



ИНСТРУКЦИЯ

по применению набора реагентов
для подготовки библиотек фрагментов ДНК генов HLA I и II классов
для генотипирования высокопроизводительным секвенированием (NGS)

HLA-Эксперт

Регистрационное удостоверение
№ РЗН 2019/9208 от 08 ноября 2019 года

ВНИМАНИЕ! Изучите инструкцию перед началом работы

СОДЕРЖАНИЕ

ВВЕДЕНИЕ	4
1 НАЗНАЧЕНИЕ	7
2 ХАРАКТЕРИСТИКА НАБОРА РЕАГЕНТОВ	8
2.1 Состав набора	8
2.2 Количество анализируемых проб	14
2.3 Принцип действия	14
2.4 Время проведения анализа	16
3 АНАЛИТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ	16
3.1 Предел обнаружения	16
3.2 Аналитическая специфичность	16
3.3 Диагностические характеристики, точность, воспроизводимость	17
4 МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ	18
5 ОБОРУДОВАНИЕ И МАТЕРИАЛЫ	20
6 АНАЛИЗИРУЕМЫЕ ОБРАЗЦЫ	21
6.1 Материал для исследования	21
6.2 Транспортирование и хранение исследуемого материала	21
7 ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА	22
7.1 Выделение ДНК из биологического материала	22
7.2 Оценка пригодности выделенной ДНК (Фасовка N)	22
7.2.1 Проведение ПЦР (Фасовка N)	22
7.2.2 Проведение ПЦР (Фасовка A)	23
7.2.3 Интерпретация результатов ПЦР (оценка пригодности ДНК)	24
7.2.4 Нормализация концентрации ДНК образцов	25
7.3 Амплификация фрагментов ДНК	25
7.3.1 Проведение ПЦР (Фасовка N)	25
7.3.2 Проведение ПЦР (Фасовка A)	27
7.3.3 Регистрация результатов ПЦР	28
7.4 Подготовка библиотек фрагментов ДНК	29
7.4.1 Подготовка фрагментов ДНК к лигированию (Фасовка N)	29
7.4.2 Подготовка фрагментов ДНК к лигированию (Фасовка A)	30
7.4.3 Лигирование библиотек фрагментов ДНК (Фасовка N)	30
7.4.4 Лигирование библиотек фрагментов ДНК (Фасовка A)	32
7.4.5 Пулирование, очистка и проведение амплификации библиотек фрагментов ДНК (Фасовка N)	33
7.4.6 Пулирование, очистка и проведение амплификации библиотек фрагментов ДНК (Фасовка A)	36
7.4.7 Очистка библиотек фрагментов ДНК (Фасовка N)	37
7.4.8 Очистка библиотек фрагментов ДНК (Фасовка A)	39
8 ОЦЕНКА КОЛИЧЕСТВА И КАЧЕСТВА БИБЛИОТЕКИ	39
9 ПРОВЕДЕНИЕ СЕКВЕНИРОВАНИЯ	40
10 АНАЛИЗ ПОЛУЧЕННЫХ ДАННЫХ	40
11 ТРАНСПОРТИРОВАНИЕ, ХРАНЕНИЕ И ЭКСПЛУАТАЦИЯ	40
11.1 Транспортирование	40
11.2 Хранение	41
11.3 Указания по эксплуатации	41
12 УКАЗАНИЯ ПО УТИЛИЗАЦИИ	42
13 ГАРАНТИИ ИЗГОТОВИТЕЛЯ	42
14 РЕМОНТ И ТЕХНИЧЕСКОЕ ОБСЛУЖИВАНИЕ	42
15 СИМВОЛЫ, ИСПОЛЬЗУЕМЫЕ ПРИ МАРКИРОВКЕ НАБОРА РЕАГЕНТОВ	43
16 ПЕРЕЧЕНЬ ПРИМЕНЯЕМЫХ НАЦИОНАЛЬНЫХ СТАНДАРТОВ	44
17 АДРЕС ДЛЯ ОБРАЩЕНИЯ	45
Приложение А	47
Приложение Б	48
Приложение В	49
Приложение Г	52

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

В настоящей инструкции используются следующие сокращения и обозначения:

HLA	- Human Leukocyte Antigens
NGS	- Next Generation Sequencing
ПО	- программное обеспечение
ПЦР	- полимеразная цепная реакция
К-	- отрицательный контрольный образец
ДИ	- доверительный интервал

ВВЕДЕНИЕ

HLA (от Human Leukocyte Antigens, антигены лейкоцитов человека) – главный комплекс генов гистосовместимости человека (синоним: МНС – major histocompatibility complex), компактно расположен на коротком плече 6-ой хромосомы человека [9].

Каждый человек обладает индивидуальным набором HLA-молекул и, соответственно, индивидуальным набором HLA-генов, кодирующих эти молекулы. Ребенок наследует по одному аллельному варианту каждого HLA-гена от своих биологических родителей.

«Классические» гены HLA I и II классов играют ключевую роль в развитии приобретенного иммунного ответа на антигены чужеродных и измененных собственных белков. Их основная физиологическая функция – эффективный иммунный ответ на вирусные и бактериальные инфекции. Гены HLA участвуют в репродуктивной функции человека. Установлена связь определенных вариантов HLA-генов с развитием инфекционных, аллергических, аутоиммунных и онкологических заболеваний [6-8, 11-13].

«Классические» гены HLA I (HLA-A, HLA-B, HLA-C) и II классов (HLA-DRB1, HLA-DQB1 и HLA-DPB1) и «неклассические» гены HLA II класса DRB3/4/5 являются самыми вариabельными из числа всех известных на сегодняшний день генов человека. В настоящее время общее количество аллелей этих генов составляет около 22 000. Белки, кодируемые вариabельной частью «классических» HLA-генов, образуют антигенсвязывающий домен, в котором происходит удержание собственных и чужеродных пептидов, что является необходимым условием для распознавания их клетками иммунной системы [2,9].

Типирование HLA-генов на уровне высокого разрешения подразумевает определение всех HLA аллелей, кодирующих одинаковую последовательность белка в антигенсвязывающем домене, и исключение нулевых аллелей, имеющих полиморфизмы при отсутствии экспрессии кодируемого белка на клетке [1]. Для решения этой задачи использовано генотипирование 2 и 3 экзона для генов HLA I класса и 2 экзона для генов HLA II класса. Для решения задачи определения истинных гомозигот и других неопределенностей использовано генотипирование дополнительных экзонов и интронов.

Высокопроизводительное секвенирование нового поколения (Next Generation Sequence – NGS), представляет собой одновременное (параллельное) прочтение нуклеотидной последовательности нескольких миллионов «коротких» фрагментов исходного «длинного» фрагмента ДНК с последующей «реконструкцией» исходного «длинного» фрагмента ДНК из «коротких» с помощью биоинформационных методов [4,5,16].

Технологические этапы высокопроизводительного секвенирования:

1. Выделение ДНК из образца биоматериала;
2. Оценка качества выделенной ДНК;
3. Фрагментация выделенной ДНК (физическая, ферментативная или наработка с помощью ПЦР целевого участка гена для «таргетного» секвенирования);
4. Присоединение уникальных синтетических олигонуклеотидных последовательностей (индексов) к фрагментам ДНК для обеспечения возможности их последующей идентификации – маркировка «библиотеки» фрагментов ДНК;
5. Оценка соответствия качественно-количественных характеристик подготовленной «библиотеки» требованиям, необходимым для проведения последующей клональной амплификации;
6. Клональная амплификация (эмульсионная ПЦР или мостиковая ПЦР);
7. Автоматическое секвенирование (определение нуклеотидной последовательности амплифицированной ДНК проводится на приборе для NGS);
8. Обработка результатов секвенирования (проводится программным обеспечением прибора для NGS);
9. Биоинформационный анализ данных.

Список литературы

1. Standards for histocompatibility immunogenetics testing
2. Marsh S.G.E.; by the WHO Nomenclature Committee for Factors of the HLA System. Nomenclature for factors of the HLA system, update March 2017 // HLA. 2017 Jul; 90(1): 70-76. doi: 10.1111/tan.13054.
3. Middleton D., Hahn A.B., Marsh S.G.E. Publication Ethos in the Immunogenetics community. // Int J Immunogenet. 2017 Aug; 44(4):151-152. doi: 10.1111/iji.12326.
4. Jankevic T., Korostin D., Kochetkova T., Mukosey I., Shubina E., Altukhova O., Boldyreva M., Trofimov D. Modification of amplicon and libraries preparation for NGS HLA-typing // 30th European Immunogenetics & Histocompatibility Conference, Kos, Greece, 2016, P.112.
5. Jankevic T., Korostin D., Kochetkova T., Mukosey I., Shubina E., Altukhova O., Boldyreva M., Trofimov D. HLA-typing of 3 populations of Russia using a modified procedure NGS typing // 30th European Immunogenetics & Histocompatibility Conference, Kos, Greece, 2016, P.161.
6. Riezzo I., Pascale N., La Russa R., Liso A., Salerno M., Turillazzi E. Donor Selection for Allogenic Hemopoietic Stem Cell Transplantation: Clinical and Ethical Considerations. // Stem Cells Int. 2017; 2017:5250790. doi: 10.1155/2017/5250790. Epub 2017 Jun 7.
7. Eapen M., Wang T., Veys P.A., Boelens J.J., St Martin A. et al. Allele-level HLA matching for umbilical cord blood transplantation for non-malignant diseases in children: a retrospective analysis. // Lancet Haematol. 2017 Jul; 4(7): e325-e333. doi: 10.1016 / S2352-3026(17)30104-7. Epub 2017 Jun 13.

8. Querol S., Mufti G.J., Marsh S.G.E. et al. Cord blood stem cells for hematopoietic stem cell transplantation in the UK: how big should the bank be? // Haematologica. 2009 Apr; 94(4): 536–541.
9. Болдырева М.Н. HLA (класс II) и естественный отбор. «Функциональный» генотип, гипотеза преимущества «функциональной» гетерозиготности. // Диссертация на соискание ученой степени доктора медицинских наук, 2007.
10. Куранов А.Б. Аллельный полиморфизм генов HLA класса II в казахской популяции и его прогностическое значение при ревматоидном артрите // Диссертация на соискание ученой степени кандидата биологических наук, 2016.
11. Болдырева М.Н., Хаитов Р.М., Барцева О.Б., Гузов И.И., Барков И.Ю., Померанцева Е.И., Богатова О.В., Гуськова И.А., Янкевич Т.Э., Хромова Н.А., Сергеев И.В., Филиппова Е.В., Алексеев Л.П. Исследование роли HLA-D RB1-генов при невынашивании беременности неясного генеза. // Иммунология. – 2004. – Том 25. – №1. – С. 4-8.
12. Болдырева М.Н., Хаитов Р.М., Дедов И.И., Богатова О.В., Гуськова И.А., Янкевич Т.Э., Зилов А.В., Осокина И.В., Евсеева И.В., Ганичева Л.Л., Кашенин М.Н. Алексеев Л.П. Новый взгляд на механизм HLA ассоциированной предрасположенности к сахарному диабету 1 типа. Теоретические и прикладные аспекты. // Иммунология. – 2005. – №6. – С. 324-328.
13. Болдырева М.Н., Алексеев Л.П., Хаитов Р.М., Гуськова И.А., Богатова О.В., Янкевич Т.Э., Хромова Н.А., Балановская Е.В., Балановский О.П., Пшеничных А.С., Целинская И.Н., Кашенин М.Н., Ганичева Л.Л., Поздеева О.С., Евсеева И.В., Сароянц Л.В. HLA-генетическое разнообразие населения России и СНГ. I. Русские. // Иммунология. – 2005. – Т. 26 (5). – С.260-263.
14. Болдырева М.Н., Гуськова И.А., Богатова О.В., Янкевич Т.Э., Хромова Н.А., Тегако О.В., Атраментова Л.А., Ищук М.В., Дубова Н.А., Ганичева Л.Л., Поздеева О.С., Балановская Е.В., Алексеев Л.П. HLA-генетическое разнообразие населения России и СНГ. II. Народы европейской части. //Иммунология. – 2006. – Т.27. – №4. – С.198-202.
15. Хорошкеева О.В., Тетруашвили Н.К., Агаджанова А.А., Бурменская О.В., Трофимов Д.Ю. Полная гистосовместимость матери и плода как один из факторов преждевременных родов и плацентарной недостаточности. // Акушерство и гинекология. 2015. №10. С.103-106.
16. Ребриков Д.В., Коростин Д.О., Шубина Е.С., Ильинский В.В. NGS: высокопроизводительное секвенирование. – М.: «БИНОМ. Лаборатории знаний», 2014.

1 НАЗНАЧЕНИЕ

1.1 Настоящая инструкция распространяется на набор реагентов для подготовки библиотек фрагментов ДНК генов HLA I и II классов для генотипирования высокопроизводительным секвенированием (NGS) (HLA-Эксперт), далее по тексту набор реагентов.

1.2 Набор реагентов HLA-Эксперт предназначен для типирования генов HLA I (HLA-A, HLA-B, HLA-C) и HLA II (DRB1, DQB1, DPB1, DRB3/4/5) на уровне высокого разрешения методом высокопроизводительного секвенирования (NGS) на платформе Illumina с помощью программного обеспечения «HLA-Эксперт» в биологическом материале человека.

1.3 Функциональное назначение: набор реагентов предназначен для диагностики *in vitro* (подготовка библиотек фрагментов геномной ДНК человека для последующего типирования генов HLA I и II классов на уровне высокого разрешения методом высокопроизводительного секвенирования).

1.4 Показания к проведению исследования: HLA-генотипирование потенциальных доноров гемопоэтических стволовых клеток для включения в Регистр и обследование потенциальных доноров и реципиентов с целью подбора гистосовместимого донора при трансплантации органов и тканей, супружеских пар с репродуктивными нарушениями и больных с иммуноопосредованными заболеваниями.

1.5 В качестве биологического материала для анализа используют цельную периферическую кровь.

1.6 Набор может быть использован в клинко-диагностических лабораториях медицинских учреждений и научно-исследовательской практике.

1.7 Применение набора реагентов не зависит от популяционных и демографических аспектов. Противопоказаний к применению нет.

1.8 Потенциальные пользователи: квалифицированный персонал, обученный методам молекулярной диагностики и правилам работы в клинко-диагностической лаборатории.

1.9 Применять набор реагентов строго по назначению согласно данной инструкции по применению.

2 ХАРАКТЕРИСТИКА НАБОРА РЕАГЕНТОВ

2.1 Состав набора

Набор реагентов выпускается в фасовке N (для ручного дозирования) и в фасовке A (для автоматизированного дозирования).

I. Фасовка N v3-600, REF S5-H013-NI:

- 1) Комплект реагентов для амплификации и подготовки библиотек фрагментов ДНК
 - Смесь для амплификации KBM – 3 пробирки (по 1,2 мл);
 - Смесь для амплификации HLA I – 3 пробирки (по 1,0 мл);
 - Смесь для амплификации HLA II – 3 пробирки (по 1,0 мл);
 - Буфер для разведения ДНК – 6 пробирок (по 4,5 мл);
 - Смесь для амплификации библиотек ИЛМ – 1 пробирка (300 мкл);
 - Фермент-TAT (30) – 3 пробирки (по 30 мкл);
 - Фермент-TAT (100) – 3 пробирки (по 100 мкл);
 - Реагент L1 – 3 пробирки (по 340 мкл);
 - Реагент L2 – 3 пробирки (по 340 мкл);
 - Фермент-LIG – 3 пробирки (по 100 мкл);
 - Фермент-TAT (15) – 1 пробирка (15 мкл).
- 2) Комплект индексов для подготовки библиотек фрагментов ДНК
 - Индексы ts1 - ts96 – 1 микропланшет;
 - Индексы ts97 - ts192 – 1 микропланшет;
 - Индексы ts193 - ts288 – 1 микропланшет;
 - Адгезивная плёнка – 3 шт.
- 3) Комплект реагентов для очистки библиотек фрагментов ДНК
 - Раствор МЧ – 1 пробирка (2,4 мл);
 - Элюирующий раствор TEL – 1 пробирка (3,0 мл).
- 4) Комплект реагентов для секвенирования v3-600:
 - Картридж с реагентами – 1шт.;
 - HT1 буфер – 1 пробирка (4,5 мл);
 - PR2 буфер – 1 флакон (500 мл);
 - Проточная ячейка – 1 шт.
- 5) Дистрибутив с программным обеспечением «HLA-Эксперт» (версия 2.0 и выше) – 1 шт.

