

LT

HLA SSP Kits

Paruoštas naudoti SSP reagentų rinkinys DNR paremtam HLA tipavimui

IVD

For In Vitro Diagnostic Use

HLA-A SSP	REF	826 201	CE 0197
HLA-B SSP	REF	826 206	CE 0197
HLA-C SSP	REF	826 212	CE
DRB SSP	REF	826 215	CE 0197
DQB SSP	REF	826 220	CE
ABDR SSPtray	REF	826 230	CE 0197
ABC SSPtray	REF	826 240	CE 0197

BIO-RAD

189738/07 – 04/2016

Specialios pastabos naudotojui

SSP TIPAVIMO RINKINIAI SU TAQ POLIMERAZE – RIBOTA LICENCIJA:

Į šio produkto įsigijimo kainą įeina ribotos, neperkeliamos teisės pagal JAV patentus 4,683,202, 4,683,195 ir 4,965,188 ir jų užsieninius papildymus, priklausančius Roche Molecular Systems, Inc. ir F. Hoffmann-La Roche Ltd („Roche“), naudoti tik šį produkto kiekį taikant polimerazinės grandininės reakcijos (PGR) procesus, apibūdintus nurodytuose patentuose, tik įsigijusio naudotojo HLA tipavimo taikymams tik organų, audinių ar kaulų čiulpų transplantacijai, ir pabrėžtinai netaikant teismo ekspertizės įrodymų ir tėvystės nustatymo analizėms. Taip pat suteikiama teisė naudoti šį produktą ir siūlyti komercines HLA tipavimo paslaugas organų ar audinių transplantacijai naudojant PGR, įskaitant įsigijusio naudotojo veiklos rezultatų paskelbimą už tam tikrą mokestį ar kitokią komercinę išraišką. Daugiau informacijos apie licencijų įsigijimą praktikuoti PGR galite gauti JAV susisiekę su licencijavimo direktoriumi, Roche Molecular Systems, Inc. 1145 Atlantic Avenue, Alameda, California 94501, o už JAV ribų – su PGR licencijavimo vadovu, F. Hoffmann-La Roche Ltd, Grenzacherstr. 124, CH-4070, Basel, Šveicarija.

SSP TIPAVIMO RINKINIAI BE TAQ POLIMERAZĖS – LICENCIJOS ATSISAKYMAS:

Šis produktas optimizuotas naudoti polimerazinės grandininės reakcijos (PGR) procese, kuris įtrauktas į patentus, priklausančius Roche Molecular Systems, Inc. ir F. Hoffmann-La Roche Ltd („Roche“). Įsigyjant šį produktą naudotojui nėra suteikiama tiesioginė ar netiesioginė licencija pagal šiuos patentus naudoti PGR procesą. Daugiau informacijos apie licencijų įsigijimą praktikuoti PGR galite gauti JAV susisiekę su licencijavimo direktoriumi, Roche Molecular Systems, Inc. 1145 Atlantic Avenue, Alameda, California 94501, o už JAV ribų – su PGR licencijavimo vadovu, F. Hoffmann-La Roche Ltd, Grenzacherstr. 124, CH-4070, Basel, Šveicarija.

REF	GB	Article number	IVD	GB	For in vitro diagnostic use			
	DE	Artikelnummer		DE	Nur zur in-vitro Diagnostik			
	ES	Artículo número		ES	Sólo para el diagnóstico in vitro			
	IT	Codice prodotto		IT	Solo per la diagnostica in vitro			
	FR	Référence du produit		FR	Pour le diagnostic in vitro			
	NL	Artikelnummer		NL	Voor in vitro gebruik			
	DK	Artikelnummer		DK	Til diagnostik brug i glas			
	CZ	Katalogové číslo		CZ	Použití pro in vitro diagnostiku			
	LT	Produkto numeris	LT	Skirta in vitro diagnostiniam naudojimui				
BLOCK	GB	PCR block	NC	GB	negative control	CK	GB	PCR cocktail
	DE	PCR-Block		DE	Negativkontrolle		DE	PCR-Cocktail
	ES	PCR bloque		ES	control negativo		ES	PCR coctel
	IT	PCR blocco		IT	controllo negativo		IT	PCR cocktail
	FR	PCR bloc		FR	contrôle négatif		FR	PCR cocktail
	NL	PCR blok		NL	negatieve controle		NL	PCR cocktail
	DK	PCR blok		DK	negativ kontrol		DK	PCR blanding
	CZ	PCR blok		CZ	negativní kontrola		CZ	PCR koktejl
	LT	PGR blokas	LT	Neigiama kontrolė	LT	PGR kokteilis		

