

Руководство по эксплуатации  
**HISTO TYPE SSP (Хисто Тайп ЭсЭсПи) kits**



Наборы для гистотипирования HLA аллелей  
(Класс I: HLA-A, B, C и Класс II: HLA-DR, DQ)  
на молекулярно-генетической основе



**для 20 типирований, алиquotные,  
готовые к использованию**

<b>НОМЕР 70721: HISTO TYPE A low</b>	<b>(красный)</b>
<b>НОМЕР 70731: HISTO TYPE B low</b>	<b>(белый)</b>
<b>НОМЕР 70741: HISTO TYPE C low</b>	<b>(желтый)</b>
<b>НОМЕР 70751: HISTO TYPE DR low</b>	<b>(фиолетовый)</b>
<b>НОМЕР 70891: HISTO TYPE DQB low</b>	<b>(белый)</b>
<b>НОМЕР 7098: HISTO TYPE ABDR</b>	<b>(белый)</b>
<b>НОМЕР 7102: HISTO TYPE ABC</b>	<b>(синий)</b>
<b>НОМЕР 7103: HISTO TYPE DR/DQB</b>	<b>(белый)</b>
<b>НОМЕР 709010: HISTO TYPE DQB high</b>	<b>(синий)</b>
<b>НОМЕР 7070/7071: HISTO TYPE B27</b>	<b>(красный)</b>
<b>НОМЕР 70941: HISTO TYPE Целиаксия</b>	<b>(желтый)</b>
<b>НОМЕР 70715: HISTO TYPE B 57</b>	<b>(фиолетовый)</b>
<b>НОМЕР 70716: HISTO TYPE Нарколепсия</b>	<b>(красный)</b>

#### Содержание

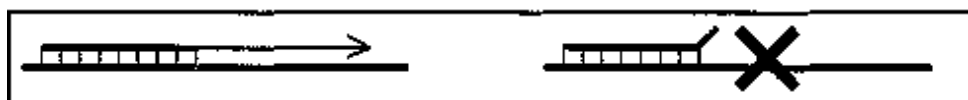
1. Описание изделия.....	2
2. Материал.....	2
2.1 Состав наборов HISTO TYPE SSP.....	2
2.2 Требования и дополнительный материал.....	2
2.3 Хранение и стабильность.....	3
3. Рабочие характеристики.....	3
4. Процедура анализа.....	3
4.1 Безопасные условия и особые примечания.....	3
4.2 Выделение ДНК.....	4
4.3 Амплификация.....	4
4.4 Электрофорез в геле.....	6
4.5 Регистрация и интерпретация результатов.....	6
5. Предупреждения и предосторожности.....	6
6. Поиск и устранение неисправностей.....	6
7. Литература.....	7
8. Символы, используемые при маркировке.....	7

Версия 11/2013

## 1. Описание изделия

Использование Полимеразной цепной реакции (ПЦР) при HLA-типировании стало уже обычной процедурой. Секвенирование HLA аллелей [1] позволило получить наиболее четкое типирование HLA на уровне ДНК с высоким разрешением. Оно имеет массу преимуществ по сравнению с традиционно используемыми серологическими методами.

Основной материал для типирования в наборах HISTO TYPE SSP - очищенная ДНК. Процедура анализа осуществляется с использованием Праймеров, обладающих специфичностью к последовательности ДНК (SSP)<sup>(1)</sup> (см. рис. 1) [2, 3]. В основе метода лежит тот факт, что распрямление праймера и, следовательно, успех ПЦР, зависит от точного соответствия 3'-концов обоих праймеров. И только в том случае, если праймеры полностью соответствуют целевой последовательности, происходит амплификация, которая впоследствии визуализируется с помощью электрофореза в агарозном геле.



Точное соответствие - амплификация (специфическая аллель)      Несовпадение – нет амплификации (неспецифическая аллель)

Рис. 1: Принцип SSP-ПЦР

Состав отдельных смесей праймеров позволяет осуществлять четкую идентификацию типов HLA, указанных на соответствующих диаграммах оценки. При каждом типировании используется определенное количество (4, 8, 24, 32, 48 или 96) **аликвотных** и **высушенных** реакционных смесей, включая внутренний контроль амплификации. Конечный объем реакционной смеси составляет 10 мкл.

