راهنما دفترچه

کیت شناسایی و سنجش کیفی

HLA-B52

با روشReal-Time PCR

Doc. #: IFU-HLA52-01 Doc. Version: 01 Revision Date 02-13-2023

فهرست مطالب

شماره رفرانس ۳

شرح کیت ۳

اصول ۳

اطلاعات ژن ۳

نگهداری و انتقال کیت ۴

نکات احتیاط عمومی ۵

هشدارها و محدودیت‌ها ۶

عوامل تداخلی ۷

آمادهسازی ۷

اضافه کردن الگو ۸

برنامه دمایی ۹

تعریف طیف سنجش فلورسنت در دستگاه ها ۱۰

آنالیز نتایج Rotor Gene ۱۲

جدول تفسیر نتایج Rotor Gene ۱۳

آنالیز نتایج MIC ۱۳

جدول تفسیر نتایج MIC ۱۴

نشانه ها ۱۵

اطلاعات تماس ۱۵

شماره رفرانس

- BONHLAB52-24

شرح کیت

این کیت بر اساس واکنش زنجیره‌ای پلیمراز (PCR) به صورتReal-Time ساخته شده است. این محصول برای تشخیص در شرایط آزمایشگاهی تهیه شده است.نتایج به‌دست‌آمده توسط این محصول باید همراه با سایر داده‌های بالینی یا آزمایشگاهی تفسیر شوند.

اصول

کیت حاضر قابلیت تشخیص تمامی زیرشاخه ها ی HLA-B52 را توسط واکنش زنجیره‌ای پلیمراز (PCR) دارد. در واکنش Real-Time PCR محصول تکثیر شده از طریق فلوروسنت شناسایی می‌شوند. مشاهده شدت فلوروسنت در حین واکنش PCR (به صورت Real-Time) تشخیص محصولات در حال تکثیر را بدون نیاز به بازکردن مجدد لولههای واکنش پس از اجرای PCR ممکن می‌سازد.

اطلاعات ژن

کمپلکس اصلي سازگاري بافتی یا MHC که نقش اساسي در بروز پاسخ ايمني نسبت به آنتي ژن هاي پروتئيني ايفا ميكنند، در انسان تحت عنوان آنتي ژن هاي لكوسيتي انسان يا HLA شناخته می شوند. هر فرد ترکیبی ارثی از ژن های HLA دارا است که بسیاری از آنتی ژن های موجود در سطح سلول های خود را کد می کند. وجود یا عدم وجود هر آنتی ژن، ترکیبی مشخص برای HLA هر فرد ایجاد می کند. در افرادی که واجدHLA-B52 در ترکیب خود هستند، احتمال ابتلا به بیماری آرتریت تاکایاسو نسبت به دیگر افراد افزایش می یابد. HLA-B52 همچنین نقش مهمی در بروز همزمان بیماری کولیت اولسراتیو (Colitis Ulserative)ایفا می کند. بنابراین، شناسایی آن در فرایند تشخیص و مدیریت بیماری دارای اهمیت بسیار است.

محتویات کیت

Title	24 Tests
	Volume per Vial
Master A- B52	240 µl/tube × 1
Master B- B52	240 µl/tube × 1
Nuclease Free Water	200 µl /tube × 1
Positive Control B52	50 µl/tube × 1

نگهداری و انتقال کیت

- ✓ کلیه محتویات این کیت باید در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد و در تاریکی نگهداری گردد، همچنین به منظور انتقال و جابه جایی کیت از یونولیت با درب و یخخشک استفاده نمایید.
- ✓ نگهداری کیت دردمای ۴ درجه سانتی‌گراد هیچگاه نباید بیشتر از یکساعت شود.
- ✓ این کیت نیاز به حمل برروی بسته‌های یخزده (Frozen Ice Pack) را دارد.
- ✓ همه مواد موجود در کیت تا تاریخ انقضا، همان‌طور که روی برچسب بسته‌بندی محصول مشخص شده است، در شرایط مشخص شده پایدار هستند.
- ✓ از چرخه‌های متعدد ذوب و انجماد (Freeze-Thaw) خودداری کنید زیرا سبب کاهش حساسیت و درنتیجه عدم کارایی کیت می‌شود.
- ✓ از قراردادن مستقیم اجزای کیت در معرض نور، گرما یا رطوبت خودداری کنید.
- ✓ معرف‌ها را قبل از استفاده در دمای اتاق (۱۵ تا ۲۵ درجه سانتی‌گراد) ذوب کنید. پس از ذوب شدن مواد موجود در کیت، لوله‌ها را به طور مختصر اسپین کنید تا مطمئن شوید که مواد موجود در کیت به طور یکنواخت مخلوط شده‌اند.

