

HLA B27 REAL TIME PCR KİTİ - DNA İZOLASYONLU

Kat. No: 501R-10-02

GİRİŞ

HLA B27 (Human Leukocyte Antigen B27) kromozom 6 üzerinde yer alan ve MHC lokus B tarafından kodlanan sınıf I doku uygunluk antijenlerinden biridir. B27 pozitifliğinin birçok otoimmün hastalıkla ilişkili olduğu belirlenmiştir. En sık görüleni ankilozan spondilit'tir. Hastaların % 90-96'sında HLA B27 pozitif olduğu görülür. JRA (junenil romatoid artrit), Reaktif artrit (Reiter sendromu gibi) ve izole Akut Anterior Uveit HLA B27 pozitifliği ile ilişkili görülen diğer hastalıklardır. Ayrıca İnflamatuvar Barsak Hastalıkları ve bazı kronik hastalıklarda da pozitifliği saptanabilmektedir. Kit, **IMGT/HLA Gene FASTA 3.32.0 database'** da yer alan B27:07:01, B27:07:04, B27:24, B27:32 ve B27:70 dışındaki tüm HLA B27 alt tiplerini yüksek spesifite ile analiz eder (Bkz, Tablo 1).

TEST SİSTEMİNİN PRENSİBİ

Test prensibi, Taq DNA polimerazın 5'-3' exonuclease aktivitesine dayanmaktadır. Proben 5' ucunda bir reporter boya ve 3' ucunda da bir quencer boya bulunmaktadır. Quencer boya reporter boyanın ışmasını baskılamakta aynı zamanda da probun primer gibi davranarak uzamasına engel olmaktadır. PCR esnasında enzim aktivitesi ile birlikte reporter ve quencer arasında bulunan prob parçalanarak ayrılır ve baskılanmanın ortadan kalkmasıyla ışma meydana gelir. Bu işlem sadece hedef bölge üzerinde hibridize olmuş problemlerde gerçekleşir. Amplifikasyon miktarı arttıkça, reporter boyanın açığa çıkmasıyla birlikte ışma doğrusal olarak artmakta ve bu artış cihaz tarafından eş-zamanlı olarak tespit edilmektedir.

ÜRÜN ÖZELLİKLERİ

Kit, HLA B27 bölgesine uygun sekans spesifik primerler ve prob ile hazırlanmıştır ve 5' nükleaz PCR yöntemine uygun kimyasalları içerir.

Her hasta için HLA B27 bölgesine uygun, bir master miks ile çalışılır. Miks iki farklı primer-prob seti içermektedir. HLA B27 bölge analizi için FAM işaretli boya kullanılmıştır. Ayrıca miskin içinde, PCR çalışmasını kontrol eden (İnternal kontrol) HEX/JOE boyası ile işaretli internal kontrol mevcuttur.

Kullandığınız kit sistemi **"ready to use"** özelliğine sahiptir. Kit, Taq Polimeraz dahil Real Time PCR reaksiyonu için gerekli tüm komponentleri içermektedir.

Kit, 1 ng/μl tespit limiti (LOD) ile çok yüksek hassasiyet sağlar.

SİSTEM İÇERİĞİ

Bileşen	20 Test	50 Test
HLA B27 PCR Master Miks	400 μl	1000 μl
Solüsyon E	1000 μl x2	1700 μl x3
Pozitif Kontrol DNA*	20 μl	40 μl
Negatif Kontrol DNA*	20 μl	40 μl

*Kontrol DNA'lar plazmid içermektedir ve Plazmid DNA'ların amplifikasyon pikleri örnek DNA piklerine göre hafif farklılıklar gösterebilir.

SAKLAMA KOŞULLARI

- Tüm bileşenler – 20°C de ve karanlıkta saklanmalıdır.
- Tüm bileşenler, ürün kutusunun üzerinde belirtilen son kullanma tarihine kadar kullanılabilir.
- Sürekli eritip çözündürmek, ürünün hassasiyetinde azalmalara neden olabilir.

DNA İZOLASYONU

- Çalışmaya başlamadan önce Solüsyon E oda sıcaklığında erimeye bırakılır.
- İlk kullanımdan sonra; Solüsyon E oda sıcaklığında muhafaza edilmelidir.
- Solüsyon E**, pipetaj yaptıktan sonra **100 μl** olarak 1.5'luk mikrosantrifüj tüplerine bölünür.
- Tam kan** örneğinden **100 μl** eklenir ve 3-4 kere pipetaj yapılır. (Kan eklemeden önce periferik kan tüpleri ters düz edilerek karıştırılmalıdır.)
- 92 °C** 'de **15 dakika** inkübasyona bırakılır.
- 10.000 rpm**'de **3 dakika** santrifüj edilir.
- Süpernatanttan **5 μl DNA** olarak kullanılır.
- Çalışmada + 4 - 8 °C 'de saklanan periferik kan tüplerinin kullanılması ve izolasyonun çalışma öncesi taze yapılması önerilir.

