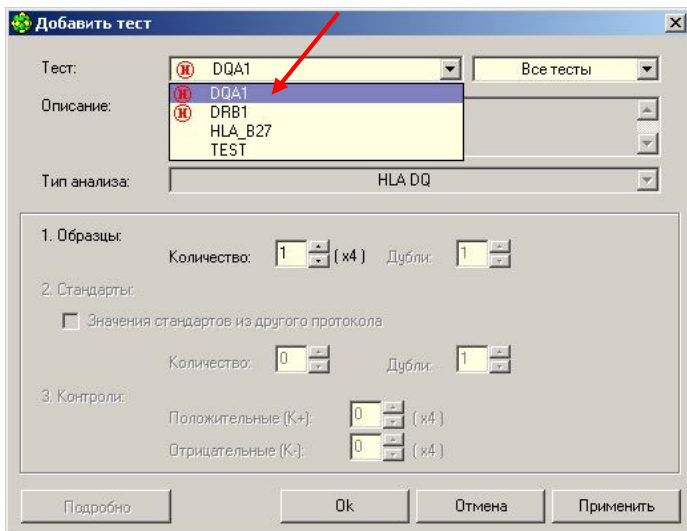
7.4. Ежедневная работа с тестом «DQA1»

7.4.1. Откройте программное обеспечение RealTime_PCR, выберите оператора, для которого копировали тест (см. п.7.3.4), выберите режим «Работа с прибором».

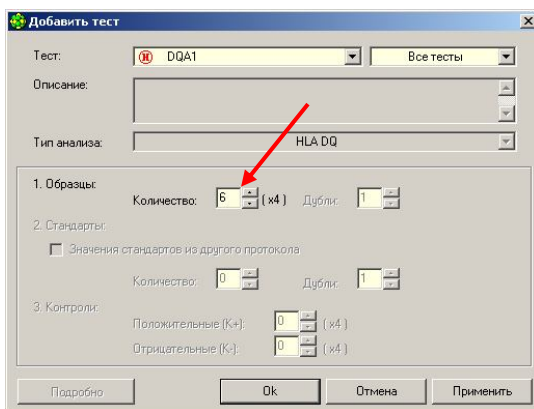
7.4.2. Нажмите кнопку «Добавить тест».



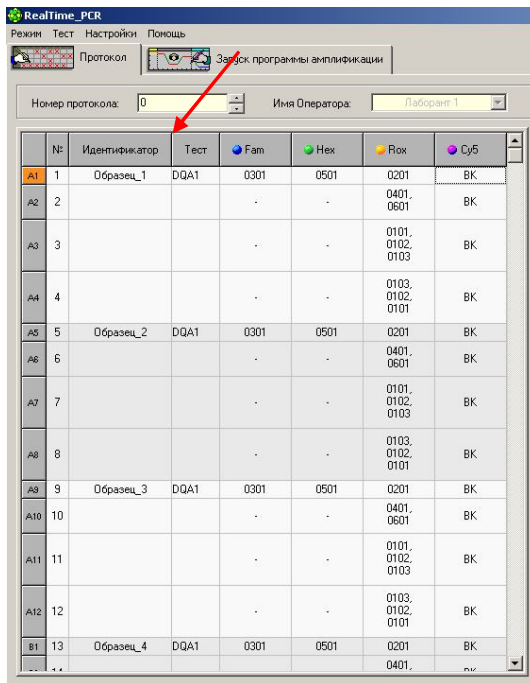
7.4.3. Выберите из списка тест «DQA1».