II. Фасовка N v2-500, REF S5-H012-NI:

- 1) Комплект реагентов для амплификации и подготовки библиотек фрагментов ДНК
 - Смесь для амплификации KBM – 3 пробирки (по 1,2 мл);
 - Смесь для амплификации HLA I – 3 пробирки (по 1,0 мл);
 - Смесь для амплификации HLA II – 3 пробирки (по 1,0 мл);
 - Буфер для разведения ДНК – 6 пробирок (по 4,5 мл);
 - Смесь для амплификации библиотек ИЛМ – 1 пробирка (300 мкл);
 - Фермент-TAT (30) – 3 пробирки (по 30 мкл);

- Фермент-TAT (100) – 3 пробирки (по 100 мкл);
 - Реагент L1 – 3 пробирки (по 340 мкл);
 - Реагент L2 – 3 пробирки (по 340 мкл);
 - Фермент-LIG – 3 пробирки (по 100 мкл);
 - Фермент-TAT (15) – 1 пробирка (15 мкл).
- 2) Комплект индексов для подготовки библиотек фрагментов ДНК
- Индексы ts1 - ts96 – 1 микропланшет;
 - Индексы ts97 - ts192 – 1 микропланшет;
 - Индексы ts193 - ts288 – 1 микропланшет;
 - Адгезивная плёнка – 3 шт.
- 3) Комплект реагентов для очистки библиотек фрагментов ДНК
- Раствор МЧ – 1 пробирка (2,4 мл);
 - Элюирующий раствор TEL – 1 пробирка (3,0 мл).
- 4) Комплект реагентов для секвенирования v2-500:
- Картридж с реагентами – 1шт.;
 - HT1 буфер – 1 пробирка (4,5 мл);
 - PR2 буфер – 1 флакон (500 мл);
 - Проточная ячейка – 1 шт.
- 5) Дистрибутив с программным обеспечением «HLA-Эксперт» (версия 2.0 и выше) – 1 шт.

III. Фасовка N v1, REF S6-H010-NI:

- 1) Комплект реагентов для амплификации и подготовки библиотек фрагментов ДНК
- Смесь для амплификации KBM – 3 пробирки (по 1,2 мл);
 - Смесь для амплификации HLA I – 3 пробирки (по 1,0 мл);
 - Смесь для амплификации HLA II – 3 пробирки (по 1,0 мл);
 - Буфер для разведения ДНК – 6 пробирок (по 4,5 мл);
 - Смесь для амплификации библиотек ИЛМ – 1 пробирка (300 мкл);
 - Фермент-TAT (30) – 3 пробирки (по 30 мкл);
 - Фермент-TAT (100) – 3 пробирки (по 100 мкл);
 - Реагент L1 – 3 пробирки (по 340 мкл);
 - Реагент L2 – 3 пробирки (по 340 мкл);
 - Фермент-LIG – 3 пробирки (по 100 мкл);
 - Фермент-TAT (15) – 1 пробирка (15 мкл).
- 2) Комплект индексов для подготовки библиотек фрагментов ДНК
- Индексы ts1 - ts96 – 1 микропланшет;
 - Индексы ts97 - ts192 – 1 микропланшет;
 - Индексы ts193 - ts288 – 1 микропланшет;
 - Адгезивная плёнка – 3 шт.
- 3) Комплект реагентов для очистки библиотек фрагментов ДНК
- Раствор МЧ – 1 пробирка (2,4 мл);
 - Элюирующий раствор TEL – 1 пробирка (3,0 мл).
- 4) Дистрибутив с программным обеспечением «HLA-Эксперт» (версия 2.0 и выше) – 1 шт.

IV. Фасовка A v3-600, REF S5-H013-AI:

- 1) Комплект реагентов для амплификации и подготовки библиотек фрагментов ДНК
 - Смесь для амплификации KBM – 3 пробирки (по 1,2 мл);
 - Смесь для амплификации HLA I – 3 пробирки (по 1,0 мл);
 - Смесь для амплификации HLA II – 3 пробирки (по 1,0 мл);
 - Смесь для амплификации библиотек ИЛМ – 1 пробирка (300 мкл);
 - Картридж с реагентами № 1 – 3 шт.;
 - Картридж с реагентами № 2 – 3 шт.;
 - Фермент-TAT (30) – 3 пробирки (по 30 мкл);
 - Фермент-TAT (100) – 3 пробирки (по 100 мкл);
 - Реагент L1 – 3 пробирки (по 340 мкл);
 - Реагент L2 – 3 пробирки (по 340 мкл);
 - Фермент-LIG – 3 пробирки (по 100 мкл);
 - Фермент-TAT (15) – 1 пробирка (15 мкл).
- 2) Комплект индексов для подготовки библиотек фрагментов ДНК
 - Индексы ts1 - ts96 – 1 микропланшет;
 - Индексы ts97 - ts192 – 1 микропланшет;
 - Индексы ts193 - ts288 – 1 микропланшет;
 - Адгезивная плёнка – 3 шт.
- 3) Комплект реагентов для очистки библиотек фрагментов ДНК
 - Картридж с реагентами № 3 – 1 шт.;
 - Стрипы по 8 пробирок – 3 шт.;
 - Крышки для стрипов – 3 шт.
- 4) Комплект реагентов для секвенирования v3-600:
 - Картридж с реагентами – 1 шт.;
 - HT1 буфер – 1 пробирка (4,5 мл);
 - PR2 буфер – 1 флакон (500 мл);
 - Проточная ячейка – 1 шт.
- 5) Дистрибутив с программным обеспечением «HLA-Эксперт» (версия 2.0 и выше) – 1 шт.

V. Фасовка A v2-500, REF S5-H012-AI:

- 1) Комплект реагентов для амплификации и подготовки библиотек фрагментов ДНК
 - Смесь для амплификации KBM – 3 пробирки (по 1,2 мл);
 - Смесь для амплификации HLA I – 3 пробирки (по 1,0 мл);
 - Смесь для амплификации HLA II – 3 пробирки (по 1,0 мл);
 - Смесь для амплификации библиотек ИЛМ – 1 пробирка (300 мкл);
 - Картридж с реагентами № 1 – 3 шт.;
 - Картридж с реагентами № 2 – 3 шт.;
 - Фермент-TAT (30) – 3 пробирки (по 30 мкл);
 - Фермент-TAT (100) – 3 пробирки (по 100 мкл);
 - Реагент L1 – 3 пробирки (по 340 мкл);
 - Реагент L2 – 3 пробирки (по 340 мкл);

- Фермент-LIG – 3 пробирки (по 100 мкл);
 - Фермент-TAT (15) – 1 пробирка (15 мкл).
- 2) Комплект индексов для подготовки библиотек фрагментов ДНК
- Индексы ts1 - ts96 – 1 микропланшет;
 - Индексы ts97 - ts192 – 1 микропланшет;
 - Индексы ts193 - ts288 – 1 микропланшет;
 - Адгезивная плёнка – 3 шт.
- 3) Комплект реагентов для очистки библиотек фрагментов ДНК
- Картридж с реагентами № 3 – 1 шт.;
 - Стрипы по 8 пробирок – 3 шт.;
 - Крышки для стрипов – 3 шт.
- 4) Комплект реагентов для секвенирования v2-500:
- Картридж с реагентами – 1 шт.;
 - HT1 буфер – 1 пробирка (4,5 мл);
 - PR2 буфер – 1 флакон (500 мл);
 - Проточная ячейка – 1 шт.
- 5) Дистрибутив с программным обеспечением «HLA-Эксперт» (версия 2.0 и выше) – 1 шт.

VI. Фасовка A v1, REF S6-H010-AI:

- 1) Комплект реагентов для амплификации и подготовки библиотек фрагментов ДНК
- Смесь для амплификации KBM – 3 пробирки (по 1,2 мл);
 - Смесь для амплификации HLA I – 3 пробирки (по 1,0 мл);
 - Смесь для амплификации HLA II – 3 пробирки (по 1,0 мл);
 - Смесь для амплификации библиотек ИЛМ – 1 пробирка (300 мкл);
 - Картридж с реагентами № 1 – 3 шт.;
 - Картридж с реагентами № 2 – 3 шт.;
 - Фермент-TAT (30) – 3 пробирки (по 30 мкл);
 - Фермент-TAT (100) – 3 пробирки (по 100 мкл);
 - Реагент L1 – 3 пробирки (по 340 мкл);
 - Реагент L2 – 3 пробирки (по 340 мкл);
 - Фермент-LIG – 3 пробирки (по 100 мкл);
 - Фермент-TAT (15) – 1 пробирка (15 мкл).
- 2) Комплект индексов для подготовки библиотек фрагментов ДНК
- Индексы ts1 - ts96 – 1 микропланшет;
 - Индексы ts97 - ts192 – 1 микропланшет;
 - Индексы ts193 - ts288 – 1 микропланшет;
 - Адгезивная плёнка – 3 шт.
- 3) Комплект реагентов для очистки библиотек фрагментов ДНК
- Картридж с реагентами № 3 – 1 шт.;
 - Стрипы по 8 пробирок – 3 шт.;
 - Крышки для стрипов – 3 шт.
- 4) Дистрибутив с программным обеспечением «HLA-Эксперт» (версия 2.0 и выше) – 1 шт.

ВНИМАНИЕ! Проведение секвенирования библиотек фрагментов ДНК на приборе MiSeq возможно только с реагентами для секвенирования, поставляемыми в составе набора «HLA-Эксперт».

Программное обеспечение предназначено только для совместного применения с набором реагентов HLA-Эксперт.

Компоненты набора реагентов

Фасовка N			
Комплект реагентов для амплификации и подготовки библиотек фрагментов ДНК			
Наименование компонентов	Внешний вид	Количество пробирок, шт.	Номинальный объём компонента
Смесь для амплификации KBM	Прозрачная бесцветная жидкость	3	по 1,2 мл
Смесь для амплификации HLA I	Прозрачная бесцветная жидкость	3	по 1,0 мл
Смесь для амплификации HLA II	Прозрачная бесцветная жидкость	3	по 1,0 мл
Буфер для разведения ДНК	Прозрачная бесцветная жидкость	6	по 4,5 мл
Смесь для амплификации библиотек ИЛМ	Прозрачная бесцветная жидкость	1	300 мкл
Фермент-TAT (30)	Прозрачная бесцветная вязкая маслянистая жидкость	3	по 30 мкл
Фермент-TAT (100)	Прозрачная бесцветная вязкая маслянистая жидкость	3	по 100 мкл
Реагент L1	Прозрачная бесцветная жидкость	3	по 340 мкл
Реагент L2	Прозрачная бесцветная вязкая маслянистая жидкость	3	по 340 мкл
Фермент-LIG	Прозрачная бесцветная вязкая маслянистая жидкость	3	по 100 мкл
Фермент-TAT (15)	Прозрачная бесцветная вязкая маслянистая жидкость	1	15 мкл
Комплект индексов для подготовки библиотек фрагментов ДНК			
Наименование компонентов	Внешний вид	Количество	
Индексы ts1 – ts96	Высушенные смеси в виде осадка синего цвета	1 микропланшет	
Индексы ts97 – ts192	Высушенные смеси в виде осадка синего цвета	1 микропланшет	
Индексы ts193 – ts288	Высушенные смеси в виде осадка синего цвета	1 микропланшет	
Адгезивная плёнка	Бесцветная прозрачная полиэфирная плёнка с липким адгезивным слоем	3 шт.	
Комплект реагентов для очистки библиотек фрагментов ДНК			
Наименование компонентов	Внешний вид	Количество пробирок, шт.	Номинальный объём компонента
Раствор МЧ	Прозрачная бесцветная жидкость с осадком, образующим взвесь коричневого цвета при встряхивании	1	2,4 мл
Элюирующий раствор TEL	Прозрачная бесцветная жидкость	1	3,0 мл
Комплект реагентов для секвенирования			
Картридж с реагентами	Резервуар, заполненный реагентами	1	-
HT1 буфер	Прозрачная бесцветная жидкость	1 пробирка	4,5 мл
PR2 буфер	Прозрачная бесцветная жидкость	1 флакон	500 мл
Проточная ячейка	Ёмкость с проточной ячейкой в буферном растворе	1	-

Фасовка А			
Комплект реагентов для амплификации и подготовки библиотек фрагментов ДНК			
Наименование компонентов	Внешний вид	Количество пробирок/картриджей, шт.	Номинальный объём компонента
Смесь для амплификации KBM	Прозрачная бесцветная жидкость	3	по 1,2 мл
Смесь для амплификации HLA I	Прозрачная бесцветная жидкость	3	по 1,0 мл
Смесь для амплификации HLA II	Прозрачная бесцветная жидкость	3	по 1,0 мл
Смесь для амплификации библиотек ИЛМ	Прозрачная бесцветная жидкость	1	300 мкл
Картридж № 1, ряд 1 и 2, ячейки 1 и 2 - Буфер для разведения ДНК	Прозрачная бесцветная жидкость	3	по 7,5 мл
Фермент-TAT (30)	Прозрачная бесцветная вязкая маслянистая жидкость	3	по 30 мкл
Фермент-TAT (100)	Прозрачная бесцветная вязкая маслянистая жидкость	3	по 100 мкл
Реагент L1	Прозрачная бесцветная жидкость	3	по 340 мкл
Реагент L2	Прозрачная бесцветная вязкая маслянистая жидкость	3	по 340 мкл
Фермент-LIG	Прозрачная бесцветная вязкая маслянистая жидкость	3	по 100 мкл
Фермент-TAT (15)	Прозрачная бесцветная вязкая маслянистая жидкость	1	15 мкл
Комплект индексов для подготовки библиотек фрагментов ДНК			
Наименование компонентов	Внешний вид	Количество	Номинальный объём компонента
Индексы ts1 – ts96	Высушенные смеси в виде осадка синего цвета	1 микропланшет	-
Индексы ts97 – ts192	Высушенные смеси в виде осадка синего цвета	1 микропланшет	-
Индексы ts193 – ts288	Высушенные смеси в виде осадка синего цвета	1 микропланшет	-
Адгезивная плёнка	Бесцветная прозрачная полиэфирная плёнка с липким адгезивным слоем	3 шт.	-
Картридж № 2, ряд 1, ячейки 1 и 2 - Буфер для разведения ДНК	Прозрачная бесцветная жидкость	3 шт.	по 7,5 мл
Комплект реагентов для очистки библиотек фрагментов ДНК			
Наименование компонентов	Внешний вид	Количество картриджей, шт.	Номинальный объём компонента
Картридж № 3, ряд 1, ячейка 1 - Раствор МЧ	Прозрачная бесцветная жидкость с осадком, образующим взвесь коричневого цвета при встряхивании	1	2,4 мл
Картридж № 3, ряд 1, ячейка 2 - Элюирующий раствор TEL	Прозрачная бесцветная жидкость		3,0 мл
Комплект реагентов для секвенирования			
Картридж с реагентами	Резервуар, заполненный реактивами	1	-
HT1 буфер	Прозрачная бесцветная жидкость	1 пробирка	4,5 мл
PR2 буфер	Прозрачная бесцветная жидкость	1 флакон	500 мл
Проточная ячейка	Ёмкость с проточной ячейкой в буферном растворе	1	-

Примечание – Расположение индексов для подготовки библиотек фрагментов ДНК в пробирках микропланшета приведено в Приложении А.

2.2 Количество анализируемых проб

Набор реагентов предназначен для одноразового применения и рассчитан на 288 исследований.

2.3 Принцип действия

Метод: полимеразная цепная реакция (ПЦР) и реакция лигирования; качественный анализ.

В основе работы набора реагентов лежит принцип амплификации ДНК методом ПЦР и лигирования дуплексов комплементарных олигонуклеотидов, несущих биоинформатическую метку, с полученными ампликонами.

Процесс амплификации заключается в серии повторяющихся циклов температурной денатурации ДНК, отжига праймеров комплементарных специфическому участку ДНК и последующей достройке полинуклеотидных цепей с этих праймеров Taq-полимеразой. На данном этапе происходит наработка целевых продуктов необходимой длины, что позволяет исключить в дальнейшем этап фрагментации.

Использование мультиплексирования праймеров позволяет сократить количество пробирок до 2-х, поскольку появляется возможность амплификации до 27 участков ДНК в одной пробирке.

Для повышения чувствительности и специфичности реакции предусмотрено применение «горячего старта», который обеспечивается модификацией полимеразы. Используемый подход исключает неспецифический отжиг праймеров на ДНК-мишени при начальном прогреве пробирки.

Исследование с применением набора реагентов для подготовки библиотек фрагментов ДНК генов HLA I и II классов для генотипирования высокопроизводительным секвенированием (NGS) состоит из следующих этапов:

1. Выделение ДНК.

2. Подготовка библиотек фрагментов ДНК.

2.1. Оценка качества и количества исходной ДНК методом количественной ПЦР.

Предварительная оценка количества и качества исходной ДНК методом количественной ПЦР позволяет оценить количество ДНК без учета разрушенной, а также определить в растворе ДНК наличие веществ, влияющих на проведение ПЦР. Такой подход делает возможным проводить нормализацию (выравнивание) концентрации ДНК перед ПЦР-амплификацией.

2.2. Нормализация концентрации ДНК.