مواد و تجهیزات مورد نیاز که باید توسط کاربر تدارک دیده شود:

۱. کیت استخراج DNA
۲. سمپلر قابل تنظیم در اندازههای مختلف و نوك سمپلر فیلتردار
۳. سانتریفوژ رومیزي
٤. بلوك خنك كننده
٥. وایتکس ۱۰ درصد
٦. گان و دستکش
۷. دستگاه با قابلیت خوانش در کانال‌های فلوروسنت مخصوص Green وYellow
۸. نرم‌افزار 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 درحین کار دستورالعمل را دقیقاً دنبال کنید.

✓ لطفاً قبل از استفاده، ابزارهای Real-Time PCR سازگار را بررسی کنید و فرآیند را با آن‌ها جلو ببرید.

✓ از کیت یا اجزای کیت پس از تاریخ انقضا استفاده نکنید.

✓ در کیت آزمایش از ماده دیگری استفاده نکنید.

۲. استفاده از سرسمپلرهای فیلتردار وRNase & DNase free
۳. نگهداری و تخلیص نمونههای گرفته شده، کنترلها و محصولات حاصل از PCR باید در محلی کاملا جدا از محل نگهداری و آماده سازی مسترمیکس صورت پذیرد.
٤. همه مواد مورد نیاز کیت قبل از شروع کار باید به طورکامل در دمای اتاق ذوب شود.
٥. بعد از ذوب شدن، کلیه مواد را به خوبی پیپتاژ نمایید و بهطور مختصر اسپین کنید. این امر برای جلوگیری از کاهش عملکرد کیت در طی زمان بهطورکامل توصیه میشود.
٦. تمام مراحل مربوط به تهیه مسترمیکس باید بر روی یخ یا جعبههای سرد(Cooling Box) انجام شود. استوک اصلی مربوط به مسترمیکس بعد از برداشتن مقدار مورد نیاز از آن باید به سرعت به فریزر منتقل شود.

۷. هنگام کار با مواد شیمیائي، روپوش مناسب آزمایشگاهي، دستکش یکبار مصرف، وعینك هاي محافظ داشته باشید.
۸. 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 کاملا جدا کنید.
۹. PCR بسیار حساس به آلودگی متقابل است، پس فرآیند کار را با دقت انجام دهید.
۱۰. هنگام کار با نمونه‌ها و مواد موجود در کیت، برای جلوگیری از آلودگی، دستکش‌ها باید مرتباً تعویض شوند.
۱۱. از تیپ‌های جداگانه و اختصاصی استفاده کنید. هنگام کار با نمونه‌ها و مواد موجود در کیت از میکروتیپ‌های فیلتردار برای جلوگیری از ورود آلودگی RNA وDNA استفاده کنید.
۱۲. لطفاً لوله‌های PCR را با دو دستکش یکبار مصرف بسته‌بندی کرده و به‌درستی دور بیندازید. لوله‌های PCR پس از امپلیفای را باز نکنید.
۱۳. از استفاده ی مجدد مواد یکبار مصرف بپرهیزید.
۱٤. مواد موجود درکیت که بلا استفاده شدند، کیت استفاده شده و زباله‌ها باید به درستی دور انداخته شوند.
۱۵. پس از آزمایش، محل کار را پاک کنید، پیپت‌ها و تجهیزات را با اسپری اتانول ۷۵٪ و وایتکس ۱۰٪ تمیز کنید.

هشدارها و محدودیت‌ها

۱. تمامی مراحل آزمایش باید بر اساس اصول GLP[۱] توسط پرسنل آموزش دیده دارای پوشش حرفه ای و محافظ (PPE[۲]) انجام شود. آزمایش‌های بالینی بر نمونه‌ها باید در هود کلاس دو (Class II Biological Safety Cabinet) در محیط BSL-۲ انجام شود. (استفاده از دستورالعمل: Interim Laboratory Biosafety Guideline For Handling and Processing Specimen Associated)
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 محل استخراج DNA، آماده‌سازی مخلوط واکنش از فضای آماده‌سازی و اضافه کردن نمونه و نمونه کنترل مثبت جدا باشند زیرا ممکن است نتایج مثبت کاذب به وجود آید.
٤. پس از آماده‌سازی مخلوط واکنش، آن را در تاریکی نگهداری نمایید.

