



Instruction for Use

HLA-B52 Detection RT-PCR Kit

باروش

Real-Time PCR

Cat-No: BONHLAB52-24



Doc. #: IFU-HLA52-01 Doc. Version: 05 Revision Date 1403-08-08

فهرست مطالب

۳	شماره رفرانس
۳	شرح کیت
۳	اطلاعات ژن
۴	نگهداری و انتقال کیت
۷	هشدارها و محدودیت‌ها
۸	عوامل تداخلی
۹	آماده سازی
۱۰	برنامه دمایی
۱۱	تعریف طیف سنجش فلورسنت در دستگاه‌ها
۱۱	دستگاه Rotor-Gene
۱۳	دستگاه MIC
۱۴	آنالیز نتایج Rotor Gene
۱۵	جدول تفسیر نتایج Rotor Gene
۱۵	آنالیز نتایج MIC
۱۶	جدول تفسیر نتایج MIC
۱۷	پشتیبانی فنی
۱۷	نشانه‌ها
۱۸	اطلاعات تماس

- BONHLAB52-24

شرح کیت

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

اصول

کیت حاضر قابلیت تشخیص تمامی زیرشاخه های HLA-B52 را توسط واکنش زنجیره ای پلیمرز (PCR) دارد. در واکنش Real-Time PCR محصول تکثیر شده از طریق فلورسنت شناسایی می شوند. مشاهده شدت فلورسنت در حین واکنش PCR (به صورت Real-Time) تشخیص محصولات در حال تکثیر را بدون نیاز به باز کردن مجدد لوله های واکنش پس از اجرای PCR ممکن می سازد.

اطلاعات ژن

کمپلکس اصلی سازگاری بافتی یا MHC که نقش اساسی در بروز پاسخ ایمنی نسبت به آنتی ژن های پروتئینی ایفا می کنند، در انسان تحت عنوان آنتی ژن های لکوسیتی انسان یا HLA شناخته می شوند. هر فرد ترکیبی ارثی از ژن های HLA دارا است که بسیاری از آنتی ژن های موجود در سطح سلول های خود را کد می کند. وجود یا عدم وجود هر آنتی ژن، ترکیبی مشخص برای HLA هر فرد ایجاد می کند. در افرادی که واجد HLA-B52 در ترکیب خود هستند، احتمال ابتلا به بیماری آرتریت تاکایاسو نسبت به دیگر افراد افزایش می یابد. HLA-B52 همچنین نقش مهمی در بروز هم زمان بیماری کولیت اولسراتیو (Colitis Ulserative) ایفا می کند. بنابراین، شناسایی آن در فرایند تشخیص و مدیریت بیماری دارای اهمیت بسیار است.

محتویات کیت

Title	24 Tests
	Volume per Vial
Master A- B52	240 μ l/tube $\times$ 1
Master B-HLA	240 μ l/tube $\times$ 1
Nuclease Free Water	250 μ l /tube $\times$ 1
Positive Control B52	50 μ l/tube $\times$ 1

جدول ۱. محتویات کیت

نگهداری و انتقال کیت

- ✓ کلیه محتویات این کیت باید در دمای ۲۰- درجه سانتی گراد و در تاریکی نگهداری گردد، همچنین به منظور انتقال و جابه جایی کیت از یونولیت با درب و یخ خشک استفاده نمایید.
- ✓ نگهداری کیت در دمای ۴ درجه سانتی گراد هیچ گاه نباید بیشتر از یک ساعت شود.
- ✓ این کیت نیاز به حمل بر روی بسته های یخ زده (Frozen Ice Pack) را دارد.
- ✓ همه مواد موجود در کیت تا تاریخ انقضا، همان طور که روی برچسب بسته بندی محصول مشخص شده است، در شرایط مشخص شده پایدار هستند.
- ✓ از چرخه های متعدد ذوب و انجماد (Freeze-Thaw) خودداری کنید زیرا سبب کاهش حساسیت و در نتیجه عدم کارایی کیت می شود.
- ✓ از قرار دادن مستقیم اجزای کیت در معرض نور، گرما یا رطوبت خودداری کنید.
- ✓ معرف ها را قبل از استفاده در دمای اتاق (۱۵ تا ۲۵ درجه سانتی گراد) ذوب کنید. پس از ذوب شدن مواد موجود در کیت، لوله ها را به طور مختصر سانتریفیوژ کنید تا مطمئن شوید که مواد موجود در کیت به طور یکنواخت مخلوط شده اند.