Нормализация (выравнивание) концентрации ДНК проводится путем разведения исходной ДНК буфером для разведения ДНК. Кратность разведения каждого образца рассчитывается по формуле:

$$a = 2^{(Cp_{max} - b)},$$

где: a – кратность разведения;

Cp_{max} – значение Cp , по которому проводится нормализация;

b – Cp КВМ для данного образца.

- 2.3. ПЦР-амплификация ДНК для наработки ампликонов необходимой длины.
- 2.4. Присоединение индексов к полученным ампликонам с помощью реакции лигирования. Для маркировки фрагментов ДНК используются индексы (дуплексы комплементарных олигонуклеотидов), которые имеют уникальную последовательность, позволяющую в дальнейшем программному обеспечению идентифицировать образцы. Маркировка библиотек фрагментов ДНК индексами, происходит с помощью реакции лигирования. Фермент ДНК-лигаза катализирует образование фосфодиэфирных связей между 3'-гидроксилом и 5'-фосфатом расположенных рядом оснований в ДНК, за счет чего способна «сшивать» двухцепочечные фрагменты ДНК.
- В результате лигирования формируются **библиотеки фрагментов ДНК**, соответствующие исследуемым образцам.
- 2.5. Дополнительная ПЦР-амплификация для наработки библиотек с двумя индексами.
- 2.6. Пулирование (объединение) библиотек.
- 2.7. Подготовка библиотек к проведению секвенирования (разведение и денатурация библиотек).

3. Проведение высокопроизводительного секвенирования.

4. Анализ данных с помощью программного обеспечения HLA-Эксперт.

- 4.1. Начальные этапы обработки данных – процедуры демультиплексирования и генерации FASTQ файлов данных – выполняются на оборудовании производителя (секвенаторе). В результате получают FASTQ файлы с данными, соответствующими анализируемым образцам.
- 4.2. Программное обеспечение HLA-Эксперт проводит анализ FASTQ файлов, полученных с секвенатора, процедура анализа включает:
- **Выравнивание последовательностей.** Полученные последовательности сравниваются с референтной последовательностью. Данные последовательностей экзонов аллелей берут из базы данных IPD-IMGT/HLA. Для выравнивания используется метод глобального выравнивания последовательностей, применяется алгоритм Нидлмана-Вунша с использованием одинакового веса замен и аффинной функции для вставок/удалений. На основании статистического анализа для каждого аллельного варианта в образце формируются средние (консенсусные) последовательности.
 - **Определение HLA-генотипа.** Проводится поиск полученных консенсусных последовательностей групп в базе последовательностей экзонов IPD-IMGT/HLA по каждому исследуемому гену. Для каждого аллельного варианта определяется его значимость (ранг) в соответствии с количественной представленностью (весом) экзонов. Аллели с лучшим рангом определяют результаты типирования. Определение более двух аллелей свидетельствует о возможной контаминации. В этом случае результат считается недостоверным. Если в процессе анализа обнаружены варианты, не имеющие соответствия базе данных IPD-IMGT/HLA, делается вывод о возможном присутствии нового аллеля.

- **Вывод результатов.** Найденные аллельные варианты выводятся для просмотра в интерфейсе программы. В программе также предусмотрена возможность генерации отчетов с результатами для вывода на печать, сохранения в формате pdf, а также экспорт в файлы формата csv, xlsx.

Программное обеспечение предназначено только для совместного применения с набором реагентов HLA-Эксперт.

ВНИМАНИЕ! Клинико-диагностическая лаборатория должна провести валидацию медицинского изделия HLA-Эксперт перед началом процесса (при первичной подготовке библиотек) с использованием референтных образцов. Для валидации медицинского изделия в качестве контроля используются образцы с известными нуклеотидными последовательностями HLA, например, образцы из референтных панелей CET EPT, INWG, UCLA.

2.4 Время проведения анализа (без учета пробоподготовки и проведения секвенирования): от 8 часов.

3 АНАЛИТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

3.1 Предел обнаружения

Предел обнаружения – 5,0 нг ДНК человека на амплификационную пробирку, что соответствует концентрации ДНК 1,0 нг/мкл. При использовании меньшего количества ДНК производитель не гарантирует корректную работу набора.

3.2 Аналитическая специфичность

В отрицательном контрольном образце на этапе проведения гель-электрофореза должны отсутствовать продукты амплификации длиной 329-377 п.н. для HLA I и 318-375 п.н. для HLA II.

На этапе оценки библиотеки на электрофореграмме должны определяться пики длиной от 440 до 520 п.н. После проведения секвенирования программное обеспечение «HLA-Эксперт» должно определить генотипы по HLA-A, HLA-B, HLA-C, DRB1, DPB1, DQB1, DRB3/4/5.

Реактивность (инклюзивность) проверена на коллекции из 70 образцов ДНК с известным генотипом, предоставленной Европейским обществом иммуногенетиков EFI в ходе проведения внешнего контроля качества HLA-типирования (CET2011-2017). В коллекции представлены как образцы с самыми частыми, характерными для жителей Европы, HLA-генотипами, так и образцы с редкими HLA-генотипами. В коллекциях представлены как гетерозиготные, так и гомозиготные образцы. Генотипы всех испытанных образцов были установлены в 100% случаев.

Интерферирующие вещества в концентрациях: билирубин – 684 мкмоль/л, гемоглобин 2 г/л, холестерин 13 ммоль/л, триглицериды – 37 ммоль/л не влияют на специфичность набора реагентов.

ВНИМАНИЕ! Набор не позволяет определять следующие нулевые аллели, необходимые для типирования на уровне высокого разрешения в соответствии с международными требованиями (NMDP Policy for Adult Donor and Patient HLA Confirmatory Typing Policy с января 2015, версия базы IPD-IMGT/HLA 3.36.0): A*68:11N и C*04:09N.

3.3 Диагностические характеристики, точность, воспроизводимость

Показатель	Диагностическая чувствительность (ДЧ), диагностическая специфичность (ДС), правильность/точность								
	Кол-во	ИП	ИО	ЛП	ЛО	ДЧ (%)	ДС (%)	Точность, (%)	95% ДИ
HLA-A	96	96	0	0	0	100	НО	100	96,2-100,0
HLA-B	96	96	0	0	0	100	НО	100	96,2-100,0
HLA-C	96	96	0	0	0	100	НО	100	96,2-100,0
HLA-DRB1	96	96	0	0	0	100	НО	100	96,2-100,0
HLA-DQB1	96	96	0	0	0	100	НО	100	96,2-100,0
HLA-DPB1	30	30	0	0	0	100	НО	100	88,4-100,0
HLA-DRB3/4/5	30	30	0	0	0	100	НО	100	88,4-100,0
Всего	540	540	0	0	0	100	НО	100	99,3-100,0
Р _{ист}	99,6								
ИП – Истинно положительный результат ИО – Истинно отрицательный результат ЛП – Ложноположительный результат ЛО – Ложноотрицательный результат ДИ – Доверительный интервал НО – Не может быть определена									

Показатели сравнения	Воспроизводимость				
	Между сериями	Между вариантами исполнения	Между вариантами исполнения + между запусками		Между приборами + операторами
HLA-A	100% (48/48)	100% (48/48)	100% (48/48)	100% (96/96)	100% (30/30)
HLA-B	100% (48/48)	100% (48/48)	100% (48/48)	100% (96/96)	100% (30/30)
HLA-C	100% (48/48)	100% (48/48)	100% (48/48)	100% (96/96)	100% (30/30)
HLA-DRB1	100% (48/48)	100% (48/48)	100% (48/48)	100% (96/96)	100% (30/30)
HLA-DQB1	100% (48/48)	100% (48/48)	100% (48/48)	100% (96/96)	100% (30/30)
HLA-DPB1	-	100% (30/30)	100% (30/30)	100% (30/30)	100% (30/30)
HLA-DRB3/4/5	-	100% (30/30)	100% (30/30)	100% (30/30)	100% (30/30)
Совпадение результатов по всем вариантам сравнения	100% (1590/1590), Р _{ист} = 99,9				

4 МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

Работа должна проводиться в лаборатории, выполняющей молекулярно-биологические исследования клинического материала с соблюдением методических указаний МУ 1.3.2569-09 «Организация работы лабораторий, использующих методы амплификации нуклеиновых кислот, при работе с материалом, содержащим микроорганизмы I-IV групп патогенности» и с соблюдением санитарно-эпидемиологических правил СП 1.3.2322-08 «Безопасность работы микроорганизмами III-IV групп патогенности (опасности) и возбудителями паразитарных болезней». Исследуемые образцы рассматриваются как потенциально-опасные.

К работе с набором реагентов допускается только персонал, обученный методам молекулярной диагностики и правилам работы в клинко-диагностической лаборатории.

При работе с набором следует надевать одноразовые перчатки без талька.

На стадиях приготовления реакционной смеси и обработки образцов биологического материала необходимо использовать только новые наконечники и пробирки.

Не допускается использование одних и тех же наконечников при обработке различных образцов биологического материала.

Экстракцию НК следует проводить в боксах биологической безопасности II класса. Приготовление реакционной смеси возможно проводить в ПЦР-боксах.

Все лабораторное оборудование, в том числе дозаторы, штативы, лабораторная посуда, халаты, головные уборы и пр., а также растворы реагентов должны быть строго стационарными. Запрещается их перемещение из одного помещения в другое.

Дозаторы должны быть соответствующим образом поверены (в аккредитованных лабораториях) и промаркированы.

Поверхности рабочих столов, а также помещений, в которых проводится ПЦР, следует обязательно, до и после проведения работ, облучать бактерицидными облучателями в течение 30 минут.

Использованные одноразовые принадлежности (пробирки, наконечники) должны сбрасываться в специальный контейнер, содержащий дезинфицирующий раствор.

Удалять отходы с продуктами ПЦР необходимо только в закрытом виде. Не допускается открывать пробирки после амплификации за исключением этапов проведения детекции методом гель-электрофореза и подготовки библиотек, которые проводят в зоне 4 (МУ 1.3.2569-09).

Все поверхности в лаборатории (рабочие столы, штативы, оборудование и др.) ежедневно подвергают влажной уборке с применением дезинфицирующих/моющих средств, регламентированных санитарными правилами СП 1.3.2322-08.

При использовании набора реагентов для предотвращения контаминации этапы выделения ДНК, ПЦР, детекции результатов амплификации и подготовки библиотек фрагментов ДНК следует проводить в отдельных помещениях или тщательно изолированных зонах, снабженных комплектами полуавтоматических дозаторов, халатами и прочими принадлежностями.

При проведении электрофореза запрещается снимать крышку с электрофоретической камеры, если она подключена к источнику питания.

При работе с включенным трансиллюминатором необходимо пользоваться защитным экраном или специальной защитной маской.

При использовании набора в клинично-диагностической лаборатории образуются отходы классов А и Б, которые классифицируются и утилизируются в соответствии с требованиями СанПиН 2.1.7.2790-10 «Санитарно-эпидемиологические требования к обращению с медицинскими отходами».

ВНИМАНИЕ! Картридж с реагентами из комплекта реагентов для секвенирования (ячейка 8) содержит формамид, который является репродуктивным токсином (указание на риски: H360). Может наносить вред при вдыхании, заглатывании, попадании на кожу или в глаза. Меры предосторожности: P201, P202, P260, P270, P280, P264, P272, P308+P313, P362, P405, P501¹. PR2 буфер содержит раздражающие компоненты.

H360 – Может нарушать способность к размножению или причинять вред нерождённому ребёнку. Может наносить вред при вдыхании.

При работе с набором реагентов использовать средства индивидуальной защиты для предотвращения контакта с организмом человека. После окончания работы тщательно вымыть руки. Избегать контакта с кожей, глазами и слизистой оболочкой. При аварийных ситуациях возможно следующее: раздражение кожи и слизистой оболочки глаз у чувствительных лиц. При контакте промыть пораженное место водой и обратиться за медицинской помощью.

При использовании по назначению и соблюдении мер предосторожности контакт с организмом человека исключён.

Примечание – Набор реагентов **не содержит** материалов биологического происхождения, веществ, обладающих канцерогенным, мутагенным действием, а также влияющих на репродуктивную функцию человека. При использовании по назначению и соблюдении мер предосторожности является безопасным.

Не допускается использовать набор реагентов:

- при нарушении условий транспортирования и хранения;
- при несоответствии внешнего вида реагентов, указанного в паспорте к набору;
- при нарушении внутренней упаковки компонентов набора;
- по истечению срока годности.

¹ - P201 – Перед использованием получить специальные инструкции. P202 – Не приступать к обработке до тех пор, пока не прочитана и не понята информация о мерах предосторожности. P260 – Не вдыхать пыль/дымовые газы/газ/туман/пары/аэрозоль. P270 – Не принимать пищу, не пить и не курить в процессе использования этого продукта. P280 – Пользоваться защитными перчатками/защитной одеждой/средствами защиты глаз/лица. P264 – После работы тщательно вымыть лицо, руки и все открытые участки кожи. P272 – Не выносить загрязненную одежду с рабочего места. P308 + P313 – При воздействии или беспокойности: Обратиться к врачу. P362 – Снять загрязненную одежду и выстирать ее перед использованием. P405 – Хранить под замком. P501 – Утилизировать содержимое/контейнер на предназначенном для этого предприятии по переработке отходов

5 ОБОРУДОВАНИЕ И МАТЕРИАЛЫ

При работе с набором реагентов HLA-Эксперт требуются следующие оборудование и материалы:

- амплификатор детектирующий с подогреваемой крышкой (например, ДТлайт, РУ № ФСР 2011/10228; ДТпрайм, РУ № ФСР 2011/10229 или ДТ-96, РУ № ФСР 2007/01250, ООО «НПО ДНК-Технология», Россия);
- дозирующее устройство ДТстрим 12М1 или 15М1 (для фасовки А, РУ № РЗН 2015/2982, ООО «НПО ДНК-Технология», Россия);
- геномный секвенатор MiSeq (Illumina, США, РУ № РЗН 2014/1568);
- дозаторы электронные с адаптером и/или дозаторы механические переменного объёма одноканальные со сменными наконечниками, позволяющие отбирать объёмы жидкости 2,0–20 мкл, 20–200 мкл, 100–1000 мкл (например, ВІОНІТ, «Биохит Биотех (Сучжоу) Ко., Лтд.», Китай, РУ № ФСЗ 2012/11562; Eppendorf Research® Plus, Эппендорф АГ, Германия, РУ № ФСЗ 2011/11028);
- набор/комплект реагентов для выделения ДНК (например, ПРОБА-ГС-ГЕНЕТИКА, ООО «НПО ДНК-Технология», Россия, РУ № ФСР 2010/08696; MagNa Pure Compact Nucleic Acid Isolation Kit I, Roche Diagnostics GmbH, Германия, РУ ФСЗ 2009/04405).

Дополнительное общелабораторное оборудование:

- бокс биологической безопасности II класса;
- ПЦР-бокс;
- устройство для запечатывания планшет ДТпак (для фасовки А, ООО «НПО ДНК-Технология», Россия);
- микроцентрифуга-вортекс;
- холодильник с морозильной камерой;
- магнитный штатив;
- штатив «рабочее место» для стрипованных пробирок объёмом 0,2 мл, например, ООО «НПО ДНК-Технология», Россия, или аналогичный;
- штатив «рабочее место» для пробирок объёмом 0,5 и 1,5 мл, например, ООО «НПО ДНК-Технология», Россия, или аналогичный;
- источник питания (например, Эльф-4, ООО «НПО ДНК-Технология», Россия);
- трансиллюминатор ультрафиолетовый (флуоскоп);
- флуориметр или флуоресцентный анализатор.

Дополнительные расходные материалы:

- вакуумные пластиковые пробирки типа Vacuette с ЭДТА или цитратом натрия;
- одноразовые пластиковые пробирки вместимостью 0,2 мл, 0,5 мл, 1,5 мл;
- одноразовые пластиковые пробирки вместимостью 0,2 мл в стрипах по 8 шт.;
- одноразовые наконечники с фильтром, свободные от РНКаз и ДНКаз, вместимостью 20 мкл, 200 мкл, 1000 мкл;
- полимерная термоплёнка для запечатывания микропланшет ПЦР;

- микропланшет ПЦР, 96 лунок;
- одноразовые перчатки медицинские, без талька, текстурированные;
- ёмкость с дезинфицирующим раствором;
- комплект для детекции ДНК методом гель-электрофореза (например, ООО «НПО ДНК-Технология», Россия);
- маркер длин амплифицированных фрагментов (pUC19 ДНК/MspI) (например, ООО «Силекс», Россия).

6 АНАЛИЗИРУЕМЫЕ ОБРАЗЦЫ

6.1 Материал для исследования

Для исследования используют цельную периферическую кровь человека.

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

Взятие цельной периферической крови проводится в вакуумные пластиковые пробирки типа Vacuette объёмом 2,0 или 4,0 мл с добавленной в качестве антикоагулянта 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 Транспортирование и хранение исследуемого материала

Допускается хранение образцов при температуре от 2 °С до 8 °С 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 °С в течение одного месяца.

