

famtaSCREEN HLA B27 Real-Time PCR Kit

کیت تشخیص مولکولی HLA B27 به روش Real-Time PCR

راهنمای سریع

Cat Number: 2040220 (24 Reactions)
2040221 (48 Reactions)
2040222 (96 Reactions)



مشخصات محصول

کیت famtaSCREEN HLA B27 Real-Time PCR، شرکت فام تن آزما با برند تجاری FAMTA (فماتا) یک کیت تشخیصی آزمایشگاهی مبتنی بر متد TaqMan Probe بوده که به منظور تشخیص مولکولی HLA B27 در DNA انسانی تولید گردیده است. تست دارای یک سیستم تکثیر هترولوگ (تکثیر ژن کنترل داخلی) جهت تعیین احتمال وجود ممانعت کننده‌های PCR و همچنین صحت عملکرد محلول‌های کیت می‌باشد.

پروپ اختصاصی HLA B27 با رنگ FAM (کانال سبز) و پروپ اختصاصی ژن کنترل داخلی (IC) با رنگ JOE (کانال زرد) نشان دار شده است.

محتویات کیت

جدول ۱) محتویات کیت

Color	Title	Volume per vial	24 Rxns	48 Rxns	96 Rxns
Blue	HLA B27 Master Mix	520 µl	1	2	4
Red	Positive Control	100 µl	1	1	2
White	Negative Control	100 µl	1	1	2
White	DDW	600 µl	1	1	2

شرایط نگهداری

- کیت را تا زمان انقضا در فریز -۲۰ درجه سانتیگراد نگهداری نمایید.
- از کیتی که تاریخ انقضای آن گذشته است استفاده نکنید.
- از مخلوط کردن محلولها و موادی که شماره سریال (Lot Number) متفاوت دارند خودداری نمایید.
- ذوب مکرر (بیشتر از ۳ بار) اجزای کیت ممکن است بر عملکرد سنجش تاثیر بگذارد به همین منظور در ابتدا اجزای کیت را Aliquot کنید.

مواد و تجهیزات لازم

- دستگاه Real-Time PCR که دارای رنگ های خوانش FAM و JOE باشد.
- بلوک های آلومینیومی (Ice Racks) که از قبل در یخچال قرار گرفته و سرد باشند.
- سمپلرهای متغیر (۱۰-۱۰۰ µL و ۰.۵-۱۰ µL)
- سر سمپلر فیلتردار DNase-RNase Free
- میکروتیوب DNase-RNase Free، ۱.۵ ml
- میکروتیوب های مخصوص PCR
- دستگاه مینی اسپین ورتکس
- کیت استخراج DNA ژنومیک از خون
- دستکش لاتکس بدون پودر

دستگاه های Real-Time PCR

دستگاه های Real-Time PCR که دارای رنگ های خوانش FAM و JOE باشند، جهت استفاده با کیت حاضر مناسب هستند. در دستگاه ABI 7500 رنگ های آلترناتیو JOE، HEX یا VIC می‌باشند.

نمونه و شرایط نگهداری آن

نمونه مناسب جهت انجام آزمون HLA B27، خون تام است. نمونه خون باید در لوله استریل حاوی ماده ضد انعقاد EDTA گرفته شده و بعد از جداسازی، بلافاصله نسبت به استخراج ژنوم اقدام گردد. در صورتی که امکان استخراج ژنوم فراهم نباشد نمونه خون باید تا زمان استخراج در فریزر -۲۴ درجه سانتیگراد نگهداری شود.

پیشنهاد می‌شود قبل از فریز کردن، نمونه‌ی خون تام را در دو حجم ۲۰۰ µL جهت انجام تست و احیاناً تکرار آن، و یک حجم ۱۰۰۰ µL جهت Backup، در میکروتیوب های DNase-RNase Free، ۱.۵ mL جداسازی نمایید.

به هیچ وجه از نمونه حاوی هپارین و EDTA در غلظت های بالا استفاده نشود.

نمونه هایی که به صورت زیر باشند، کیفیت لازم جهت استفاده برای تست HLA B27 را دارا نمی باشند:

- ۱- نمونه هایی که خون آنها همولیز شده باشند.
- ۲- نمونه هایی که در اطراف لوله نمونه گیری لکه های خون مشاهده گردد.
- ۳- نمونه هایی که بیش از دو ساعت در دمای محیط نگهداری شده باشند.
- ۴- نمونه هایی که بیش از ۱۲ ساعت در دمای یخچال نگهداری شوند.
- ۵- نمونه هایی که بیش از ۲ سال در دمای -۲۰ نگهداری شده باشد.

