



کیت PCR شناسایی HLA B27

Version 5

۱- محتوای کیت

Color tube	Content	Quantity
Green	B27 PCR Mix	470 µl
Colorless	B27 Negative gDNA	60 µl
Red	B27 Positive gDNA	60 µl

۲- ویژگیهای تکنیکی کلی کیت

تکنولوژی	Post-PCR
نوع بررسی	کیفی
توالی هدف	B*2701-2709
حساسیت	حداقل 5 ng/µl
اختصاصیت تشخیص	98%
حساسیت تشخیص	98%
نوع نمونه	خون تام
ذخیره	-20°C ± 5
دستگاههای مناسب	Thermal Cycler

۳- پروتوکل

الف- برای هر بیمار یک تیوب مجزا در نظر گرفته شود. تیوب ها با نام بیمار نشانه گذاری گردد. همچنین یک تیوب برای کنترل منفی کیت (DNA فرد فاقد ال B27) و یک تیوب برای کنترل مثبت کیت (DNA فرد دارای ال B27) نشانه گذاری گردد.

ب- درون تمامی تیوب ها ۱۸ میکرولیتر از محتویات ویال B27 PCR Mix اضافه نمایید.

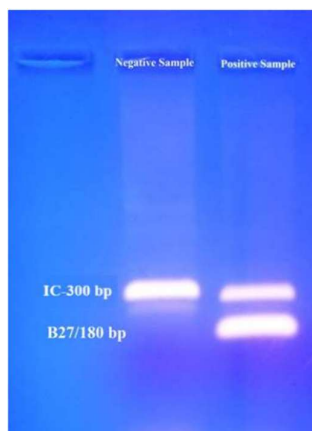
ج- سپس ۲ میکرولیتر از DNA استخراج شده به طور مجزا به تیوب های مشخص شده بیمار اضافه گردد. این عمل برای کنترل های منفی و مثبت نیز انجام شود.

د- بعد از vortex و Spin تیوب ها ، تیوب ها در دستگاه PCR بار گذاری شده و برنامه زیر اجراء می گردد:

Initial denaturation	95 °C/15 min	1 repeat
Denaturation	95 °C/15 sec	34 repeat
Annealing	58 °C/20 sec	
Extension	72 °C/30 sec	
Final extension	72 °C/5 min	1 repeat

۴- الکتروفورز ژل آگاروز

پس از پایان PCR ، محصولات تکثیری با رنگ Safe Stain GelRed (Cat No:1146-1ml, PZP) یا سایر رنگهای فلورسنت مناسب مخلوط و درون چاهکهای ژل آگاروز 2.5٪ بارگذاری و به مدت ۳۰ دقیقه در ولتاژ مناسب الکتروفورز گردد. حضور قطعه ۱۸۰ جفت بازی نشانه حضور ال B27 می باشد. قطعه تکثیری ۳۰۰ جفت بازی کنترل داخلی است که برپایه یکی از ژنهای انسانی می باشد و باید در تمامی میکروتیوب های واکنش مشاهده شود.



توجه: برای انجام صحیح HLA Typing به DNA الگو با غلظت پایین نیاز می باشد. برای اجتناب از باند های ناخواسته توصیه می گردد حجم بافر Elution نهایی که به ستون استخراج اضافه می گردد، کمتر از ۲۰۰ میکرولیتر نباشد.

۵- آزمایش نامعتبر

در صورتی که تیوب حاوی کنترل منفی حاوی قطعه ۱۸۰ جفت بازی باشد یا تیوب کنترل مثبت فاقد قطعه ۱۸۰ جفت بازی باشد آزمایش نامعتبر بوده و مجدد باید تکرار گردد. در میکروتیوب مربوط به بیمار باید قطعه کنترل داخلی (۳۰۰ جفت بازی) تکثیر شده باشد در غیر این صورت DNA ژنومی استخراج شده نامناسب است و باید مجدد و به درستی استخراج شود.