Turinys

1.	Įvadas	4
1.1	Paskirtis	4
1.2	Santrauka ir paaiškinimas.....	4
1.3	Testo principas.....	4
2.	Reagentai	4
2.1	HLA SSP rinkinių sudėtis.....	4
2.2	Įspėjimai ir atsargumo priemonės.....	5
2.3	Saugojimas ir galiojimo laikas.....	5
2.4	Nestabilumo ar sugedimo indikacijos.....	5
3.	Reikalavimai Prietaisams	5
3.1	Termociklerio programavimas.....	5
3.2	Elektroforezė gelyje.....	6
4.	Mėginio paėmimas ir paruošimas	6
4.1	DNR išskyrimas.....	6
4.2	Mėginio paėmimas ir paruošimas.....	6
5.	Procedūra	7
5.1	Tiekiamos medžiagos.....	7
5.2	Papildomai reikalingos priemonės.....	7
5.3	PGR.....	7
5.4	Elektroforezė gelyje.....	8
6.	Rezultatai	9
6.1	Įvertinimas.....	9
6.2	Procedūros apribojimai.....	9
6.3	Kokybės kontrolė.....	10
6.4	Specifinės našumo charakteristikos.....	10
7.	Trikčių šalinimas	11
8.	Literatūra	12

1. ĮVADAS

1.1. Paskirtis

HLA sekai specifinių pradmenų (SSP) rinkiniai skirti I klasės HLA ir II klasės HLA alelių nustatymui.

1.2 Santrauka ir paaiškinimas

HLA sistema yra sudėtinga, kodominantiškai paveldima antigenų sistema, kuri atlieka svarbų vaidmenį imuninėje sistemoje, leisdama atskirti „save“ nuo „ne savęs“. Organų transplantacijoje HLA suderinamumas tarp donoro ir recipiento yra viena iš pagrindinių transplantacijos rezultato determinančių. Dėl šios priežasties atskirų HLA antigenų derinių nustatymas yra naudojamas kaip pagrindas donorams ir recipientams parinkti.

Plėtojant DNR pagrįstus tyrimų metodus, atsivėrė nauji šiuolaikinės diagnostikos aspektai. HLA antigenai vienas nuo kito iš dalies skiriasi tik pavienėmis aminorūgštimis polipeptidinėje grandinėje. Šių iš esmės identiškų struktūrų atpažinimas serologinėmis priemonėmis yra beveik neįmanomas. Dėl šios priežasties metodo skiriami geba yra ribota. Kadangi svarbiausių HLA alelių DNR sekos dabar žinomos, sekų variantai gali būti identifikuojami DNR lygiu, naudojant sintetinius oligonukleotidus. Naudojant genominės DNR pagausinimus (PGR, polimerazinę grandininę reakciją) kartu su specifinėmis pradmenų poromis (SSP, sekai specifiniais pradmenimis), molekuliniais tyrimų metodais galima nustatyti didelį HLA alelių skaičių.

1.3 Testo principas

HLA SSP rinkiniai yra testo sistemos, skirtos HLA savybių tipavimui naudojant PGR metodus. SSP metodas pagausinimo reakcijos metu tipavimui naudoja aleliams specifinius pradmenis. Šis metodas pagrįstas principu, kad tik tie pradmenys, kurių sekos yra visiškai komplementarios DNR mėginyje esančioms taikinio sekoms, prisijungs prie šios DNR ir PGR reakcijoje DNR bus pagausinta. Kita vertus, nekomplementarūs pradmenys nesijungs prie DNR ir pagausinimas nevyks.

Pagausinta DNR nustatoma naudojant elektroforezę agarozės gelyje. Sėkmingo pagausinimo metu bus pagamintas apibrėžto ilgio DNR fragmentas, kuris gelyje atrodys kaip juostelė. Jeigu pagausinimas neįvyks, šios juostelės nebus.

Pradmenų sudėtis leidžia teigiamai identifikuoti HLA savybes. Šios nustatymo sistemos pritaikymo sritis yra individualių HLA alelių nustatymas organų donorams ir recipientams bei pacientams, kuriems atliekamas kraujo perpylimas arba kuriems taikoma pakaitinė kraujo komponentų terapija.

2. Reagentai

2.1 HLA SSP rinkinių sudėtis

HLA SSP rinkinių turinio pakanka 24 testams.

