

Time PCR و همچنین استفاده از تکنیک TaqMan طراحی شده است. این کیت توانایی شناسایی بیش از 99 درصد زیر آلل های HLA-B27 را دارا می باشد.

5. نکات مهم : لطفا قبل از استفاده مطالعه شود.

- قبل از شروع فرآیند تمامی ریجنت ها بایستی در دمای محیط قرار گیرند تا ذوب شوند.
- زمان ذوب شدن ریجنت ها بیش از 30 دقیقه نباشد تا از تخریب مواد جلوگیری شود.
- پس از ذوب ریجنت ها، همگن و میکروفیوژ شوند.
- از میکروتیوب های DNase & RNase free و تیپ های فیلتردار DNase & RNase free استفاده شود.

6. تجهیزات و مواد لازم که در کیت فراهم نشده است

- دستگاه های Real-Time PCR سازگار (به بخش 8 دستگاه های سازگار مراجعه شود)
- کیت ها و یا دستگاه های استخراج DNA مناسب (به بخش 10-1 استخراج DNA مراجعه شود)
- دستگاه سانتریفیوژ و میکرواسپین
- میکروتیوب PCR و تیپ های فیلتر دار DNase & RNase free
- دستکش بدون پودر یک بار مصرف

7. نمونه های قابل استفاده

- نمونه خون جمع آوری در تیوب های حاوی EDTA
- نمونه ها تا قبل از استخراج DNA بایستی نهایتا به مدت 24 ساعت در دمای -20 درجه سانتی گراد نگه داری گردد و در صورتی که شرایط استخراج و یا انتقال نمونه در طی 24 ساعت اولیه فراهم نبود، نگه داری نمونه ها در دمای -20 تا -80 درجه سانتی گراد صورت گیرد.
- **توجه:** استفاده از هیپارین به عنوان ضد انعقاد در فرایند PCR اختلال ایجاد می کند، به همین دلیل از لوله های حاوی هیپارین استفاده نشود. همچنین نمونه بیماران که هیپارین مصرف می کنند برای PCR مناسب نمی باشد.

8. دستگاه های سازگار

کیت برای استفاده در دستگاه های PCR زیر توسعه و اعتبارسنجی شد.

- Rotor-Gene® Q5/6 plex Platform (QIAGEN)
- Mic qPCR cyclers (Bio Molecular Systems)
- Tianlong Real-Time PCR systems (Xi'an Tianlong Science and Technology)
- QuantStudio™ 5 Pro Real-Time PCR System
- CFX96™ Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad)
- CFX96™ Deep Well Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad)
- LightCycler® 480 Instrument II (Roche)
- **توجه:** این کیت برای استفاده در دستگاه های بدون نیاز به ROX طراحی گردیده است.

9. نکات ایمنی

- از جا به جایی و یا ترکیب ریجنت های کیت با Lot Number مختلف جدا خودداری کنید.
- برای جلوگیری از انتقال آلودگی به محلول مسترمیکس، بلافاصله پس از دریافت کیت، تیوب های کنترل مثبت و منفی را در فریزر مجزا از تیوب های مسترمیکس قرار دهید.

1. محتویات کیت

CAT.NO	محتویات	HLA-B27 (24RXN)	HLA-B27 (48RXN)	HLA-B27 (96RXN)	رنگ درب تیوب
BD123	B27 Mix 1	1x360 µl	2x360 µl	4x360 µl	آبی
BD124	B27 Mix 2	1x120 µl	2x120 µl	4x120 µl	قهوه ای
BD125	B27 Positive Control	1x40 µl	1x80 µl	2x80 µl	قرمز
BD126	B27 Negative Control	1x40 µl	1x80 µl	1x160 µl	سبز

2. شرایط پایداری و نگهداری

- حمل کیت بایستی در شرایط دمای °C -20 و در حداقل زمان ممکن صورت گیرد.
- پس از دریافت کیت، محتویات بایستی مطابق شرایط درج شده بر روی جعبه کیت نگه داری شوند.
- در صورت نگه داری کیت در دمای نامناسب در حین حمل از آن استفاده نشود.
- در صورت سالم نبودن بسته بندی کیت و یا عدم تطابق شکل ظاهری مواد مصرفی با توضیحات از آن استفاده نشود.
- کیت را در دمای ثابت نگه داری نموده و از نور خورشید محافظت کنید.
- از تکرار متعدد چرخه انجماد / ذوب پرهیزید.
- در صورت باز نشدن مواد مصرفی و نگه داری در دمای توصیه شده این محصول تا پایان تاریخ انقضای مندرج بر روی جعبه کیت پایدار خواهد ماند.