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 خنک کننده
۵. وایتکس ۱۰ درصد
۶. گان و دستکش
۷. دستگاه Rotor-Gene و MIC یا دستگاه‌های دیگر با ۲ کانال فلورسنت رنگ Green و Yellow و یا انتخاب فلورفورهای FAM و HEX
۸. نرم افزار 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 فیلتر دار و RNase & DNase free استفاده نمایید.
۶. نگهداری و تخلیص مواد مثبت برای HLA-B52، نمونه‌های گرفته شده از مریض و محصولات حاصل از PCR باید در محلی کاملاً جدا از محل نگهداری و آماده سازی Master Mix صورت پذیرد.
۷. همه مواد موردنیاز کیت قبل از شروع کار باید به طور کامل در دمای اتاق ذوب شود.

۸. بعد از ذوب شدن، کلیه مواد را به خوبی پیپتاژ نمایید و به طور مختصر اسپین کنید. این امر برای جلوگیری از کاهش عملکرد کیت در طی زمان به طور کامل توصیه می شود.
۹. تمام مراحل مربوط به تهیه Master Mix باید بر روی یخ یا جعبه های سرد (Cooling Box) انجام شود. استوک اصلی مربوط به Master Mix بعد از برداشتن مقدار مورد نیاز از آن باید به سرعت به فریزر منتقل شود.
۱۰. هنگام کار با مواد شیمیائی، همیشه روپوش مناسب آزمایشگاهی، دستکش یک بار مصرف و عینک های 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 نمونه ها و مواد موجود در کیت، برای جلوگیری از آلودگی، دستکش ها باید مرتباً تعویض شوند.
۱۴. از تیپ های جداگانه و اختصاصی استفاده کنید. هنگام کار با نمونه ها و مواد موجود در کیت از میکروتیپ های فیلتر دار برای جلوگیری از ورود آلودگی DNA استفاده کنید.
۱۵. لطفاً لوله های PCR را با دو دستکش یک بار مصرف بسته بندی کرده و به درستی دور بیندازید. لوله های PCR را پس از امپلی فای باز نکنید.
۱۶. از مواد یک بار مصرف، بیش از یک بار استفاده نکنید.
۱۷. مواد موجود در کیت که بلا استفاده هستند، کیت استفاده شده و زباله ها باید به درستی دور انداخته شوند.
۱۸. پس از آزمایش، محل کار را پاک کنید، پیپت ها و تجهیزات را با اتانول ۷۵٪ و وایتکس ۱۰٪ اسپری کنید.

هشدارها و محدودیت‌ها

۱. تمامی مراحل آزمایش باید بر اساس اصول GLP^۱ توسط کارکنان آموزش دیده دارای پوشش حرفه‌ای و محافظ^۲ (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 ۳ 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.

نگهداری نمونه‌های گرفته شده

نمونه می‌تواند کمتر از ۸ ساعت در یخچال با محدوده دما از ۲ تا ۸ درجه سانتی‌گراد و برای نگهداری طولانی مدت 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.

^۱ Good Laboratory Practice

^۲ Personal Protective Equipment

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 اسیدنوکلوئیک 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 پیتاژ و یا ورتکس کنید و به طور مختصر سانتریفیوژ کنید.
۲. مقدار ۱۰ میکرو لیتر از MasterA-B52 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 – B52	10 µl
Master B- HLA	10 µl
نمونه or Control	5 µl
Final volume	25 µl

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 در جدول ۳ آورده شده است.

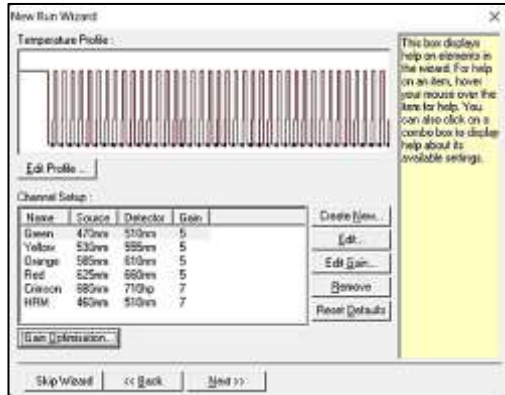
	Temperature	Hold	Cycle
Pre-Denaturation	95 °C	5 min	1
Denaturation	95 °C	20 sec	35
Annealing and Acquisition on Channel Green (FAM) And Yellow (HEX)	58°C	45 sec	
Extension	72°C	20 sec	

