



کیت PCR شناسایی HLA B5

Version 1.2

۱- محتوای کیت :

Color tube	Content	Quantity
Green	B5 Mix	500 µl
Red	B5 Positive control	100 µl
Colorless	B5 Negative control	100 µl

۲- ویژگیهای تکنیکی کلی کیت :

PCR	تکنولوژی
کیفی	نوع بررسی
B*5101-5105, 51V, B51GAC, 52011, 52012	توالی هدف
حداقل 5 ng/µl	حساسیت
۱۰۰%	اختصاصیت تشخیص
95%	حساسیت تشخیص
خون تام	نوع نمونه
-20°C ± 5	ذخیره
Thermal Cycler	دستگاههای مناسب

۳- پروتوکول :

(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، 20 میکرولیتر از محتویات ویال B5 Mix بریزید (قبل از استفاده و پس از ذوب شدن کامل چند بار با سر و ته کردن مخلوط و سپس اسپین گردد).

(c) سپس 5 میکرولیتر از DNA استخراج شده را به طور مجزا به تیوب های مشخص شده بیماران اضافه نماید. این عمل برای کنترل های منفی (آب مقطر استریل) و مثبت (کنترل مثبت کیت) نیز انجام گیرد.

(d) بعد از vortex و Spin تیوب ها ، تیوب ها در دستگاه PCR قرار داده و برنامه زیر اجراء شود:

Initial denaturation	95 °C/15 min	1 repeat
Denaturation	95 °C/35 sec	34 repeat
Annealing	65 °C/20 sec	
Extension	72 °C/40 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 لثاژ مناسب الکتروفورز گردد. حضور قطعه ۴۰۰ جفت بازی نشانه حضور ال B5 می باشد.

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 ۴۰۰ جفت بازی باشد یا تیوب کنترل مثبت فاقد قطعه ۴۰۰ جفت بازی باشد آزمایش نامعتبر بوده و مجدد باید تکرار گردد.