3. معرفی

آنتی ژن لوکوسیت انسانی B (HLA-B) توسط جایگاه B در کمپلکس اصلی سازگاری بافتی (MHC) که بر روی کروموزوم 6 قرار دارد؛ کد گذاری می شود. این آنتی ژن در سطح تمام سلول های هسته دار وجود دارد. عملکرد آن ها ارائه آنتی ژن های درون زا مانند پپتیدهای ویروسی یا پاتوژن های داخل سلولی به سلول های T سیتوتوکسیک است. HLA-B27 یکی از آلل های این ژن می باشد که در جمعیت دارای فراوانی بین 8-10% است. همبستگی بین حضور آلل HLA-B27 و بیماری اسپوندیلیت انکیلوزان (Ankylosing spondylitis) از اوایل دهه 1970 شناخته شده است. اگرچه این آلل در جمعیت عمومی رایج است، اما به شدت به استعداد ابتلا به بیماری های روماتولوژیک التهابی به خصوص اسپوندیلوآرتريت (Spondylarthritis) مرتبط می شود. بیماری های نظیر یوئیت (Uveitis) حاد قدامی، بیماری التهابی روده، آرتريت پسوریاتیک و آرتريت واکنشی نیز با داشتن HLA-B27 ارتباط زیادی دارند.

کیت BehDx HLA-B27 Real Time PCR جهت شناسایی آلل HLA-B27 با استفاده از روش TaqMan Real Time PCR در نمونه های خون طراحی و عرضه شده است.

4. حیطه کاربری

کیت BehDx HLA-B27 Real Time PCR یک کیت کیفی آزمایشگاهی با کاربرد تحقیقاتی جهت تشخیص آلل HLA-B27 می باشد که بر مبنای روش Real-

Reaction setup	
Master Mix	20 µl
Sample or Control	5 µl
Total	25 µl

4-10. برنامه دمایی

تیوب ها را در دستگاه قرار داده و مطابق برنامه زیر تست را انجام دهید.

program	Temperature [°C]	Hold [hh:mm:ss]	Cycles	Analysis Mode
Activation	95	00:15:00	1	None
Amplification	95	00:15:00	40	Quantification
	60*	00:00:45		

* خوانش در دمای 60 °C انجام می گیرد و کانال های FAM و HEX بایستی روشن شوند. در این آزمون سیگنال FAM یا سبز نشان دهنده وضعیت ژن کنترل داخلی و سیگنال HEX یا زرد نشان دهنده وضعیت آلل HLA-B27 می باشد.

11. تفسیر نتایج

- در صورت مشاهده منحنی سیگموئیدی در کانال FAM یا سبز (کنترل داخلی) و همچنین مشاهده منحنی سیگموئیدی در کانال HEX یا زرد نمونه مثبت است.
- در صورت مشاهده نشدن منحنی سیگموئیدی در هر دو کانال FAM و HEX آزمایش بایستی از مرحله استخراج مجدداً تکرار شود.
- در صورتی که برای نمونه در کانال FAM منحنی سیگموئیدی مشاهده نشود ولی در کانال HEX نمونه دارای منحنی سیگموئیدی باشد، نمونه مثبت در نظر گرفته می شود.
- کانال FAM و HEX برای تیوب کنترل مثبت باید مثبت و برای تیوب کنترل منفی باید منفی باشند.
- در صورتی که سیگنال FAM (کنترل داخلی) دارای $Ct \geq 30$ بود؛ تست را از مرحله استخراج با مقدار و خلوص بیشتر DNA تکرار نمایید.