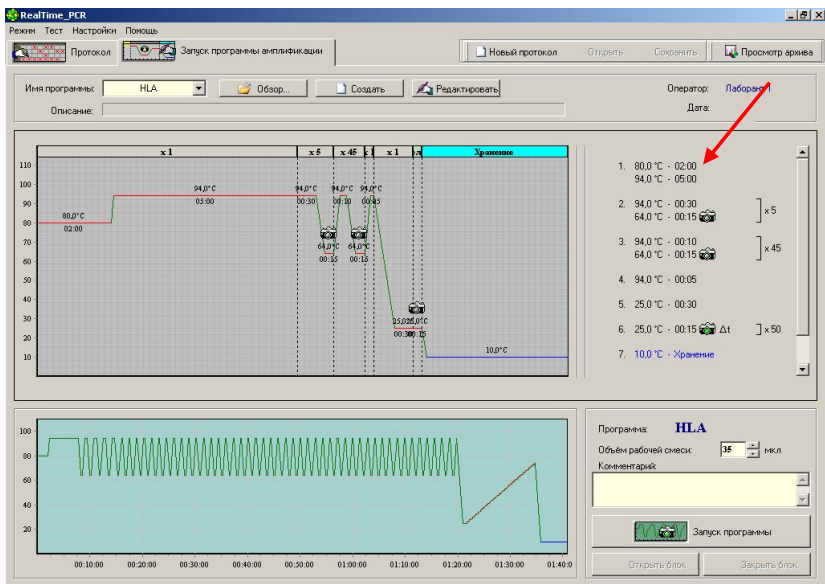
7.4.4. Укажите количество исследуемых образцов (отрицательные контрольные образцы следует указывать как образцы), нажмите кнопку «Ок».



7.4.5. Укажите идентификаторы пробирок.



- 7.4.6. Отметьте расположение пробирок на матрице термоблока в соответствии с их установкой.
- 7.4.7. Нажмите кнопку «Применить» в правом нижнем углу окна «Протокол».
- 7.4.8. В окне «Запуск программы амплификации» будет отображена необходимая программа амплификации «HLA».



7.4.9. Нажмите кнопку «Запустить программы» в правом нижнем углу окна.

7.4.10. Укажите имя файла и директорию на компьютере для сохранения файла с результатами (по умолчанию будет предложено сохранить файл в рабочую директорию выбранного оператора, см. п.7.3.1).

8. РЕГИСТРАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ АМПЛИФИКАЦИИ

Регистрация сигнала флуоресценции проводится прибором автоматически во время выполнения программы амплификации.


Детекция и учёт результатов осуществляется амплификатором детектирующим автоматически.




После окончания программы амплификации на экране появится соответствующее информационное сообщение и будет предложено перейти к анализу результатов (п.4.6. «Руководство по эксплуатации. Часть 1. Работа с прибором»).

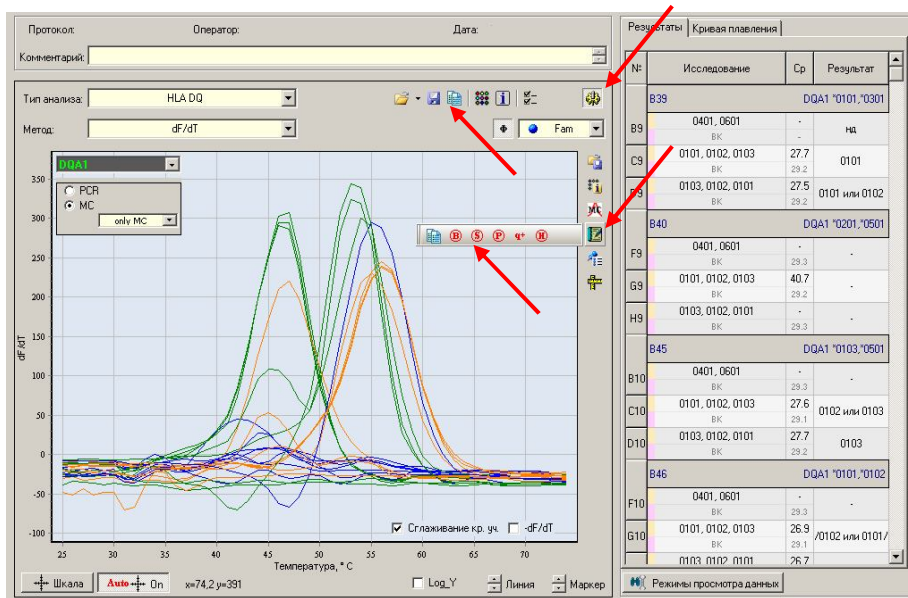
Анализ проводится программным обеспечением. На графике будет отображена зависимость флуоресценции от номера цикла (режим PCR) или от температуры плавления (режим MC) для каждой пробирки в термоблоке. В таблице справа будет показан идентификатор образца, индикаторный цикл (Cp) для специфического продукта и ВК, результат по каждому образцу (качественный анализ или анализ кривых плавления для каждой

пробирки и генотип для образца).

