



**Instruction for Use**

## **HLA-B27 Detection RT-PCR Kit**

**باروش**

**Real-Time PCR**

**Cat-No: BONHLAB27-24**



**Doc. #: IFU-HLA27-01 Doc. Version: 14RUO Revision Date:1403-08-08**

|    |                                       |
|----|---------------------------------------|
| ۳  | شماره رفرانس                          |
| ۳  | اطلاعات ژن                            |
| ۴  | محتویات کیت                           |
| ۵  | نگهداری و انتقال کیت                  |
| ۶  | نکات احتیاط عمومی                     |
| ۷  | هشدارها و محدودیت‌ها                  |
| ۸  | عوامل تداخلی                          |
| ۹  | آماده‌سازی                            |
| ۱۰ | برنامه دمایی                          |
| ۱۱ | تعریف طیف سنجش فلورسنت در دستگاه‌ها   |
| ۱۱ | دستگاه ROTOR-GENE                     |
| ۱۳ | دستگاه MIC                            |
| ۱۵ | جدول تفسیر نتایج                      |
| ۱۶ | نکات آنالیز نتایج در دستگاه‌های مختلف |
| ۱۶ | دستگاه ROTOR-GENE                     |
| ۱۷ | پشتیبانی فنی                          |
| ۱۷ | نشانه‌ها                              |
| ۱۸ | اطلاعات تماس                          |

- BONHLAB27-24

### شرح کیت

این کیت بر اساس واکنش زنجیره‌ای پلیمرز (PCR) به صورت Real-Time و برای تشخیص در شرایط آزمایشگاهی تهیه شده است. نتایج به دست آمده توسط این محصول باید همراه با سایر داده‌های بالینی یا آزمایشگاهی تفسیر شوند.

### اصول

کیت حاضر قابلیت تشخیص تمامی زیرشاخه‌های HLA-B27 را توسط واکنش زنجیره‌ای پلیمرز (PCR) دارد. در واکنش Real-Time PCR محصول تکثیر شده از طریق فلورسنت شناسایی می‌شوند. مشاهده شدت فلورسنت در حین واکنش PCR (به صورت Real-Time) تشخیص محصولات در حال تکثیر را بدون نیاز به باز کردن مجدد لوله‌های واکنش پس از اجرای PCR ممکن می‌سازد.

### اطلاعات ژن

کمپلکس اصلی سازگاری بافتی یا MHC که نقش اساسی در بروز پاسخ ایمنی نسبت به آنتی‌ژن‌های پروتئینی ایفا می‌کنند، در انسان تحت عنوان آنتی‌ژن‌های لکوسیتی انسان یا HLA شناخته می‌شوند. هرکسی ترکیبی ارثی از ژن‌های HLA دارد که بسیاری از آنتی‌ژن‌های موجود در سطح سلول‌های خود را کد می‌کند. وجود یا عدم وجود هر آنتی‌ژن ترکیبی مشخص HLA برای هر شخص ایجاد می‌کند.

در افراد دارای ترکیب شامل HLA-B27، احتمال ابتلا به بیماری‌های خود ایمنی مانند اسپوندیلیت آنکیلوزان، آرتریت روماتوئید نوجوانان (JRA)، آرتریت واکنشی (که یکی از زیرمجموعه آن‌ها سندرم ریتیر است) نسبت به دیگر افراد بیشتر است.

اسپوندیلیت آنکیلوزان و آرتریت واکنشی هر دو بیماری مزمن و پیشرونده هستند. اولین علائم معمولاً در اوایل دهه ۳۰ زندگی مشاهده می‌شود. اغلب، علائم اولیه این اختلالات خود ایمنی، جزئی است

و ممکن است چند سال طول بکشد تا تغییرات دژنراتیو مشخص در استخوان‌ها و مفاصل و در پرتوهای X قابل مشاهده باشد.

آزمایش HLA-B27 به تقویت یا تأیید تشخیص موارد مشکوک به اسپوندیلیت آنکیلوزان، آرتریت واکنشی، آرتریت روماتوئید نوجوانان (JRA) یا گاهی اوقات یوویتیت قدامی کمک می‌کند.