7 ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА

ВНИМАНИЕ! Клинико-диагностическая лаборатория должна перед началом процесса (при первичной подготовке библиотек) провести валидацию медицинского изделия HLA-Эксперт с использованием референтных образцов. Для этого вместе с исследуемыми образцами, начиная от этапа оценки пригодности ДНК (7.1.2), необходимо провести исследование не менее пяти контрольных образцов с известными нуклеотидными последовательностями HLA, например, образцов из референтных панелей CET EPT, IHWG, UCLA.

Валидация медицинского изделия HLA-Эксперт считается успешной при корректном определении последовательностей контрольных образцов.

Рекомендуется пройти обучение по использованию набора реагентов HLA-Эксперт на всех этапах проведения анализа. Контактные данные службы клиентской поддержки представлены в разделе 17 инструкции по применению.

7.1 Выделение ДНК из биологического материала

Выделение ДНК проводят в соответствии с инструкцией к используемому комплекту (набору) реагентов. Для проведения выделения ДНК рекомендуются комплекты/наборы реагентов, предназначенные для выделения ДНК из соответствующего биоматериала.

Пригодность полученной ДНК для исследования необходимо определить с использованием «смеси для амплификации KBM», входящей в состав набора реагентов HLA-Эксперт. Для корректной работы набора реагентов количество анализируемой ДНК должно быть не менее 5,0 нг на амплификационную пробирку, что соответствует $C_p (FAM) = 29,7 \pm 0,5$.

Примечание – Допускается хранение ДНК при температуре от 2 °С до 8 °С не более 1 месяца или от минус 18 °С до минус 22 °С не более 6 месяцев.

ВНИМАНИЕ! Независимо от используемого комплекта для выделения ДНК из биологического материала одновременно необходимо подготовить отрицательный контрольный образец, прошедший все этапы пробоподготовки. В качестве отрицательного контрольного образца рекомендуется использовать физиологический раствор в объёме, указанном в инструкции к комплекту реагентов для выделения ДНК.

ВНИМАНИЕ! При проведении всех последующих действий следует избегать воздействия прямых солнечных лучей на пробирки со смесью для амплификации!

7.2 Оценка пригодности выделенной ДНК (Фасовка N)

7.2.1 Проведение ПЦР (Фасовка N)

7.2.1.1 Инкубируйте при комнатной температуре от 18 °С до 25 °С «Смесь для амплификации KBM» до полного размораживания содержимого. Встряхните пробирку в течение 3-5 с и центрифугируйте в течение 1-3 с на микроцентрифуге-вортексе.

7.2.1.2 Промаркируйте необходимое количество пустых пробирок объёмом 0,2 мл для каждого исследуемого образца и одну для отрицательного контрольного образца.

Например: Необходимо проанализировать три образца. Нужно промаркировать три пробирки для исследуемых образцов и одну пробирку для «К-».

- 7.2.1.3 Встряхните пробирку «Фермент-ТАТ (30)» в течение 3-5 с на микроцентрифуге-вортексе и центрифугируйте в течение 1-3 с на микроцентрифуге-вортексе.

Примечание – Фермент-ТАТ (30) необходимо вынимать из морозильной камеры непосредственно перед использованием.

- 7.2.1.4 Приготовьте смесь фермента-ТАТ (30) со смесью для амплификации KBM. Для этого смешайте в отдельной пробирке объемом 0,5 мл:

- 12 x (N+1) мкл Смеси для амплификации KBM,
- 0,3 x (N+1) мкл Фермента-ТАТ (30),

где N – количество анализируемых образцов.

- 7.2.1.5 Закройте крышку пробирки, встряхните пробирку в течение 3-5 с на микроцентрифуге-вортексе и центрифугируйте в течение 1-3 с на микроцентрифуге-вортексе.

- 7.2.1.6 Внесите в каждую промаркированную пробирку по 12 мкл смеси для амплификации KBM с ферментом-ТАТ (30).

- 7.2.1.7 Внесите по 6,0 мкл выделенного препарата ДНК в соответствующую пробирку для исследуемых образцов. В пробирку «К-» ДНК не вносится. Закройте крышки пробирок.

- 7.2.1.8 Внесите по 6,0 мкл отрицательного контрольного образца, прошедшего этап выделения ДНК, в пробирку, маркированную «К-». Закройте крышку пробирки.

- 7.2.1.9 Центрифугируйте пробирки на микроцентрифуге-вортексе в течение 1-3 с.

- 7.2.1.10 Установите все пробирки в блок амплификатора и проведите ПЦР-амплификацию с учетом объема реакционной смеси, равного 18 мкл. Программа амплификации приведена в таблице 1.

7.2.2 Проведение ПЦР (Фасовка А)

- 7.2.2.1 Инкубируйте при комнатной температуре от 18 °С до 25 °С «Смесь для амплификации KBM» до полного размораживания содержимого. Встряхните пробирку в течение 3-5 с на микроцентрифуге-вортексе и центрифугируйте в течение 1-3 с на микроцентрифуге-вортексе.

- 7.2.2.2 Встряхните пробирку «Фермент-ТАТ (30)» в течение 3-5 с на микроцентрифуге-вортексе и центрифугируйте в течение 1-3 с на микроцентрифуге-вортексе.

Примечание – Фермент-ТАТ (30) необходимо вынимать из морозильной камеры непосредственно перед использованием.

- 7.2.2.3 Установите пробирки со смесью для амплификации KBM, с ферментом-ТАТ (30), с препаратами ДНК и отрицательным контрольным образцом, а также микропланшет для ПЦР на рабочий стол ДТстрим и проведите дозирование компонентов согласно руководству по эксплуатации. Пример расположения реагентов на рабочем столе ДТстрим приведен в Приложении В, рис.1.

- 7.2.2.4 После завершения программы на дозирующем устройстве ДТстрим поместите аккуратно, не встряхивая, микропланшет в подложку устройства для запечатывания планшет ДТпак.
- 7.2.2.5 Запечатайте микропланшет адгезивной плёнкой.
- 7.2.2.6 Центрифугируйте микропланшет при 1000 об/мин в течение 30 с.
- 7.2.2.7 Установите микропланшет в блок детектирующего амплификатора и проведите ПЦР-амплификацию с учетом объёма реакционной смеси, равного 35 мкл. Программа амплификации приведена в таблице 1.

Таблица 1 – Программа амплификации

№ блока	Температура, °C	Время		Число циклов	Режим оптических измерений	Тип блока
		мин	с			
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	00	05	1	-	Цикл
5	10,0	...	...	Хранение	-	Хранение

7.2.3 Интерпретация результатов ПЦР (оценка пригодности ДНК).

- Допустимые значения C_r по каналу Fam не должны превышать 29,7, что соответствует пределу обнаружения (5,0 нг на амплификационную пробирку или 1,0 нг/мкл).
- В случае получения результата C_r больше 29,7 необходимо повторить процедуру выделения данного образца.

Примечание – Для образцов с концентрацией ДНК, близкой к пределу обнаружения, возможно нарушение корреляции полученного значения C_r со значением концентрации ДНК, определённым спектрофотометрическим методом (т.е. для образцов с концентрацией ДНК 1,0 нг/мкл, определённой спектрофотометрическим методом, значение C_r может превышать 29,7). Это связано с тем, что при измерении концентрации ДНК спектрофотометрическим методом определяется концентрация тотальной ДНК (в т.ч. разрушенной) и не учитывается наличие в растворе ДНК веществ, влияющих на проведение ПЦР. В связи с этим последующая нормализация концентрации ДНК в образцах **проводится только по значению C_r КВМ для этих образцов**, результаты спектрофотометрии не учитываются.

7.2.4 Нормализация концентрации ДНК образцов

Нормализация проводится **по образцу с наибольшим значением Ср КВМ** в данной постановке (обозначается **Ср max**) при условии, что это значение не превышает предел обнаружения ($\text{Ср КВМ} \leq 29,7$). См. п.7.2.3.

В случае, если полученный $\text{Ср max} < 26,0$, рекомендуется принять значение $\text{Ср max} = 27$.

Кратность разведения полученной ДНК для каждого образца (а) рассчитывается по формуле:

$$a = 2^{(\text{Ср max}-b)},$$

где: а – кратность разведения данного образца;

Ср max – значение Ср КВМ, по которому проводится нормализация;

b – Ср КВМ для данного образца.

Для проведения нормализации концентрации ДНК:

- Промаркируйте необходимое количество пробирок (для каждого исследуемого образца).
- Разведите каждый образец в необходимое количество раз (а – кратность разведения данного образца), используя буфер для разведения ДНК.

Например: Ср КВМ образца = 27,0, Ср max = 29,0 Разведение: $2^{(29-27)}=2^2=4$.

Исходную ДНК необходимо развести в 4 раза: Для этого в отдельную пробирку объемом 0,5 мл нужно добавить 10 мкл исходной ДНК и 30 мкл буфера для разведения ДНК. Полученную разведённую ДНК использовать для проведения амплификации.

7.3 Амплификация фрагментов ДНК

7.3.1 Проведение ПЦР (Фасовка N)

7.3.1.1 Инкубируйте при комнатной температуре от 18 °С до 25 °С «Смесь для амплификации HLA I», «Смесь для амплификации HLA II» и «Буфер для разведения ДНК» до полного размораживания содержимого. Встряхните пробирки в течение 3-5 с на микроцентрифуге-вортексе и центрифугируйте в течение 1-3 с на микроцентрифуге-вортексе.

7.3.1.2 Промаркируйте необходимое количество пустых пробирок объёмом 0,2 мл для каждого исследуемого образца (включая образцы для валидации при первичной подготовке) и две для отрицательного контрольного образца.

Например: необходимо проанализировать три образца. Нужно промаркировать шесть пробирок для исследуемых образцов и две пробирки для «К-». Общее количество пробирок – восемь (таблица 2).

В случае если необходимо провести валидацию методики, для анализа трёх исследуемых образцов и пяти контрольных образцов нужно промаркировать шесть пробирок для исследуемых образцов, 10 пробирок для контрольных образцов и две пробирки для «К-». Общее количество пробирок – 18.

Таблица 2 – Пример маркировки пробирок для проведения ПЦР

№ образца	№ амплификационной пробирки	Наименование вносимой смеси для амплификации
Образец 1	1-1	HLA I
	1-2	HLA II
Образец 2	2-1	HLA I
	2-2	HLA II
Образец 3	3-1	HLA I
	3-2	HLA II
К-	«К- 1»	HLA I
	«К- 2»	HLA II

Примечание – Далее в тексте инструкции используется следующее обозначение для промаркированных пробирок:

№ образца	№ амплификационной пробирки для образца X	Наименование вносимой смеси для амплификации
Образец X	X-1	HLA I
	X-2	HLA II
где X – номер исследуемого образца		

7.3.1.3 Встряхните пробирку «Фермент-ТАТ (100)» в течение 3-5 с на микроцентрифуге-вортке и центрифугируйте в течение 1-3 с на микроцентрифуге-вортке.

Примечание – Фермент-ТАТ (100) необходимо вынимать из морозильной камеры непосредственно перед использованием.

7.3.1.4 Приготовьте смеси фермента-ТАТ (100) со смесями для амплификации HLA. Для этого промаркируйте две пробирки объёмом 0,5 мл «HLA I» и «HLA II».

7.3.1.5 Смешайте в пробирке «HLA I»:

- 10 x (N+1) мкл Смеси для амплификации HLA I,
- 20 x (N+1) мкл Буфера для разведения ДНК,
- 0,5 x (N+1) мкл Фермента-ТАТ (100),

где N – количество тестируемых образцов с учётом «К-».

7.3.1.6 Смешайте в пробирке «HLA II»:

- 10 x (N+1) мкл Смеси для амплификации HLA II,
- 20 x (N+1) мкл Буфера для разведения ДНК,
- 0,5 x (N+1) мкл Фермента-ТАТ (100),

где N – количество анализируемых образцов с учётом «К-».

7.3.1.7 Закройте крышки пробирок, встряхните пробирки в течение 3-5 с на микроцентрифуге-вортке и центрифугируйте в течение 1-3 с на микроцентрифуге-вортке.

7.3.1.8 Внесите в каждую пробирку «X-1», промаркированную для внесения смеси HLA I, по 30 мкл смеси для амплификации HLA I с ферментом-ТАТ (100).

7.3.1.9 Внесите в каждую пробирку «X-2», промаркированную для внесения смеси HLA II, по 30 мкл смеси для амплификации HLA II с ферментом-ТАТ (100).

Примечание – 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 фильтром.

- 7.3.1.10 Внесите по 5,0 мкл выделенного и разведенного до нужной концентрации препарата ДНК в соответствующие пробирки для исследуемых образцов. При проведении валидации внесите ДНК контрольных образцов в соответствующие пробирки. В пробирки «К-» ДНК не вносится. Закройте крышки пробирок.
- 7.3.1.11 Внесите по 5,0 мкл отрицательного контрольного образца, прошедшего этап выделения ДНК, в пробирки, маркированные «К-». Закройте крышку пробирки.
- 7.3.1.12 Центрифугируйте все пробирки на микроцентрифуге-вортексе в течение 1-3 с.
- 7.3.1.13 Установите все пробирки в блок амплификатора и проведите ПЦР-амплификацию с учетом объема реакционной смеси, равного 35 мкл. Программа амплификации приведена в таблице 3.
- 7.3.1.14 После окончания амплификации извлеките пробирки из амплификатора и поместите на рабочий стол.

7.3.2 Проведение ПЦР (Фасовка А)

- 7.3.2.1 Инкубируйте при комнатной температуре от 18 °С до 25 °С «Смесь для амплификации HLA I», «Смесь для амплификации HLA II» и «Буфер для разведения ДНК» до полного размораживания содержимого. Встряхните пробирку в течение 3-5 с на микроцентрифуге-вортексе и центрифугируйте в течение 1-3 с на микроцентрифуге-вортексе.
- 7.3.2.2 Встряхните пробирку «Фермент-ТАТ (100)» в течение 3-5 с на микроцентрифуге-вортексе и центрифугируйте в течение 1-3 с на микроцентрифуге-вортексе.

Примечание – Фермент-ТАТ (100) необходимо вынимать из морозильной камеры непосредственно перед использованием.

- 7.3.2.3 Установите картридж №1, пробирки со смесью для амплификации HLA I, смесью для амплификации HLA II, с ферментом-ТАТ (100), с препаратами ДНК, контрольными образцами ДНК (в случае проведения валидации) и отрицательным контрольным образцом, прошедшим этап выделения ДНК, а также микропланшет для ПЦР на рабочий стол ДТстрим и проведите дозирование компонентов согласно руководству по эксплуатации. Пример расположения реагентов на рабочем столе ДТстрим приведен в Приложении В, рис.1.
- 7.3.2.4 Поместите аккуратно, не встряхивая микропланшет в подложку герметизирующего устройства ДТпак после завершения программы на дозирующем устройстве ДТстрим.
- 7.3.2.5 Запечатайте микропланшет адгезивной пленкой.
- 7.3.2.6 Центрифугируйте микропланшет при 1000 об/мин в течение 30 с.
- 7.3.2.7 Установите микропланшет в блок детектирующего амплификатора и проведите ПЦР-амплификацию с учетом объема реакционной смеси, равного 35 мкл. Программа амплификации приведена в таблице 3.

7.3.2.8 После окончания амплификации извлеките микропланшет из амплификатора и поместите на рабочий стол.

Таблица 3 – Программа амплификации

№ блока	Температура, °С	Время		Число циклов	Режим оптических измерений*	Тип блока
		мин	с			
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	25	-	Цикл
	64,0	0	15		-*	
4	60,0	20	00	1	-	Цикл
5	10,0	...	...	Хранение	-	Хранение
* - режим оптических измерений устанавливается при использовании детектирующего амплификатора						

Примечание – Допускается хранение продукта амплификации при температуре от минус 18 °C до минус 22 °C не более 1 месяца.

7.3.3 Регистрация результатов ПЦР

После окончания реакции амплификации проанализируйте результаты.

7.3.3.1 Регистрация результата производится методом горизонтального геле-электрофореза в 2,5% агарозном геле.

Примечание – При использовании детектирующего амплификатора регистрация результата возможна путём оценки экспоненциального роста кривой по каналу Fam.

7.3.3.2 Осторожно внесите отдельным наконечником по 5,0 мкл продуктов амплификации из каждой амплификационной пробирки в соответствующую лунку агарозного геля под буфер. В соседние с первой и последней лунками агарозного геля, в которые внесены продукты амплификации, внести по 5,0 мкл маркера длин амплифицированных фрагментов (pUC19 ДНК/MspI).

