

HLA 高分辨率基因分型检测试剂盒说明书

版本号：23N30

【产品名称】

HLA 高分辨率基因分型检测试剂盒

【包装规格】

96 人份/盒

【货号】

ABX06001-06

【预期用途】

HLA 高分辨率基因分型检测试剂盒基于 Long-range PCR 及二代测序技术，针对血液、口腔拭子、骨髓细胞、唾液、组织、脐带血等样本，对 HLA 进行高分辨率分型。

HLA 基因编码的人类白细胞抗原又被称为移植抗原，是决定移植排斥反应高低的重要因素。在骨髓和器官移植时，供者和受体之间的 HLA 相容程度越高，排斥反应的发生率就越低，移植成功率和受体长期存活率就越高；反之，就越容易发生排斥反应。因此，准确且高精度地进行 HLA 分型在临床上是极其重要的。

本试剂盒利用 NGS 技术可大规模平行覆盖数百万个 DNA 片段进行测序，具有分辨率高、分型准确、覆盖位点更广的优势，可检 HLA-A、B、C、DRB1/3/4/5、DQB1、DPB1、DPA1、DQA1 位点，适用于大规模开展高精度的 HLA 基因分型。

【检测原理】

HLA 高分辨率基因分型检测试剂盒根据已知人类白细胞抗原基因序列，设计特异性扩增引物，通过 HLA 引物混合液，单管扩增出所有待检基因，经过酶切打断建库上机测序，结合 HLA 分析软件，对样本 HLA 基因进行高分辨率分型。

【主要组成成分】

包装盒	组分名称	规格	数量
试剂盒 1	HLA 扩增缓冲液	960 μ L/管	1 管
	dNTP	384 μ L/管	1 管
	HLA 扩增酶	96 μ L/管	1 管
	HLA 引物混合液 1	60 μ L/管	1 管
	HLA 引物混合液 2	72 μ L/管	1 管

试剂盒 2	DNA 末修缓冲液	480 μ L/管	1 管
	DNA 末修酶	960 μ L/管	1 管
	连接缓冲液	600 μ L/管	4 管
	连接酶	480 μ L/管	1 管
	PCR 反应液	600 μ L/管	4 管
	PCR 引物*	480 μ L/管	1 管
试剂盒 3	磁珠	12 mL/瓶	1 瓶
	洗脱液 EB	8 mL/瓶	1 瓶
	无核酸酶水	7 mL/管	1 管

注：不同批号试剂盒中各组分不可互换；

*试剂盒 2 中 PCR 引物为单 barcode 建库使用引物，双 barcode 建库使用的 PCR 引物需自备。

客户自备试剂（推荐）

用途	试剂盒名称	生产企业
建库	MSI-接头（124 个 index）	福州奥吉芯生物科技有限公司
	双端独立标签引物接头试剂盒	深圳华大智造科技有限公司
测序	DNA 环化反应试剂盒	福州奥吉芯生物科技有限公司
	测序反应通用试剂盒 （联合探针锚定聚合测序法）	深圳华大智造科技有限公司
其他试剂	Qubit™ dsDNA HS Assay kit	赛默飞世尔科技公司
	无水乙醇（分析纯）	不限

【储存条件及有效期】

1. 试剂盒 1 及试剂盒 2 于 -20 $^{\circ}$ C \pm 5 $^{\circ}$ C 保存，试剂盒 3 于 2~8 $^{\circ}$ C 保存，有效期为 12 个月。
2. 试剂应避免反复冻融。
3. 试剂盒 1 及试剂盒 2 采用干冰运输，试剂盒 3 采用冰袋运输。

【自备仪器、耗材】

1. 设备：PCR 仪、磁力架、Qubit 仪、基因测序仪（DNBSEQ-G99、MGISEQ-200）
2. 耗材：低吸附离心管、PCR 管、带滤芯吸头
3. 试剂：无水乙醇（分析纯）、Qubit™ dsDNA HS Assay kit

【样本要求】

1. 样本类型：血液、口腔拭子、骨髓细胞、唾液、组织、脐带血等样本。
2. 样本采集及保存

2.1 血液：常规全血采集方法抽取全血样本后置于 EDTA 抗凝管中，并立即上下颠倒混匀（5~10 次，不可用力振荡），使之与抗凝剂充分混匀；2°C~8°C保存不超过 7 天，-20°C±5°C保存不超过 1 年。

2.2 口腔拭子：取出采样棉签，手持口腔采样棉签伸进口腔一侧，在内壁黏膜旋转 10-15 圈，然后再上下移动刮拭 5-10 次，力度适中，以紧贴口腔内壁黏膜为宜，确保采样拭头各处都能蘸取口腔黏膜脱落细胞；按照同样方法，在口腔内壁另一侧进行采集。采集完成后，将拭子放入保存管中，可在室温保存 1-3 个月。