## محتویات کیت

| Title                | 24 Tests         |
|----------------------|------------------|
|                      | Volume per Vial  |
| MasterA - B27        | 240 µl/tube × 1  |
| MasterB-HLA          | 240 µl/tube × 1  |
| Nuclease Free Water  | 250 µl /tube × 1 |
| Positive Control B27 | 50µl/tube × 1    |

جدول ۱. محتویات کیت

## نگهداری و انتقال کیت

- ✓ کلیه محتویات این کیت باید در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد و در تاریکی نگهداری گردد، همچنین به‌منظور انتقال و جابه‌جایی کیت از یونولیت با درب و یخ‌خشک استفاده نمایید.
- ✓ نگهداری کیت در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد هیچ‌گاه نباید بیشتر از یک ساعت شود.
- ✓ این کیت نیاز به حمل بر روی بسته‌های یخ‌زده (Frozen Ice Pack) را دارد.
- ✓ همه مواد موجود در کیت تا تاریخ انقضا، همان‌طور که روی برچسب بسته‌بندی محصول مشخص شده است، در شرایط مشخص شده پایدار هستند.
- ✓ از چرخه‌های متعدد ذوب و انجماد (Freeze-Thaw) خودداری کنید زیرا سبب کاهش حساسیت و در نتیجه عدم کارایی کیت می‌شود.
- ✓ از قرار دادن مستقیم اجزای کیت در معرض نور، گرما یا رطوبت خودداری کنید.
- ✓ معرف‌ها را قبل از استفاده در دمای اتاق (۱۵ تا ۲۵ درجه سانتی‌گراد) ذوب کنید. پس از ذوب شدن مواد موجود در کیت، لوله‌ها را به‌طور مختصر سانتریفیوژ کنید تا مطمئن شوید که مواد موجود در کیت به‌طور یکنواخت مخلوط شده‌اند.

### مواد و تجهیزات موردنیاز که باید توسط کاربر تدارک دیده شود:

۱. کیت استخراج DNA
۲. سمپلر قابل تنظیم در اندازه‌های مختلف و نوک سمپلر فیلتر دار
۳. سانتریفوژ رومیزی
۴. بلوک خنک‌کننده
۵. وایتکس ۱۰ درصد
۶. گان و دستکش
۷. دستگاه Rotor-Gene, MIC یا دستگاه‌های دیگر با ۲ کانال فلورسنت رنگ Green و Yellow و یا انتخاب فلورفورهای FAM و HEX
۸. نرم‌افزار دستگاه مورد استفاده
۹. استریپ و کپ مناسب دستگاه مورد استفاده

## نکات احتیاط عمومی

۱. لطفاً دستورالعمل را با دقت بخوانید و قبل از استفاده محصول با تمام اجزای کیت آشنا شوید و در حین کار دستورالعمل را دقیقاً دنبال کنید.
۲. لطفاً قبل از استفاده، ابزارهای Real-Time PCR سازگار را بررسی کنید و فرآیند را با آنها جلو ببرید.
۳. از کیت یا اجزای کیت پس از تاریخ انقضا استفاده نکنید.
۴. در کیت آزمایش از ماده دیگری استفاده نکنید.
۵. از سرسمپلرهای فیلتردار و RNase & DNase free استفاده نمایید.
۶. نگهداری و تخلیص مواد مثبت برای HLA-B27، نمونه‌های گرفته‌شده از مریض و محصولات حاصل از PCR باید در محلی کاملاً جدا از محل نگهداری و آماده‌سازی Master Mix صورت پذیرد.
۷. همه مواد موردنیاز کیت قبل از شروع کار باید به‌طور کامل در دمای اتاق ذوب شود.
۸. بعد از ذوب شدن، کلیه مواد را به‌خوبی پیپتاژ نمایید و به‌طور مختصر اسپین کنید. این امر برای جلوگیری از کاهش عملکرد کیت در طی زمان به‌طور کامل توصیه می‌شود.
۹. تمام مراحل مربوط به تهیه Master Mix باید بر روی یخ یا جعبه‌های سرد (Cooling Box) انجام شود. استوک اصلی مربوط به Master Mix بعد از برداشتن مقدار موردنیاز از آن باید به سرعت به فریزر منتقل شود.
۱۰. هنگام کار با مواد شیمیایی، همیشه روپوش مناسب آزمایشگاهی، دستکش یک‌بارمصرف و عینک‌های محافظ داشته باشید.
۱۱. کیت حاوی کنترل مثبت است. برای جلوگیری از آلودگی که ممکن است باعث ایجاد مثبت کاذب شود، کنترل مثبت را از سایر مواد موجود در کیت کاملاً جدا کنید.
۱۲. PCR بسیار حساس به آلودگی متقابل است، پس فرآیند کار را با دقت انجام دهید.
۱۳. هنگام کار با نمونه‌ها و مواد موجود در کیت، برای جلوگیری از آلودگی، دستکش‌ها باید مرتباً تعویض شوند.
۱۴. از تیپ‌های جداگانه و اختصاصی استفاده کنید. هنگام کار با نمونه‌ها و مواد موجود در کیت از میکرو تیپ‌های فیلتر دار برای جلوگیری از ورود آلودگی DNA استفاده کنید.