По результатам анализа можно сформировать и распечатать отчет.

Для создания лабораторного отчета необходимо нажать кнопку  «Отчёт по результатам анализа».

Для создания специализированного отчета следует открыть инструментальную панель (кнопка ) , выбрать «Отчёты» (кнопка ) , выбрать «Специализированный отчёт по HLA» (кнопка ) .



9. УЧЁТ РЕЗУЛЬТАТОВ РЕАКЦИИ

Учёт и интерпретация результатов реакции осуществляется автоматически с помощью программного обеспечения, поставляемого с амплификатором детектирующим.

Специфичности гена HLA DQA1 для каждого образца вычисляются программным обеспечением автоматически с учётом результатов по каждой пробирке для этого образца.

Результат по каждой пробирке данного образца не является генотипом образца. Результат генотипирования указан в верхней графе таблицы справа рядом с идентификатором образца.

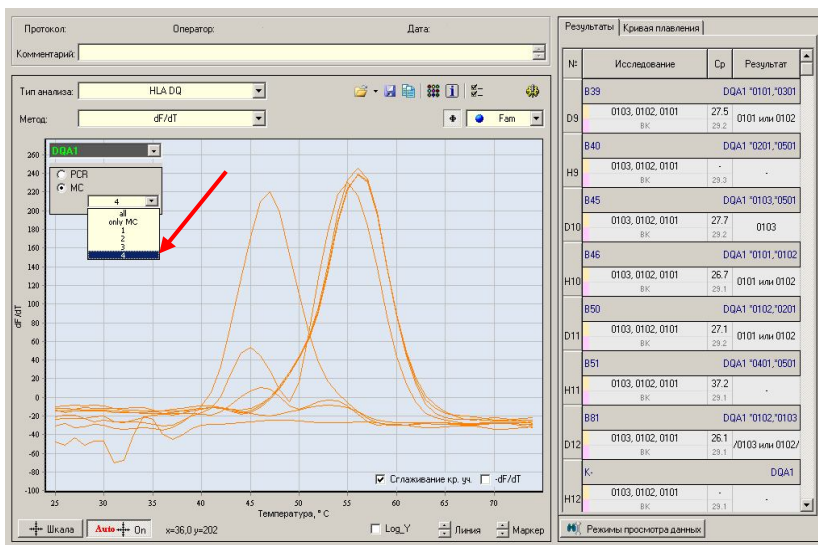
№	Исследование	Ср	Результат
B50			DQA1 *0102,*0201
A11	0301	-	0201
	0501	-	
	0201	28.9	
	ВК	29.7	
B11	0401, 0601	-	-
	ВК	29.3	
C11	0101, 0102, 0103	27.2	0102 или 0103
	ВК	29.1	
D11	0103, 0102, 0101	27.1	0101 или 0102
	ВК	29.2	




Образец **B50**, результат генотипирования **DQA1*0102, *0201**.

9.1. Корректировка результатов анализа в режиме МС (только для смесей 2, 3, 4)