### 1.1. Краткое описание набора HISTO TYPE Целиаксия

Целиаксия – это аутоиммунное заболевание, связанное с реакцией организма на глютен, содержащийся в злаковых. В случае поздней диагностики, эта реакция приводит к развитию хронического воспаления и деструкции тонкой кишки. Целиаксия имеет сильную связь с выявлением DQA1\*05:01-DQB1\*02:01 и DQA1\*03-DQB1\*03:02 гаплотипов. Дополнительно, DR3, DR7 и DR11 аллели могут быть использованы в качестве генетических маркеров. [8-10]

### 1.2. Краткое описание набора HISTO TYPE B57

Лечение антиретровирусными препаратами (например, в терапии ВИЧ), содержащими в качестве активного вещества Абакавир, разрешено только в том случае, если у пациента исключен HLA B\*57:01 аллель. Это связано с потенциальной реакцией гиперчувствительности, которая ассоциирована с указанным аллелем. [11-13]

### 1.3. Кратко описание набора HISTO TYPE Нарколепсия

Нарколепсия относится к группе расстройств сна (диссомния). Характерными симптомами заболевания является избыточная сонливость в дневное время, нарушения сна, сонный паралич, катаплексия и гипнагогические галлюцинации. 98 % населения европеоидной расы, страдающих нарколепсией, имеют DRB1\*15:01 – DQA1\*01:02 – DQB1\*06:02 гаплотип. В связи с этим, типирование HLA может быть полезным для подтверждения или исключения диагноза нарколепсии. [14-16]

### 1.4. Краткое описание HISTO TYPE B27

Взаимосвязь между определенными типами HLA и некоторыми заболеваниями была подтверждена для более чем 40 различных комбинаций. Наиболее важной является взаимосвязь HLA-B27 с картиной серонегативного артрита (болезнь Бехтерева, болезнь Рейтера, реактивный артрит). Положительный результат HLA-B27 связан с чрезвычайно высоким риском заболевания (см. Таблицу 1) [17, 18]. Чаще всего подтвержденный результат HLA-B27 диагностики вносит значительный вклад в терапию пациента в неясных случаях заболевания с подозрением на болезнь Бехтерева.

Заболевания	Частота B27 у пациентов	Относительный риск
Анкилозирующий спондилоартрит (Болезнь Бехтерева)	90.2 %	91
Болезнь Рейтера	78.8 %	37.6
Постинфекционный реактивный артрит	70.2 %	

Таблица 1: Частота HLA-B27 и риск.

## 2. Материал

### 2.1 Состав наборов HISTO TYPE SSP

- 20 планшетов HISTO TYPE, что достаточно для проведения 20 HLA-типирований. Аликвотные и высушенные реакционные смеси состоящие из аллель-специфичных праймеров, праймеров внутреннего контроля (специфичных

для человеческого гена G3PDH) и нуклеотидов. Лунка с первой реакционной смесью имеет маркировку. В некоторых наборах HISTO TYPE контроль загрязнения находится в последней позиции планшета (см. прилагаемую таблицу специфичности и диаграмму оценки для каждой партии). Номер партии напечатан на каждом планшете/полоске.

- 24 реакционные смеси для ПЦР с контролем загрязнения, праймеры внутреннего контроля и специфичные праймеры для амплификации (не разделены, если контроль загрязнения встроен в последнюю позицию тестового планшета).
- 10хПЦР-буфер для 20 типирований
- Полоски крышек или ПЦР фольга для 20 типирований
- Руководство по эксплуатации, таблица специфичности, схема оценки и рабочий бланк

## 2.2 Требования и дополнительный материал

- Taq Полимераза (5 Ед/мкл), например HISTO TAQ ; **REF: 70975. Пожалуйста, не используйте Taq Полимеразу с горячим стартом (Hot Taq Polymerase)!**
- Набор **BAG EXTRA-GENE** (**REF: 7059**) для выделения ДНК из крови / лимфоцитов / лейкоцитов или материал для других методов выделения ДНК
- поршневые пипетки переменной объема (0,5-250 мкл)
- стерильные наконечники со встроенными фильтрами
- ДНК Амплификатор (например, PTC 200 с нагреваемой и регулируемой крышкой, MJ Research/BioRad). Перечень проверенных ДНК амплификаторов приведен на стр.4.