- 24 PGR blokai [BLOCK], atitinkamai, kiekvienas sudarytas iš PGR mėgintuvėlių blokų, kuriuose yra išdžiovinti pradmenų/nukleotidų mišiniai. Kaip pagalbinė identifikavimo priemonė, ant pirmos pozicijos (=H1) buvo uždėta juoda žymė.
- PGR kokteilis [CK] (paruoštas naudoti)
Kokteilių sudaro PGR buferinis tirpalas (galutinė koncentracija): 1,5 mM MgCl₂, 50 mM KCl, 10 mM Tris-HCl, 0,001% želatinos), glicerolis ir krezolio raudonasis.
- PGR dengiamosios juostelės arba PGR dengiamosios plėvelės.
- Darbalapiai, reakcijos modelio schema, pradmenų padėties lapas.

Neigiama kontrolė [NC] yra supakuota atskirai, kaip papildomi PGR mėgintuvėliai (bespalviai), jeigu ji nėra pridėta PGR bloke [BLOCK].

2.2 Įspėjimai ir atsargumo priemonės

Skirta *in vitro* diagnostiniam naudojimui [IVD]

Dėmesio: Testą turi atlikti gerai apmokyti ir įgalioti laboratorijos techniniai darbuotojai.

Dėmesio: Su visais reagentais turi būti dirbama pagal gerąją laboratorijos praktiką, naudojant tinkamas atsargumo priemones. Be to, visus pacientų mėginius laikykite potencialiai infekciniais. Nesiurbkite pipete, naudodami burną.

Dėmesio: Nenaudokite reagentų, pasibaigus galiojimo terminui, kuris atspausdintas ant etiketės.

Dėmesio: Nenaudokite reagentų, kuriuose pastebėtas koks nors drumstumas ar užteršimas mikrobais.

Dėmesio: Pipetės, kurios naudojamos manipuliacijoms po PGR, neturėtų būti naudojamos manipuliacijoms prieš PGR.

Dėmesio: Įspėjimas dėl biologinio pavojaus: Etidžio bromidas, kuris naudojamas DNR dažymui, yra potencialus karcinogenas. Dirbdami su nudažytais geliais, visuomet mėvėkite apsaugines pirštines. Atliekos tvarkomos sudeginant.

Dėmesio: Įspėjimas dėl biologinio pavojaus: Su visais kraujo produktais turėtų būti dirbama kaip su potencialiai infekciniais.

Dėmesio: Visi panaudoti PGR blokai turi būti laikomi potencialiai infekciniais ir turėtų būti sunaikinami pagal galiojančius nacionalinius reikalavimus.

Dėmesio: Žiūrėdami arba fotografuodami gelius, dėvėkite akių apsaugą nuo UV ir nežiūrėkite tiesiogiai į UV šviesos šaltinį.

Išsamesnės informacijos ieškokite medžiagų saugos duomenų lapuose.

2.3 Saugojimas ir galiojimo laikas

SSP reagentai ([BLOCK], [CK], [NC]) turi būti laikomi, kai temperatūra 2–8 °C. Galiojimo data yra atspausdinta ant rinkinio komponentų pakuotės. PGR blokai sandariai supakuoti maišeliuose.

2.4 Nestabilumo ar sugedimo indikacijos

Po to, kai maišeliai buvo atidaryti, likę nepanaudoti PGR blokai [BLOCK] turi būti laikomi jų originaliame maišelyje užsandarinus lipnia juostele arba karščiu, siekiant išvengti drėgmės kaupimosi saugojimo metu. Atidarius PGR blokai turi būti panaudoti per 4 savaites.

3. Reikalavimai Prietaisams

3.1 Termociklerio programavimas

1.1.1.	HLA SSP programa:					
1.1.2.	Pradinis denatūravimas:	94 °C	2 min.			
1.1.3.	Denatūravimas:	94 °C	10 sek.]		
1.1.4.	Prilydymas ir ilginimas:	65 °C	60 sek.]	10 ciklų
1.1.5.	Denatūravimas:	94 °C	10 sek.]		
1.1.6.	Prilydymas:	61 °C	50 sek.			
1.1.7.	Ilginimas:	72 °C	30 sek.]	20 ciklų

Anksčiau parodyta PGR programa pritaikyta Perkin-Elmer termocikleriams. Naudojant PE 9700, mėginio kaitinimo/šaldymo vidutinis greitis yra 1 °C/sekundę, o temperatūros tikslumas 35-100 °C intervale yra ± 0,25 °C.

Kitokie nei rekomenduojama termocikleriai turi būti patvirtinti naudotojo. Termocikleriams, kurie neturi reguliuojamos prispaudimo plokštelės, reikia adapterinio paklotėlio, kad būtų užtikrintas optimalus šilumos perdavimas PGR mėgintuvėliams nuo kaitinimo paviršiaus.

