

HLA B52 REAL TIME PCR KİTİ

Kat. No: 504R-10-01

GİRİŞ

HLA B5 (Human Leukocyte Antigen B5) kromozom 6 üzerinde yer alan ve MHC lokus B tarafından kodlanan sınıf I doku uygunluk antijenlerinden biridir. HLA B5 pozitifliği Behçet Hastalığı ile ilişkilendirilmektedir. Behçet Hastalığına sahip bireylerin % 70 – 80 'inde HLA B5 pozitifdir. Kit, **IMGT/HLA Gene FASTA 3.32.0 database**' da yer alan tüm HLA B52 alt tiplerini yüksek spesifite ile analiz eder.

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 ışınmasını 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 ışımaya meydana gelir. Bu işlem sadece hedef bölge üzerinde hibridize olmuş problemlerde gerçekleşir. Amplifikasyon miktarı arttıkça, reporter boyanın açığa çıkmasıyla birlikte ışımaya doğrusal olarak artmakta ve bu artış cihaz tarafından eş-zamanlı olarak tespit edilmektedir.

ÜRÜN ÖZELLİKLERİ

Kit, HLA B52 bölgesine uygun sekans spesifik primerler ve prob ile hazırlanmıştır ve 5' nükleaz PCR yöntemine uygun kimyasalları içerir.

Her hasta için HLA B52 bölgesine uygun, iki master miks ile çalışılır. Miks 1'de ve Miks 2'de HLA B52 için FAM işaretli boyayı analiz etmeniz gerekmektedir. Ayrıca Her iki miksde de PCR çalışmasını kontrol eden, 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
• HLA B52 Miks 1	400 μl
• HLA B52 Miks 2	400 μl
• Pozitif Kontrol DNA*	20 μl
• Negatif Kontrol DNA*	20 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 çözdürmek, ürünün hassasiyetinde azalmalara neden olabilir.

DNA İZOLASYONU

Örnekler steril, EDTA'lı (mor kapaklı) tüplere alınmalı, örnek alındıktan sonra kanın pıhtılaşmasına engel olmak amacı ile tüp hafifçe karıştırılmalıdır. Alınan kan örnekleri izolasyon aşamasına kadar +4°C'de saklanmalı, kan örnekleri bir aydan fazla bir süre bekletilecek ise -20°C'de muhafaza edilmelidir.

Kitimiz, SNPure ve MN NucleoSpin®Blood kitine göre optimize edilmiştir. İzolasyonun son aşamasında, elde edilen DNA'nın **150 μl elüsyon solüsyonu** ile sulandırılması tavsiye edilmektedir.

TEST PROSEDÜRÜ

- Miks 1 ve Miks 2 ayrı tüplerde çalışılmalıdır.
- Miksler çözüldükten 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.
- Aşağıda belirtilen programla çalıştırılır.

PCR PROGRAMI

95 °C	3 dk.	Taq Aktivasyonu
95 °C	15 sn.	30 Döngü
60 °C	1 dk.	

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

Eğer:

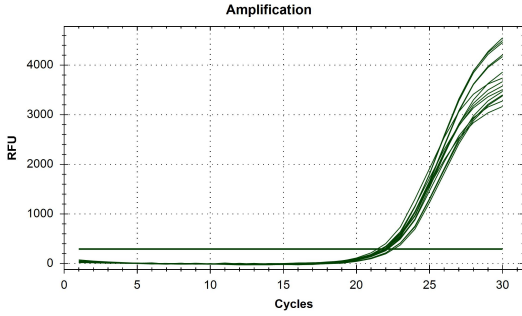
- ABI Prism® sistemi kullanıyorsanız, lütfen pasif referans olarak **"none"** seçeneğini seçiniz.
- Mic qPCR Cycler kullanıyorsanız, lütfen **"Adjust Gain Settings"** kısmında **Green Auto Gain** değerini **20'** ye, **Yellow Auto Gain** değerini **10'** a ayarlayın.