## Устройства и материал для электрофореза в геле

- агароза для электрофореза ДНК (2-2,5%)
- 0.5 x буфер TBE (45 ммоль трис, 45 ммоль борной кислоты, 0,5 ммоль этилендиаминтетрауксусной кислоты)
- бромистый этидий (EtBr)
- камера для электрофореза типа Submarine
- источник тока (200-300 В, 200 мА)
- маркер молекулярного веса ДНК фрагментов (**REF: 7097**)

## Устройства для интерпретации и регистрации

- источник УФ излучения (220-310 нм)
- камера (например, Polaroid) с пленками (тип Polaroid 667) или видео система с термобумагой (например, типа KP65NM-CE)
- персональный компьютер с программным обеспечением HISTO MATCH (BAG Health Care) или Score.

## 2.3. Хранение и стабильность

Наборы реагентов поставляются размороженными. Рекомендуемые условия хранения реагентов: температура  $\leq$  20°C или 2-8°C в темном месте. **Избегайте частой смены температурного режима хранения!** Срок годности указан на ярлыке каждого реактива, он действителен также и для открытых реактивов. Срок годности, указанный на внешнем ярлыке, относится к реактиву с самой низкой стабильностью, находящемуся в наборе. Размораживать 10 x ПЦР-буфер рекомендуется непосредственно перед использованием.

## 3. Рабочие характеристики

Состав праймерной смеси гарантирует надежную идентификацию HLA-типов (основанных на последних данных секвенирования), указанных в диаграмме оценки. Обновление перечня выполняется регулярно.

**Аналитическая чувствительность:** Гарантируется надежное типирование при использовании 50-80 нг ДНК на реакционную смесь.

**Диагностическая специфичность:** Состав смеси праймера гарантирует надежную идентификацию HLA-типов (основанную на данных последней последовательности), указанных на диаграмме оценки. Производится регулярное обновление базы данных аллелей.

Для каждой партии специфичность каждой смеси праймера была проверена с использованием ДНК по контрольным образцам: каждая ПЦР реакция прошла, по крайней мере, однократную положительную проверку. Редкие аллели, не прошедшие соответствующую проверку и не вошедшие в диаграмму оценки отмечены в диаграмме оценки или в таблице специфичности.

Оценка рабочих характеристик производилась для всех наборов HISTO TYPE SSP, по крайней мере, с 50 образцами ДНК. Сравнение результатов анализа с другими типированиями, выполненными с SSP комплектами другого поставщика, не выявило никаких несоответствий.

Оценка и контроль качества смесей были выполнены с образцами ДНК, выделенными с помощью наборов Extra Gene I и/или Qiagen. Для анализа использовалась Taq полимераза HISTO TAQ (REF 70975) и Taq Полимераза Qiagen.

## 4. Процедура анализа

### 4.1 Безопасные условия и особые примечания

ПЦР является чрезвычайно чувствительным методом и должен выполняться хорошо обученным персоналом, обладающим достаточным опытом в области методов молекулярной генетики и оценки тканевой совместимости. Следует выполнять требования руководящих принципов в области трансплантации, а также стандарты EFI, что позволит минимизировать риск ложного типирования в конкретном случае несоответствий серологического и молекулярно-генетического методов.

Необходимо учитывать особые условия безопасности, что позволит избежать загрязнения и, таким образом, формирования ложной реакции:

- При работе рекомендуется использовать перчатки (желательно, без талька).
- При работе пипеткой рекомендуется каждый раз использовать новые наконечники (со встроенным фильтром).
- Рекомендуются отдельные рабочие зоны для пробоподготовки (выделение ДНК и подготовка реакции) и детекции (гель-электрофорез, документация). Лучше использовать отдельные помещения для каждого этапа.
- Рекомендуется использовать устройства и другие материалы только в соответствующих рабочих зонах. Нельзя перемещать их между зонами.