جدول ۳. تنظیم برنامه دستگاه ریل تایم

تعریف طیف سنجی فلورسنت در دستگاه‌ها

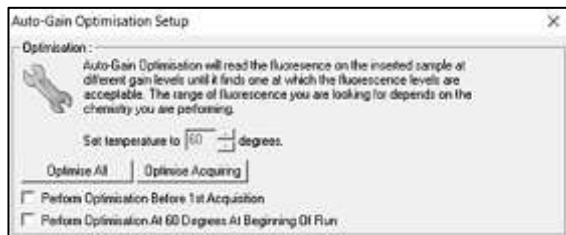
دستگاه Rotor-Gene

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



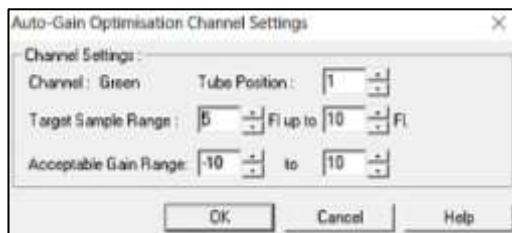
شکل ۱. تنظیمات دستگاه Rotor-Gene برای Gain Optimization

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



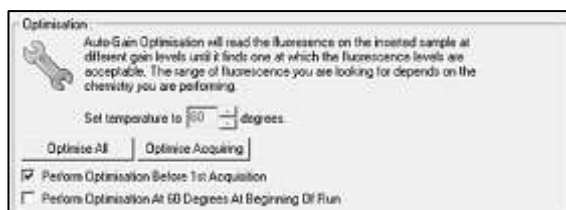
شکل ۲. تنظیمات دستگاه Rotor-Gene برای Auto Gain Optimization

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

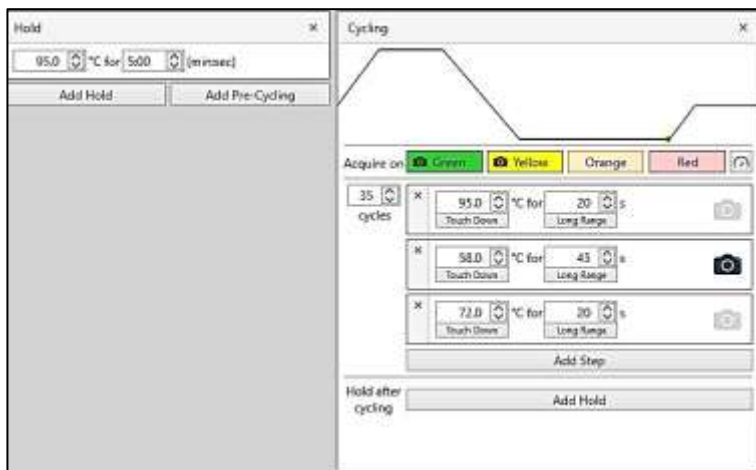
پس از انتخاب بازه‌ی مناسب برای هر کانال، گزینه‌ی 1st Perform Optimization Before Acquisition را انتخاب کرده، و پنجره را ببندید (شکل ۴).



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

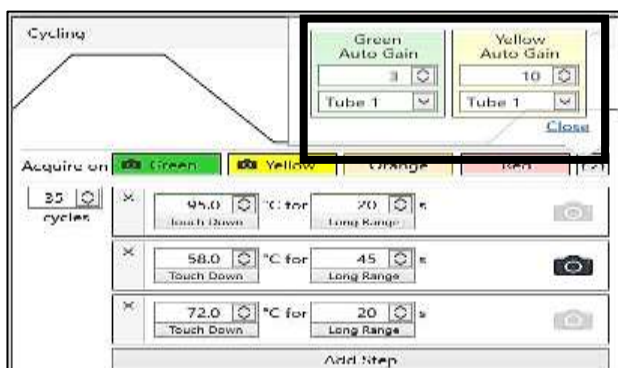
دستگاه MIC

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

حساسیت کیت

توجه! در نظر داشته باشید که غلظت DNA ژنومی بهینه برای کیت، 5-50 ng/μl می باشد. غلظت بیشتر از این محدوده به علت ایجاد مهار واکنش و غلظت کمتر به علت عدم شناسایی توسط کیت، به هیچ وجه توصیه نمی شود.