2.3 骨髓细胞及脐带血：由医院采集，-20°C±5°C保存。

2.4 唾液：直接吐出唾液至离心管中，加入保存液，颠倒混匀，样品可在室温保存 6 个月以上。

2.5 组织：按组织块剪切成黄豆粒大小，转移至合适的离心管，加入保存液，室温保存 15 天，2°C-8°C保存 30 天，-20°C±5°C长期保存，可反复冻融。

注：样本需经核酸提取后进行后续操作，核酸提取试剂盒自备，提取完的 DNA 建议立即进行检测，否则请于-20°C±5°C保存。

【操作步骤】

1. 试剂准备

使用前请将试剂置于冰上解冻。

2. 实验步骤

步骤一：PCR 扩增

- 1) 将试剂盒 1 中的 HLA 扩增缓冲液、dNTP、HLA 引物混合液 1、HLA 引物混合液 2、HLA 扩增酶取出，HLA 扩增酶短暂离心后置于冰盒上备用，其余试剂解冻并混匀、短暂离心收集至管底，置于冰盒上备用，以下所有步骤均在冰上操作。
- 2) 根据下表在 0.2mL PCR 管中配置如下反应，N=待检样本数。

组分	体积
HLA 扩增缓冲液	10 μ L×N
dNTP	4 μ L×N
HLA 引物混合液 1	0.625 μ L×N
HLA 引物混合液 2	0.75 μ L×N
HLA 扩增酶	1 μ L×N
核酸模板（血液样本）	200ng
无核酸酶水	补至 50 μ L
总体积	50 μ L×N

注：本体系适用于血液样本检测，其他类型的样本扩增体系需自行测试。

- 3) 充分混匀，短暂离心后，将 PCR 管置于 PCR 仪中，运行如下程序：

温度	时间	循环数
----	----	-----

98 °C	1 min	1
98 °C	10 s	22
69 °C	6 min	
98 °C	10 s	8
60 °C	6 min	
69 °C	6 min	1
4 °C	Hold	1

步骤二：PCR 产物纯化

- 1) 磁珠平衡至室温后，涡旋振荡混匀磁珠。
- 2) 吸取 50 μ L 磁珠、50 μ L PCR 产物至 1.5mL 离心管中，涡旋振荡或使用移液器轻轻吹打 10 次充分混匀。
- 3) 室温孵育 5 min。
- 4) 将 1.5 mL 离心管短暂离心并置于磁力架中分离磁珠和液体，待溶液澄清后(约 5 min)，小心移除上清。
- 5) 保持离心管始终置于磁力架中，加入 200 μ L 新鲜配制的 80%乙醇漂洗磁珠，室温孵育 30 sec，小心移除上清。
- 6) 重复步骤 5，总计漂洗两次。
- 7) 保持离心管始终置于磁力架中，开盖空气干燥磁珠 5-10 min 至无乙醇残留。
- 8) 将离心管从磁力架中取出，加入 27 μ L 洗脱液 EB 洗脱，涡旋振荡或使用移液器轻轻吹打充分混匀，于室温放置 5 min，将 PCR 管短暂离心并置于磁力架中静置，待溶液澄清后(约 2~3 min)，小心移取 26 μ L 上清至新离心管中，切勿触碰磁珠。
- 9) 取 0.5 mL Qubit 定量管，依次加入 199 μ L Qubit 定量液和 1 μ L 纯化产物，涡旋混匀（管壁不可与振荡仪接触），瞬时离心，室温避光 2min，用 Qubit4.0 仪器测定浓度并记录。

步骤三：DNA 片段化、末端修复、添加 dA 尾

- 1) 将 DNA 末修缓冲液、DNA 末修酶取出，解冻并混匀、短暂离心收集至管底，置于冰上备用，以下所有步骤均在冰上操作。
- 2) 根据下表配置如下反应：

组分	体积/投入量
纯化后的 PCR 产物	200 ng
DNA 末修缓冲液	5 μ L
DNA 末修酶	10 μ L
无核酸酶水	补至 50 μ L
总体积	50 μ L

- 3) 0.2 mL PCR 管中依次加入上述组分，使用移液器轻轻吹打混匀或振荡混匀，并短暂离心将反应液收集至管底。
- 4) 将 PCR 管置于 PCR 仪中，运行如下程序：