3.2 Elektroforezė gelyje

Informacijos ieškokite 5 skyriuje „Procedūra“, skirsnyje apie elektroforezę.

4. MĖGINIO PAĖMIMAS IR PARUOŠIMAS

4.1 DNR išskyrimas

Genominė DNR gali būti gaunama iš visų branduolį turinčių ląstelių. Paprasčiausias būdas yra DNR išskirti iš ląstelių suspensijų (iš kraujo, nekoaguliotos kraujo mėginio frakcijos, daugiausiai sudarytos iš leukocitų ir trombocitų, arba iš kultivuojamų ląstelių). Egzistuoja daug įvairių metodų, skirtų DNR išskyrimui iš ląstelių. PGR SSP tyrimui naudokite tik tuos metodus, kurie užtikrina PGR tinkamą DNR kokybę ir kiekį, pvz., išsūdymo metodą (2 literatūros šaltinis).

Iš komercinių DNR išskyrimo rinkinių tiekėjų tinkami produktai yra „Puregene“ iš Gentra Systems ir „Super Quick Gene“ iš Analizinių genetinių tyrimų centro.

4.2. Mėginio paėmimas ir paruošimas

4.2.1 Mėginys

Tipavimas atliekamas naudojant periferinį kraują, paveiktą antikoagulantais (pvz., natrio citratu, EDTA). Informacijos apie kraujo mėginių saugojimą ir stabilumą ieškokite techninėje informacijoje, kurią pateikia išskyrimo testo rinkinio gamintojas, ir ji turi būti patvirtinama naudotojo.

4.2.2 Užteršimas

DNR užteršimas PGR slopikliais, pavyzdžiui, hemoglobinu, heparinu, etanoliu ir kt. gali sukelti rimtų trukdžių PGR reakcijai. Dėl šios priežasties heparinu paveiktas kraujas neturėtų būti naudojamas kaip pradinė medžiaga DNR išskyrimui. Vietoje to naudokite citratu arba EDTA paveiktą kraują. Jeigu pacientui atliekamas gydymas heparinu, naudokite alternatyvų DNR šaltinį.

4.2.3 Hemolizinis mėginys

Venkite lipeminių ir hemolizinių mėginių naudojimo. Nerekomenduojama naudoti mėginių, kurie buvo surinkti be antikoagulianto arba kurie buvo keletą kartų užšaldyti ir atšildyti, nes tokios sąlygos gali neužtikrinti tyrimui reikalingo, pakankamo DNR kiekio ar kokybės.

4.2.4 DNR kiekis

DNR mėginys, kuris bus naudojamas, turi būti ištirpinamas steriliame distiliuotame vandenyje, kad koncentracija būtų apie 100 ± 50 ng/ μ l. DNR **neturėtų būti tirpinama** tirpaluose, kurių sudėtyje yra chelatinų medžiagų, **tokių kaip EDTA**, didesnėmis nei 0,5 mM koncentracijomis.

4.2.5 DNR kokybė

DNR koncentracijos nustatymas atliekamas matuojant optinį tankį (OD), kai bangos ilgis 260 nm (A_{260}). Vertė, kai $A_{260} = 1$ (= OD 1,0), apytiksliai atitinka 50 μ g/ml dvigrandinės DNR.

Norint įvertinti DNR užteršimo baltymais laipsnį, atliekami papildomi matavimai, kai bangos ilgis 280 nm, ir paskaičiuojamas A_{260}/A_{280} santykis. Esant grynai DNR, A_{260}/A_{280} santykis bus 1,8 arba daugiau. A_{260}/A_{280} santykio vertės, kurios yra mažesnės nei 1,8, reiškia, kad DNR užteršta baltymais. Kai A_{260}/A_{280} santykis lygus 1,5, baltymai DNR preparate sudaro apie 50%.

Siekiant gerų PGR SSP rezultatų, reikalinga DNR, kurios A_{260}/A_{280} santykis yra $\geq 1,6$.



DNR grynumas ir koncentracija turi lemiamą reikšmę optimaliems testo rezultatams.

DNR mėginys gali būti naudojamas iš karto po išskyrimo arba saugomas ilgesnį laiką (ilgiau nei 1 metus), kai temperatūra – 20 °C ar žemesnė, be neigiamo poveikio rezultatams.

Informacijos apie išskirtos DNR saugojimą ir stabilumą ieškokite techninėje informacijoje, kurią pateikia DNR išskyrimo testo rinkinio gamintojas.

5. PROCEDŪRA

5.1 Tiekiamos medžiagos

Žiūrėkite skyrių 2.1 „HLA SSP rinkinių sudėtis“.