---

[۱] Good Laboratoty Practice

[۲] Personal Protective Equipment

کنترل‌ها

۱. نمونه بیمار: از محتویات اسید نوکلئیک حاصل از استخراج DNA 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 به‌جای نمونه در یک واکنش استفاده شود.

نگهداری نمونه‌های گرفته شده

نمونه می‌تواند کمتر از ۸ ساعت در یخچال با محدوده دما از ۲ تا ۸ درجه سانتی‌گراد و برای نگهداری طولانی‌مدت 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.

عوامل تداخلی

(HCl (1N ،EDTA (0.5M)، دانه‌های سیلیس (۱μl)، خون (۱μl)، اوره (۴۰ گرم در ۱۰۰ میلی‌لیتر) و بافر لیز عملکرد آزمایش را مهار میکنند. توجه شود که در هنگام نمونه گیری از هپارین استفاده نشود. وجود مهارکننده در واکنش با ژن کنترل داخلی قابل ردیابی است.

خالص‌سازی نوکلئیک اسید

جداسازی اسید نوکلئیک باید توسط کیت‌های جداسازی موجود در بازار مطابق پروتکل‌های جداسازی مواد بالینی خاص انجام شود.
مواد نمونه باید از نمونه ی خونی که توسط EDTA از انعقاد آن جلوگیری شده است، استخراج شده باشد.
کیت استخراج DNA در این کیت گنجانده نشده است.

آمادهسازی

۱. ابتدا لوله‌ها را رویرکیخ بگذارید تا محتویات آن‌ها ذوب شوند و لوله‌های بافر واکنش، پرایمر پروب و کنترل مثبت را به آرامی ورتکسکنید و بهطور مختصر اسپین کنید.
۲. مقدار ۱۰میکرولیتر از ۵۲Master A- B را به لوله‌های PCR اضافه کنید.
۳. به هر لوله مقدار ۱۰ میکرولیتر از ۵۲Master B-B اضافه کنید.
۳. مقدار ۵ میکرولیتر از نمونه اسید نوکلئیک جدا شده یا ۵ میکرولیتر کنترل مثبت را به لوله‌های PCR جداگانه اضافه کرده و با پیپتینگ مخلوط کنید. در حین تهیه PCR لازم است همه اجزا در دمای ۲ تا ۸ درجه سانتیگراد نگهداری شوند. از موادبالینی منفی می‌توان به‌عنوان کنترل جداسازی منفی استفاده کرد.

٤. لوله‌ها را ببندید، مختصراً اسپین کنید، آنها را داخل دستگاه قرار داده و اجازه دهید مطابق مشخصات برنامه قید شده در این دفترچه تکثیر شوند. هنگام استفاده از کنترل مثبت یا مواد بالینی بسیار مراقب باشید.
٥. در این مرحله، بهتر است از فضاهای جداگانه برای اضافه‌کردن مستر واکنش و نمونه‌های بیمار استفاده کرد و همچنین در نظر داشته باشید که در ویالکنترل مثبت را تنها در محل آماده‌سازی مستر واکنش و فضای تمیز باز کنید.
نکته در هر بار انجام تست یک لوله به‌عنوان NTC (No Template Control) باید گذاشته شود. در NTC به‌جای نمونه استخراج شده از آب استفاده می‌شود که برای کنترل آلودگی واکنش کاربرد دارد.

اضافه کردن الگو

پس از آماده سازی محلول‌ها و انتقال آن به تیوب‌های واکنش، ابتدا نمونه کنترل منفی (NTC) را آماده کنید. برای این کار، ٥ میکرولیتر از آب بدون نوکلئاز را به تیوب کنترل منفی اضافه نمایید. پس از انتقال به منطقه کار با اسیدنوکلئیک، ٥ میکرولیتر از کنترل مثبت و٥ میکرولیتر از نمونه‌های بیمار را به تیوب‌های مربوطه اضافه نمایید. سپس تیوب‌ها را در دستگاه ترمال سایکلر قرار داده و نمونه‌ها را نام‌گذاری کنید.

