



famtaSCREEN HLA B5/51 Real-Time PCR Kit

کیت تشخیص مولکولی HLAB5/51 به روش Real-Time PCR

راهنمای سریع

Cat Number: 2040217 (24 Reactions)
2040218 (48 Reactions)
2040219 (96 Reactions)



مشخصات محصول

کیت famtaSCREEN HLA B5/51 Real-Time PCR، شرکت فام تن آزما با برند تجاری FAMTA (فمِتا) یک کیت تشخیصی آزمایشگاهی مبتنی بر متد TaqMan Probe بوده که به منظور تشخیص مولکولی HLA B5/51 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 B5/51 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 B5/51 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 ۲ 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 (10-100 µL و 0.5-10 µL)
- سر سمپلر فیلتردار DNase-RNase Free
- میکروتیوب DNase-RNase Free، 1.5 ml
- میکروتیوب های مخصوص PCR
- دستگاه میخی 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 B5/51، 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 200 µL جهت انجام تست و احیاناً تکرار آن، و یک حجم 1000 µL جهت Backup، در میکروتیوب های DNase-RNase Free، 1.5 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 B51 را دارا نمی باشند:

۱- نمونه هایی که خون آنها همولیز شده باشد.

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

- نمونه‌ی 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 200 µL از خون بیمار را در یک میکروتیوب 1.5 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 100-150 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	DNA مناسب	DNA نامناسب
غلظت	20-50 ng	کمتر از 10 یا بیشتر از 100 ng
نسبت A260/A280	1.8-2.0	کمتر از 1.7
نسبت A260/A230	≥2	کمتر از 2

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 پیپتینگ و یا ورتکس آرام، هموزن و سپس اسپین نمایید.
- مقدار 20 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 5 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 پیپتینگ نمایید.
- نکته: برای جلوگیری از آلودگی حین کار به ترتیب لوله NTC، نمونه‌های 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 B5/51 (Reporter)، FAM 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.

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	هپارین ۰/۰۵ واحد بر میلی لیتر
ایزوپروپانول ۵ درصد حجمی/حجمی	

پایداری (Stability)

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

یادداشت:

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

* برای دسترسی به دفترچه‌ی راهنما کد QR را اسکن نمایید

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



ایمیل پشتیبانی: support@famta.co

تلفن پشتیبانی: ۰۹۰۴ ۴۳۷ ۹۰۰۰

	Temperature	Hold	Acquisition	Cycle
Initial denaturation and polymerase activation	95°C	15 min	-----	1X
Denaturation	95°C	20 sec	-----	45X
Annealing and elongation	64°C	40 sec	yes	

تنظیمات اختصاصی دستگاه Rotorgene Q جهت بهینه سازی خوانش:

Gain optimization:

Optimize Acquiring → perform optimization before 1st Acquisition

تفسیر نتایج (Result Interpretation)

در نرم افزار دستگاه Rotor Gene Q از منوی Analysis گزینه Quantitation را انتخاب کرده و روی Cycling A. Green کلیک کنید و Threshold را روی 0.05 قرار دهید. سپس روی Cycling A. Yellow کلیک کرده و Threshold را روی 0.05 قرار دهید.

از نوار بالای پنجره‌ی Quantitation Analysis، گزینه‌های Dynamic Tube و Slope Correct را روشن نموده و گزینه‌ی Outlier Removal (جهت مماس کردن نمودار NTC با خط صفر) را در بازه‌ی ۱ تا ۱۰ درصد تنظیم نمایید.

فلورسنت سبز (Green) مربوط به HLA B5/51 و فلورسنت زرد (Yellow) مربوط به کنترل داخلی (IC) می باشد.

در صورتیکه نمونه در کانال سبز دارای منحنی سیگموئیدی بوده و Ct آن کمتر از ۳۲ باشد و در کانال زرد دارای منحنی سیگموئیدی و Ct ۲۰ تا ۳۰ باشد، نمونه مثبت می باشد.

در صورتیکه نمونه در کانال سبز و زرد فاقد منحنی سیگموئیدی باشد، استخراج نمونه و سپس تست را تکرار کنید.

توجه: نمونه‌ی کنترل مثبت فاقد ژنوم کنترل داخلی بوده و منحنی سیگموئیدی در کانال زرد مربوط به این نمونه مشاهده نمی گردد.

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

Detection Channel		Result Interpretation
FAM (HLA B5/51 target)	JOE (Internal Control)	-----
Positive	Positive or Negative	HLA B5/51 DNA detected
Negative	Positive	HLA B5/51 not detected. The sample is negative
Negative	Negative	PCR inhibition or reagent failure. Repeat test or Extraction again.

* کیت حاضر قادر به شناسایی آلل های زیر از HLA-B51 نمی باشد:

HLA-B 51:22, 51:26, 51:45, 51:50, 51:54, 51:67, 51:78

صحه گذاری

آزمون های اعتبارسنجی کیت حاضر، مطابق با راهنمای صحه گذاری تولید کیت های حوزه پزشکی آزمایشگاهی اداره کل تجهیزات پزشکی انجام شده که نتایج آن به شرح زیر است:

حساسیت آنالیتیکال و بالینی (Sensitivity)

حساسیت آنالیتیکال کیت حاضر با محاسبه میزان LOD کیت ارزیابی گردید. بدین منظور رقت های متوالی از کمینه میزان DNA ژنومی استخراج شده ی بیمار تهیه گردید. بر مبنای نتایج حاصله، کمترین میزان حد تشخیص کیت حاضر برای شناسایی با دامنه اطمینان ۹۵ درصد، معادل مقدار DNA ۰/۱ نانوگرم بر میکرولیتر است. بدین معنی که با احتمال ۹۵ درصد، این میزان DNA استخراج شده از بیمار قابلیت شناسایی با کیت حاضر را دارد.

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.

اختصاصیت آنالیتیکال و بالینی (Specificity)

با توجه به نتایج بالینی انجام شده بر روی ۲۰۰ نمونه بیمار فاقد ژن HLA B51، کیت حاضر دارای اختصاصیت ۱۰۰ درصد می باشد. نتایج حاصل از این آزمون، توسط آنالیزهای بیوفورماتیک نیز تایید گردیده است.

مداخله گرها (Interference)

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.

CCCTCGAGGACAAGGCGTTC
CAGTCCAGATGACCA
TACCFAMTAAGAA
TGAAAGAT
TAGGA
CT