احتیاط ها و هشدار ها

- این کیت در مصارف تشخیصی کاربرد دارد. استناد به نتایج این کیت بدون استفاده از سایر داده های بالینی، آزمایشگاهی و پاراکلینیکی توصیه نمی شود.
- رعایت اقدامات ایمنی عمومی در هنگام کار با نمونه های عفونی، محلول ها و ریجنتها الزامیست.
- قبل از انجام آزمون سطوح کاری را به وسیله ی وایتکس ۱۰٪ و سپس الکل ۷۰٪ ضدعفونی نمایید.
- سپس به مدت حداقل ۲۰ دقیقه لامپ UV هود و یا Workstation را روشن نموده تا فضای زیر آن ضد عفونی گردد.
- مقررات کار با نمونه های عفونی باید بر اساس رعایت اصول صحیح آزمایشگاهی (GLP) انجام گیرد.
- جهت جلوگیری از بروز آلودگی حین کار (Carry over contamination) استفاده از مکان های مجزا جهت آماده سازی و انجام واکنش ضروری است.
- هرگز درب ویال های تکثیر شده را باز نکنید. بعد از اتمام آزمون فوراً ویال های تکثیر شده را از دستگاه Real-Time PCR خارج نموده و در ظرف محتوی هیپوکلریت سدیم ۱۰٪ قرار داده و نسبت به اتوکلاو آن اقدام و در فضایی خارج از آزمایشگاه معدوم نمایید.
- چنانچه نمونه های آزمایشگاه شما به تعداد کافی نمیباشند، به محض دریافت کیت آن را در حجم های کمتر Aliquot کرده و تا زمان استفاده، در فریزر و دمای -۲۰ درجه سانتی گراد نگهداری نمایید.

روش استخراج ژنوم

نمونه ی خون را از فریزر خارج کرده و اجازه دهید تا در دمای اتاق ذوب شود. سپس آن را مدت کوتاهی ورتکس و اسپین نمایید. سپس مقدار ۲۰۰ µL از خون بیمار را در یک میکروتیوب ۱.۵ mL ریخته و با استفاده از کیت و یا دستگاه های استخراج اتوماتیک، DNA را از نمونه استخراج نمایید.

- در هر آزمون یک نمونه منفی را نیز جهت کنترل، استخراج کنید.
- بهتر است حجم Elution Buffer نهایی ۱۵۰-۱۰۰ µL باشد.
- DNA استخراج شده را می‌توان تا زمان انجام آزمایش در فریزر -۲۰ درجه سانتیگراد نگهداری نمود.

جدول ۲) جدول مشخصات DNA

ویژگی DNA	مناسب DNA	نامناسب DNA
غلظت	20-50 ng	کمتر از ۱۰ یا بیشتر از ۱۰۰ ng
نسبت A260/A280	1.8 - 2.0	کمتر از ۱.۷
نسبت A260/A230	≥ 2	کمتر از ۲

آماده سازی واکنش

از کالیبره بودن سمپلرها قبل از آماده سازی واکنش اطمینان حاصل نمایید. بر اساس تعداد واکنش هایی که میخواهید انجام دهید ویال های کیت شامل Master Mix، Positive Control، Negative Control و DDW را از فریزر خارج کرده و اجازه دهید تا بر روی Ice Rack به تدریج ذوب شوند و پس از اطمینان از ذوب شدن، ویال ها را به طور مختصر ورتکس و سپس اسپین نمایید. جهت اطمینان از نتایج به دست آمده از نمونه ها تست را به صورت دوتایی (Duplicate) ران نمایید. اینکار به خصوص در مورد نمونه هایی که به طور نامناسب استخراج شده باشند و یا اگر DNA استخراج شده از کیفیت مناسبی برخوردار نباشد، ضروری است.

برای هر ران کاری حتماً از هر دو کنترل مثبت، و منفی استفاده نمایید.

اضافه کردن الگو

- مستر میکس را به کمک پیتپینگ و یا ورتکس آرام، هموژن و سپس اسپین نمایید.
- مقدار ۲۰ µL از مستر میکس تهیه شده را به میکرو تیوب ها که بر روی بلوک آلومینیومی سرد شده (Ice Rack) قرار دارند اضافه نمایید.
- مقدار ۵ µL از DNA استخراج شده (برای بیماران)، همچنین کنترل مثبت و کنترل منفی را در میکروتیوب های مربوطه اضافه نموده و حداقل ۲ بار و به آرامی پیتپینگ نمایید.
- نکته: برای جلوگیری از آلودگی حین کار به ترتیب لوله NTC، کنترل منفی، نمونه های بیماران و سپس لوله ی کنترل مثبت را آماده نمایید.
- سپس بلوک آلومینیومی سرد (Ice Rack) را به اتاقی که دستگاه Real-Time PCR قرار دارد منتقل کنید.