آنالیز نتایج Rotor Gene

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 و زرد دارای منحنی سیگموئیدی و فاز لگاریتمی باشد، و Ct در کانال زرد $Ct \leq 30$ باشد، و اختلاف Ct نتایج هر دو کانال کمتر از ۷ واحد Ct باشد، نمونه دارای HLA-B52 می باشد.

۲. زمانی که Ct کنترل داخلی در کانال زرد $Ct \leq 30$ باشد، و در کانال سبز منحنی سیگموئیدی نباشد و سیگنالی در این کانال دیده نشود و یا اختلاف Ct نتایج هر دو کانال بیشتر از ۸ واحد Ct باشد، نمونه دارای ژن HLA-B52 نمی باشد.

۳. زمانی که اختلاف Ct دو کانال سبز و زرد بین ۷ تا ۸ باشد ($7 < \Delta Ct < 8$)، فرد مشکوک به HLA-B52 می باشد و تست باید تکرار شود. در صورت تکرار نتایج مشکوک، برای راهنمایی و کسب اطلاعات بیشتر می توانید 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 می تواند دلیل بروز چنین نتیجه‌ای باشد.

۵. چنانچه کانال سبز بالا نیامد Ct آن را برابر ۴۰ در نظر بگیرید و در فرمول بگذارید.

	Green (FAM)	Yellow (HEX)	Result
HLA-B52 Mix	Ct Green - Ct Yellow ≤ 7	Ct ≤ 30	HLA-B52 positive
	Ct Green - Ct Yellow > 8	Ct ≤ 30	HLA-B52 negative
	+/-	- Or Ct > 30	Invalid
	$7 < \Delta Ct < 8$	Ct ≤ 30	HLA-B52 Suspicious

جدول ۴. تفسیر نتایج Rotor-gene

آنالیز نتایج MIC

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 و زرد دارای منحنی سیگموئیدی و فاز لگاریتمی باشد و Ct در کانال زرد $Ct \leq 30$ باشد، و اختلاف Ct نتایج هر دو کانال کمتر از ۹ واحد باشد، نمونه دارای HLA-B52 می باشد.

۲. زمانی که Ct کنترل داخلی در کانال زرد $Ct \leq 30$ باشد، و در کانال سبز منحنی سیگموئیدی نباشد و سیگنالی در این کانال دیده نشود و یا اختلاف Ct نتایج هر دو کانال بیشتر از ۱۰ واحد باشد، نمونه دارای ژن HLA-B52 نمی باشد.

۳. زمانی که اختلاف Ct دو کانال سبز و زرد بین ۹ تا ۱۰ باشد ($9 < \Delta Ct < 10$)، فرد مشکوک به HLA-B52 می باشد و تست باید تکرار شود. تکرار نتایج مشکوک، نشان دهنده وجود مهارکننده

در استخراج است، بنابراین پیشنهاد می‌شود نمونه به میزان $\frac{1}{2}$ رقیق شود و تست تکرار گردد. 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.

۵. چنانچه کانال سبز بالا نیامد Ct آن را برابر ۴۰ در نظر بگیرید و در فرمول بگذارید.

جدول تفسیر نتایج MIC

	Green (FAM)	Yellow (HEX)	Result
HLA-B52 Mix	$Ct \text{ Green} - Ct \text{ Yellow} \leq 9$	$Ct \leq 30$	HLA-B52 positive
	$Ct \text{ Green} - Ct \text{ Yellow} > 10$	$Ct \leq 30$	HLA-B52 negative
	+/-	- Or $Ct > 30$	Invalid
	$9 < \Delta Ct < 10$	$Ct \leq 30$	HLA-B52 Suspicious

جدول ۵. تفسیر نتایج MIC

توجه: جهت دریافت برنامه‌ی آنالیز نتایج، لطفاً QR CODE زیر را اسکن نمایید.



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
	Temperature Limitation	محدودیت دمایی
	Consult Instruction For Use	مطالعه دستورالعمل
	Content sufficient for <n> tests	تعداد تست
	Use by	تاریخ انقضا
	Manufacturer	آدرس

اطلاعات تماس

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

Email: info@senmurv.ir