



Instruction for Use

HLA-B5/51 Detection RT-PCR Kit

باروش

Real-Time PCR

Cat-No: BONHLA-B5/51-24



Doc. #:IFU-HLAB5/51-01 Doc. Version: 11 Revision Date:1403-08-09

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

- BONHLA-B5/51-24

شرح کیت

این کیت بر اساس واکنش زنجیره‌ای 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 داده‌های بالینی یا آزمایشگاهی تفسیر شوند.

اصول

کیت حاضر قابلیت تشخیص تمامی زیرشاخه‌های HLA-B5/51 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 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-B5/51، احتمال ابتلا به سندرم بهجت، نسبت به دیگر افراد بیشتر است. سندروم بهجت یا بیماری بهجت یک وسکولیت سیستمیک (به مفهوم وجود التهاب در رگ‌های خونی قسمت‌های مختلف بدن) است که مخاط و پوست را درگیر می‌کند و علائم اصلی آن ایجاد زخم دردهان و دستگاه تناسلی، درگیری‌های چشمی، پوستی، رگ‌های خونی و سیستم عصبی است. آزمایش HLA-B5/51 به تقویت یا تأیید تشخیص موارد مشکوک به سندروم بهجت کمک می‌کند.

Title	24 Tests
	Volume per Vial
Master A- B5/51	240 μ l/tube $\times$ 1
Master B- B5/51	240 μ l/tube $\times$ 1
Nuclease Free Water	250 μ l /tube $\times$ 1
Positive Control B5/51	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 مورد نیاز 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 فرایند 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-B5/51، 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 مورد نیاز 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 جعبه‌های 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 شیمیایی، همیشه روپوش مناسب آزمایشگاهی، دستکش یک بار مصرف 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 میکروتیپ‌های فیلتر دار برای جلوگیری از ورود آلودگی DNA استفاده کنید.
۱۵. لطفاً لوله‌های PCR را با دو دستکش یک بار مصرف بسته‌بندی کرده و به درستی دور بیندازید. لوله‌های 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 زباله‌ها باید به درستی دور انداخته شوند.
۱۸. پس از آزمایش، محل کار را پاک کنید، پیت‌ها 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 گرفته‌شده

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 اسیدنوکلئیک 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، استخراج‌شده باشد. کیت استخراج DNA در این کیت گنجانده نشده است.

آماده‌سازی

۱. ابتدا لوله‌ها را روی رک یخ بگذارید تا محتویات آن‌ها ذوب شوند و محتویات لوله‌ها را به آرامی پیپتاژ و یا ورتکس کنید و به‌طور مختصر سانتریفیوژ کنید.
۲. مقدار ۱۰ میکرو لیتر از Master A- B5/51 را به لوله‌های PCR اضافه کنید. سپس، ۱۰ میکرو لیتر از Master B- HLA را نیز به هر لوله اضافه نمایید.
۳. پس از انتقال مستر میکس‌ها به تیوب‌های 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 لوله‌ها را به منطقه کار با اسید نوکلئیک انتقال دهید، ۵ میکرو لیتر از کنترل مثبت و ۵ میکرو لیتر از نمونه‌های بیمار را به تیوب‌های مربوطه اضافه نمایید. در حین آماده‌سازی واکنش PCR لازم است همه اجزا در دمای ۲ تا ۸ درجه سانتی‌گراد نگهداری شوند (جدول ۲).

Reaction Setup	Volume
Master A – B5/51	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. لوله‌ها را ببندید، مختصراً سانتریفیوژ کنید، آن‌ها را داخل دستگاه قرار دهید و اجازه دهید مطابق مشخصات برنامه قیدشده 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 به‌عنوان No Template Control باید گذاشته شود. در NTC به‌جای نمونه استخراج‌شده از آب استفاده می‌شود که برای کنترل آلودگی واکنش کاربرد دارد.
- بهتر است از فضاهای جداگانه برای اضافه کردن مستر واکنش و نمونه‌های بیمار استفاده کرد و همچنین در نظر داشته باشید که در ویال کنترل مثبت را تنها در محل آماده‌سازی 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 ۳ آورده شده است.