تنظیم برنامه دستگاه

- رنگ فلورسنت جهت گزارشگر FAM، HLA B27 (Reporter) و رنگ فلورسنت جهت گزارشگر (Reporter) کنترل داخلی، JOE است.
- نکته: بهتر است برنامه دمایی قبل از آماده کردن مستر میکس و اضافه کردن الگو، تنظیم گردد.

جدول ۳) برنامه ی دمایی

	Temperature	Hold	Acquisition	Cycle
Initial denaturation and polymerase activation	95°C	15 min	---	1X
Denaturation	95°C	20 sec	---	40X
Annealing and elongation	60°C	60 sec	yes	

Optimize Acquiring → perform optimization before 1st Acquisition

جدول ۴) برنامه ی دمایی

	Temperature	Hold	Acquisition	Cycle
Initial denaturation and polymerase activation	95°C	15 min	-----	1X
Denaturation	95°C	20 sec	-----	40X
Annealing	64°C	25 sec	-----	
Elongation	72°C	10 sec	Green, Yellow	

توجه: دقت نمایی که شرط دارا بودن شکل سیگموییدی برای تفسیر نتایج نمودار ضروری است. در دستگاه Rotor Gene Q می توانید جهت اصلاح شیب نمودار ها و مشاهده نمودارهای سیگموییدی، گزینه‌ی Slope correction را روشن و یا خاموش نمایید.

جدول ۵) تفسیر نتایج

Detection Channel		Result Interpretation
FAM (HLA B27 target)	JOE (Internal Control)	-----
Positive	Positive or Negative	HLA B27 DNA detected
Negative	Positive	HLA B27 not detected. The sample is negative
Negative	Negative	PCR inhibition or reagent failure. Repeat test or Extraction again.

HLA-B 27:09, 27:11, 27:14, 27:19, 27:21, 27:22, 27:30, 27:43, 27:90, 27:102, 27:130, 27:153, 27:219

حساسیت آنالیتیکال و بالینی (Sensitivity)

حساسیت بالینی کیت نیز با توجه به نتایج بالینی حاصل از آزمون بر روی ۲۰۰ نمونه بیمار دارای ژن HLA B27 به میزان ۱۰۰ درصد تعیین گردید.

با توجه به تست های انجام شده بر روی تکرارهای سه تایی از نمونه هایی که دارای مواد مداخله گر احتمالی در فرایند آزمون Real-Time PCR می باشند، نتایج نشان می دهد که مواد مداخله گر به میزان اعلام شده در جدول زیر اثر مهارکنندگی بر روی تست ندارند. استفاده از نمونه هایی که دارای مقادیر بیشتر از اعداد اعلام شده در جدول زیر باشند، توصیه نمی شود.

جدول ۶) مواد مداخله کننده

ماده مداخله کننده و غلظت آن	
هموگلوبین ۲۰ گرم بر دسی لیتر	EDTA با غلظت ۱/۸ میلی گرم بر میلی لیتر
سیترات سدیم ۰/۰۱ مولار	تری گلیسرید ۴۰۰ میلی گرم بر دسی لیتر
آلبومین با غلظت ۶۰ میلی گرم بر میلی لیتر	بیلی روبین ۰/۶ میلی گرم بر دسی لیتر
سدیم کلرید ۱۵۰ میلی مولار	هیپارین ۰/۰۵ واحد بر میلی لیتر
ایزوپروپانول ۵ درصد حجمی/حجمی	

دمای نگهداری کیت حاضر ۲۰- درجه سانتی گراد می باشد. در صورت نگهداری کیت در دمای ذکرشده، محتویات کیت تا حداقل ۱۲ ماه پایدار می باشند. جهت حفظ پایداری بهینه، اکیدا توصیه می شود نگهداری کیت مطابق با شرایط اعلام شده در دفترچه پذیرد. در غیر این صورت، جهت راهنمایی بیشتر لطفا با کارشناسان ما تماس حاصل فرمایید.

[illegible]

* برای دسترسی به دفترچه‌ی راهنما کد QR را اسکن نمایید

این کیت براساس قوانین و مقررات گواهینامه ایزو 13458 تولید شده است.



تلفن یشتیانی: ۰۹۰۴۴۳۷۹۰۰۰

TCCCTCGAGGACAAGGCGTTC
ACAGTCCAGTACCAAA
CTACCFAMTAAAGACC
AATGAAAGATC
CCTAGGAA
ACTG