5.2 Papildomai reikalingos priemonės

5.2.1 Priemonės mėginiams (DNR)

- UV spektrofotometras

5.2.2 PGR

- Taq DNR polimerazė (5 U/μl, pvz., PE Applied Biosystems)
- Termocikleris su kaitinamu dangteliu (pvz., PE 9600, PE 9700 PE Applied Biosystems)
- Reguliuojamos pipetės
- Eppendorf Multipette dozatorius su Combipip antgaliais (10 μl)
- Pipetės antgaliai su filtrais

- Distiliuotas vanduo (dH₂O)

5.2.3 Elektroforezė gelyje

- Agarozė (skirta molekulinei biologijai)
- Gelio kamera (tinkama geliui su mažiausiai 25 kišenėlėmis)
- 5x TBE buferinis tirpalas
 - Tris(hidroksimetil)-aminometanas (bazė)
 - Boro rūgštis (H₃BO₃)
 - Dinatrio EDTA
- Etidžio bromido tirpalas (10 mg/ml)
- DNR kopėtėlės (50 – 1000 bp žymuo)
- Magnetinė maišyklė su kaitinamąja plokšte arba mikrobangų krosnele
- Reguliuojamos pipetės
- Polaroid fotoaparatas su UV filtru ir 667 tipo Polaroid juostele
- UV transiliuminatorius (maždaug 200 – 300 nm)
- Maitinimo šaltinis
- Distiliuotas vanduo (dH₂O)

5.3 PGR (polimerazinė grandininė reakcija)

5.3.1 Atsargumo priemonės

PGR yra ypatingai jautrus metodas, kuriuo galima efektyviai pagausinti net ir mažiausius DNR kiekius. Vadinas, kad net ir teršiančios DNR pėdsakai mėginyje gali būti padauginti PGR reakcijos metu ir taip jie gali iškreipti testo rezultatus. Vienas iš konkrečių užteršimo šaltinių yra pagausinta DNR, susisiekti su mėginiais, kurie turi būti pagausinti. Siekiant išvengti užteršimo pagausinta medžiaga, rekomenduojama, kad darbo zonos būtų griežtai atskirtos taip:

1. Zona prieš PGR:

Visas darbas, atliekamas prieš PGR (DNR išskyrimas ir saugojimas, pasiruošimai PGR, reagentų ir tirpalų, skirtų DNR išskyrimui ir PGR, gamyba bei saugojimas).

2. Zona po PGR:

Termocikleris, elektroforezė gelyje, įvertinimas, pagausintos DNR saugojimas.
Įranga ir medžiagos iš zonos po PGR neturėtų būti pernešamos į zoną prieš PGR.

3. Dirbant zonoje prieš PGR, turi būti naudojamos pipetės su apsauga nuo aerozolių (antgaliai su filtrais).
Rekomenduojama, kad neigiama kontrolė būtų įtraukta į testo procedūrą, kaip indikacija apie užteršimą svetima DNR.

5.3.2 HLA SSP tipavimo testo atlikimas

- (1) Vienam DNR mėginio HLA tipavimui kiekviename PGR mėgintuvėlyje atliekamos PGR reakcijos, kurių tūris 10 μl. Juoda žymė yra pagalbinė priemonė, kuri padeda teisingai orientuoti PGR bloką **BLOCK** (H1 pozicijoje).

- (2) Eppendorf reakcijos mėgintuvėlyje paruoškite **kiekvienam tipavimo testui skirtą pagrindinį mišinį**, kurį sudaro šie komponentai:
 PGR kokteilis **CK**
 Taq DNR polimerazė (5U/μl)
 dH₂O
 (dėl skirtingų konfigūracijų žiūrėkite toliau esančią lentelę)

Gerai sumaišykite ir 10 μl šio mišinio pipete sulašinkite į neigiamą kontrolę **NC** Po to pridėkite DNR (maždaug 100 ± 50 ng/μl) ir gerai sumaišykite.

Skirtingų pagrindinio mišinio konfigūracijų ieškokite toliau pateiktoje lentelėje:

PGR reakcijų skaičius	Pagrindinis mišinys konfigūracijai su				
	8	18	24	48	96
PGR kokteilis CK	44 μl	100 μl	120 μl	228 μl	440 μl
Taq DNR polimerazė	0,7 μl	1,5 μl	1,8 μl	3,5 μl	7 μl
dH ₂ O	55 μl	125 μl	150 μl	288 μl	550 μl
DNR (apie 100 ± 50 ng/μl)	11 μl	25 μl	30 μl	57 μl	110 μl

- (3) Iš šio pagrindinio mišinio pipete paimkite po 10 μl ir sulašinkite į kiekvieną išdžiovintų pradmenų mišinį. Tai geriausiai atliekama naudojant Multipette dozatorių. Siekiant išvengti pradmenų pernešimo, reikėtų pasirūpinti, kad pipetės antgaliai neprisiliestų prie pradmenų. Dėl šios priežasties pagrindinį mišinį pipete lašinkite ant šulinėlių sienelių..
- (4) Tinkamai užsandarinkite PGR juosteles, naudodami tiekiamas PGR dengiamąsias juosteles arba plėveles. Dėklą perkelkite į termociklerį ir pradėkite PGR, naudodami HLA SSP programą.