Reaction Setup	Volume
Master A- B52	10 µl
Master B- B52	10 µl
Sample or Control	5 µl
Final volume	25 µl

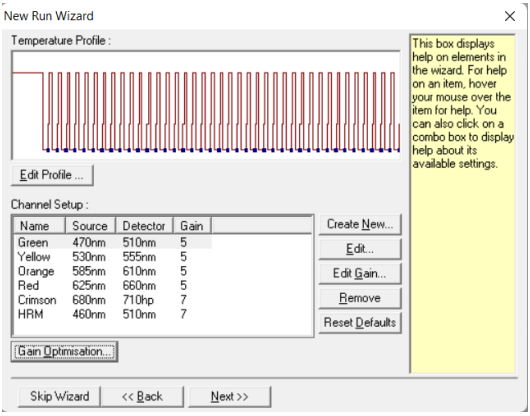
برنامه دمایی

دستورالعمل برای دستگاه‌های Real-Time PCR دارای کانال Green و Yellow توصیف شده است. پس از تنظیمکردن دستگاه مطابق برنامه زیر، واکنش را راه اندازی کنید. برای آگاهی از نحوه تعریف کانال در دستگاه Rotor Gene به کاتالوگ دستگاه مراجعه کنید. مقادیر دمایی هر قسمت در جدول صفحه بعد آورده شده است.

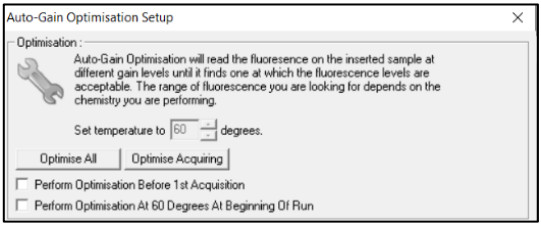
	Temperature	Hold	Cycle
Pre-Denaturation	95 ℃	5 min	1
Denaturation	95 ℃	20 sec	35
Annealing and Acquisition on Channel Green And Yellow	58 ℃	45 sec	
Extension	72 ℃	20 sec	

دستگاه Rotor-Gene

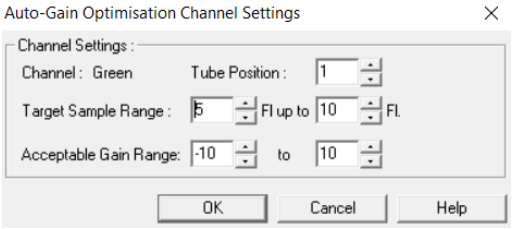
بدین منظور در دستگاه Rotor-gene گزینه‌ی Gain Optimization را انتخاب کنید.



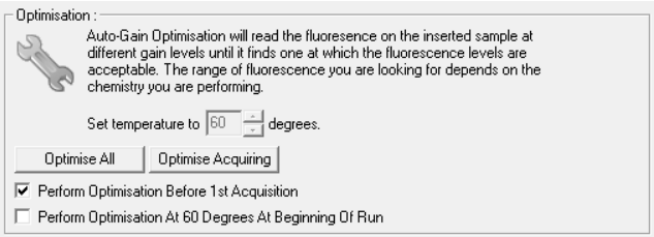
در این صفحه با انتخاب گزینه‌ی Optimise Acquiring برای هر ۲ کانال سبز و زرد بازه‌ی Target sample range از ۵ تا ۱۰ (حالت پیش‌فرض دستگاه) انتخاب شود.



همچنینGain دستگاه باید برمبنای تیوب اول انجام شود.

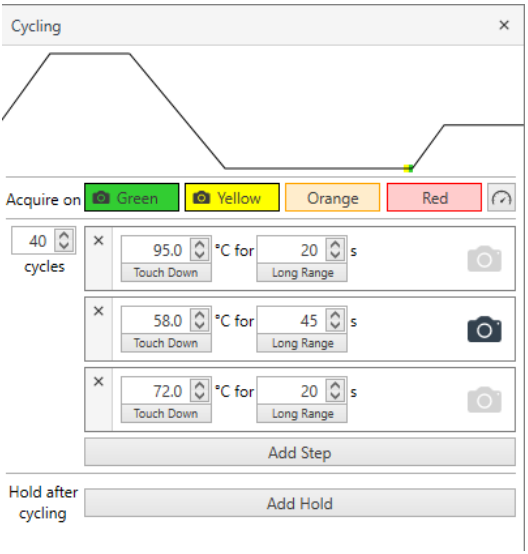


پس از انتخاب بازه‌ی مناسب برای هر کانال، گزینه‌یPerform Optimization Before 1st Acquisation را انتخاب کرده، و پنجره را ببندید.