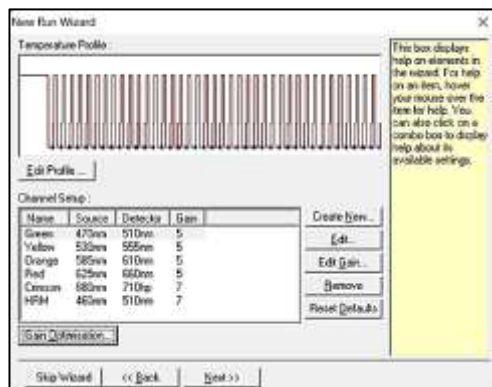
	Temperature	Hold	Cycle
Pre-Denaturation	95 °C	5 min	1
Denaturation	95 °C	20 sec	35
Annealing and Acquisition on Channel Green (FAM) And Yellow (HEX)	58°C	45 sec	
Extension	72°C	20 sec	

جدول ۳. تنظیم برنامه دستگاه ریل تایم

تعریف طیف سنجی فلورسنت در دستگاه‌ها

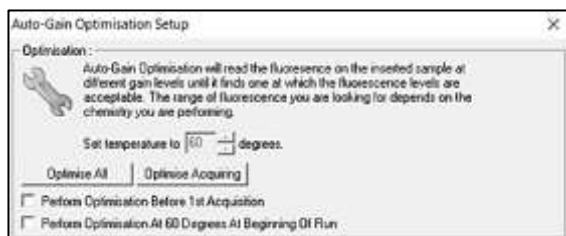
دستگاه Rotor-Gene

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



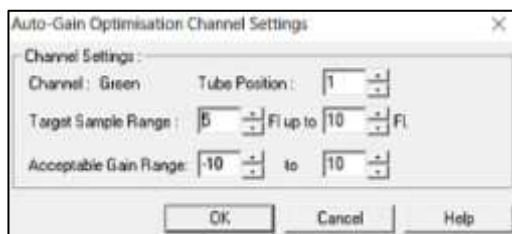
شکل ۱. تنظیمات دستگاه Rotor-Gene برای Gain Optimization

در این صفحه با انتخاب گزینه‌ی 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).



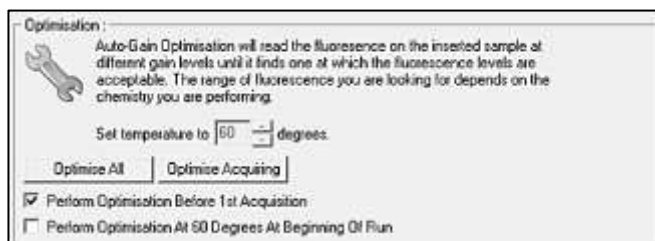
شکل ۲. تنظیمات دستگاه Rotor-Gene برای Auto Gain Optimization

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

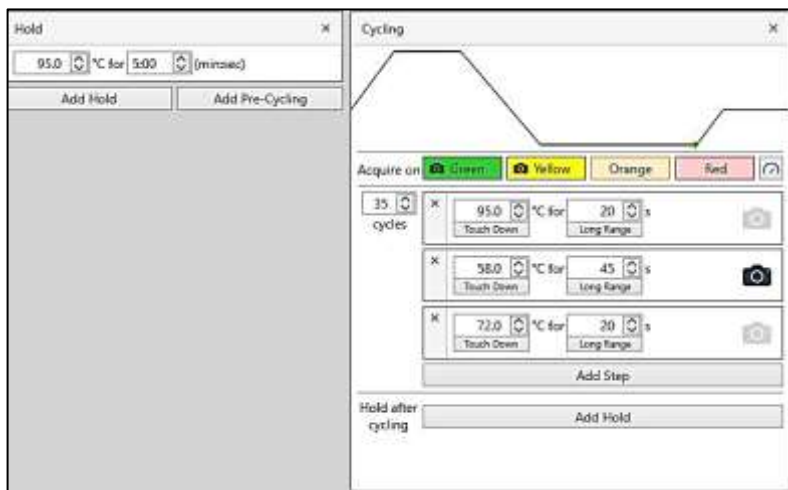
پس از انتخاب بازه‌ی مناسب برای هر کانال، گزینه‌ی **Perform Optimization Before 1st Acquisition** را انتخاب کرده و پنجره را ببندید (شکل ۴).