۱۵. لطفاً لوله‌های PCR را با دو دستکش یک‌بار مصرف بسته‌بندی کرده و به‌درستی دور بیندازید. لوله‌های PCR را پس از امپلی فای باز نکنید.
۱۶. از مواد یک‌بار مصرف، بیش از یک‌بار استفاده نکنید.
۱۷. مواد موجود در کیت که بلااستفاده هستند، کیت استفاده‌شده و زباله‌ها باید به‌درستی دور انداخته شوند.
۱۸. پس از آزمایش، محل کار را پاک کنید، پیپت‌ها و تجهیزات را با اتانول ۷۵٪ و وایتکس ۱۰٪ اسپری کنید.

## هشدارها و محدودیت‌ها

۱. تمامی مراحل آزمایش باید بر اساس اصول GLP<sup>۱</sup> توسط کارکنان آموزش‌دیده دارای پوشش حرفه‌ای و محافظ<sup>۲</sup> (PPE) انجام شود. آزمایش‌های بالینی بر نمونه‌های عفونی باید در هود کلاس دو (Class II Biological Safety Cabinet) در محیط BSL-2 انجام شود.
۲. پیشنهاد می‌شود هود و یا استیشن مورد استفاده قبل و بعد از کار با وایتکس ۱۰ درصد تمیز شود و همین‌طور بعد از کار لامپ UV زده شود.
۳. پیشنهاد می‌شود<sup>۳</sup> مکان مجزا برای استخراج DNA، آماده‌سازی مخلوط واکنش و اضافه کردن نمونه و نمونه استاندارد در نظر گرفته شود تا از ایجاد نتایج مثبت کاذب جلوگیری شود.
۴. پس از آماده‌سازی مخلوط واکنش، آن را در تاریکی نگهداری نمایید.

## کنترل‌ها

۱. نمونه بیمار: از محتویات اسید نوکلئیک DNA حاصل از استخراج نمونه استفاده شود.
۲. کنترل منفی (NTC): همواره یک نمونه کنترل منفی حاوی آب بجای نمونه استفاده شود.
۳. کنترل مثبت (PTC): از کنترل مثبت کیت به جای نمونه در یک واکنش استفاده شود.

---

<sup>۱</sup> Good Laboratory Practice

<sup>۲</sup> Personal Protective Equipment

## نگهداری نمونه‌های گرفته‌شده

نمونه می‌تواند کمتر از ۸ ساعت در یخچال با محدوده دما از ۲ تا ۸ درجه سانتی‌گراد و برای نگهداری طولانی‌مدت آن، باید در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد منجمد شده و نگهداری شود.

## تاریخ انقضای کیت

تاریخ انقضای کیت بر روی جعبه محصول درج شده است.

## عوامل تداخلی

حضور EDTA (0.5M)، HCl (1N)، دانه‌های سیلیس (1μl)، خون (1μl)، اوره (۴۰ گرم در ۱۰۰ میلی‌لیتر) و بافر لیز موجب مهار واکنش PCR می‌شود. توجه شود که در هنگام نمونه‌گیری از هیپارین استفاده نشود. وجود مهارکننده در واکنش با ژن کنترل داخلی قابل‌ردیابی است.

## خالص‌سازی نوکلئیک اسید

جداسازی اسید نوکلئیک باید توسط کیت‌های جداسازی موجود در بازار مطابق پروتکل‌های جداسازی مواد بالینی خاص انجام شود.