7.3.3.3 Наденьте защитную маску или установите защитный экран, включите трансиллюминатор и проанализируйте полученные результаты. Продукт амплификации виден в ультрафиолетовом свете (длина волны 254 нм или 310 нм) в виде светящейся полосы красно-оранжевого цвета.

7.3.3.4 В каждой дорожке геля, соответствующей лунке, в которую был внесен продукт амплификации из пробирок, промаркированных как «X-1», где X – номер исследуемого образца, должна быть видна светящаяся полоса оранжево-красного цвета, соответствующая фрагментам амплифицированных продуктов

размером 329-377 п.н. Допускается наличие светящихся полос длиной до 60 п.н. и разной степени интенсивности.

7.3.3.5 В каждой дорожке геля, соответствующей лунке, в которую был внесен продукт амплификации из пробирок, промаркированных как «Х-2», где *Х* – номер исследуемого образца, должна быть видна светящаяся полоса оранжево-красного цвета, соответствующая фрагментам амплифицированных продуктов размером 318-375 п.н. Допускается наличие светящихся полос длиной до 60 п.н. и разной степени интенсивности.

7.3.3.6 В дорожке геля, соответствующей лунке, в которую был внесен продукт амплификации из пробирки, промаркированной «К- 1», не должно быть видно светящихся полос оранжево-красного цвета, соответствующих фрагментам специфических амплифицированных продуктов размером 329-377 п.н. Допускается наличие светящихся полос длиной до 60 п.н. и разной степени интенсивности.

В случае наличия продукта размером 329-377 п.н. результаты всей постановочной серии считают недостоверными. В этом случае необходимо проведение специальных мероприятий для устранения возможной контаминации.

7.3.3.7 В дорожке геля, соответствующей лунке, в которую был внесен продукт амплификации из пробирки, промаркированной «К- 2», не должно быть видно светящихся полос оранжево-красного цвета, соответствующих фрагментам специфических амплифицированных продуктов размером 318-375 п.н. Допускается наличие светящихся полос длиной до 60 п.н. и разной степени интенсивности.

В случае наличия продукта размером 318-375 п.н. результаты всей постановочной серии считают недостоверными. В этом случае необходимо проведение специальных мероприятий для устранения возможной контаминации.

7.4 Подготовка библиотек фрагментов ДНК

7.4.1 Подготовка фрагментов ДНК к лигированию (Фасовка N)

Смешивание продуктов амплификации одного образца HLA I: HLA II производится в соотношении 7:1.

7.4.1.1 Промаркируйте необходимое количество пустых пробирок объемом 0,5 мл для каждого исследуемого образца (таблица 4).

7.4.1.2 Внесите в соответствующие пробирки, в каждую, отдельным наконечником по 20 мкл продукта амплификации из пробирок, промаркированных как «Х-1», где *Х* – номер исследуемого образца.

7.4.1.3 Внесите в соответствующие пробирки, в каждую, отдельным наконечником по 3,0 мкл продукта амплификации из пробирок, промаркированных как «Х-2», где *Х* – номер исследуемого образца.

7.4.1.4 Встряхните пробирку в течение 3-5 с на микроцентрифуге-вортексе и центрифугируйте в течение 1-3 с на микроцентрифуге-вортексе.

Таблица 4 – Пример маркировки пробирок для смешивания ампликонов

№ образца	№ пробирки для смешивания ампликонов	Название вносимого компонента	Количество вносимого компонента, мкл
Образец 1	«Amp-1»	Продукт амплификации из пробирки 1-1	20
		Продукт амплификации из пробирки 1-2	3
Образец 2	«Amp-2»	Продукт амплификации из пробирки 2-1	20
		Продукт амплификации из пробирки 2-2	3
Образец 3	«Amp-3»	Продукт амплификации из пробирки 3-1	20
		Продукт амплификации из пробирки 3-2	3
Образец X	«Amp-X»	Продукт амплификации из пробирки X-1	20
		Продукт амплификации из пробирки X-2	3

7.4.2 Подготовка фрагментов ДНК к лигированию (Фасовка А)

Смешивание продуктов амплификации одного образца HLA I:HLA II производится в соотношении 7:1.

Установите микропланшет с полученными ампликонами HLA I и HLA II, и проведите дозирование компонентов согласно руководству по эксплуатации дозирующего устройства. Пример расположения реагентов на рабочем столе ДТстрим приведен в Приложении В, рис.2.

Примечание – Допускается хранение смешанных продуктов амплификации при температуре от минус 18 °С до минус 22 °С не более 1 месяца.

7.4.3 Лигирование библиотек фрагментов ДНК (Фасовка N)

7.4.3.1 Возьмите необходимое количество микропланшетов с индексами.

7.4.3.2 Внесите в соответствующие пробирки микропланшета с индексами, в каждую, отдельным наконечником, по 2,0 мкл содержимого из пробирки (ампликоны), промаркированной «Amp-X», где X – номер исследуемого образца (таблица 4).

7.4.3.3 Зафиксируйте в протоколе постановки соответствие индексов и образца (таблица 5).

7.4.3.4 Инкубируйте при комнатной температуре пробирки «Реагент L1» и «Реагент L2» до полного размораживания содержимого. Встряхните пробирки в течение 3-5 с на микроцентрифуге-вортексе и центрифугируйте в течение 1-3 с на микроцентрифуге-вортексе.

ВНИМАНИЕ! В пробирке с реагентом L1 возможно выпадение осадка. Встряхивайте пробирку до полного растворения осадка. Не допускается нагревания пробирки с реагентом L1. Не допускается использование реагента L1 с нерастворенным осадком.

Таблица 5 – Пример заполнения протокола постановки

Обр.1 /ts1	Обр.9 /ts9	Обр.17 /ts17	Обр.25 /ts25	Обр.33 /ts33	Обр.41 /ts41	Обр.49 /ts49	Обр.57 /ts57	Обр.65 /ts65	Обр.73 /ts73	Обр.81 /ts81	Обр.89 /ts89
Обр.2 /ts2	Обр.10 /ts10	Обр.18 /ts18	Обр.26 /ts26	Обр.34 /ts34	Обр.42 /ts42	Обр.50 /ts50	Обр.58 /ts58	Обр.66 /ts66	Обр.74 /ts74	Обр.82 /ts82	Обр.90 /ts90
Обр.3 /ts3	Обр.11 /ts11	Обр.19 /ts19	Обр.27 /ts27	Обр.35 /ts35	Обр.43 /ts43	Обр.51 /ts51	Обр.59 /ts59	Обр.67 /ts67	Обр.75 /ts75	Обр.83 /ts83	Обр.91 /ts91
Обр.4 /ts4	Обр.12 /ts12	Обр.20 /ts20	Обр.28 /ts28	Обр.36 /ts36	Обр.44 /ts44	Обр.52 /ts52	Обр.60 /ts60	Обр.68 /ts68	Обр.76 /ts76	Обр.84 /ts84	Обр.92 /ts92
Обр.5 /ts5	Обр.13 /ts13	Обр.21 /ts21	Обр.29 /ts29	Обр.37 /ts37	Обр.45 /ts45	Обр.53 /ts53	Обр.61 /ts61	Обр.69 /ts69	Обр.77 /ts77	Обр.85 /ts85	Обр.93 /ts93
Обр.6 /ts6	Обр.14 /ts14	Обр.22 /ts22	Обр.30 /ts30	Обр.38 /ts38	Обр.46 /ts46	Обр.54 /ts54	Обр.62 /ts62	Обр.70 /ts70	Обр.78 /ts78	Обр.86 /ts86	Обр.94 /ts94
Обр.7 /ts7	Обр.15 /ts15	Обр.23 /ts23	Обр.31 /ts31	Обр.39 /ts39	Обр.47 /ts47	Обр.55 /ts55	Обр.63 /ts63	Обр.71 /ts71	Обр.79 /ts79	Обр.87 /ts87	Обр.95 /ts95
Обр.8 /ts8	Обр.16 /ts16	Обр.24 /ts24	Обр.32 /ts32	Обр.40 /ts40	Обр.48 /ts48	Обр.56 /ts56	Обр.64 /ts64	Обр.72 /ts72	Обр.80 /ts80	Обр.88 /ts88	Обр.96 /ts96

7.4.3.5 Встряхните пробирку «Фермент-LIG» в течение 3-5 с на микроцентрифуге-вортексе и центрифугируйте в течение 1-3 с на микроцентрифуге-вортексе.

Примечание – Фермент-LIG необходимо вынимать из морозильной камеры непосредственно перед использованием.

7.4.3.6 Приготовьте смесь реагентов L1 и L2 с Ферментом-LIG. Для этого смешайте в отдельной пробирке объемом 0,5 мл:

- 3,5 x (N+1) мкл Реагента L1,
- 3,5 x (N+1) мкл Реагента L2,
- 1,0 x (N+1) мкл Фермента-LIG.
- 25,0 x (N+1) мкл Буфера для разведения ДНК.

где N – количество подготавливаемых библиотек (соответствует количеству анализируемых образцов).

7.4.3.7 Закройте крышку пробирки, встряхните пробирку в течение 3-5 с на микроцентрифуге-вортексе и центрифугируйте в течение 1-3 с на микроцентрифуге-вортексе.

7.4.3.8 Осторожно добавьте в пробирки микропланшета, содержащие смесь соответствующих индексов и ампликонов, в каждую отдельным наконечником по 33,0 мкл приготовленной смеси и перемешайте пипетированием 5 раз.

7.4.3.9 Запечатйте микропланшет адгезивной плёнкой.

7.4.3.10 Центрифугируйте микропланшет при 1000 об/мин в течение 30 с.

7.4.3.11 Установите все пробирки в блок амплификатора и проведите реакцию лигирования с учетом объема реакционной смеси, равного 35 мкл. Программа для проведения лигирования приведена в таблице 6.

7.4.3.12 После окончания лигирования извлеките микропланшет из амплификатора и поместите на рабочий стол.

В результате лигирования формируются библиотеки фрагментов ДНК, соответствующие исследуемым образцам.

7.4.4 Лигирование библиотек фрагментов ДНК (фасовка А)

7.4.4.1 Инкубируйте при комнатной температуре пробирки «Реагент L1» и «Реагент L2» до полного размораживания содержимого. Встряхните пробирки в течение 3-5 с на микроцентрифуге-вортексе и центрифугируйте в течение 1-3 с на микроцентрифуге-вортексе.

ВНИМАНИЕ! В пробирке с реагентом L1 возможно выпадение осадка. В этом случае необходимо встряхивать пробирку до полного растворения осадка. Не допускается нагревания пробирки с реагентом L1. Не допускается использование реагента L1 с нерастворенным осадком.

7.4.4.2 Встряхните пробирку «Фермент-LIG» в течение 3-5 с на микроцентрифуге-вортексе и центрифугируйте в течение 1-3 с на микроцентрифуге-вортексе.

Примечание – Фермент-LIG необходимо вынимать из морозильной камеры непосредственно перед использованием.

7.4.4.3 Установите картридж №2, пробирки с реагентом L1, L2 и ферментом-LIG, микропланшет со смешанными ампликонами (см.7.4.2.1) и микропланшет с индексами на рабочий стол ДТстрим и проведите дозирование компонентов согласно руководству по эксплуатации. Пример расположения реагентов на рабочем столе ДТстрим приведен в Приложении В, рис.2.

7.4.4.4 После завершения программы на дозирующем устройстве ДТстрим аккуратно, не встряхивая, поместите микропланшет в подложку устройства для запечатывания планшет ДТпак

7.4.4.5 Запечатайте микропланшет адгезивной плёнкой.

7.4.4.6 Центрифугируйте микропланшет при 1000 об/мин в течение 30 с.

7.4.4.7 Установите микропланшет в блок детектирующего амплификатора и проведите реакцию лигирования с учетом объема реакционной смеси, равного 35 мкл. Программа для проведения лигирования приведена в таблице 6.

Таблица 6 – Программа лигирования

№ блока	Температура, °С	Время		Число циклов	Режим оптических измерений*	Тип блока
		мин	с			
1	17,0	60	00	1	-	Цикл
2	85,0	10	00	1	-	Цикл
5	10,0	...	...	Хранение	-	Хранение
* - режим оптических измерений при данной процедуре не устанавливается						

7.4.4.8 После окончания лигирования извлеките микропланшет из амплификатора и поместите на рабочий стол.

В результате лигирования формируются библиотеки фрагментов ДНК, соответствующие исследуемым образцам.

7.4.5 Пулирование, очистка и проведение амплификации библиотек фрагментов ДНК (Фасовка N)

Пулирование библиотек проводится по 16 или 18 исследуемых образцов.

7.4.5.1 Промаркируйте по одной пустой пробирке объемом 0,5 мл для каждого пула образцов (см. пример в таблице 7).

7.4.5.2 Внесите в пробирки объемом 0,5 мл, промаркированные «Пул X-Z», где X-Z – номера исследуемых образцов, по 30 мкл из соответствующих пробирок микропланшета с библиотеками, закройте крышки, встряхните пробирки в течение 3-5 с на микроцентрифуге-вортексе и центрифугируйте в течение 1-3 с на микроцентрифуге-вортексе.

ВНИМАНИЕ! Содержимое пробирок объемом 0,5 мл, промаркированных «Пул X-Z», не хранить и сразу использовать для дальнейшей постановки.

Т а б л и ц а 7 – Пример маркировки пробирок для пулирования 16 библиотек фрагментов ДНК

№ образца	№ библиотеки	№ пробирки для пула
Образец 1	Библиотека 1	Пул 1-16
Образец 2	Библиотека 2	
Образец 3	Библиотека 3	
Образец 4	Библиотека 4	
...	...	
Образец 13	Библиотека 13	
Образец 14	Библиотека 14	
Образец 15	Библиотека 15	
Образец 16	Библиотека 16	

7.4.5.3 Встряхните флакон «Раствор МЧ» в течение 3-5 с до получения раствора равномерного коричневого цвета. Инкубируйте при комнатной температуре не менее 30 мин.

7.4.5.4 Перед использованием встряхните флакон «Раствор МЧ» в течение 3-5 с до получения раствора равномерного коричневого цвета.

7.4.5.5 Промаркируйте пустые пробирки объемом 1,5 мл для каждого пула исследуемых образцов (таблица 7).

7.4.5.6 Внесите в пробирки объемом 1,5 мл, промаркированных «Пул X-Z» по 50 мкл раствора МЧ. Затем добавьте в каждую пробирку отдельным наконечником 70 мкл из соответствующих пробирок объемом 0,5 мл. Закройте крышки пробирок, встряхните пробирки в течение 3-5 с на микроцентрифуге-вортексе и центрифугируйте в течение 1-3 с на микроцентрифуге-вортексе.

Примечание – Хранение остатков пулов не допускается. Утилизация остатков пулов проводится в соответствии с требованиями СанПиН 2.1.7.2790-10 «Санитарно-эпидемиологические требования к обращению с медицинскими отходами».

7.4.5.7 Инкубируйте пробирки при комнатной температуре в течение 5 мин.

7.4.5.8 Приготовьте 70% этанол. Смешайте в отдельном флаконе:

- 1,0 x (N+1) мл 96% этанола,
 - 360 x (N+1) мкл деионизированной воды,
- где N – количество подготавливаемых пулов.

ВНИМАНИЕ! Срок хранения 70% этанола не более 3-х дней. При превышении этого срока готовится новый раствор.

7.4.5.9 Поместите пробирки в магнитный штатив.

7.4.5.10 Инкубируйте пробирки при комнатной температуре в течение 3 мин либо до тех пор, пока все магнитные частицы не соберутся у стенки пробирки.

7.4.5.11 Удалите жидкость с использованием дозатора, не задевая магнитные частицы.

7.4.5.12 Добавьте 200 мкл 70 % этанола.

7.4.5.13 Извлеките пробирки из магнитного штатива и поместите обратно, провернув пробирку вокруг вертикальной оси на 180 градусов. Повторите 4 раза.

7.4.5.14 Удалите жидкость с использованием дозатора, не задевая магнитные частицы.

7.4.5.15 Закройте крышки пробирок. Центрифугируйте в течение 1-3 с на микроцентрифуге-вортексе.

7.4.5.16 Верните пробирки в магнитный штатив и, используя дозатор, позволяющий отбирать объёмы жидкости от 2 до 20 мкл, аккуратно уберите оставшуюся жидкость со дна, не задевая магнитные частицы.

7.4.5.17 Инкубируйте пробирки с открытой крышкой при комнатной температуре 4 мин, не вынимая из магнитного штатива.

7.4.5.18 Добавьте в пробирки 37 мкл элюирующего раствора TEL. Снимите пробирки с магнитного штатива, встряхните в течение 5-10 с на микроцентрифуге-вортексе и центрифугируйте в течение 1-3 с на микроцентрифуге-вортексе.

7.4.5.19 Поставьте в магнитный штатив, инкубируйте в течение 2-3 мин, пока жидкость не станет прозрачной.

7.4.5.20 Промаркируйте по одной пустой пробирке объёмом 1,5 мл для каждого пула исследуемых образцов (таблица 7).