TEST PROSEDÜRÜ

- Mix çözöldükten sonra hafif pipetaj yaparak bir örnek için, her optik kapaklı tüp veya strip'e, **20 μl master miks (Ready to use)** kullanılır. Daha sonra her tüpe **5 μl örnek DNA** 'sı eklenir.
- Optik kapaklar kapatılır ve aşağıda belirtilen programla çalıştırılır.

PCR PROGRAMI

95 °C	3 dk.	Taq Aktivasyonu
95 °C	15 sn.	35-40 Döngü*
60 °C	1 dk.	

Floresan boya olarak **FAM ve HEX/JOE** seçilmelidir.

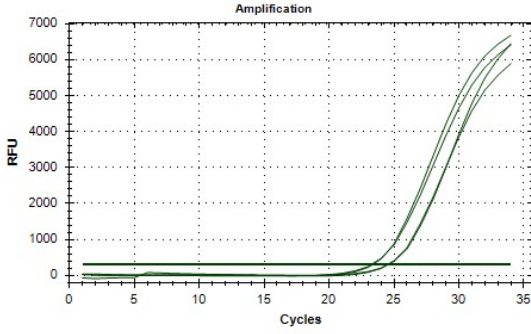
***Programdaki döngü sayısı kullanılan cihaza ve/veya kullanılan PCR tüplerine göre değişiklik gösterebilir.**

Bu sistemin çalışabileceği cihazlar:

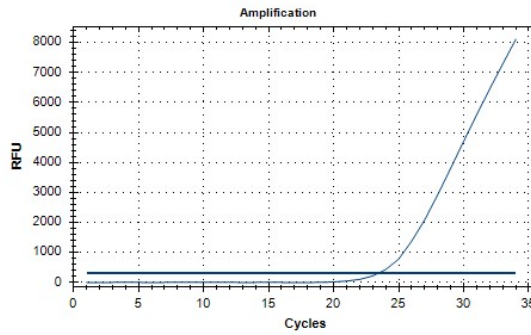
Bio-Rad CFX96, Opus 96
ABI Prism® 7500/7500 Fast
Roche LightCycler® 480 System
Rotor Gene Q
Mic qPCR Cycler
Long Gene

ANALİZ

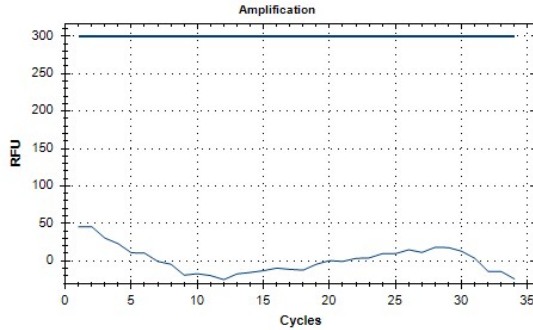
PCR işlemi bittikten sonra, sonuçlarınızı FAM ve HEX/JOE boyasında analiz edebilirsiniz. Aşağıdaki analiz resimleri Bio-RAD CFX96 cihazına aittir. İnternal Kontrol pikleri HEX/JOE boyası ile analiz edilmelidir. DNA eklenmiş tüm kuyularda internal kontrol pikleri gözlenmelidir. CT değeri ise **23 ≤ ct ≤ 33** aralığında olmalıdır (Şekil 1). Bu ct aralığı kullanılan cihaza göre ya da kullanılan PCR tüplerine göre değişiklik gösterebilir. FAM boyasında amplifikasyon piki var ise testin sonucu **"HLA B27 Pozitif"** olarak değerlendirilmelidir (Şekil: 2). FAM boyasında pik yok ise testin sonucu **"HLA B27 Negatif"** olarak değerlendirilmelidir (Şekil: 3).



Şekil 1: İnternal Kontrol (HEX/JOE Boyası)



Şekil 2: HLA B27 Pozitif Örnek (FAM Boyası)



Şekil 3: HLA B27 Negatif Örnek (FAM Boyası)

OLASI PROBLEMLER

Eğer internal kontrol negatifse,

- DNA eksikliği,
- Test'te inhibitör varlığı söz konusudur.

Eğer pikler geç başlıyorsa,

- Örneğinizin DNA'sı saf değildir veya az miktarda inhibitör içeriyor olabilir.
- Yeterli miktarda DNA elde edememiş olabilirsiniz.