温度	时间
4°C	1min
37°C	4min
65°C	30min
4°C	Hold
热盖 105°C	On

步骤四：接头连接

- 1) 将连接缓冲液、连接酶从-20°C取出，解冻并混匀、短暂离心收集至管底，置于冰上备用。
- 2) 根据反应的数量 N，按照下表配制反应体系：

组分	体积
连接缓冲液	25 $\mu\text{L} \times N$
连接酶	5 $\mu\text{L} \times N$
无核酸酶水	17.5 $\mu\text{L} \times N$
总体积	47.5 $\times N$

- 3) 使用移液器轻轻吹打混匀或振荡混匀，并短暂离心将反应液收集至管底。
- 4) 取 47.5 μL 配置的反应体系加入步骤三反应管中。
- 5) 每管加入 2.5 μL 接头 X（使用“MSI-接头（124 个 index）”或 10 μM 双 barcode UDB 接头）。
- 6) 使用移液器轻轻吹打混匀，并短暂离心将反应液收集至管底。将 PCR 管置于 PCR 仪中，进行下述反应：

温度	时间
20°C	15min
4°C	Hold
热盖 105°C	On

步骤五：连接产物纯化

- 1) 磁珠平衡至室温后，涡旋振荡混匀磁珠。
- 2) 吸取 60 μL 磁珠、100 μL 连接产物至 1.5mL 离心管中，涡旋振荡或使用移液器轻轻吹打 10 次充分混匀。

- 3) 室温孵育 5 min。
- 4) 将 1.5 mL 离心管短暂离心并置于磁力架中分离磁珠和液体，待溶液澄清后(约 5 min)，小心移除上清。
- 5) 保持离心管始终置于磁力架中，加入 200 μL 新鲜配制的 80%乙醇漂洗磁珠，室温孵育 30 sec，小心移除上清。
- 6) 重复步骤 5，总计漂洗两次。
- 7) 保持离心管始终置于磁力架中，开盖空气干燥磁珠 5-10 min 至无乙醇残留。
- 8) 将离心管从磁力架中取出，加入 25 μL 洗脱液 EB 洗脱，涡旋振荡或使用移液器轻轻吹打充分混匀，于室温放置 5 min，将 PCR 管短暂离心并置于磁力架中静置，待溶液澄清后(约 2~3 min)，小心移取 20 μL 上清至新离心管中，切勿触碰磁珠。

步骤六：文库扩增

- 1) 将 PCR 引物（单 barcode）或 UDB PCR 引物（双 barcode，自备）、PCR 反应液解冻后颠倒混匀，短暂离心收集至管底。
- 2) 根据反应的数量 N，按照下表配制反应体系：

单 barcode 扩增反应液	体积
PCR 引物	5 $\mu\text{L}\times\text{N}$
PCR 反应液	25 $\mu\text{L}\times\text{N}$
总体积	30 $\mu\text{L}\times\text{N}$

双 barcode 扩增反应液	体积
UDB PCR 引物	2.5 $\mu\text{L}\times\text{N}$
PCR 反应液	25 $\mu\text{L}\times\text{N}$
无核酸酶水	2.5 $\mu\text{L}\times\text{N}$
总体积	30 $\mu\text{L}\times\text{N}$

- 3) 使用移液器轻轻吹打混匀(请勿振荡混匀)，并短暂离心将反应液收集至管底。
- 4) 将配置好的反应液取 30 μL 加入 0.2mL PCR 管中，分别加入 20 μL 纯化产物。
- 5) 充分混匀，短暂离心后将 PCR 管置于 PCR 仪中，进行下述反应：

温度	时间	单 barcode 建库 循环数	双 barcode 建库 循环数
95°C	3min	1	1

98°C	20s	3	4
60°C	15s		
72°C	30s		
72°C	5min	1	1
4°C	Hold	1	1

注意：循环数可根据需要进行调整。

步骤七：扩增产物纯化

- 1) 磁珠平衡至室温后，涡旋振荡混匀磁珠。
- 2) 吸取 45 μ L 磁珠、50 μ L 扩增产物至 1.5 mL 离心管中，涡旋振荡或使用移液器轻轻吹打 10 次充分混匀。
- 3) 室温孵育 5 min。
- 4) 将 1.5 mL 离心管短暂离心并置于磁力架中分离磁珠和液体，待溶液澄清后(约 5 min)，小心移除上清。
- 5) 保持离心管始终置于磁力架中，加入 200 μ L 新鲜配制的 80%乙醇漂洗磁珠，室温孵育 30 sec，小心移除上清。
- 6) 重复步骤 5，总计漂洗两次。
- 7) 保持离心管始终置于磁力架中，开盖空气干燥磁珠 5-10 min 至无乙醇残留。
- 8) 将离心管从磁力架中取出，加入 30 μ L 洗脱液 EB 洗脱，涡旋振荡或使用移液器轻轻吹打充分混匀，于室温放置 5 min，将 PCR 管短暂离心并置于磁力架中静置，待溶液澄清后(约 2~3 min)，小心移取 25 μ L 上清至新离心管中，切勿触碰磁珠。