Bu sistemin çalışabileceği cihazlar:

ABI Prism® 7000/7300/7500/7900
Bio-Rad CFX96
Roche LightCycler® 480 System
Rotor Gene Q
Mic qPCR Cycler

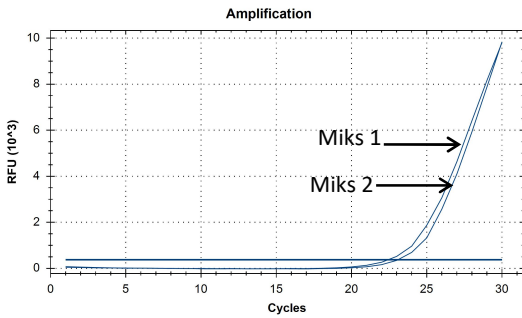
ANALİZ

PCR işlemi bittikten sonra, sonuçlarınızı FAM, ve HEX/JOE boyasında analiz edebilirsiniz. Aşağıdaki analiz resimleri Bio-Rad CFX96 cihazına aittir.



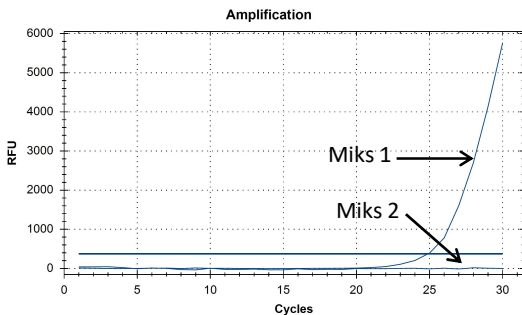
Şekil 1: İnternal Kontrol (HEX/JOE Boyası)

İnternal Kontrol pikleri HEX/JOE boyası ile analiz edilmelidir. DNA eklenmiş tüm kuyularda internal kontrol pikleri gözlenmelidir. CT değeri ise $20 \leq ct \leq 26$ aralığında olmalıdır (Şekil: 1)



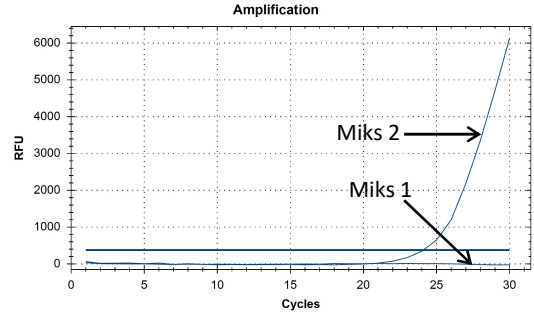
Şekil 2: HLA B52 Pozitif Örnek (FAM Boyası, iki miks sonucu da pozitif)

- Örneğiniz İki Master mikste de (FAM Boyası) pozitif ise testin sonucu **"HLA B52 Pozitif"** olarak değerlendirilmelidir (Şekil: 2).

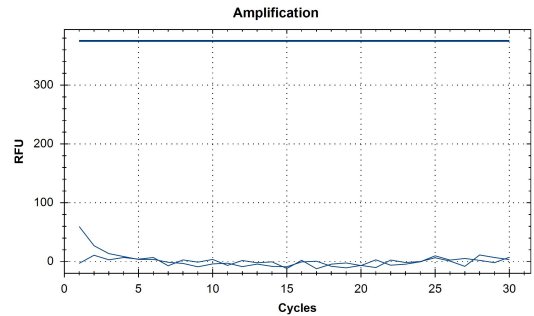


Şekil 3: HLA B52 Negatif Örnek (FAM Boyası, sadece Miks 1 sonucu pozitif, Miks 2 Negatif)

- Örneğiniz İki Master miksten (FAM Boyası) sadece birinde pozitif ya da her iki master miks için negatif ise testin sonucu **"HLA B52 Negatif"** olarak değerlendirilmelidir (Şekil: 3-4-5).



Şekil 4: HLA B52 Negatif Örnek (FAM Boyası, sadece Miks 2 sonucu pozitif, Miks 1 Negatif)



Şekil 5: HLA B52 Negatif Örnek (İki master miks de negatif)

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 miksleri kullanılmamalıdır.
- PCR master miksi oda sıcaklığında tamamen eritilip, baş aşağı edilerek hafifçe karıştırıldıktan sonra tüplere bölünmelidir.
- PCR master mikslerin raf ömrü 12 aydır. Kullanmadan önce üretim tarihine dikkat edilmelidir.
- Yalnızca in-vitro tanı amaçlı kullanılabilir.

Düzenleme Tarihi: 06.04.2016