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.



آنالیز نتایج Rotor Gene

۱.آنالیز نتایج توسط نرم افزار مربوطه و بر اساس دستورالعمل دستگاه انجام شود. در کانال رنگی سبز آستانه را در بازه‌ی ۰٫۰۲ قرار دهید. بعد از آنالیز باید نتایج را به صورت زیر تفسیر کرد:

۱. چنانچه نمونه در کانال سبز و زرد دارای منحنی سیگموئیدی و فاز لگاریتمی باشد، و Ct در کانال زرد کمتر از ۳۰ باشد، و اختلاف Ct نتایج هر دوکانال کمتر از ۷ واحد باشد، نمونه دارای HLA-B۵۲ می باشد.

۲. زمانیکه Ct کنترلداخلی در کانال زرد کمتر از ۳۰ باشد، و در کانال سبز منحنی سیگموئیدی نباشد و یا سیگنالی در این کانال دیده نشود و یا اختلاف Ct نتایج هر دوکانال بیشتر از ۷ واحد باشد، نمونه دارای ژن HLA-B۵۲ نمی باشد.

۳. زمانی که کنترل داخلی تکثیر نشده و نتیجه کانال زرد منفی و یا Ct<۳۰ باشد، تست فاقد اعتبار است و باید تکرار شود. استخراج نامناسب یا خطا در آزمایش می تواند دلیل بروز چنین نتیجه ای باشد.

جدول تفسیر نتایج Rotor Gene

	Yellow	Green	Result
HLA-B52 Mix	+ Ct(<30)	+ Or Ct Green - Ct Yellow ≤ 7	HLA-B52 positive
	+ Ct(<30)	- Or Ct Green - Ct Yellow > 7	HLA-B52 negative
	- Ct(>30)	-	Invalid

آنالیز نتایج MIC

۱.آنالیز نتایج توسط نرم افزار مربوطه و بر اساس دستورالعمل دستگاه انجام شود. در کانال رنگی سبز آستانه را در بازه‌ی ۰/۰۳ قرار دهید. بعد از آنالیز باید نتایج را به صورت زیر تفسیر کرد:

۱. چنانچه نمونه در کانال سبز و زرد دارای منحنی سیگموئیدی و فاز لگاریتمی باشد، و Ct در کانال زرد کمتر از ۳۰ باشد، و اختلاف Ct نتایج هر دوکانال کمتر از**9** واحد باشد، نمونه دارای HLA-B۵۲ می باشد.

۲. زمانیکه Ct کنترلداخلی در کانال زرد کمتر از ۳۰ باشد، و در کانال سبز منحنی سیگموئیدی نباشد و سیگنالی در این کانال دیده نشود و یا اختلاف Ct نتایج هر دوکانال بیشتر از **9**واحد باشد، نمونه دارای ژن HLA-B۵۲ نمی باشد.

۳. زمانی که کنترل داخلی تکثیر نشده و نتیجه کانال زرد منفی و یا Ct<۳۰ باشد، تست فاقد اعتبار است و باید تکرار شود. استخراج نامناسب یا خطا در آزمایش می تواند دلیل بروز چنین نتیجه ای باشد.

جدول تفسیر نتایج MIC

	Yellow	Green	Result
HLA-B52 Mix	+ Ct(<30)	+ Or Ct Green - Ct Yellow ≤ 9	HLA-B52 positive
	+ Ct(<30)	- Or Ct Green - Ct Yellow > 9	HLA-B52 negative
	- Ct(>30)	-	Invalid

نشانه ها

	Research Use Only	برای مصارف پژوهشی
	Catalog Number	کد کالا
	Batch Number	شماره بچ تولید شده
	Temprature Limitation	محدودیت دمایی
	Concult Instructon For Use	مطالعه دستورالعمل
	Content sufficent for <n> tets	تعداد تست
	Use by	تاریخ انقضا
	Manufacturer	آدرس

اطلاعات تماس

شرکت فناوری بن یاخته- گروه سین مورو

دفتر مرکزی : تهران، سعادت آباد، میدان فرهنگ، بلوار 24 متری سعادت آباد، خیابان حیدرنیا (دوم شرقی)، پلاک9 ، شرکت فناوری بن یاخته

کد پستی: 1997775555 پشتیبان فنی: 09301821601

تلفن تماس 02122082120

Web Site: www.Senmurv.co Email: info@senmurv.ir