### 4.2 Выделение ДНК

Для HLA-SSP типирования одного пациента требуется 5-10 мкг ДНК (что соответствует приблизительно 0.5 мл крови). Наиболее подходящим набором для выделения ДНК является BAG EXTRA-GENE, так как чистую ДНК можно получить из цельной крови за короткое время без использования токсичных химикатов или растворителей. Помимо этого, для получения ДНК достаточной чистоты можно использовать и другие методы, описанные в литературе [5], типа, хлороформ-триэтил-аммония-бромид (СТАВ) или фенол-хлороформной очистки. Наличие гепарина может ингибировать ПЦР [6]. В качестве консерванта рекомендуется использовать ЭДТА или цитрат Na. ДНК должна иметь индекс чистоты (коэффициент экстинкции  $OD_{260}/OD_{280}$ ) между 1.5 и 2.0.

- $OD_{260}/OD_{280}$  = контаминация РНК:  $>1.5$  and  $<2.0$
- $OD_{260}/OD_{230}$  = контаминация солями, углеводами или органическими растворителями:  $>1.8$

### 4.3 Амплификация

Все аликвотные и высушенные реакционные смеси уже содержат аллель-, контроль-специфичные праймеры и нуклеотиды. Они поставляются высушенными в реакционных планшетах. Параметры амплификации оптимизированы для окончательного объема реакционной смеси 10 мкл.

1. Извлеките требуемое количество реакционных планшетов из  $-20^{\circ}\text{C}$  и разморозьте 10 x ПЦР-буфер при комнатной температуре.
2. В отдельной пробирке типа Эппендорф (500 мкл) приготовьте Мастер-микс и тщательно его перемешайте. Состав Мастер-микса приведен в Таблице 1. Все наборы HISTO TYPE работают с одним и тем же Мастер-миксом, поэтому их можно объединять.

В случае HISTO TYPE B27 рекомендуется приготовить смесь **Тaq-буфер- $\text{H}_2\text{O}$** :

**0.08  $\mu\text{l}$**  Таq полимеразы (5 Ед/ $\mu\text{l}$ ) *x* число тестов + 1

**1.0  $\mu\text{l}$**  10 x ПЦР-буфер *x* число тестов + 1

**7.0  $\mu\text{l}$**   $\text{H}_2\text{O}$  *x* число тестов + 1

Тщательно перемешайте полученную смесь и внесите по **8,0  $\mu\text{l}$**  смеси в каждую реакционную пробирку. Затем добавьте по **2.0  $\mu\text{l}$  раствора ДНК** (25-40 нг/мкл) в соответствующие реакционные пробирки.

Если необходимо осуществить контроль загрязнения, приготовьте Мастер-микс без раствора ДНК и с помощью пипетки добавьте 10 мкл этой смеси в контроль загрязнения. Затем добавьте в Мастер-микс раствор ДНК и тщательно перемешайте полученную смесь.

**Таблица 1: Состав Мастер-микса в зависимости от числа реакционных смесей:**

Число смесей	Дист. вода	10x ПЦР буфер	Раствор ДНК (25-40 нг/мкл)	Тақ-полимераза (5 Ед/мкл)	Общий объем
1	7	1	2	0.08	10 мкл
4	55	8	16	0.6	80 мкл
8	69	10	20	0.8	100 мкл
16	131	19	38	1.5	190 мкл
24	194	28	56	2.2	280 мкл
30	235	34	68	2.7	340 мкл
32	249	36	72	2.9	360 мкл
48	360	52	104	4.2	520 мкл
54	401	58	116	4.6	580 мкл
56	415	60	120	4.8	600 мкл
72	540	78	156	6.2	780 мкл
80	595	86	172	6.9	860 мкл
96	706	102	204	8.2	1020 мкл

➤ Количество ДНК должно составлять 50-80 нг на смесь. Если концентрация ДНК пробы превышает рекомендованную, необходимо изменить соотношение раствора ДНК и воды (например, для 24 смесей: 28 мкл раствора ДНК (50 нг/мкл) и 222 мкл дистиллированной воды.).

В случае NISTO TYPE B27 для приготовления ПЦР-смеси рекомендуется:

**0,08 мкл** Тақ полимераза (5 Ед/мкл) x число реакций +1

**1,0 мкл** 10xПЦР буфер x число реакций +1

**7,0 мкл** вода x число реакций +1

Тщательно перемешайте все компоненты смеси и добавьте по 8 мкл этой смеси в каждую реакционную лунку. После этого добавьте по 2,0 мкл ДНК (25-40 нг/мкл) в соответствующие реакционные лунки.