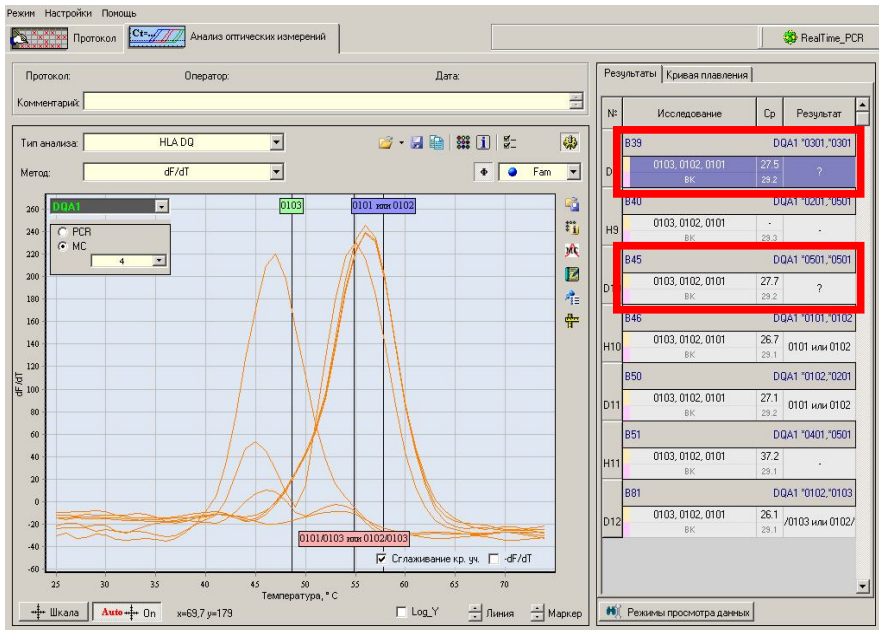
При наличии образцов, для которых получен сомнительный (?) результат определения специфичностей гена DQA1, необходимо интерпретацию результатов проконтролировать визуально. Для этого следует перейти в режим «МС» (Melting Curve) и рассмотреть результаты типирования по каждой смеси (DQA1-2, DQA1-3, DQA1-4) отдельно.

Например, режим «МС» (для смеси DQA1-4):

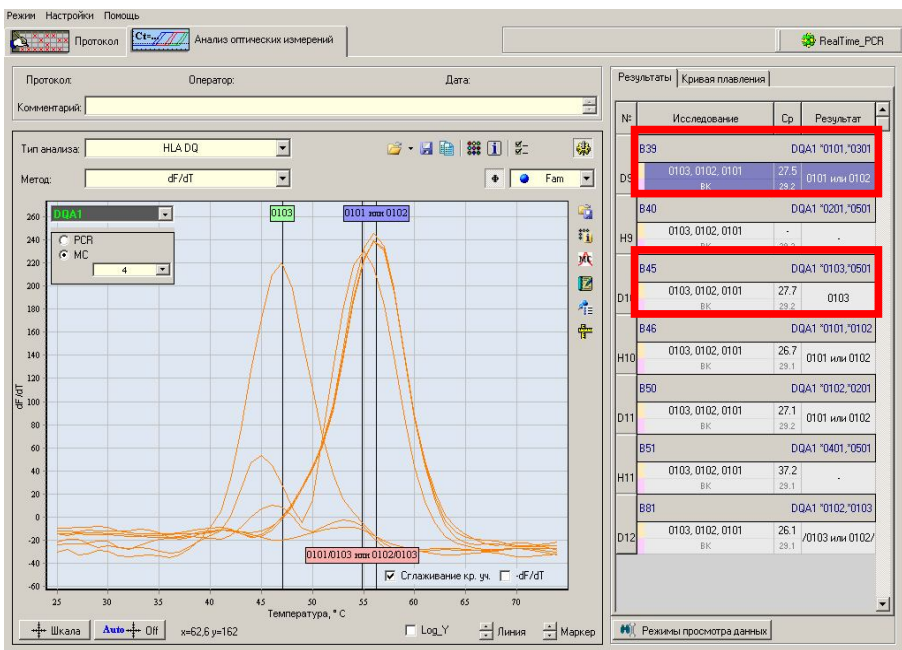


Заданные в тесте (файл «HLA.ini») температуры плавления продуктов амплификации отражаются на графике в виде температурных баров. Для вывода на экран температурных баров следует открыть инструментальную панель (кнопка ) , нажать «Анализ полиморфизмов, плавление» (кнопка ) , выбрать «Температурные бары» (кнопка ) .


При несовпадении температурных баров с полученными на графике пиками плавления их необходимо совместить вручную на каналах Fam и Hex, передвигая мышкой.



После этого для сомнительных образцов будет определен генотип.