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

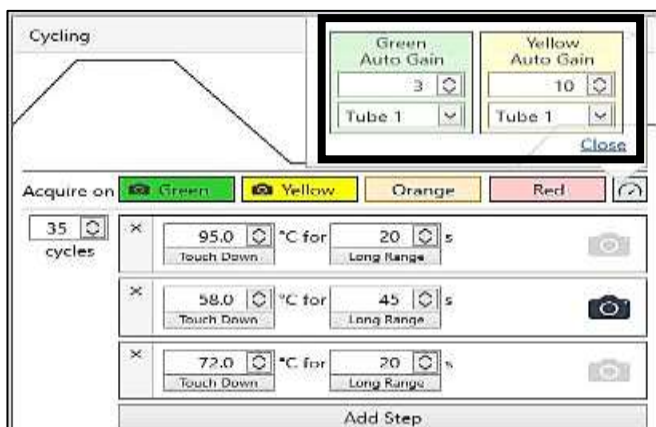
دستگاه MIC

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 مستر میکس 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-B5/51 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-B5/51 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-B51 می باشد و تست باید تکرار شود. تکرار نتایج مشکوک، نشان دهنده وجود مهارکننده در استخراج است، بنابراین پیشنهاد می شود نمونه به میزان $\frac{1}{2}$ رقیق شود و تست تکرار گردد. 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.

جدول تفسیر نتایج Rotor Gene

	Green (FAM)	Yellow (HEX)	Result
HLA-B5/51 Mix	Ct Green - Ct Yellow ≤ 7	Ct ≤ 30	HLA-B5/51 positive
	Ct Green - Ct Yellow > 8	Ct ≤ 30	HLA-B5/51 negative
	+/-	- Or Ct > 30	Invalid
	$7 < \Delta Ct < 8$	Ct ≤ 30	HLA-B51 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-B5/51 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-B5/51 نمی باشد.

۳. زمانی که اختلاف Ct دو کانال سبز و زرد بین ۹ تا ۱۰ باشد ($9 < \Delta Ct < 10$)، فرد مشکوک به HLAB51 می باشد و تست باید تکرار شود. تکرار نتایج مشکوک، نشان دهنده وجود مهارکننده در استخراج است، بنابراین پیشنهاد می شود نمونه به میزان $\frac{1}{2}$ رقیق شود و تست تکرار گردد. 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 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-B5/51 Mix	$Ct \text{ Green} - Ct \text{ Yellow} \leq 9$	$Ct \leq 30$	HLA-B5/51 positive
	$Ct \text{ Green} - Ct \text{ Yellow} > 10$	$Ct \leq 30$	HLA-B5/51 negative
	+/-	- Or $Ct > 30$	Invalid
	$9 < \Delta Ct < 10$	$Ct \leq 30$	HLA-B5/51 Suspicious

جدول ۵. تفسیر نتایج MIC

توجه: جهت دریافت برنامه‌ی آنالیز نتایج، لطفاً [اینجا](#) را کلیک کنید. یا لینک زیر را در Web Browser وارد کنید.

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

پشتیبان 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 تولید شده
	Temprature Limitation	محدودیت دمایی
	Conculta Instructon For Use	مطالعه دستورالعمل
	Content sufficient 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

Email: info@senmurv.ir