کیت PCR شناسایی HLA B52

Version 1.2

۱- محتوای کیت :

Color tube	Content	Quantity
Green	B52 Mix	500 µl
Red	B52 Positive control	100 µl
Colorless	B52 Negative control	100 µl

۲- ویژگیهای تکنیکی کلی کیت :

تکنولوژی	PCR
نوع بررسی	کیفی
توالی هدف	**B*52011,52012**
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، 20 میکرولیتر از محتویات ویال B52 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 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 لتاژ مناسب الکتروفورز گردد. حضور قطعه ۴۰۰ جفت بازی نشانه حضور الل B52 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.