После корректировки температурных баров экспериментальную температуру плавления можно увидеть в окне «Дополнительные настройки анализа». Для этого необходимо

нажать кнопку  , в появившемся окне «Параметры анализа» нажать кнопку «Дополнительные настройки анализа» в пункте 5. В появившемся окне выбрать номер, по которому в режиме МС проводилась коррекция результатов.

ВНИМАНИЕ! После корректировки результатов полученные температуры не должны отличаться от заданных более чем на 1,5°C. Различия более чем на 1,5 °C могут свидетельствовать об ошибках при проведении ПЦР (раскапывании другой смеси для амплификации, некорректной расстановки пробирок в матрицу термоблока прибора и др.).

Одной из наиболее частых ошибок при проведении генотипирования является несоответствие расстановки пробирок в термоблоке прибора указанной при заполнении протокола.

9.2. После проведения корректировки результатов вручную для анализируемых образцов программа фиксирует сомнительный результат в следующих случаях:

- для образцов, не прошедших ПЦР (возможные причины: недостаточное количество ДНК, ошибки при постановке, ингибирование реакции и др.);
- при значительных отличиях полученной температуры плавления от заданной.

9.3. Недостоверный результат фиксируется в случае получения отрицательного результата амплификации специфического продукта и ВК в конкретной пробирке.

В этих случаях (сомнительный или недостоверный результат) требуется повторное проведение ПЦР с имеющимся препаратом ДНК, либо повторное выделение ДНК и постановка ПЦР, либо повторное взятие клинического материала (выполняется последовательно).

Для оценки количества выделенной ДНК рекомендуется использовать комплект реагентов для ПЦР-амплификации геномной ДНК человека в режиме реального времени (КВМ).

9.4. Для отрицательных контрольных образцов генотип не определяется.

Результаты		Кривая плавления	
№:	Исследование	Ср	Результат
	K-		DQA1
E12	0301	-	-
	0501	-	
	0201	-	
	ВК	30.1	
F12	0401, 0601	-	-
	ВК	29.1	
G12	0101, 0102, 0103	-	-
	ВК	29.0	
H12	0103, 0102, 0101	-	-
	ВК	29.1	

При получении для отрицательного контрольного образца положительного значения (определение генотипа) результаты всей постановочной серии считают недостоверными. В этом случае необходимо проведение специальных мероприятий для устранения контаминации.

10. УСЛОВИЯ ТРАНСПОРТИРОВКИ, ХРАНЕНИЯ И ЭКСПЛУАТАЦИИ КОМПЛЕКТОВ

- 10.1. Срок годности комплектов – 6 месяцев с даты изготовления.
- 10.2. Смесь для амплификации, ПЦР-буфер и минеральное масло следует хранить при температуре 2–8°C в течение всего срока годности.
- 10.3. Taq-АТ-полимеразу следует хранить при температуре минус 20°C в течение всего срока годности.
- 10.4. Транспортировку комплектов осуществляют всеми видами крытого транспорта при температурах, соответствующих условиям хранения комплектов реагентов, входящих в состав набора.
- 10.5. Комплект с истекшим сроком годности использованию не подлежит.
- 10.6. Для получения надёжных результатов необходимо строгое соблюдение инструкции по применению набора.
- 10.7. Предприятие-изготовитель гарантирует соответствие набора требованиям технических условий при соблюдении условий транспортировки, хранения и применения,

установленных техническими условиями.

По вопросам, касающимся качества комплекта реагентов для типирования гена DQA1 методом ПЦР в режиме реального времени (HLA DQA1), следует обращаться к официальному представителю производителя по адресу:

ООО «ДНК-Технология», 117587, Москва, Варшавское ш., д.125ж, корп.6

Тел./факс + 7 (495) 980-45-55

E-mail: help@dna-technology.ru

www.dna-technology.ru

Анкета для осуществления обратной связи находится на сайте компании «ДНК-Технология»: <http://www.dna-technology.ru/support/>

Приложение.