5.4 Elektroforezė gelyje

PGR produktai identifikuojami naudojant elektroforezę agarozės gelyje, po kurios DNR juostelės aptinkamos UV šviesoje.

5.4.1 Reagentų paruošimai

- **5 x buferinis tirpalas** (0,445 M tris-boratas, 0,0125 M EDTA):
 54 g Tris(hidroksimetil)-aminometanas (bazė)
 27,5 g Boro rūgštis (H₃BO₃)
 4,65 g Dinatrio EDTA
 Pripilkite 1000 ml distiliuoto vandens, laikykite esant kambario temperatūrai.
- **Etidžio bromido tirpalas** (10 mg/ml)
 100 mg etidžio bromido ištirpinkite 10 ml distiliuoto vandens ir laikykite, esant 2–8 °C, saugodami nuo šviesos.
Dėmesio: Etidžio bromidas yra mutageniškas ir toksiškas. Visada mūvėkite apsaugines pirštines, kai dirbate su etidžio bromidu (taip pat ir su skiestu). Patekus ant odos, nedelsdami nuplaukite dideliu vandens kiekiu.
- **1 x buferinis tirpalas**
 5x TBE buferinio tirpalo galutinis skiedimas demineralizuotame vandenyje santykiu 1:5.

5.4.2 Elektroforezės gelyje atlikimas

2 % agarozės tirpalas paruošiamas 5 g agarozės verdant 250 ml 1x TBE, kol agarozė visiškai ištirps. Maišydami tirpalą, jį atvėsinkite iki < 60 °C temperatūros ir pridėkite 4 μl etidžio bromido. Paskui, į paruoštą ir užsandarintą gelio dėklą supilkite agarozės tirpalą, neturintį burbuliukų. Įstatykite šukas (10 μl kišenėlėmis) ir mažiausiai 10 minučių laikykite esant kambario temperatūrai.

Kai agarozė sustingsta, gelis įstatomas į gelio kamerą. Šukos ištraukiamos, o gelis padengiamas 1x TBE. Gelio kišenėlės turi būti visiškai padengtos buferiniu tirpalu. Visą PGR mišinių tūrį (po 10 μl) pipete sulašinkite į gelio kišenėles.

Norint patikrinti PGR produktų dydį, elektroforezei rekomenduojama naudoti tinkamą molekulinį masių standartą (50 – 1000 bp žymeni).

Elektroforezė trunka nuo 15 iki 25 minučių, esant 8 V/cm (atstumas tarp elektrodų). Krezolio raudonojo judėjimo atstumas turėtų siekti iki 1–1,5 cm.

5.4.3 Dokumentacija

Užbaigus elektroforezę, gelis dedamas ant UV transiluminatoriaus ir fotografuojamas dokumentacijai ir interpretavimui.

Dėmesio: Apžiūrėdami ar fotografuodami gelius, dėvėkite akių apsaugą nuo UV ir nežiūrėkite tiesiai į UV šviesos šaltinį.

6. REZULTATAI

6.1 Įvertinimas








HLA pradmenų mišinyje yra kontrolinių pradmenų, kurie pagausina 1069 bp žmogaus augimo hormono (HGH) fragmentą. Šių pradmenų koncentracija yra mažesnė nei aleliams specifinių pradmenų porų, o jų paskirtis yra užtikrinti vidinę sėkmingo PGR pagausinimo kontrolę. Šis pagausinimas paprastai visada įvyksta, t.y. tiek esant, tiek nesant aleliui ar grupei specifiniam PGR fragmentui. Todėl kontrolinė juostelė paprastai gali būti matoma visose PGR reakcijose. Retkarčiais kontrolinė juostelė gali atrodyti silpna arba jos gali iš viso nebūti, esant aleliui specifiniam HLA PGR produktui. Tai nėra metodo apribojimas, nes specifinė juostelė atstoja sėkmingo PGR proceso kontrolę.

Pradmenų sudėtis leidžia atlikti teigiamą HLA savybių identifikavimą. Interpretavimas paremtas tuo, ar gelyje yra specifinė juostelė, ar jos nėra.

