

HLA B27 REAL TIME PCR KİTİ

Kat. No: 501R-10-01

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.

TEST SİSTEMİNİN PRENSİBİ

Test prensibi, Taq DNA polimerazın 5'-3' exonuclease aktivitesine dayanmaktadır. Probenin 5' ucunda bir reporter boya ve 3' ucunda da bir quencer boya bulunmaktadır. Quencer boya reporter boyanın ışımamasını 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 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 miks 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
• HLA B27 PCR Master Miks	400 µl
• Pozitif Kontrol DNA	20 µl
• Negatif Kontrol DNA	20 µl

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

Örnekler steril, EDTA'lı (mor kapaklı) tüplere alınmalı, örnek alındıktan sonra kanın pıhtılaşmasına engel olmak amacıyla 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, MN NucleoSpin®Blood kitine göre optimize edilmiştir. İzolasyonun son aşamasında, elde edilen DNA'nın **150 µl elüsyon solüsyonu** ile sulandırılması tavsiye edilmektedir.

TEST PROSEDÜRÜ

- Mix 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 (~10-100 ng) 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 Cyler 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

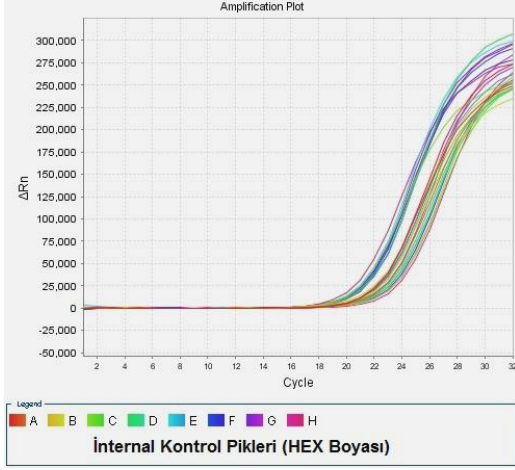
Roche LightCycler® 480 System

Rotor Gene Q

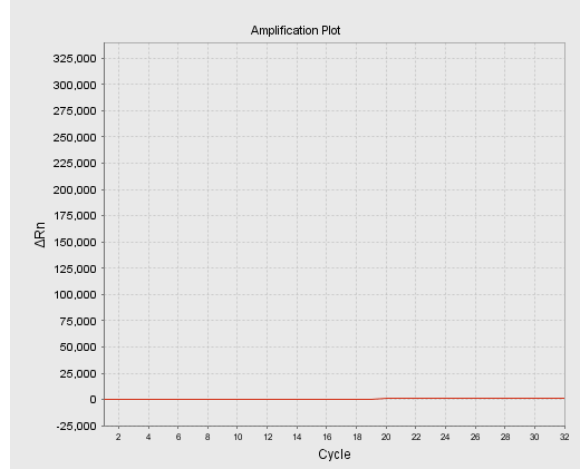
Mic qPCR Cyler

ANALİZ

PCR işlemi bittikten sonra, sonuçlarınızı FAM ve HEX/JOE boyasında analiz edebilirsiniz. Aşağıdaki analiz resimleri ABI7500 cihazına aittir.

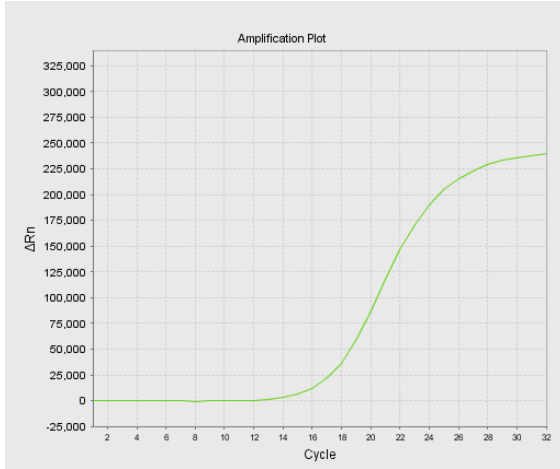


Şekil 1: İnternal Kontrol (HEX/JOE Boyası)



Şekil 3: HLA B27 Negatif Örnek (FAM Boyası)

İnternal Kontrol pikleri HEX/JOE boyası ile analiz edilmelidir. DNA eklenmiş tüm kuyularda internal kontrol pikleri gözlenmelidir. CT değeri ise $22 \leq ct \leq 26$ aralığında olmalıdır.



Şekil 2: HLA B27 Pozitif Örnek (FAM Boyası)

- Örneğiniz FAM boyasında pozitif ise testin sonucu "**HLA B27 Pozitif**" olarak değerlendirilmelidir (Şekil: 2).

- Örneğiniz FAM boyasında negatif ise testin sonucu "**HLA B27 Negatif**" olarak değerlendirilmelidir (Şekil: 3).

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