مواد نمونه باید از نمونه‌ی خونی که توسط EDTA از انعقاد آن جلوگیری شده است، استخراج شده باشد.

کیت استخراج DNA در این کیت گنجانده نشده است.

## آماده سازی

۱. ابتدا لوله ها را روی رک یخ بگذارید تا محتویات آن ها ذوب شوند و محتویات لوله ها را به آرامی پیپتاژ و یا ورتکس کنید و به طور مختصر سانتریفیوژ کنید.
۲. مقدار ۱۰ میکرو لیتر از MasterA-B27 را به لوله های PCR اضافه کنید. سپس، ۱۰ میکرو لیتر از MasterB-HLA را نیز به هر لوله اضافه نمایید.
۳. پس از انتقال مستر میکس ها به تیوب های واکنش، ابتدا نمونه کنترل منفی (NTC) را آماده کنید. برای این کار، ۵ میکرو لیتر از آب بدون نوکلئاز را به تیوب کنترل منفی اضافه نمایید و درب آن را ببندید. سپس لوله ها را به منطقه کار با اسید نوکلئیک انتقال دهید، ۵ میکرو لیتر از کنترل مثبت و ۵ میکرو لیتر از نمونه های بیمار را به تیوب های مربوطه اضافه نمایید. در حین تهیه PCR لازم است همه اجزا در دمای ۲ تا ۸ درجه سانتی گراد نگهداری شوند (جدول ۲).

| Reaction Setup    | Volume     |
|-------------------|------------|
| Master A - B27    | 10 $\mu$ l |
| Master B- HLA     | 10 $\mu$ l |
| Sample or Control | 5 $\mu$ l  |
| Final volume      | 25 $\mu$ l |

جدول ۲. مقادیر مورد استفاده در هر واکنش

۴. لوله ها را ببندید، مختصراً سانتریفیوژ کنید، آن ها را داخل دستگاه قرار دهید و اجازه دهید مطابق مشخصات برنامه قید شده در جدول شماره ۳ تکثیر شوند. هنگام استفاده از کنترل مثبت یا مواد بالینی بسیار مراقب باشید.
- نکته: در هر بار انجام تست یک لوله به عنوان No Template Control باید گذاشته شود. در NTC به جای نمونه استخراج شده از آب استفاده می شود که برای کنترل آلودگی واکنش کاربرد دارد.
- بهتر است از فضاهای جداگانه برای اضافه کردن مستر واکنش و نمونه های بیمار استفاده کرد و همچنین در نظر داشته باشید که در ویال کنترل مثبت را تنها در محل آماده سازی نمونه و فضای آلوده بازنمایید.

## برنامه دمایی

دستورالعمل برای دستگاه‌های Real-Time PCR دارای کانال Green (FAM) و Yellow (HEX) توصیف شده است. پس از تنظیم کردن دستگاه مطابق برنامه زیر (جدول شماره ۳)، واکنش را راه‌اندازی کنید. برای آگاهی از نحوه تعریف کانال در دستگاه Rotor Gene به کاتالوگ دستگاه مراجعه کنید. مقادیر دمایی هر قسمت در جدول صفحه بعد آورده شده است.

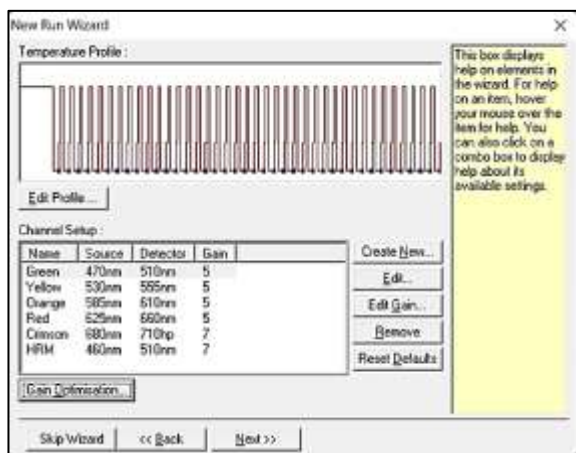
|                                                                   | Temperature | Hold   | Cycle |
|-------------------------------------------------------------------|-------------|--------|-------|
| Pre-Denaturation                                                  | 95 °C       | 5 min  | 1     |
| Denaturation                                                      | 95 °C       | 20 sec | 35    |
| Annealing and Acquisition on Channel Green (FAM) And Yellow (HEX) | 58°C        | 45 sec |       |
| Extention                                                         | 72°C        | 20 sec |       |