در جدول زیر نحوه تفسیر نتایج بطور خلاصه آورده شده است

کانال		تفسیر
FAM	HEX	
+	-	• نمونه برای آلل HLA-B27 منفی است.
-/+	+	• نمونه برای آلل HLA-B27 مثبت است.
-	-	• وجود مهار کننده در واکنش PCR • انجام ناصحیح مراحل فرآیند تست و آماده سازی واکنش، • تست از مرحله استخراج یا PCR تکرار شود.

12. حساسیت و اختصاصیت بالینی:

تست های بالینی انجام شده بر روی 85 نمونه مثبت، نشان دهنده حساسیت 100% تشخیص بود.

تست های بالینی انجام شده بر روی 98 نمونه منفی، نشان دهنده اختصاصیت 100% تشخیص بود

نماد	مفهوم	نماد	مفهوم
	کاربرد تحقیقاتی		محدودیت زمانی
	اطلاعات کارخانه		تعداد تست
	تاریخ تولید		تاریخ انقضا
	از تاریخ دور نگه داشته شود		خطرات زیستی
	احتیاط		مقایسه دستورالعمل استفاده از محصول
	شماره سری ساخت		کد REF

- از کیت و یا اجزای کیت بعد از گذشت تاریخ انقضا استفاده نشود.
- این محصول توسط افراد متخصص و آموزش دیده در زمینه تست های مولکولی قابل استفاده می باشد، هنگام کار از گان آزمایشگاهی و دستکش یکبار مصرف استفاده کنید.
- در هنگام استفاده از ریجنت های کیت توصیه می شود از دستکش های بدون پودر استفاده شود.
- تمامی نمونه ها می توانند باعث انتقال آلودگی شوند و بایستی در حمل و استفاده از آن ها دقت شود. از تماس مستقیم با نمونه ها خودداری شود. لوازم و موادی که با نمونه ها در ارتباط بوده بایستی به درستی ضد عفونی و اتوکلاو شوند.
- از تماس نمونه یا ریجنت ها با پوست، چشم و غشاهای مخاطی خودداری کنید. در صورت تماس با پوست، چشم یا غشاهای مخاطی، فوراً با آب بشویید و سریعاً به پزشک مراجعه کنید.
- تمامی محتویات کیت پس از استفاده جزء دسته ی زباله های زیستی خطرناک می باشد و باید به درستی دفع شود.

10. فرآیند (دستورالعمل استفاده)

1-10. استخراج DNA

برای جداسازی DNA استفاده از کیت های زیر توصیه می شود :

- BehPrep G-Plus DNA Extraction Kit (Cat Number: BP101)
 - BehPrep Genomic DNA Extraction Kit (Cat Number: BP102)
- میزان غلظت مناسب از DNA بیمار برای باقی مراحل 10-100 ng/µl است.

استخراج DNA توسط کیت و دستگاه های استخراج با کیفیت و خلوص کافی نیز مورد تایید است.

استخراج دستگاهی زیر نیز توصیه می شود:

- BehMag Genomic DNA Extraction Kit (Cat Number: BM201)

10-2. آماده سازی مسترمیکس

- برای تهیه مسترمیکس، 15 µl از B27 Mix1 و 5 µl از B27 Mix2 برای هر نمونه به لوله اصلی واکنش اضافه نمایید.

Number of reactions	1	15
B27 Mix 1	15 µl	225 µl
B27 Mix 2	5 µl	75 µl
Total	20 µl	300 µl

- میکروتیوب را ابتدا ورتکس و سپس برای مدت کوتاهی میکروپیوژ نمایید.

10-3. آماده سازی واکنش PCR

- 20 µl از مسترمیکس تهیه شده در مرحله قبل را به تیوب های PCR اضافه گردد.
- به هر تیوب تست 5 µl از DNA استخراج شده بیمار یا 5 µl از کنترل ها (کنترل مثبت یا منفی) را اضافه گردد.
- میکس نمونه و مسترمیکس، و همچنین کنترل و مسترمیکس کاملاً همگن و میکروپیوژ گردد.
- پیشنهاد می شود تمام این مراحل بر روی یخ یا بلوک سرد انجام شود.