3. После перемешивания немедленно добавьте **10 мкл** этой смеси к предварительно аликвотированным и высушенным реакционным смесям.

Маркировка



Меняйте наконечник при внесении каждого образца. Плотно закройте планшет соответствующими крышками. Не касаетесь внутренней стороны крышек и верхних краев лунок пальцами, это позволит вам избежать контаминации. Немного потрясите планшет, чтобы растворить синий шарик на дне планшета. Вся ПЦР смесь должна осесть на дно.

4. Поместите реакционный планшет в термоциклер и плотно закройте крышку, чтобы он не деформировался при нагреве. Запустите программу ПЦР. Покрытие реакционных смесей минеральным маслом не требуется, если используется обогреваемая и регулируемая крышка!

Типы амплификаторов: PTC 100/200/C1000 (MJ Research / BioRad) и GeneAmp PCR-System 9600/9700 (пожалуйста, используйте скорость нагрева 9600) (ABI), Mastercycler epGradient S (используйте функцию “simulate Mastercycler gradient”) (Eppendorf), Tprofessional (Biotetra).

**Применяя термоциклеры с высокой скоростью нагрева и охлаждения, рекомендуется использовать скорость нагрева и охлаждения не более 2.5°C/сек.**

Так как амплификаторы различных производителей имеют разные рабочие характеристики, и даже устройства одного типа могут быть откалиброваны по-разному, может возникнуть необходимость в оптимизации параметров амплификации.

Чтобы оптимизировать работу вашего амплификатора, руководствуйтесь следующими принципами:

Ложноположительные реакции (неспецифичные полосы, дополнительные типы): Увеличить температуру отжига с шагом 1°C.

Ложноотрицательные реакции (отсутствие полос): Снизить температуру отжига с шагом 1°C и/или увеличить период отжига с шагом 5 секунд и/или увеличить периоды денатурации с шагом 5 секунд.

#### Параметры амплификации:

Этап программы	Температура	Время	Число циклов
Первая денатурация	96°C	5 минут	1 Цикл
Денатурация	96°C	20 секунд	5 Циклов
Отжиг+Элонгация	68°C	1 минута	
Денатурация	96°C	20 секунд	10 Циклов
Отжиг	64°C	50 секунд	
Элонгация	72°C	45 секунд	
Денатурация	96°C	20 секунд	15 Циклов
Отжиг	61°C	50 секунд	
Элонгация	72°C	45 секунд	
Заключительная элонгация	72°C	5 минут	1 Цикл

Рекомендуется использовать только те амплификаторы, которые регулярно проходят калибровку. Для калибровки можно использовать набор BAG-Cycler Check (REF: 7104).

**Контроль качества тестов был выполнен на PTC-200 соотв., C1000 (MJ Research / BioRad), 9700 (ABI), Mastercycler epGradient S (Eppendorf) и Tprofessional (Biometra).**

#### 4.4 Электрофорез в геле

Разделение продуктов амплификации производится в ходе электрофореза в (горизонтальном) агарозном геле. В качестве буфера для электрофореза рекомендуется 0.5 x TBE (45 мм триса, 45 мм борной кислоты, 0.5 мм ЭДТА). Концентрация геля должна составить 2.0 - 2.5% агарозы для электрофореза ДНК. Перед загрузкой образцов необходимо обеспечить полимеризацию геля в течение, по крайней мере, 30 минут. После окончания амплификации, возьмите образцы из термоциклера и аккуратно внесите в каждую порцию геля весь объем реакционных смесей. Помимо этого добавьте 10 мкл маркера молекулярного веса ДНК для сравнения размера ДНК фрагментов. Электрофоретическое разделение осуществляется при 10-12 В/см (при расстоянии 20 см между электродами приблизительно 200-240 В) в течение 20-40 мин. По окончании электрофореза гель окрашивается раствором бромид этидия (EtBr) (приблизительно 0.5 мкг/мл EtBr в буфере TBE в течение 30-40 мин.). В качестве альтернативы можно также добавить EtBr (0.5 мкг/мл) к буферу для электрофореза или к агарозному гелю. Если это необходимо, избыток EtBr может быть удален при замачивании геля в H<sub>2</sub>O или в 0.5 x буфера TBE в течение 20-30 минут.