7.4.5.21 Внесите в пробирки объёмом 1,5 мл, промаркированных «Пул X-Z» по 25 мкл раствора МЧ.

7.4.5.22 Перенесите 35 мкл надосадочной жидкости из пробирок на магнитном штативе в пробирки объёмом 1,5 мл с раствором МЧ с соответствующей маркировкой, не задевая магнитные частицы. Закройте крышки, встряхните пробирки в течение 3-5 с на микроцентрифуге-вортексе и центрифугируйте в течение 1-3 с на микроцентрифуге-вортексе.

7.4.5.23 Инкубируйте пробирки при комнатной температуре в течение 5 мин.

7.4.5.24 Поместите пробирки в магнитный штатив.

7.4.5.25 Инкубируйте 3 мин при комнатной температуре либо до тех пор, пока все магнитные частицы не соберутся у стенки пробирки.

7.4.5.26 Удалите жидкость с использованием дозатора, не задевая магнитные частицы.

- 7.4.5.27 Добавьте 200 мкл 70% этанола.
- 7.4.5.28 Извлеките пробирки из магнитного штатива и поместите обратно, провернув пробирку вокруг вертикальной оси на 180 градусов. Повторите 4 раза.
- 7.4.5.29 Удалите жидкость с использованием дозатора, не задевая магнитные частицы.
- 7.4.5.30 Закройте крышки пробирок. Центрифугируйте в течение 1-3 с на микроцентрифуге-вортексе.
- 7.4.5.31 Верните пробирки в магнитный штатив, аккуратно уберите оставшуюся жидкость со дна, не задевая магнитные частицы с использованием дозатора на 2-20 мкл.
- 7.4.5.32 Инкубируйте пробирки с открытой крышкой при комнатной температуре 4 мин, не вынимая из магнитного штатива.
- 7.4.5.33 Добавьте в пробирки 27 мкл элюирующего раствора TEL.
- 7.4.5.34 Снимите пробирки с магнитного штатива, встряхните в течении 5-10 с на микроцентрифуге-вортексе и центрифугируйте в течение 1-3 с на микроцентрифуге-вортексе.
- 7.4.5.35 Поставьте в магнитный штатив, инкубируйте в течение 2-3 мин, пока жидкость не станет прозрачной.
- 7.4.5.36 Промаркируйте по одной пустой пробирке объемом 0,2 мл для каждого пула исследуемых образцов (таблица 7).
- 7.4.5.37 Перенесите 25 мкл жидкости в пробирку объемом 0,2 мл с соответствующей маркировкой, не задевая магнитные частицы.

Примечание – Допускается хранение очищенного продукта лигирования при температуре от минус 18 °С до минус 22 °С не более 1 месяца.

- 7.4.5.38 Инкубируйте при комнатной температуре «Смесь для амплификации библиотек ИЛМ» до полного размораживания содержимого. Встряхните пробирки в течение 3-5 с на микроцентрифуге-вортексе и центрифугируйте в течение 1-3 с на микроцентрифуге-вортексе.
- 7.4.5.39 Встряхните пробирку «Фермент-ТАТ (15)» в течение 3-5 с на микроцентрифуге-вортексе и центрифугируйте в течение 1-3 с на микроцентрифуге-вортексе.

Примечание – Фермент-ТАТ (15) необходимо вынимать из морозильной камеры непосредственно перед использованием.

- 7.4.5.40 Внесите в отдельную пробирку объемом 0,5 мл:
- 10 x (N+1) мкл Смеси для амплификации библиотек ИЛМ,
 - 0,5 x (N+1) мкл Фермента-ТАТ (15),
- где N – количество подготавливаемых пулов.
- 7.4.5.41 Закройте крышки пробирок, встряхните пробирки в течение 3-5 с на микроцентрифуге-вортексе и центрифугируйте в течение 1-3 с на микроцентрифуге-вортексе.

- 7.4.5.42 Осторожно добавьте в пробирки, содержащие пулы подготавливаемых библиотек, в каждую, отдельным наконечником по 10 мкл приготовленной смеси, закройте крышки пробирок, встряхните пробирки в течение 3-5 с на микроцентрифуге-вортексе и центрифугируйте в течение 1-3 с на микроцентрифуге-вортексе.
- 7.4.5.43 Установите все пробирки в блок амплификатора и проведите ПЦР-амплификацию с учетом объема реакционной смеси, равного 35 мкл. Программа амплификации приведена в таблице 8.
- 7.4.5.44 После окончания амплификации извлеките пробирки из амплификатора и поставьте на рабочий стол.
- 7.4.6 Пулирование, очистка и проведение амплификации библиотек фрагментов ДНК (Фасовка А)
- 7.4.6.1 Приготовьте в отдельном флаконе 70% этанол:
- 12,0 мл 96% этанола,
 - 4,3 мл деионизированной воды.

ВНИМАНИЕ! Срок хранения 70% этанола не более 3-х дней. При превышении этого срока готовится новый раствор.

- 7.4.6.2 Инкубируйте при комнатной температуре «Смесь для амплификации библиотек ИЛМ» до полного размораживания содержимого. Встряхните пробирки в течение 3-5 с на микроцентрифуге-вортексе и центрифугируйте в течение 1-3 с на микроцентрифуге-вортексе.
- 7.4.6.3 Встряхните пробирку «Фермент-ТАТ (15)» в течение 3-5 с на микроцентрифуге-вортексе и центрифугируйте в течение 1-3 с на микроцентрифуге-вортексе.

Примечание – Фермент-ТАТ (15) необходимо вынимать из морозильной камеры непосредственно перед использованием.

- 7.4.6.4 Установите Картридж №3, пробирки со смесью для амплификации библиотек ИЛМ, ферментом-ТАТ (15), микропланшет с лигированными продуктами, а также одноразовые пробирки объемом 1,5 мл и объемом 0,2 мл в стрипах по 8 шт. на рабочий стол ДТстрим. Пример расположения реагентов на рабочем столе ДТстрим приведен в Приложении В, рис.3.
- 7.4.6.5 Внесите по 8,0 мл 70% этанола в картридж №3, ряд 5, ячейки 1, 2 и проведите дозирование компонентов согласно руководству по эксплуатации.
- 7.4.6.6 Снимите два стрипа с раскапанной смесью для амплификации библиотек ИЛМ и образцами с рабочего стола ДТстрим, установите в блок амплификатора и проведите ПЦР-амплификацию с учетом объема реакционной смеси, равного 35 мкл. Программа амплификации приведена в таблице 8.

Таблица 8 – Программа амплификации

№ блока	Температура, °C	Время		Число циклов	Режим оптических измерений*	Тип блока
		мин	с			
1	94,0	5	00	1	-	Цикл
2	94,0	0	20	8	-	Цикл
	60,0	0	15		-	
	72,0	0	30		-	
3	72,0	5	00	1	-	Цикл
5	10,0	...	...	Хранение	-	Хранение
* - режим оптических измерений при данной процедуре не устанавливается						

7.4.7 Очистка библиотек фрагментов ДНК (Фасовка N)

- 7.4.7.1 Встряхните флакон «Раствор МЧ» в течение 3-5 с до получения раствора равномерного коричневого цвета. Инкубируйте при комнатной температуре не менее 30 минут.
- 7.4.7.2 Встряхните флакон «Раствор МЧ» в течение 3-5 с до получения раствора равномерного коричневого цвета перед использованием.
- 7.4.7.3 Промаркируйте по одной пустой пробирке объемом 1,5 мл, для каждого пула исследуемых образцов (таблица 7).
- 7.4.7.4 Внесите в пробирки объемом 1,5 мл, промаркированных «Пул X-Z», где X-Z – номера исследуемых образцов, по 25 мкл раствора МЧ и добавьте отдельными наконечниками весь объем из соответствующих пробирок микропланшета с библиотеками, закройте крышки, встряхните пробирки в течение 3-5 с на микроцентрифуге-вортексе и центрифугируйте в течение 1-3 с на микроцентрифуге-вортексе.
- 7.4.7.5 Инкубируйте пробирки при комнатной температуре в течение 5 мин.
- 7.4.7.6 Поместите пробирки в магнитный штатив.
- 7.4.7.7 Инкубируйте 3 минуты при комнатной температуре либо до тех пор, пока все магнитные частицы не соберутся у стенки пробирки.
- 7.4.7.8 Удалите жидкость с использованием дозатора, не задевая магнитные частицы.
- 7.4.7.9 Добавьте 200 мкл 70% этанола.
- 7.4.7.10 Извлеките пробирки из магнитного штатива и поместите обратно, провернув пробирку вокруг вертикальной оси на 180 градусов. Повторите 4 раза.
- 7.4.7.11 Удалите жидкость с использованием дозатора, не задевая магнитные частицы.
- 7.4.7.12 Закройте крышки пробирок. Центрифугируйте в течение 1-3 с на микроцентрифуге-вортексе.
- 7.4.7.13 Верните пробирки в магнитный штатив, аккуратно уберите оставшуюся жидкость со дна, не задевая магнитные частицы с использованием дозатора на 2-20 мкл.

- 7.4.7.14 Инкубируйте пробирки с открытой крышкой при комнатной температуре 4 мин, не вынимая из магнитного штатива.
- 7.4.7.15 Добавьте в пробирки 37 мкл элюирующего раствора TEL. Снимите пробирки с магнитного штатива, встряхните в течение 5-10 с и центрифугируйте в течение 1-3 с на микроцентрифуге-вортексе.
- 7.4.7.16 Поставьте в магнитный штатив, инкубируйте в течение 2-3 мин, пока жидкость не станет прозрачной.
- 7.4.7.17 Промаркируйте по одной пустой пробирке объёмом 1,5 мл для каждого пула исследуемых образцов (таблица 7).
- 7.4.7.18 Внесите в пробирки объёмом 1,5 мл, промаркированных «Пул X-Z» по 25 мкл раствора МЧ.
- 7.4.7.19 Перенесите 35 мкл надосадочной жидкости из пробирок на магнитном штативе в пробирки объёмом 1,5 мл с раствором МЧ с соответствующей маркировкой, не задевая магнитные частицы. Закройте крышки, встряхните пробирки в течение 3-5 с на микроцентрифуге-вортексе и центрифугируйте в течение 1-3 с на микроцентрифуге-вортексе.
- 7.4.7.20 Инкубируйте пробирки при комнатной температуре в течение 5 мин.
- 7.4.7.21 Поместите пробирки в магнитный штатив.
- 7.4.7.22 Инкубируйте 3 мин при комнатной температуре либо до тех пор, пока все магнитные частицы не соберутся у стенки пробирки.
- 7.4.7.23 Удалите жидкость с использованием дозатора, не задевая магнитные частицы.
- 7.4.7.24 Добавьте 200 мкл 70% этанола.
- 7.4.7.25 Извлеките пробирки из магнитного штатива и поместите обратно, провернув пробирку вокруг вертикальной оси на 180 градусов. Повторите 4 раза.
- 7.4.7.26 Удалите жидкость с использованием дозатора, не задевая магнитные частицы.
- 7.4.7.27 Закройте крышки пробирок. Центрифугируйте в течение 1-3 с на микроцентрифуге-вортексе.
- 7.4.7.28 Верните пробирки в магнитный штатив, аккуратно уберите оставшуюся жидкость со дна, не задевая магнитные частицы с использованием дозатора на 2-20 мкл.
- 7.4.7.29 Инкубируйте пробирки с открытой крышкой при комнатной температуре 4 мин, не вынимая из магнитного штатива.
- 7.4.7.30 Добавьте в пробирки 50 мкл элюирующего раствора TEL. Снимите пробирки с магнитного штатива, встряхните в течение 5-10 с на микроцентрифуге-вортексе и центрифугируйте в течение 1-3 с на микроцентрифуге-вортексе.
- 7.4.7.31 Поставьте в магнитный штатив, инкубируйте в течение 2-3 мин, пока жидкость не станет прозрачной.
- 7.4.7.32 Промаркируйте по одной пустой пробирке объёмом 0,5 мл, для каждого пула библиотек. Укажите номера внесенных индексов (таблица 9).
- 7.4.7.33 Перенесите 45 мкл жидкости в пробирку объёмом 0,5 мл с соответствующей маркировкой, не задевая магнитные частицы.

Таблица 9 – Пример маркировки пробирок для готовой библиотеки

№ образца	№ пробирки для пула библиотек
Образец 1	«Пул Lib1-16 ts1 – ts 16»
Образец 2	
Образец 3	
Образец 4	
...	
Образец 13	
Образец 14	
Образец 15	
Образец 16	

Примечание – Допускается хранение библиотеки при температуре от минус 18 °С до минус 22 °С не более 1 месяца или в морозильной камере на минус 70 °С не более 1 года.

7.4.8 Очистка библиотек фрагментов ДНК (Фасовка А)

7.4.8.1 После окончания амплификации извлеките пробирки из амплификатора и верните на рабочий стол ДТстрим и проведите дальнейшее дозирование компонентов согласно руководству по эксплуатации к дозирующему устройству.

8 ОЦЕНКА КОЛИЧЕСТВА И КАЧЕСТВА БИБЛИОТЕКИ

8.1 Проведите оценку количества и качества полученных пулов библиотек на флуориметре или флуоресцентном анализаторе согласно инструкции к набору реагентов и прибору.

Для оценки качественного профиля библиотеки (длины представленных в библиотеке фрагментов, долю лигированных продуктов) можно использовать метод горизонтального гель-электрофореза в соответствии с инструкцией к комплекту реагентов для детекции продуктов ПЦР методом гель-электрофореза.

8.2 На полученной электрофореграмме должны присутствовать основные пики длиной от 442 до 520 п.н. Более короткие пики должны отсутствовать либо составлять не более 20% от концентрации всего продукта. Допускается наличие продуктов длиной более 520 п.н.

При проведении гель-электрофореза в каждой дорожке геля, в которую были внесены пулы библиотек, должна быть видна светящаяся полоса оранжево-красного цвета, соответствующая фрагментам амплифицированных продуктов размером 442 до 520 п.н. Более короткие полосы должны отсутствовать. Допускается наличие светящихся полос длиной более 520 п.н. и разной степени интенсивности.

8.3 Молярная концентрация библиотеки должна быть не менее 2000 пмоль/л (не менее 2 нмоль/л).

Если прибор выдаёт концентрацию в «нг/мкл», то для расчёта молярной концентрации (нмоль/л) необходимо концентрацию, полученную в «нг/мкл», умножить на коэффициент 3,03.

Библиотеки готовы для дальнейшего проведения секвенирования.

9 ПРОВЕДЕНИЕ СЕКВЕНИРОВАНИЯ

Секвенирование библиотек следует проводить на приборе MiSeq (Illumina, USA, РУ № РЗН 2014/1568) с использованием Комплекта реагентов для секвенирования из набора реагентов HLA-Эксперт, согласно Приложению Г к данной инструкции и Инструкции к прибору MiSeq.

Регистрация результатов секвенирования проводится прибором автоматически во время проведения секвенирования. Первичный анализ данных секвенирования осуществляется прибором после завершения программы.

10 АНАЛИЗ ПОЛУЧЕННЫХ ДАННЫХ

Типирование генов HLA I (HLA-A, HLA-B, HLA-C) и HLA II (DRB1, DQB1, DPB1, DRB3/4/5) на уровне высокого разрешения методом высокопроизводительного секвенирования (NGS) осуществляется с помощью программного обеспечения «HLA-Эксперт» согласно Руководству пользователя к программному обеспечению. Программное обеспечение предназначено только для совместного применения с набором реагентов «HLA-Эксперт». Рекомендуется пройти обучение.

Программное обеспечение «HLA-Эксперт» и Руководство пользователя предоставляется на USB-флеш-накопителе.

В случае возникновения вопросов обращаться в службу клиентской поддержки. Контакты службы клиентской поддержки представлены в разделе 17.

11 ТРАНСПОРТИРОВАНИЕ, ХРАНЕНИЕ И ЭКСПЛУАТАЦИЯ

11.1 Транспортирование

- 11.1.1 Транспортирование набора реагентов осуществляют в термоконтейнерах с хладоэлементами всеми видами крытого транспорта при температурах, соответствующих условиям хранения компонентов, входящих в состав набора.
- 11.1.2 Допускается транспортирование реагентов, упакованных для хранения от 2 °С до 8 °С, в вариантах исполнения «Фасовка N v1» и «Фасовка A v1» при температуре от 2 °С до 25 °С не более 5 суток.
- 11.1.3 Допускается транспортирование реагентов, упакованных для хранения от минус 18 °С до минус 22 °С, в вариантах исполнения «Фасовка N v1» и «Фасовка A v1», при температуре не выше 8 °С не более 5 суток.
- 11.1.4 Наборы реагентов, транспортированные с нарушением температурного режима, применению не подлежат.