【文库质控】

1. 文库长度分布检测：文库长度分布可通过 LabChip GX、GXII、GX Touch (PerkinElmer); Bioanalyzer、Tapestation (Agilent Technologies); Fragment Analyzer (Advanced Analytical); Qsep 等基于电泳分离原理的设备进行检测。
2. 文库浓度检测：使用 Qubit™ dsDNA HS Assay kit 检测文库的浓度。

【上机测序】

1. Pooling

按照 Pooling 表体积吸取待测序样本至 1.5 mL 离心管中，漩涡振荡器震荡混匀。

2. 环化反应（单 barcode 环化）

建议采用福州奥吉芯生物科技有限公司生产的“DNA 环化反应试剂盒”；如使用其它供应商生产的环化试剂盒需自己评估适配性；如果使用福州奥吉芯生物科技有限公司的“DNA 环化反应试剂盒”，可按如下步骤进行文库环化。

2.1 环化反应试剂的准备

取出 Splint Buffer 和 DNA Rapid Ligase，置于冰盒上，待融化后用漩涡振荡器震荡混匀 5 秒后，短暂离心置于冰盒上备用。

注意：不要将连接酶室温解冻，不要用手长时间触碰管壁。

2.2 根据 DNA 文库定量结果，于新的 PCR 管中将待测文库根据标签接头编号等量混合，取 200 ng DNA 混合文库，用 TE 缓冲液将体积补充至 46 μL （若混合文库体积大于 46 μL ，请浓缩文库或重新制备文库），充分混匀后短暂离心 5 s，置于 PCR 仪上 95 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 3 min，孵育完毕即刻取出 PCR 管放置于冰上冷却 2 min。

2.3 向上述反应体系中加入 13 μL Splint Buffer、1.5 μL DNA Rapid Ligase，涡旋振荡，短暂离心，37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 30 min。反应产物可进入下一步反应或置于 -20 $^{\circ}\text{C}$ 以下冻存。

注：使用双 barcode 建库，环化反应参照双 barcode 环化试剂盒说明书。

3. 测序

建议采用深圳华大智造科技有限公司生产的 DNBSEQ-G99 基因测序仪平台对应的 DNBSEQ-G99RS 高通量测序试剂套装（G99 SM FCL PE150，940-000410-00）进行文库 DNB 制备和上机测序。

也可采用国内外其它厂商提供的平台或平台对应的测序通用试剂盒进行文库制备和上机测序，但需要自行进行适配性测试。

【检验结果的质量控制】

1. 待检测的文库浓度应 $> 5 \text{ ng}/\mu\text{L}$ 。
2. 待检测的文库片段应 $> 500\text{bp}$ 。
3. 待检测样本数据量应 $\geq 0.5\text{M Reads}$ 。

【注意事项】

1. 为了避免试剂的反复冻融影响文库产量，建议在首次使用时进行分装保存。
2. DNA 样本需溶解于以下溶液中：无核酸酶水、10 mM Tris、Buffer EB 或 0.1 \times TE 等。需确认 DNA 溶液中不含阳离子及螯合剂。如果 DNA 溶解液中含 EDTA，需先使用 DNA 纯化磁珠进行纯化。
3. 上样 DNA 浓度至关重要，推荐使用 Qubit、Picogreen 或者其他染料法对 DNA 浓度进行准确定量。
4. DNA 片段化产物的大小和分布范围是由时间依赖的酶促反应决定的，因此配制片段化反应体系时应在冰上操作。
5. 使用前请将试剂盒各组份置于室温解冻。解冻后上下颠倒数次充分混匀，短暂离心后置于冰上待用。
6. 为避免样品交叉污染，推荐使用带滤芯的枪头，吸取不同样品时请更换枪头。
7. 推荐在带热盖的 PCR 仪中进行各步骤反应，使用前应预热 PCR 仪至反应温度附近。
8. PCR 产物因操作不当极易产生气溶胶污染，进而影响实验结果准确性。因此，我们推荐将 PCR 反应体系配制区和 PCR 产物纯化检测区进行强制性的物理隔离；使用专用的移液器等设备；并定时对各实验区域进行清洁(使用 0.5%次氯酸钠或核酸清除剂、75%酒精等进行擦拭清理)，以保证实验环境的洁净度。

【基本信息】

生产企业名称：福州奥吉芯生物科技有限公司

住所：福建省福州市闽侯县南屿镇尧溪路 3 号福建省电子信息集团科学工业园二号厂房 4 层西侧 401

电话：0591-85666335

邮编：350100