Vertinant testą neturėtų būti atsižvelgiama į pagausintų DNR fragmentų dydį, tačiau tai gali būti naudinga testo interpretavimui.

Vertinimui specifinių juostelių modelis perkeliamas į pateiktą rezultatų lapą, o tipavimo rezultatas nuskaitomas remiantis reakcijos modeliu.

Gelio interpretavimas

	Teigiama reakcija	Teigiama reakcija	Neigiama reakcija	Neįvykęs pagausinimas
Gelio kišenėlė				
Kontrolinė juostelė	Nėra	-----		Nėra
Specifinė juostelė			Nėra	Nėra
Pradmens dimeras				

6.2 Procedūros apribojimai

1. Priklausomai nuo naudojamos DNR kokybės ir kiekio juostelių intensyvumas gali skirtis. PGR produkto kiekis atitinka UV šviesoje matomų juostelių intensyvumą.
2. Jeigu 1 arba 2 PGR pagausinimai nepavyksta, turite nustatyti, ar jų teigiamas įvertinimas veda prie tipiško rezultato. Tokiu atveju testas turi būti pakartojamas. Jeigu trūkstamų pagausinimų teigiamas įvertinimas neveda prie tipiško rezultato ir jeigu yra aiškus dviejų alelių buvimo įrodymas, nereikia jokių papildomų vertinimų. Tačiau jeigu galima rasti tik vieną alelį, testas turi būti pakartojamas.
3. Kitos Taq DNR polimerazės naudojimas, nei tos, kurią rekomendavo PE Applied Biosystems, gali sukelti nesėkmių ir nespecifinių, klaidingai teigiamų PGR pagausinimų.
4. DNR mėginiai gali būti naudojami iš karto po išskyrimo arba saugomi ilgesnį laiką (ilgiau nei 1 metus), kai temperatūra – 20 °C arba žemesnė, be neigiamo poveikio rezultatams.
5. Testo našumas gali būti garantuojamas tik tuomet, jeigu griežtai laikomasi pridėtų instrukcijų.
6. Šis testas turėtų būti naudojamas tik pradiniam HLA tipavimui. Nustatant tinkamumą transplantacijai, papildomai turėtų būti naudojamos ir kitos klinikinės bei diagnostinės išvados.
7. Naudojant Bio-Rad HLA SSP tipavimo rinkinį negalima nustatyti visų derinių.

6.3 Kokybės kontrolė

Kiekviena pagaminta partija yra patikrinama pagal DNR mėginių platformą, būdingą specifinei DNR, kuri aptinkama pradmenimis, o ji prieinama pagal pageidavimą.

Naujų partijų numerių kokybės kontrolė gali būti atliekama tipuojant žinomų heterozigotinių alelių derinius, kurie reaguos su daugeliu pradmenų mišinių rinkinyje.

6.4 Specifinės našumo charakteristikos

Bio-Rad SSP tipavimo rinkinys buvo palygintas su SSP tipavimo rinkiniu ir SSO tipavimo sistema, ištyrus 167 mėginius (atsitiktinius transplantacijos kandidatus ir potencialius donorus) dviejose geografiškai skirtingose vietose. Bio-Rad SSP tipavimo rinkinio rezultatai ir rezultatai, gauti naudojant SSP bei SSO testus, atitiko 100% (167/167).