11.2 Хранение

11.2.1 Следующие компоненты следует хранить в холодильнике или холодильной камере при температуре от 2 °С до 8 °С в течение всего срока годности набора:

Смесь для амплификации KBM, Смесь для амплификации HLA I, Смесь для амплификации HLA II, Буфер для разведения ДНК, Смесь для амплификации библиотек ИЛМ, Индексы ts1 – ts96, Индексы ts97 – ts192, Индексы ts193 – ts288, Адгезивная плёнка, Раствор МЧ, Элюирующий раствор TEL, PR2 буфер, Проточная ячейка.

Указанные компоненты упакованы в коробку для хранения при температуре от 2 °С до 8 °С. Смеси для амплификации следует хранить в холодильнике или холодильной камере при температуре от 2 °С до 8 °С в защищенном от света месте в течение всего срока годности набора.

11.2.2 Следующие компоненты следует хранить в морозильной камере при температуре от минус 18 °С до минус 22 °С в течение всего срока годности набора:

Фермент-TAT (30), Фермент-TAT (100), Реагент L1, Реагент L2, Фермент-LIG, Фермент-TAT (15), Картридж с реагентами, HT1 буфер.

Указанные компоненты упакованы в коробку для хранения при температуре от минус 18 °С до минус 22 °С.

11.2.3 Наборы реагентов, хранившиеся с нарушением регламентированного режима, применению не подлежат.

11.3 Указания по эксплуатации

11.3.1 Набор должен применяться согласно действующей версии утвержденной инструкции по применению.

11.3.2 После вскрытия упаковки компоненты набора следует хранить при следующих условиях:

- Смесь для амплификации библиотек ИЛМ, Буфер для разведения ДНК, Раствор МЧ, Элюирующий раствор TEL следует хранить в холодильнике или холодильной камере при температуре от 2 °С до 8 °С в течение всего срока годности набора;
- Фермент-TAT (15) следует хранить в морозильной камере при температуре от минус 18 °С до минус 22 °С в течение всего срока годности набора, допускается замораживание/размораживание до 3 раз.

11.3.3 Смесь для амплификации KBM, Смесь для амплификации HLA I, Смесь для амплификации HLA II, Индексы ts1 – ts96, Индексы ts97 – ts192, Индексы ts193 – ts288, Картридж с реагентами №1, Картридж с реагентами №2, Картридж с реагентами №3 предназначены для одноразового использования.

11.3.4 PR2 буфер, Проточная ячейка, HT1 буфер предназначены для одноразового использования и должны быть извлечены из холодильника непосредственно перед использованием.

11.3.5 Картридж с реагентами (из комплекта реагентов для секвенирования) должен быть использован не позднее, чем через 6 часов после размораживания; до использования необходимо хранить при температуре от 2 °С до 8 °С.

- 11.3.6 Фермент-ТАТ (30), Фермент-ТАТ (100), Реагент L1, Реагент L2, Фермент-LIG предназначены для одноразового использования и должны быть извлечены из морозильной камеры непосредственно перед использованием.
- 11.3.7 Набор с истекшим сроком годности применению не подлежит.
- 11.3.8 Для получения надежных результатов необходимо строгое соблюдение инструкции по применению набора.

12 УКАЗАНИЯ ПО УТИЛИЗАЦИИ

12.1 Наборы, пришедшие в непригодность, в том числе в связи с истечением срока годности, и неиспользованные реактивы, относятся к классу Б и подлежат утилизации в соответствии с требованиями СанПиН 2.1.7.2790-10 и МУ 1.3.2569-09.

12.2 При использовании набора в клинично-диагностической лаборатории образуются отходы классов А и Б, которые классифицируются и утилизируются в соответствии с требованиями СанПиН 2.1.7.2790-10.

12.3 Входящие в состав набора реагентов жидкие компоненты, пришедшие в непригодность, перед сливом в канализацию должны быть предварительно разбавлены водой 1:100.

12.4 Упаковка набора реагентов (первичная: пробирки, флаконы и внешняя: пакеты полиэтиленовые с замком и коробки картонные) после использования по назначению относится к отходам класса А и утилизируется с бытовыми отходами.

ВНИМАНИЕ! В случае вскрытия упаковки набора в боксе она относится к отходам класса Б и подлежит утилизации в соответствии с требованиями СанПиН 2.1.7.2790-10 и МУ 1.3.2569-09.

13 ГАРАНТИИ ИЗГОТОВИТЕЛЯ

13.1 Предприятие-изготовитель гарантирует соответствие набора требованиям технических условий при соблюдении условий транспортирования, хранения и применения, установленных техническими условиями.

13.2 Срок годности набора и контрольных образцов к набору – 12 месяцев при соблюдении всех условий транспортирования, хранения и эксплуатации.

14 РЕМОНТ И ТЕХНИЧЕСКОЕ ОБСЛУЖИВАНИЕ

Набор реагентов предназначен для одноразового использования и не подлежит техническому обслуживанию и текущему ремонту.

15 СИМВОЛЫ, ИСПОЛЬЗУЕМЫЕ ПРИ МАРКИРОВКЕ НАБОРА РЕАГЕНТОВ

	Медицинское изделие для диагностики in vitro
	Температурный диапазон
	Количество тестов
	Годеи до
	Серия набора
	Дата изготовления
	Репродуктивная токсичность
	Обратитесь к инструкции по применению
	Каталожный номер
	Адрес изготовителя
	Не допускается воздействие солнечного света
	Не стерильно
	Одноразовое использование
	Осторожно! Содержит раздражающие компоненты

16 ПЕРЕЧЕНЬ ПРИМЕНЯЕМЫХ НАЦИОНАЛЬНЫХ СТАНДАРТОВ

ГОСТ 2.105-95 Общие требования к текстовым документам.

ГОСТ ISO 14971-2011 Изделия медицинские. Применение менеджмента риска к медицинским изделиям.

ГОСТ Р 15.309-98 Система разработки и постановки продукции на производство. Испытания и приёмка выпускаемой продукции. Основные положения.

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

ГОСТ Р 51352-2013 Медицинские изделия для диагностики ин витро. Методы испытаний.

ГОСТ Р 53022.3-2008 Требования к качеству клинических лабораторных исследований.

Ч.3. Правила оценки клинической информативности лабораторных тестов.

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

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

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

ГОСТ Р ИСО 15223-1-2014 Изделия медицинские. Символы, применяемые при маркировании на медицинских изделиях, этикетках и в сопроводительной документации. Ч.1. Основные требования.

ГОСТ Р 52905-2007 (ИСО 15190:2003) Лаборатории медицинские. Требования безопасности.

Примечания:

- 1 Указанные выше стандарты были действующими на момент утверждения инструкции по применению. В дальнейшем, при пользовании документом, целесообразно проверить действие ссылочных нормативных документов на текущий момент. Если ссылочный документ заменён или изменён, то при применении настоящего документа следует пользоваться заменённым (изменённым) документом.
- 2 Перечень стандартов, относящихся к программному обеспечению, приведён в руководстве пользователя.

17 АДРЕС ДЛЯ ОБРАЩЕНИЯ

Производство наборов реагентов имеет сертифицированную систему менеджмента качества и соответствует требованиям стандарта систем менеджмента качества ISO 9001 в области разработки, производства и продажи IVD реагентов и приборов для медицинской молекулярно-генетической диагностики и другого лабораторного применения и EN ISO 13485 в области разработки, производства и продажи IVD реагентов и приборов для медицинской молекулярно-генетической диагностики.

Производитель: Общество с ограниченной ответственностью «ДНК-Технология ТС» ООО «ДНК-Технология ТС», Россия.

Адрес производителя: ООО «ДНК-Технология ТС», 117246, Россия, г. Москва, проезд Научный, д. 20, строение 4.

Место производства: ООО «ДНК-Технология ТС», 117246, Россия, г. Москва, проезд Научный, д. 20, строение 4.

Рекламации по вопросам качества набора реагентов HLA-Эксперт следует направлять по адресу:

ООО «ДНК-Технология», 117587, Россия, г. Москва, вн. тер. г. муниципальный округ Чертаново Северное, ш. Варшавское, д. 125Ж, к. 5, этаж 1, пом. 12,
тел./факс +7 (495) 640-17-71, www.dna-technology.ru

Служба клиентской поддержки:

8-800-200-75-15 (звонок по России бесплатный),

+7(495) 640-16-93 (для стран СНГ и зарубежья, звонок платный),

E-mail: hotline@dna-technology.ru

Расположение индексов для подготовки библиотек фрагментов ДНК:

– ts1 – ts96 – 1 микропланшет

ts1	ts9	ts17	ts25	ts33	ts41	ts49	ts57	ts65	ts73	ts81	ts89
ts2	ts10	ts18	ts26	ts34	ts42	ts50	ts58	ts66	ts74	ts82	ts90
ts3	ts11	ts19	ts27	ts35	ts43	ts51	ts59	ts67	ts75	ts83	ts91
ts4	ts12	ts20	ts28	ts36	ts44	ts52	ts60	ts68	ts76	ts84	ts92
ts5	ts13	ts21	ts29	ts37	ts45	ts53	ts61	ts69	ts77	ts85	ts93
ts6	ts14	ts22	ts30	ts38	ts46	ts54	ts62	ts70	ts78	ts86	ts94
ts7	ts15	ts23	ts31	ts39	ts47	ts55	ts63	ts71	ts79	ts87	ts95
ts8	ts16	ts24	ts32	ts40	ts48	ts56	ts64	ts72	ts80	ts88	ts96

– ts97 – ts192 – 1 микропланшет

ts97	ts105	ts113	ts121	ts129	ts137	ts145	ts153	ts161	ts169	ts177	ts185
ts98	ts106	ts114	ts122	ts130	ts138	ts146	ts154	ts162	ts170	ts178	ts186
ts99	ts107	ts115	ts123	ts131	ts139	ts147	ts155	ts163	ts171	ts179	ts187
ts100	ts108	ts116	ts124	ts132	ts140	ts148	ts156	ts164	ts172	ts180	ts188
ts101	ts109	ts117	ts125	ts133	ts141	ts149	ts157	ts165	ts173	ts181	ts189
ts102	ts110	ts118	ts126	ts134	ts142	ts150	ts158	ts166	ts174	ts182	ts190
ts103	ts111	ts119	ts127	ts135	ts143	ts151	ts159	ts167	ts175	ts183	ts191
ts104	ts112	ts120	ts128	ts136	ts144	ts152	ts160	ts168	ts176	ts184	ts192

– ts193 – ts288 – 1 микропланшет

ts193	ts201	ts209	ts217	ts225	ts233	ts241	ts249	ts257	ts265	ts273	ts281
ts194	ts202	ts210	ts218	ts226	ts234	ts242	ts250	ts258	ts266	ts274	ts282
ts195	ts203	ts211	ts219	ts227	ts235	ts243	ts251	ts259	ts267	ts275	ts283
ts196	ts204	ts212	ts220	ts228	ts236	ts244	ts252	ts260	ts268	ts276	ts284
ts197	ts205	ts213	ts221	ts229	ts237	ts245	ts253	ts261	ts269	ts277	ts285
ts198	ts206	ts214	ts222	ts230	ts238	ts246	ts254	ts262	ts270	ts278	ts286
ts199	ts207	ts215	ts223	ts231	ts239	ts247	ts255	ts263	ts271	ts279	ts287
ts200	ts208	ts216	ts224	ts232	ts240	ts248	ts256	ts264	ts272	ts280	ts288

Исследование с использованием NGS состоит из следующих этапов:

№	Этап	Участие набора «HLA-Эксперт»
1	Получение биологического материала	-
2	Выделение ДНК	-
3	Оценка качества и количества полученной ДНК	
4	Фрагментация ДНК (амплификация – таргетное секвенирование)	1) Комплект реагентов для амплификации и подготовки библиотек фрагментов ДНК
5	Оценка качества полученных ампликонов	-
6	Присоединение индексов	1) Комплект реагентов для амплификации и подготовки библиотек фрагментов ДНК 2) Комплект индексов для подготовки библиотек фрагментов ДНК
7	Промежуточная очистка фрагментов ДНК	3) Комплект реагентов для очистки библиотек фрагментов ДНК
8	Дополнительная амплификация	1) Комплект реагентов для амплификации и подготовки библиотек фрагментов ДНК
9	Финальная очистка библиотеки	3) Комплект реагентов для очистки библиотек фрагментов ДНК
10	Оценка количества и качества полученной библиотеки	-
11	ПЦР обогащение (совмещен с проведением секвенирования)	-
12	Проведение секвенирования	4) Комплект реагентов для проведения секвенирования
13	Регистрация и обработка результата	-
14	Анализ полученных данных. Генотип	5) Программное обеспечение «HLA-Эксперт»

Пример расположения реагентов на рабочем столе дозирующего устройства ДТстрим
на этапах оценки пригодности выделенной ДНК и подготовки реагентов к проведению ПЦР

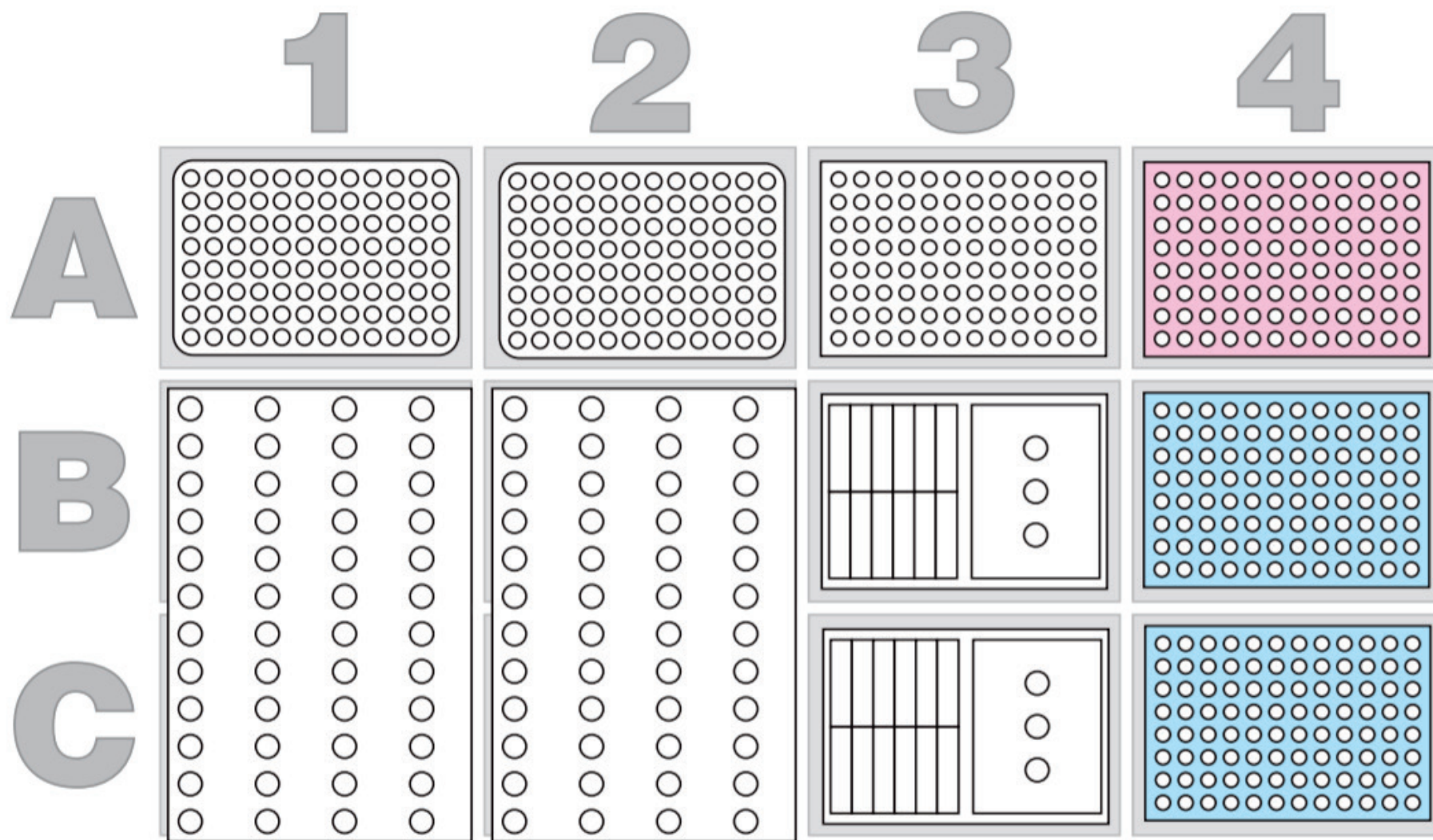


Рис. 1

Пример расположения реагентов на рабочем столе дозирующего устройства ДТстрим
на этапах подготовки фрагментов ДНК к лигированию и лигирование библиотек фрагментов ДНК