#### 4.5 Регистрация и интерпретация результатов

С целью регистрации визуализируйте ПЦР амплификацию, используя систему гель-документирования (например, ультрафиолетовый трансиллюминатор (220-310 нм)) с фотокамерой (например, Polaroid, тип пленки 667). Выберите выдержку и диафрагму, чтобы полосы выглядели четкими и выделялись на темном фоне (примерная диафрагма 11, время выдержки 1 секунда).

Для интерпретации воспользуйтесь таблицей специфичности и диаграммой оценки. Специфичными следует считать только те полосы, которые имеют правильный размер по сравнению со стандартом длины ДНК.

**В случае HISTO TYPE B27 специфические бэнды имеют размер 420 п.о. и/или 85 п.о.**

Для остальных HISTO TYPE наборов правильные размеры специфических бэндов приведены в таблице соответствующей диаграммы. На всех дорожках без аллель-специфичной амплификации, должен быть хорошо виден внутренний контроль 1070 п.о. В большинстве случаев при наличии аллель-специфичной амплификации, внутренний контроль слабо выражен или полностью исчезает! При получении неверных результатов обратитесь к разделу инструкции «Поиск и устранение неисправностей» (6).

В контроле загрязнения не должно быть видимых полос. Если имеет место загрязнение геномной ДНК, будет видна полоса 282 п.о. Дополнительно могут встречаться полосы 78 п.о., 104 п.о., 176 п.о и приблизительно 580 п.о. Если имеет место загрязнение ампликатами, то появляются полосы 78 п.о. и/или 104 п.о. и/или 282 п.о.

Оценка результатов может быть сделана с помощью программного обеспечения HISTO MATCH (BAG Health Care) или SCORE (полная версия). Файлы для оценки можно загрузить с сервера (<http://service.bag-healthcare.com>) или у своего дистрибьютора (тел.: +7 (812) 318-76-08).

#### 5. Предупреждения и предосторожности

Бромистый этидий - мощный мутаген. При работе с гелями или растворами, содержащими бромистый этидий, используйте перчатки! Обратите внимание на руководство по эксплуатации, предупреждения и предосторожности изготовителя! Трансиллюминатор формирует ультрафиолетовое излучение с чрезвычайно короткими волнами, которое может вызвать ожог кожи и сетчатки. Используйте лицевую маску для защиты от УФ облучения!

Биологический материал, используемый для выделения ДНК, например, кровь или ткани человека, следует рассматривать как потенциально инфицированный. При работе с биологическим материалом, следует использовать соответствующие меры предосторожности (не отбирать материал в пипетку ртом; при работе с биологическим материалом и выполнении теста следует использовать одноразовые перчатки; дезинфицируйте руки после окончания теста).

Биологический материал следует инактивировать перед утилизацией (например, в автоклаве). Изделия для одноразового использования следует автоклавировать или сжигать после использования.

Разлив потенциально инфицированных материалов следует удалять немедленно с помощью впитывающей бумаги, а загрязнённые зоны следует протереть соответствующим стандартным дезинфицирующим раствором или 70% спиртом.

Материал, используемый для устранения разливов, включая перчатки, следует инактивировать перед утилизацией (например, в автоклаве).