جدول شماره ۳. برنامه دمایی

## تعریف سنجش فلورسنت در دستگاه‌ها

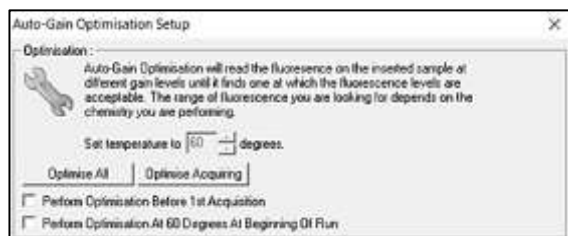
### دستگاه Rotor-Gene

بدین منظور در دستگاه Rotor-gene گزینه‌ی Gain Optimization را انتخاب کنید (شکل ۱).



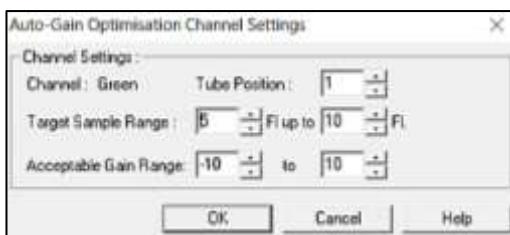
شکل ۱. تنظیمات دستگاه Rotor-Gene برای Gain Optimization

در این صفحه با انتخاب گزینه‌ی Optimise Acquiring برای هر ۲ کانال سبز و زرد بازه‌ی Target sample range از ۵ تا ۱۰ (حالت پیش فرض دستگاه) انتخاب شود (شکل ۲).



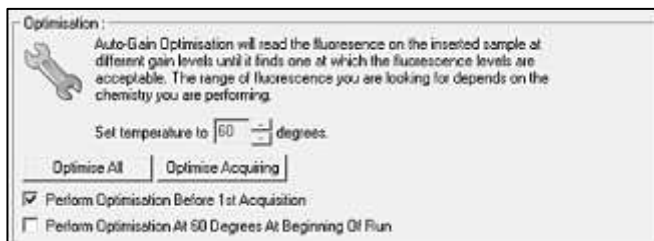
شکل ۲. تنظیمات دستگاه Rotor-Gene برای Auto Gain Optimization

همچنین Gain دستگاه باید بر مبنای تیوب اول که حاوی میکس هر دو مسترمیکس A و B به همراه کنترل مثبت یا PTC کیت است، انجام شود (شکل ۳).



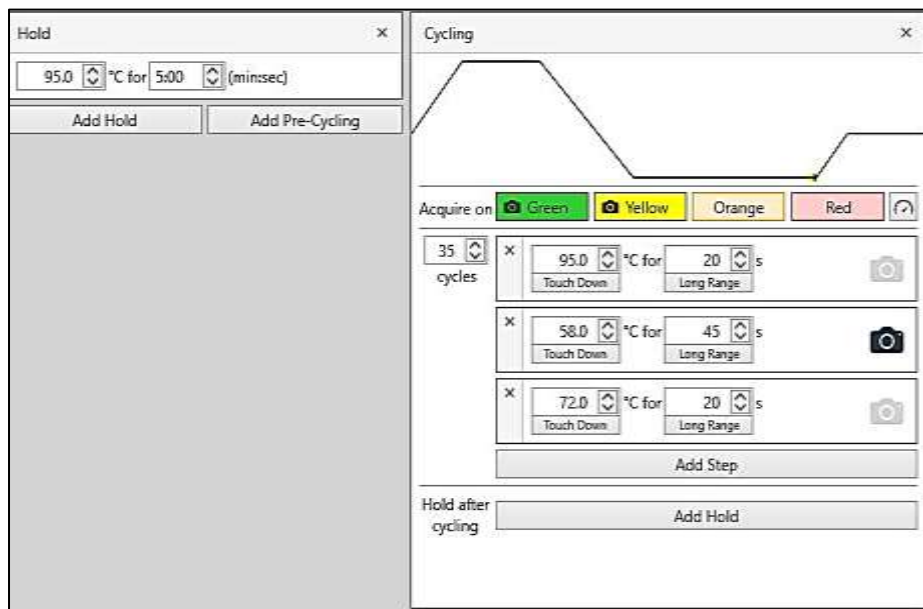
شکل ۳. تنظیمات دستگاه Rotor-Gene برای Auto Gain Optimization

پس از انتخاب بازه‌ی مناسب برای هر کانال، گزینه‌ی 1st Perform Optimization Before Acquisition را انتخاب کرده، و پنجره را ببندید (شکل ۴).