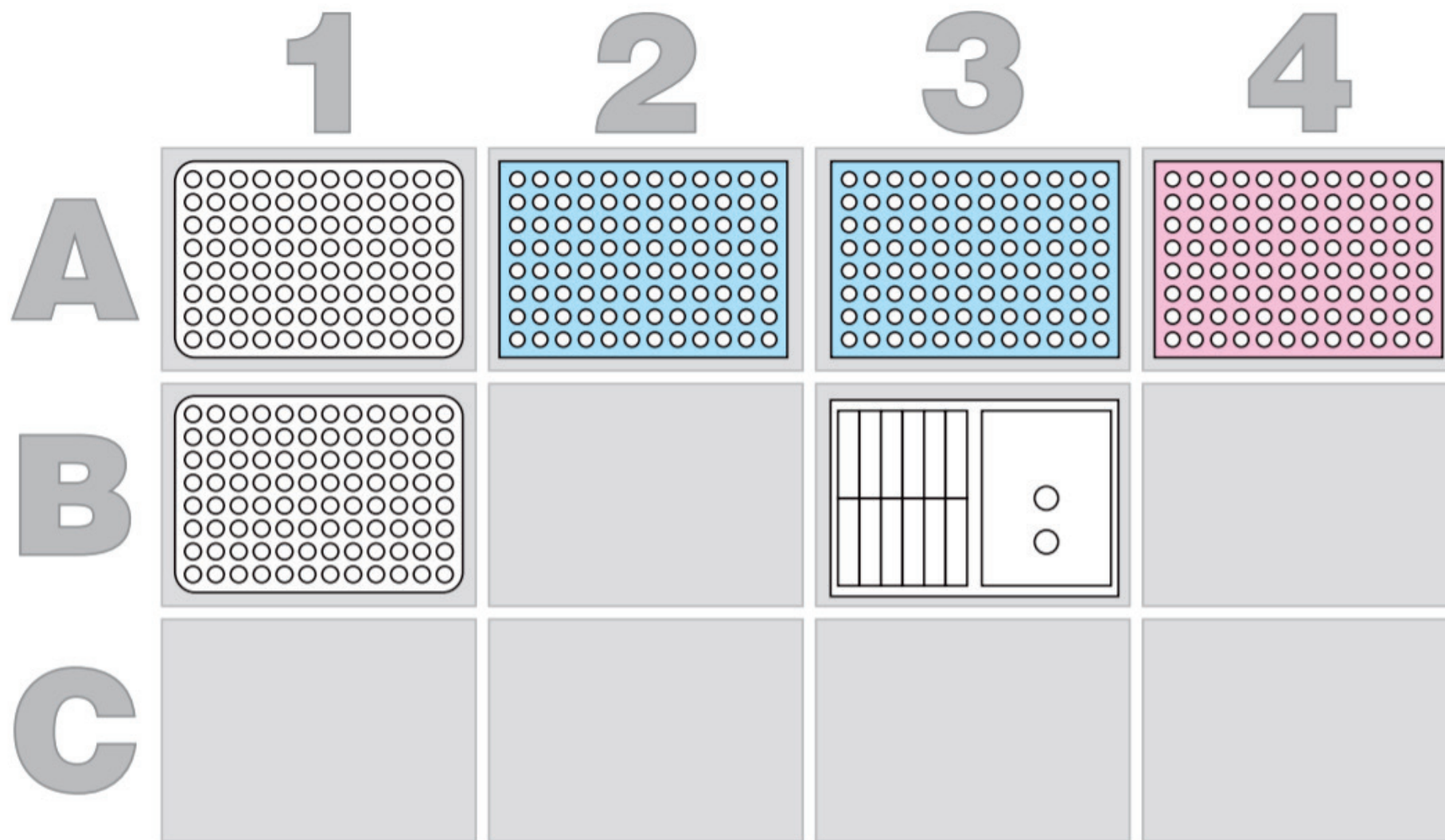


Рис. 2

Пример расположения реагентов на рабочем столе дозирующего устройства ДТстрим
на этапах очистки и амплификации библиотек фрагментов ДНК

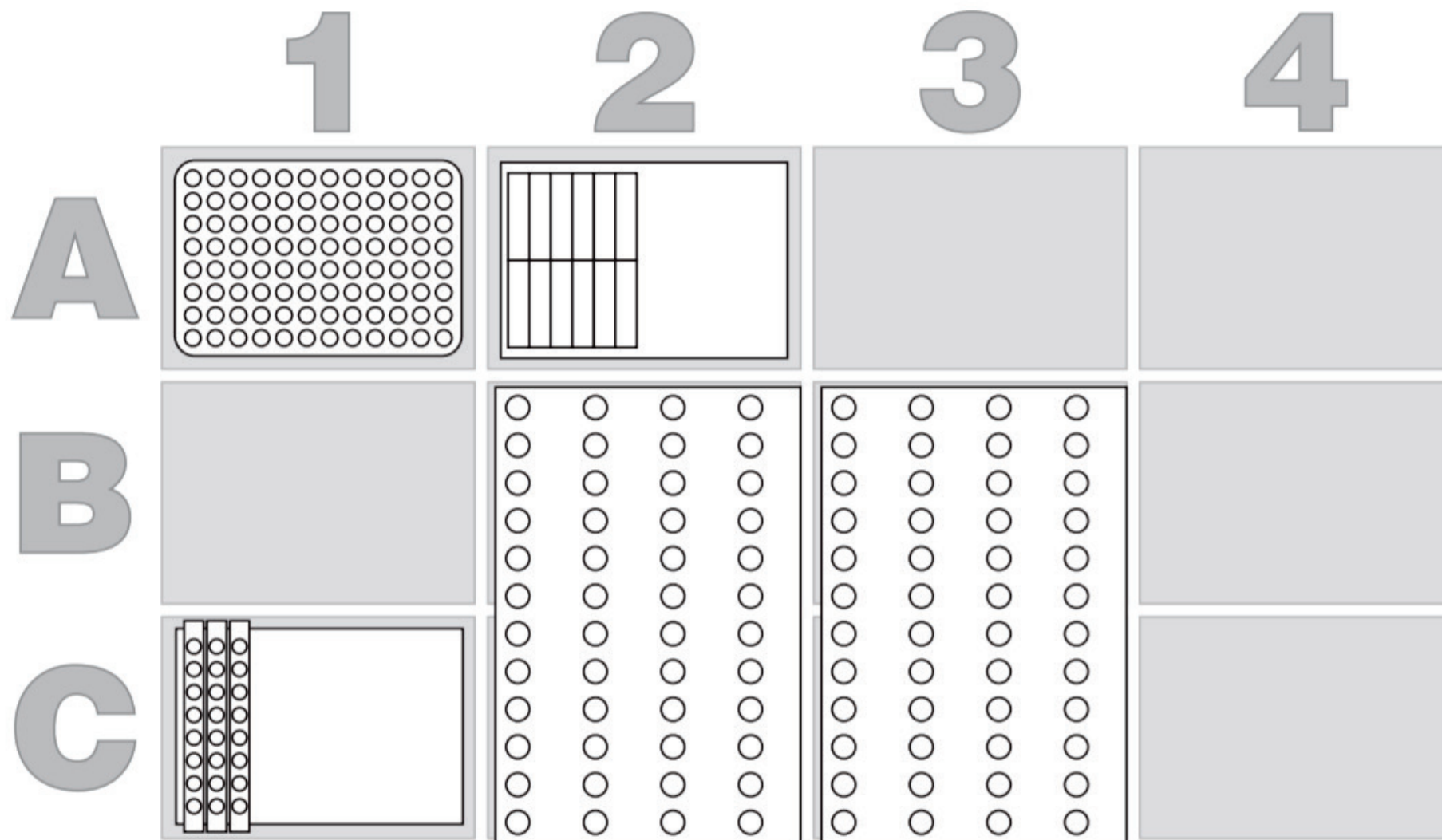


Рис. 3

ПРОВЕДЕНИЕ СЕКВЕНИРОВАНИЯ

I. Подготовка к проведению секвенирования: денатурирование и разбавление библиотек

Проведение секвенирования и подготовка к секвенированию проводится в соответствии с инструкцией к прибору MiSeq (Illumina, USA, РУ №РЗН 2014/1568 от 29.04.2014).

Данное приложение составлено на основе «Руководства по денатурированию и разбавлению библиотек для системы MiSeq (документ № 15039740)», адаптировано к набору реагентов HLA-Эксперт.

Таблица 4.1 – Маркировка компонентов комплекта реагентов для секвенирования

Расположение	Внешний вид	Маркировка компонента (англ)	Наименование в инструкции	Комментарий
Коробка для хранения при минус 18 °С - минус 22 °С (минус 15 °С - минус 25 °С)	Резервуар, заполненный реактивами	- MiSeq v2 Reagent Tray или - MiSeq v3 Reagent Tray	Картридж с реагентами	Осторожно! Содержит опасные компоненты (формамид) . См. раздел 4
	Пробирка с жидкостью	- HT1 - Hyb Buffer - 4.5 mL	HT1 буфер	
Коробка для хранения при 2 °С - 8 °С	Флакон (бутыль) с жидкостью	- PR2 - Incorporation Buffer - 500 mL	PR2 буфер	Осторожно! Содержит раздражающие компоненты
	Ёмкость с проточной ячейкой в буфере	- PE MiSeq FlowCell	Проточная ячейка	

Для разведения и денатурирования библиотек требуются следующие реагенты и расходные материалы:

- **HT1 буфер** из комплекта реагентов для проведения секвенирования;
- 1,0 М раствор NaOH (для молекулярно-биологических исследований).
- Деионизированная вода (для молекулярно-биологических исследований).
- Реагент PhiX Control производства Illumina, USA (Кат. номер FC-110-3001)
- Одноразовые пробирки вместимостью 1,5 мл.

1. Подготовка реагентов для денатурирования и разведения библиотек

1.1 Приготовьте свежий раствор 0,2 М NaOH.

Для этого смешайте в отдельной пробирке объемом 1,5 мл:

- 400 мкл деионизированной воды;
- 100 мкл 1 М NaOH.

Встряхните пробирку с 0,2 М NaOH в течение 3-5 с на микроцентрифуге-вортексе и центрифугируйте в течение 1-3 с на микроцентрифуге-вортексе.

1.2 Подготовьте **HT1 буфер**:

Разморозьте при комнатной температуре **HT1 буфер** из Комплекта реагентов для секвенирования.

2. Приготовление библиотеки с концентрацией 4 нМ

- 2.1 Готовые библиотеки (п.8.6) смешайте эквимолярно. Повторите измерение концентрации полученного пула библиотек или рассчитайте его концентрацию.
- 2.2 Рассчитайте кратность разведения полученной библиотеки.

$$Y = X/4,$$

где: Y – кратность разведения библиотеки (п.2.1),

X – концентрация библиотеки (п.2.1).

- 2.3 Разведите библиотеку до концентрации 4 нМ

Для этого смешайте в отдельной пробирке объёмом 1,5 мл:

- 10 мкл библиотеки,
- (10*Y) -10 мкл деионизованной воды,

где Y – кратность разведения для данной библиотеки.

- 2.4 Встряхните пробирку с библиотекой 4 нМ в течение 3-5 с на микроцентрифуге-вортексе и центрифугируйте в течение 1-3 с на микроцентрифуге-вортексе.

3. Денатурирование библиотеки 4 нМ

- 3.1 Смешайте в отдельной пробирке объёмом 1,5 мл:

- 5,0 мкл Библиотеки 4 нМ;
- 5,0 мкл 0,2 М NaOH.

- 3.2 Встряхните пробирку в течение 3-5 с на микроцентрифуге-вортексе и центрифугируйте в течение 1-3 с на микроцентрифуге-вортексе.

- 3.3 Инкубируйте пробирку 5 мин при комнатной температуре

- 3.4 Разведите библиотеку до 20 рМ:

Добавьте к 10 мкл денатурированной библиотеки 990 мкл **НТ1 буфера**, предварительно инкубированного при комнатной температуре.

В результате получается 1,0 мл денатурированной 20 рМ библиотеки.

- 3.5 Встряхните пробирку в течение 3-5 с на микроцентрифуге-вортексе и центрифугируйте в течение 1-3 с на микроцентрифуге-вортексе.

4. Разведение денатурированной библиотеки

- 4.1 Разведите денатурированную библиотеку до 10 рМ.

Для этого смешайте в отдельной пробирке:

- 300 мкл Библиотеки 20 рМ;
- 300 мкл НТ1 буфера.

- 4.2 Встряхните пробирку в течение 3-5 с на микроцентрифуге-вортексе и центрифугируйте в течение 1-3 с на микроцентрифуге-вортексе.

5. Приготовление 4 нМ PhiX Control

- 5.1 Разведите PhiX Control до 4 нМ.

Для этого смешайте в отдельной пробирке:

- 3,0 мкл Деионизированной воды;
- 2,0 мкл PhiX Control (исходная концентрация 10 нМ).

5.2 Встряхните пробирку в течение 3-5 с на микроцентрифуге-вortexсе и центрифугируйте в течение 1-3 с на микроцентрифуге-вortexсе.

5.3 Денатурируйте 4 нМ PhiX Control.

Для этого смешайте в отдельной пробирке:

- 5 мкл PhiX 4 нМ;
- 5 мкл 0,2 М NaOH.

5.4 Встряхните пробирку в течение 3-5 с на микроцентрифуге-вortexсе и центрифугируйте в течение 1-3 с на микроцентрифуге-вortexсе.

5.5 Инкубируйте пробирку при 5 мин при комнатной температуре.

6. Приготовление 20 pM PhiX Control

6.1 Разведите PhiX Control до 20 pM. Для этого к 10 мкл денатурированного PhiX Control добавьте 990 мкл HT1 реагента, предварительно инкубированного при комнатной температуре.

6.2 Встряхните пробирку в течение 3-5 с на микроцентрифуге-вortexсе и центрифугируйте в течение 1-3 с на микроцентрифуге-вortexсе.

ВНИМАНИЕ! При использовании комплекта реагентов для секвенирования v3-600 дальнейшего разведения не требуется.

7. Приготовление 12,5 pM PhiX Control (выполняется только для комплекта реагентов для секвенирования v2-500)

Разведите PhiX Control до 12,5 pM.

Для этого смешайте в отдельной пробирке:

- 375 мкл PhiX Control 20 pM;
- 225 мкл HT1 буфера.

8. Приготовление смеси библиотеки и PhiX

Смешайте в отдельной пробирке:

- 594 мкл Библиотеки 10 pM;
- 5,0 мкл PhiX Control (12,5 pM или 20 pM).

Библиотека в смеси с PhiX Control готова к загрузке в картридж для проведения секвенирования. Хранить на льду до загрузки в картридж с реагентами.

II. Подготовка реагентов из комплекта реагентов для проведения секвенирования к загрузке в прибор

1. Размораживание картриджа с реагентами

- 1.1 Извлеките **картридж с реагентами** (картридж хранится при температуре от минус 15 °C до минус 25 °C).
- 1.2 Поместите картридж с реагентами на водяную баню, содержащую достаточное количество деионизированной воды комнатной температуры для погружения основания картриджа с реагентом. Не допускайте превышения максимального уровня воды, указанного на картриджах с реагентами.

ВНИМАНИЕ! Картридж с реагентами из комплекта реагентов для секвенирования **v3-600** необходимо размораживать на водяной бане комнатной температуры примерно **60-90 минут** или до полного оттаивания.

Картридж с реагентами из комплекта реагентов для секвенирования **v2-500** необходимо размораживать на водяной бане комнатной температуры примерно **60 минут** или до полного оттаивания.

- 1.3 Извлеките картридж из водяной бани и осторожно постучите им по столу для удаления воды из основания картриджа. Высушите основание картриджа.

2. Проверка картриджа с реагентами

- 2.1 Переверните картридж с реагентами десять раз, чтобы смешать размороженные реагенты, а затем визуально проверьте, что все позиции разморожены.
- 2.2 Визуально проверьте реагенты в положениях 1, 2 и 4, чтобы убедиться, что они полностью перемешаны и не содержат осадков.
- 2.3 Осторожно постучите картридж по столу, чтобы уменьшить количество пузырьков воздуха в реагентах.

Примечание – Сипперы MiSeq опускаются на дно каждого резервуара для всасывания реагентов, поэтому важно, чтобы резервуары были свободны от воздушных пузырьков.

- 2.4 Поместите картридж с реагентами на лед или оставьте на срок до 6 часов при температуре от 2 °C до 8 °C до готовности к работе.
- 2.5 Для получения наилучших результатов перейдите непосредственно к загрузке образца и настройке запуска:
 - Загрузите библиотеку в картридж с реагентами в **ячейку 17, промаркированную Load Samples** (Загрузка образцов).
 - Используя интерфейс контрольного программного обеспечения MiSeq, выполните шаги настройки запуска, чтобы загрузить проточную ячейку и реагенты, а затем запустите постановку.

III. Проведите запуск прибора MiSeq согласно инструкции к прибору.