	Sutampa	Nesutampa	Iš viso	%
N	167	0	167	100
%	100%	0%		

N=Mėginių skaičius

7. TRIKČIŲ ŠALINIMAS

PROBLEMA	PRIEŽASTIS	SPRENDIMAS
Nėra matomų juostelių.	Gelyje trūksta etidžio bromido.	Iš naujo perdažykite gelį gelio vonelėje (1x TBE buferiniame tirpale su 0,5 µg/ml etidžio bromido).
Molekulinių masių standartas matomas. PGR produktų nesimato.	Neteisingas PGR paruošimas: Pamiršta pridėti DNR arba Taq polimerazės. Netinkamos temperatūros ciklo sąlygos.	Pakartokite PGR paruošimą. Patikrinkite PGR programą termocikleryje. Nurodyta programa tinkama rekomenduojamiems PE 9600 ir PE 9700 termocikleriams. Kiti termocikleriai nei tie, kurie buvo rekomenduoti, turėtų būti patvirtinami naudotojo. Kiti termocikleriai nei tie, kurie buvo rekomenduoti, gali turėti skirtingus kaitinimo ir vėsavimo greičius. <u>Galimi PGR programų variantai:</u> Jeigu vyksta nespecifinių pagausinimų, gali būti nustatomos griežtesnės sąlygos, laipsniškai didinant prilydymo temperatūrą 1 °C. Kita vertus, klaidingai neigiamus pagausinimus gali lemti pernelyg griežtos PGR sąlygos. Tokiu atveju rekomenduojamas papildomas prilydymo temperatūros sumažinimas 1 °C. Padidinkite denatūravimo trukmę nuo 10 iki 20 sekundžių. Padidinkite ilginimo trukmę nuo 30 iki 60 sekundžių.
Nepavyko vienas arba keli PGR pagausinimai (kontrolinės juostelės ir specifiniai pagausinimai).		Jeigu nepavyksta 1 arba 2 PGR pagausinimai, turite patikrinti, ar jų teigiamas įvertinimas veda prie tipiško rezultato. Tokiu atveju testas turi būti pakartojamas. Jeigu trūkstamų pagausinimų teigiamas įvertinimas neveda prie tipiško rezultato ir jeigu yra aiškus dviejų alelių buvimo įrodymas, nereikia jokių papildomų vertinimų. Tačiau jeigu randamas tik vienas alelis, testas turi būti pakartojamas. Jeigu nepavyksta daugiau nei 2 PGR pagausinimai, testas turi būti pakartojamas.
Gelyje silpnos specifinės juostelės; kontrolinių juostelių nėra arba jos labai silpnos.	Panaudotas nepakankamas DNR kiekis. Paruošimo metu pakliuvo PGR slopiklių, tokių kaip etanolis, hemoglobinas, heparinas, granulės. DNR tirpalo pH vertė yra per daug rūgštinė (pridėjus DNR, PGR kokteilio spalva pasikeičia). Netinkamos temperatūros ciklo sąlygos.	Padvigubinkite DNR kiekį (paruošimo metu sumažinkite dH ₂ O). PGR paruošimui naudokite apie 100 ng DNR. Naudokite EDTA arba citratu paveiktą kraują kaip bazinę medžiagą. (Po to, kai DNR nuosėdos plautos etanolio, užtikrinkite, kad jos būtų pakankamai sausas.) Dar kartą išsodinkite DNR ir ištirpinkite distiliuotame vandenyje. Žr. anksčiau pateiktą sprendimo būdą.
Gelyje silpnos specifinės juostelės.	Per didelė DNR koncentracija. DNR ištirpinta buferiniame tirpale, kurio sudėtyje yra PGR reakcijos slopiklio. Netinkamos temperatūros ciklo sąlygos.	Skieskite DNR. Pernelyg didelės DNR koncentracijos arba DNR, kuri buvo ištirpinta netinkamai, kai kuriais atvejais gali lemti specifinių juostelių nesusidarymą. Dar kartą išsodinkite DNR ir ištirpinkite distiliuotame vandenyje. Žr. anksčiau pateiktą sprendimo būdą.
Yra kontrolinės juostelės, yra specifinės juostelės, bet be to atsiranda viena arba kelios silpnos, nespecifinės juostelės (klaidingai teigiamos reakcijos).	Per didelės DNR koncentracijos. Pašalinės reakcijos su kitais aleliais. Nepakankama DNR kokybė arba DNR užteršimas.	Skieskite DNR. Patikrinkite reakcijos modelį. Išskirkite naujos DNR.
Juostelės neigiamos kontrolės PGR mišinys.	Įvykus klaidai, DNR pipete buvo sulašinta į neigiamos kontrolės mišinį. Reagentų užteršimas.	Galima pakartoti paruošimą arba atlikti pastabą apie tai vertinimo dokumentuose. Pakeiskite reagentus.

8. LITERATŪRA

1. Graham DE (1978)
The isolation of high molecular weight DNA from whole organisms or large tissue masses.
Anal Biochem 85: 609-613
2. Miller SA, Dykes DD, Polesky HF (1988)
A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells.
Nucl Ac Res 16: 1215
3. Olerup O, Zetterquist H (1992)
HLA-DR typing by PCR amplification with sequence-specific primers (PCR-SSP) in two hours: An alternative to serological DR typing in clinical practice including donor recipient matching in cadaveric transplantation.
Tissue Antigens 39: 225-335.
4. Bunce M, O'Neill CM, Barnado MCNM, Krausa P, Browning MJ, Morris PJ, Welsh KI (1995)
Phototyping: comprehensive DNA typing for HLA-A, B, C, DRB1, DRB3, DRB4, DRB5 & DQB1 by PCR with 144 primer mixes utilizing sequence-specific primers (PCR-SSP)
Tissue Antigens 46:355-367.