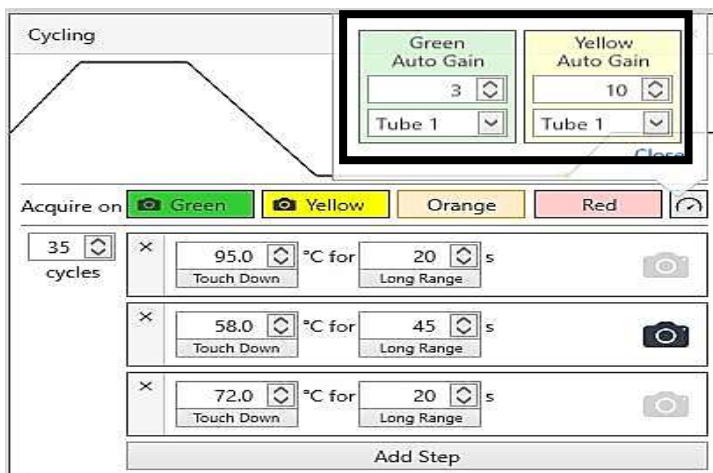
شکل ۴. تنظیمات دستگاه Rotor-Gene برای Auto Gain Optimization

بدین منظور در دستگاه MIC با انتخاب گزینهی Run Profile پروفایل دمایی کیت را وارد کرده و در بخش Cycling سنجش فلورسنت را در ۲ کانال سبز و زرد فعال کنید (شکل ۵).



شکل ۵. تنظیمات دستگاه MIC

همچنین Gain دستگاه باید بر مبنای تیوب اول که حاوی میکس هر دو مسترمیکس A و B به همراه کنترل مثبت یا PTC کیت است، انجام شود (شکل ۶)



شکل ۶. تنظیمات Gain دستگاه MIC

## آنالیز نتایج

آنالیز نتایج توسط نرم افزار مربوطه و بر اساس دستورالعمل دستگاه انجام شود. در ۲ کانال رنگی Green و Yellow آستانه را در بازه‌ی مناسب 0.02 قرار دهید.

برای تفسیر نتایج، مطابق جدول تفسیر نتایج عمل کنید.

نتایج باید به صورت زیر تفسیر گردد:

۱. چنانچه نمونه در کانال سبز دارای منحنی سیگموئیدی و فاز لگاریتمی باشد و کنترل داخلی دارای  $Ct \leq 30$  باشد و اختلاف Ct دو کانال سبز و زرد کمتر از ۵ Ct باشد، نمونه دارای HLA-B27 می باشد.

۲. زمانی که کنترل داخلی دارای  $Ct \leq 30$  و در کانال سبز منحنی سیگموئیدی نباشد و سیگنالی در این کانال دیده نشود، و یا اختلاف Ct دو کانال سبز و زرد بیشتر از ۵ Ct، باشد نمونه فاقد ژن HLA-B27 نمی باشد.

۳. زمانی که اختلاف Ct دو کانال سبز و زرد بیشتر و مساوی ۵ Ct و کمتر از ۶ باشد ( $\leq 5$ )

$\Delta Ct < 6$ ، فرد مشکوک به HLAB27 می‌باشد و تست دوباره باید تکرار شود. در صورت

تکرار نتایج مشکوک، برای راهنمایی و کسب اطلاعات بیشتر می‌توانید با پشتیبانی فنی شرکت تماس حاصل فرمایید.

۴. زمانی که کنترل داخلی تکثیر نشده و نتیجه کانال زرد منفی و یا  $Ct > 30$  باشد، تست فاقد

اعتبار است و باید تکرار شود. استخراج نامناسب یا خطا در آزمایش می‌تواند دلیل بروز چنین نتیجه‌ای باشد.