## 6. Поиск и устранение неисправностей

Проблема	Возможная причина	Решение
отсутствие амплификации, виден стандарт длины	ДНК содержит ингибиторы ПЦР	повторите выделение ДНК, попробуйте разные методы
	слишком высокая / слишком низкая концентрация ДНК	измените концентрацию ДНК, повторите выделение ДНК
	отсутствует фермент или его концентрация слишком низкая	повторите типирование, измените концентрацию фермента
	ДНК из гепаринизированной крови	повторите типирование, используя кровь, обработанную этилендиаминтетрауксусной кислотой или цитратом
	неверные параметры амплификации	оптимизируйте параметры амплификации (см. 4.3) *
повторный дефект в отдельных дорожках (нет контроля амплификации)	течь в реакционных пробирках; потеря воды и изменение концентрации в ходе ПЦР	плотно закройте пробирки крышками; возьмите другие реакционные пробирки
неспецифическая амплификация, дополнительные полосы, (дополнительные полосы несоответствующего размера следует отбрасывать)	загрязнение продуктами амплификации	повторите типирование, гарантируйте точность исполнения
	ДНК загрязнена солями	повторите выделение ДНК, попробуйте разные методы
	слишком высокая концентрация ДНК	возьмите меньшее количество ДНК
	слишком высокая концентрация фермента	возьмите меньшее количество фермента
	неверные параметры амплификации	оптимизируйте параметры амплификации (см. 4.3) *
при оценке выявлено более 2 специфичностей	загрязнение при переносе (продукты амплификации!) новая аллель	проверьте смеси для типирования (ДНК не добавлена) гарантируйте точность исполнения
полосы не видны или видны только очень светлые полосы, стандарт длины не виден	слишком слабое окрашивание EtBr (бромистым этидием)	повторите окрашивание
слишком яркое фоновое свечение геля	слишком длительное окрашивание, слишком высокая концентрация EtBr (бромистого этидия)	замочите гель в H <sub>2</sub> O или в TBE (трис-борат-ЭДТА буфере) снизьте концентрацию EtBr (бромистого этидия)
размытая полоса	слишком горячий буфер для	понижьте напряжение





	электрофореза неправильный буфер для электрофореза	воспользуйтесь буфером 0,5хTBE
--	--	--------------------------------------

\* При использовании перечисленного оборудования и материалов, оптимизация параметров амплификации является последним средством. В большинстве случаев можно оценить результаты испытания, устранив дополнительные полосы, вызванные несоответствиями в размерах.

## 7. Ссылки

1. Bodmer, J., 1993. Immunogenetics **37**:79-94
2. Olerup, O., Zetterquist H., 1992. Tissue Antigens **39**:225-235
3. Olerup, O., Zetterquist H., 1993. Tissue Antigens **41**:55-56
4. Lu, Y.H. and Négre, S., 1993. Trends in Genetics **9**:297
5. Green and Sambrook, 2012. Molecular Cloning: A Laboratory Manual. New York: Cold Spring Harbour Laboratory
6. Beutler, E. et al., 1990. BioTechniques **9**:166
7. Bunce, M., 1995. Tissue Antigens **46**:355-367
8. Sacchetti et al., 1997. Clin Chem **43**:2204-2206
9. Edwin Liu et al., 2005. Gastroenterology **128**:33.37
10. Husby et al., 2012. Journal of Pediatric Gastroenterology & Nutrition **54**:136-160
11. Deutsches Ärzteblatt vom 10.03.2008
12. Mallal et al., Lancet 2002; 359: 727-732
13. Mallal et al., New England Journal of Medicine 2008; 358: 568-579
14. Nishino, S. et al., 2000. Sleep Medicine Reviews **4**:75-99
15. Mignot, E. et al., 2001. Am. J. Hum. Genet. **68**:686-699
16. Overeem, S. et al. 2008. Sleep Medicine Reviews **12**:95-107
17. Brewerton, DA et al., 1973. Lancet **i**:904-907
18. Schlosstien L et al., 1973. N. Engl. J. Med. 288:704-706

## 8. Символы, используемые при маркировке

	Температура хранения
	Использовать до
	Смотрите инструкцию пользователя
	Достаточно для n тестов
<b>CONT</b>	Содержание, содержит
<b>CONTROL</b>   <b>CC</b>	Контроль контаминации
<b>HLA TYPING</b>	Предназначение использования: HLA типирование
<b>IFU</b>	Инструкция пользователя
<b>IVD</b>	Для диагностики in vitro
<b>LOT</b>	Код партии
<b>OR</b>	или
<b>PCRBUF</b>   <b>10x</b>	ПЦР буфер, 10-кратный концентрированный
<b>PCRCAP</b>	Крышки для ПЦР плашек
<b>PCRFOIL</b>	Пленка для ПЦР плашек
<b>PCRPLATE</b>	ПЦР плашки
<b>PCRSTRIP</b>	ПЦР-стрипы



REACTIONMIX	Реакционные смеси
REF	Каталожный номер
RTU	Готов к использованию
WORKSHEET	Рабочий протокол

- (1) Метод SSP соответствует общему названию ARMS® фирмы ZENECA, Манчестер. Этот метод включен в европейский патент номер 0332435 В1 и используется с согласия фирмы ZENECA.