Lütfen sorularınız için bizimle temasa geçin. tech@snp.com.tr

UYARILAR

- Saklama koşullarına uygun olarak saklanmalıdır.
- Oda sıcaklığında unutulmuş PCR master mikşleri kullanılmamalıdır.
- PCR master miksi oda sıcaklığında tamamen eritilip, baş aşağı edilerek hafifçe karıştırıldıktan sonra tüplere bölünmelidir.
- PCR master mikşlerin raf ömrü 12 aydır. Kullanmadan önce üretim tarihine dikkat edilmelidir.
- Yalnızca in-vitro tanı amaçlı kullanılabilir.

Tablo 1: Kitin tespit ettiği HLA B27 alt tiplerinin listesi.

HLA B27 Altıtipi			
B*27:01	B*27:05:18:01	B*27:118	B*27:207
B*27:02:01:01	B*27:05:18:02	B*27:123	B*27:208
B*27:02:01:02	B*27:05:23	B*27:131	B*27:209
B*27:02:01:03	B*27:05:31	B*27:137	B*27:210
B*27:02:01:04	B*27:05:32	B*27:142	B*27:211
B*27:02:01:05	B*27:05:33	B*27:144:01	B*27:212N
B*27:02:01:06	B*27:05:34	B*27:146	B*27:213
B*27:02:01:07	B*27:05:35	B*27:150	B*27:214
B*27:02:01:08	B*27:05:36	B*27:157	B*27:216
B*27:02:05	B*27:05:37	B*27:158	B*27:217
B*27:02:06	B*27:05:39	B*27:162	B*27:218
B*27:03	B*27:05:40	B*27:163	B*27:219
B*27:04:01	B*27:05:41	B*27:165	B*27:220
B*27:05:02:01	B*27:05:42	B*27:169	B*27:221
B*27:05:02:02	B*27:05:43	B*27:170	B*27:222
B*27:05:02:03	B*27:05:44	B*27:173	B*27:223N
B*27:05:02:04Q	B*27:05:45	B*27:174	B*27:224
B*27:05:02:05	B*27:05:46	B*27:175	B*27:227
B*27:05:02:06	B*27:05:48	B*27:176N	B*27:229
B*27:05:02:07	B*27:05:49	B*27:177	B*27:230
B*27:05:02:08	B*27:05:5	B*27:178:01	B*27:231
B*27:05:02:09	B*27:05:51	B*27:178:02	B*27:232
B*27:05:02:10	B*27:05:52	B*27:179	B*27:233
B*27:05:02:11	B*27:05:53	B*27:180	B*27:234
B*27:05:02:12	B*27:05:54	B*27:181	B*27:235
B*27:05:02:13	B*27:05:55	B*27:182	B*27:236
B*27:05:02:14	B*27:05:56	B*27:184	B*27:237
B*27:05:02:15	B*27:06:01:01	B*27:185Q	B*27:238
B*27:05:02:16	B*27:06:01:02	B*27:186	B*27:239
B*27:05:02:17	B*27:08	B*27:187	B*27:240
B*27:05:02:18	B*27:09	B*27:188	B*27:241
B*27:05:02:19	B*27:10	B*27:189	B*27:242
B*27:05:02:20	B*27:12:01:01	B*27:190	B*27:243N
B*27:05:02:21	B*27:12:01:02	B*27:191	B*27:244
B*27:05:02:22	B*27:12:01:03	B*27:192	B*27:245
B*27:05:02:23	B*27:13:01	B*27:193	B*27:246N
B*27:05:02:24	B*27:14	B*27:194	B*27:247
B*27:05:02:25	B*27:15	B*27:195	B*27:248
B*27:05:02:26	B*27:17	B*27:196	B*27:249
B*27:05:02:27	B*27:19:01:01	B*27:197	B*27:250
B*27:05:02:28	B*27:19:01:02	B*27:200	B*27:251
B*27:05:02:29	B*27:20	B*27:201	B*27:252
B*27:05:02:30	B*27:21:02	B*27:202	B*27:253Q
B*27:05:02:31	B*27:25	B*27:203	B*27:254N
B*27:05:02:32	B*27:30	B*27:204:01:01	B*27:255
B*27:05:03	B*27:90:04	B*27:204:01:02	
B*27:05:05	B*27:91	B*27:205	
B*27:05:07	B*27:101	B*27:206	

KAYNAKLAR

- Danilo Garcia Ruiz, Mário Newton Leitão de Azevedo and Omar Lupi. "HLA-B27 frequency in a group of patients with psoriatic arthritis". An Bras Dermatol. 2012;87(6):847-50.
- Jae Kyoun Ahn and Yeoung Geol Park. "Human Leukocyte Antigen B27 and B51 Double-Positive Behçet Uveitis." Arch Ophthalmol. 2007;125(10):1375-1380. doi:10.1001/archophth.125.10.1375.

Düzenleme Tarihi: 19.09.2022