Таблица 3

Генотипы и температуры плавления продуктов амплификации

Смесь для амплификации	Результат	Tm, Fam	Tm, Hex
DQA1-1	Не учитывается		
DQA1-2	*0401	55,4	46,8
	*0601	46,0	56,0
	*0401/*0601	55,8	56,7
DQA1-3	*0101	54,2	40,8
	*0102 или *0103	46,4	55,3
	*0101/*0102 или *0101/*0103	53,3	54,5
DQA1-4	*0101 или *0102	56,0	47,0
	*0103	46,8	57,1
	*0101/*0103 или *0102/*0103	55,0	55,7

Принципы вычисления результатов анализа программным обеспечением

ВНИМАНИЕ! Анализ проводится программным обеспечением автоматически. Изложенные в данном разделе принципы вычисления результатов носят информативный характер и **не предназначены** для проведения пользователями самостоятельных расчетов.

1. Режим «PCR»

Проводится оценка показателя C_p для специфического продукта (C_p DQA1) в случае, если амплификация прошла, т.е. указан C_p для каналов Fam, Hex, Rox – вычисляется минимальное значение C_p для специфического продукта ($\min C_p$ DQA1). Этот показатель используется для сравнения со значениями остальных полученных C_p DQA1. Результат считается положительным, если $dC_p(C_p \text{ DQA1} - \min C_p \text{ DQA1}) < 7,0$.

Для пробирки DQA1-1 ответ (генотип DQA1) формируется на основании получения положительного результата в режиме «PCR» (таблица 4). Для пробирок DQA1-2, DQA1-3 и DQA1-4 необходим дополнительный раунд температурного плавления продуктов амплификации (режим «MC»). Результаты плавления учитываются только в случае получения положительного результата ($dC_p(C_p \text{ DQA1} - \min C_p \text{ DQA1}) < 7,0$) по каналу Rox.

Таблица 4

Учет результатов амплификации в режиме «PCR»

Смесь для амплификации	Каналы детекции			
	Fam	Hex	Rox	Cy5
DQA1-1	Если результат положительный, то ответ: *0301	Если результат положительный, то ответ: *0501	Если результат положительный, то ответ: *0201	BK
DQA1-2	Не учитывается		Если результат положительный, то учитывается плавление в этой пробирке по Fam и Hex	
DQA1-3				
DQA1-4				

2. Режим «МС»

Таблица 5

Учет результатов амплификации в режиме «МС»

Смесь для амплификации	Результат	Аллель/группа аллелей=ответ	Tm, Fam	Tm, Hex
DQA1-1	Не учитывается			
DQA1-2	*0401	*0401	55,4	46,8
	*0601	*0601	46,0	56,0
	*0401/*0601	*0401/*0601	55,8	56,7
DQA1-3	*0101	*0101	54,2	40,8
	*0102 или *0103	Учитывается результат в пробирке 4	46,4	55,3
	*0101/*0102 или *0101/*0103		53,3	54,5
DQA1-4	*0101 или *0102	Учитывается результат в пробирке 3	56,0	47,0
	*0103	*0103	46,8	57,1
	*0101/*0103 или *0102/*0103	Учитывается результат в пробирке 3	55,0	55,7

Ответ по результатам плавления продуктов амплификации для пробирки DQA1-2 выдается автономно, для пробирок DQA1-3 и DQA1-4 – в совокупности. Принцип трактовки результатов плавления продуктов амплификации для пробирок DQA1-3 и DQA1-4 приведен в таблице 6.

Таблица 6

Принцип трактовки результатов плавления продуктов амплификации для пробирок DQA1-3 и DQA1-4

Результат по пробирке DQA1-3	Результат по пробирке DQA1-4	Аллели = ответ
*0101	*0101 или *0102	*0101
	*0102 или *0103	Не встречается
	*0101/*0102 или *0101/*0103	Не встречается
*0102 или *0103	*0101 или *0102	*0102
	*0103	*0103
	*0101/*0103 или *0102/*0103	*0102, *0103
*0101/*0102 или *0101/*0103	*0101 или *0102	*0101, *0102
	*0103	Не встречается
	*0101/*0103 или *0102/*0103	*0101, *0103

ДНК-Технология
117587, Москва, Варшавское ш., д.125ж, корп.6
Тел./факс +7 (495) 980-45-55
E-mail: help@dna-technology.ru
www.dna-technology.ru