### جدول تفسیر نتایج

|             | Green (FAM)                   | Yellow (HEX)         | Result             |
|-------------|-------------------------------|----------------------|--------------------|
| HLA-B27 Mix | Ct Green - Ct Yellow $\leq 5$ | $Ct \leq 30$         | HLA-B27 positive   |
|             | Ct Green - Ct Yellow $> 5$    | $Ct \leq 30$         | HLA-B27 negative   |
|             | +/-                           | -<br>Or<br>$Ct > 30$ | Invalid            |
|             | $5 < \Delta Ct < 6$           |                      | HLA-B27 Suspicious |

جدول ۴. تفسیر نتایج

## نکات آنالیز نتایج در دستگاه‌های مختلف

### دستگاه Rotor-Gene

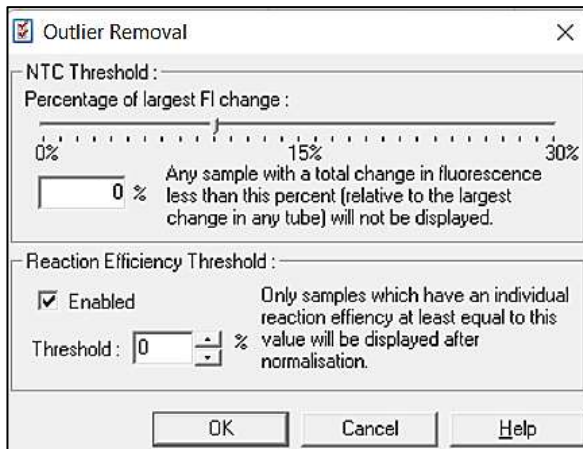
آنالیز اطلاعات در دستگاه Rotor-gene 6000 و Rotor-gene 3000 باید توسط نرم‌افزار دستگاه و بر اساس دستورالعمل دستگاه صورت گیرد.

۱. از منوی Quantitation، Analysis را انتخاب کرده و روی یک رنگ، به طور مثال Green، دو بار کلیک کنید.

۲. با کلیک بر گزینه‌ی Outlier Removal، ترشلد افیشنسی واکنش را به شکل زیر فعال کنید (شکل ۷).

۳. در این پنجره به نام Autofind Threshold دکمه Cancel را زده و در کانال Green آستانه را بر ۰/۰۲ تنظیم نمایید.

۴. مراحل بالا را برای کانال‌های Yellow تکرار کرده و آستانه را بر ۰/۰۲ تنظیم کنید.



شکل ۷. تنظیمات دستگاه Rotor-Gene

۵- جهت دریافت برنامه‌ی آنالیز نتایج، لطفاً بر روی لینک زیر کلیک نمایید.

<https://bonbiotech.ir/QRCODE/HLA-result.xlsx>

## پشتیبانی فنی

برای پشتیبانی فنی لطفاً با تلفن‌های شرکت تماس حاصل فرمایید .

✓ ۰۹۹۳۶۶۹۳۹۴۱ (آقای قره داغی)

## نشانه‌ها

|                                                                                   |                                |                   |
|-----------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------|-------------------|
|  | Research Use Only              | برای مصارف پژوهشی |
|  | Catalog Number                 | کد کالا           |
|  | Batch Number                   | شماره بچ تولیدشده |
|  | Temprature Limitation          | محدودیت دمایی     |
|  | Conculta Instructon For Use    | مطالعه دستورالعمل |
|  | Content sufficent for <n> tets | تعداد تست         |
|  | Use by                         | تاریخ انقضا       |
|  | Manufacturer                   | آدرس              |

شرکت فناوری بن یاخته- گروه سین مورو

دفتر مرکزی : تهران، سعادت آباد، میدان فرهنگ، بلوار ۲۴ متری سعادت آباد، خیابان  
حیدر نیا (دوم شرقی)، پلاک ۹، شرکت فناوری بن یاخته

کد پستی: ۱۹۹۷۷۷۵۵۵۵ تلفن تماس: ۰۲۱۲۲۰۸۲۱۲۰

Web Site: [www.Senmurv.co](http://www.Senmurv.co)

Email: [info@senmurv.ir](mailto:info@senmurv.ir)