کیت PCR شناسایی HLA B27

Version 1.2

۱- محتوای کیت :

Color tube	Content	Quantity
Green	B27 Mix	500 µl
Red	B27 Positive control	100 µl
Colorless	B27 Negative control	100 µl

۲- ویژگیهای تکنیکی کلی کیت :

تکنولوژی	PCR
نوع بررسی	کیفی
توالی هدف	**B*2701-2709**
حساسیت	حداقل 5 ng/µl
اختصاصیت تشخیص	۱۰۰٪
حساسیت تشخیص	95%
نوع نمونه	خون تام
ذخیره	-20°C ± 5
دستگاههای مناسب	Thermal Cycler

۳- پروتوکل :

a) برای هر بیمار یک تیوب مجزا در نظر گرفته میشود. تیوب ها با نام بیمار نشانه گذاری میشود. همچنین یک تیوب برای کنترل منفی و یک تیوب برای کنترل مثبت نشانه گذاری میشود.

b) درون تمامی تیوب ها 15 میکرولیتر از محتویات ویال B27 Mix بریزید (قبل از استفاده و پس از ذوب شدن کامل چند بار با سر وته کردن مخلوط و سپس اسپین گردد).

c) سپس 5 میکرولیتر از DNA استخراج شده به طور مجزا به تیوب های مشخص شده بیماران اضافه میشود. این عمل برای کنترل های منفی (Water) و مثبت (B27 Positive) نیز انجام گیرد.

d) بعد از vortex و Spin تیوب ها ، تیوب ها در دستگاه PCR بار گذاری شده و برنامه زیر اجراء میشود:

Initial denaturation	95 °C/15 min	1 repeat
Denaturation	95 °C/25 sec	34 repeat
Annealing	58 °C/30 sec	
Extension	72 °C/35 sec	
Final extension	72 °C/5 min	1 repeat

۴- الکتروفورز ژل آگاروز :

پس از پایان PCR ، محصولات تکثیری با رنگ GelRed مخلوط و درون چاهکهای ژل آگاروز ۲% بارگذاری و به مدت ۱۵-۲۰ دقیقه در ولتاژ ۱۰۰ ولت الکتروفورز میگردند. حضور قطعه ۱۵۰ جفت بازی نشانه حضور الل B27 می باشد. قطعه تکثیری ۲۸۵ جفت بازی کنترل داخلی است که برپایه یکی از ژن‌های انسانی می باشد و باید در تمامی میکروتیوب‌های واکنش به غیر از کنترل منفی مشاهده شود.

توجه: در صورت داشتن باند ناخواسته غلظت DNA را به نصف کاهش دهید (غلظت مناسب در هر واکنش 80 ng باشد).

۵- آزمایش نامعتبر :

در صورتی که تیوب حاوی کنترل منفی حاوی قطعه ۱۵۰ جفت بازی باشد یا تیوب کنترل مثبت فاقد قطعه ۱۵۰ جفت بازی باشد آزمایش نامعتبر بوده و مجدد باید تکرار گردد. در میکروتیوب مربوط به بیمار باید قطعه کنترل داخلی (285 bp) تکثیر شده باشد در غیر این صورت DNA ژنومی استخراج شده نامناسب است و باید مجدد و به درستی استخراج شود.