SimReal™ HLA-B51 Detection Kit

Cat. No:SBL11-0873

معرفی کیت :

بیماری بهجت (Behcets disease) یک اختلال مزمن، التهابی و چند سیستمی است که عمدتا در جمعیت آسیایی، خاورمیانه و مدیترانه دیده می شود. به استثنای آفت دهان، بقیه ی علائم بیماری بهجت بسیار متنوع هستند. به عنوان مثال زخم های تناسلی مکرر و درگیری پوست، مفاصل، چشم، عروق و/ CNS. مطالعات فراوانی در دهه های اخیر ارتباط بسیار قوی بین وجود HLA-B5 با بروز بیماری بهجت را ثابت کرده اند. در سال های اخیر این ارتباط به طور خاص در آلل شایع B5 یعنی HLA-B51 مشاهده شده است.

اساس کار:

کیت SimReal™ HLA-B51 Detection Kit براساس تکنولوژی SyberGreen طراحی شده و قابلیت شناسایی تمام زیر گروه های HLA B51 ثبت شده در پایگاه داده IMGT/HLA Gene FASTA 3.32.0 را (به جز B51:148, B51:42, B51:13:01, B51:10, B51: 220) با ویژگی بالا دارد. شناسایی آلل های B51 براساس وجود منحنی تکثیر و همچنین منحنی ذوب اختصاصی محصول PCR انجام می شود. علاوه بر این، کیت به صورت مولتیپلکس طراحی شده است و وجود یک کنترل داخلی در واکنش از ایجاد نتایج منفی کاذب جلوگیری می کند.

محتویات کیت:

اجزا	عنوان برچسب	مقادیر در کیت 50 تستی	مقادیر در کیت 100 تستی
مسترمیکس	Reaction Mix	500 µl	1 ml
الیگومیکس	Oligomix	200 µl	400 µl
کنترل مثبت B51	Control A	50 µl	100 µl
کنترل منفی B51	Control B	50 µl	100 µl
آب مقطر استریل	Water	400 µl	800 µl

پروتکل

الف) استخراج DNA ژنومی

جداسازی اسید نوکلئیک با کیت استخراج DNA از خون SimBioLab (SBL15-2005) یا سایر کیت های استخراج موجود در بازار طبق پروتکل های استاندارد انجام شود. DNA استخراج شده را می توان برای چندین ماه در دمای 20- درجه سانتی گراد نگهداری کرد.

ب) آماده سازی میکس PCR

قبل از شروع کار، تیوب مستر میکس و الیگومیکس را به طور کامل در دمای اتاق ذوب کرده و سپس به آرامی با پیپتاژ مخلوط کنید، و برای چند ثانیه در دور پایین سانتریفوژ کنید. تعداد مورد نیاز لوله واکنش را روی بلوک سرد بگذارید. علاوه بر تعداد نمونه ها، پیشنهاد می شود دو لوله نیز برای کنترل های مختلف (کنترل مثبت، کنترل منفی) و کنترل فاقد نمونه (NTC) در نظر بگیرید. اجزای واکنش باید مطابق نسبت های داده شده در جداول زیر مخلوط شوند:

اجزا واکنش	حجم/واکنش
مسترمیکس	10µl
الیگومیکس	4 µl

14 میکرولیتر از مسترمیکس را به هر میکروتیوب اضافه کرده و 3 میکرولیتر DNA (20-50 ng/ul) استخراج شده یا DNA کنترل را به میکروتیوب اضافه کنید. سپس 3 میکرولیتر آب مقطر استریل (Water) را تا حجم 20 میکرولیتر به هر واکنش اضافه کرده و میکروتیوب ها را اسپین کنید و داخل دستگاه PCR قرار دهید. (برای نمونه کنترل NTC از آب مخصوص PCR (Water) به عنوان نمونه استفاده کنید).

ج) برنامه واکنش PCR

دستگاه PCR را طبق پروفایل دمایی زیر تنظیم کنید:

تعداد سیکل	جمع آوری داده ها	زمان	دما	مرحله
1 X		15 min	95˚C	دناتوراسیون اولیه
40 X		30 s	95˚C	دناتوراسیون
		30 s	63˚C	دورگه سازی
	جمع آوری داده در فیلتر سبز/ سایبرگرین	30 s	72˚C	تکثیر
		...	65˚C 95˚C	آنالیز منحنی ذوب

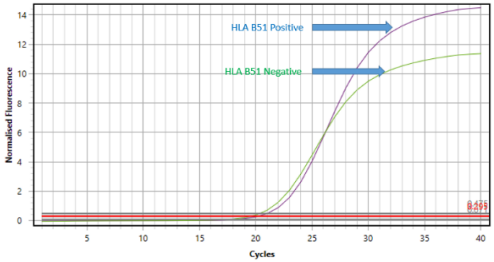
نکته: با توجه به غلظت نمونه های مورد استفاده، می توان تعداد سیکل ها را تا 45 سیکل افزایش داد.

تحلیل داده ها:

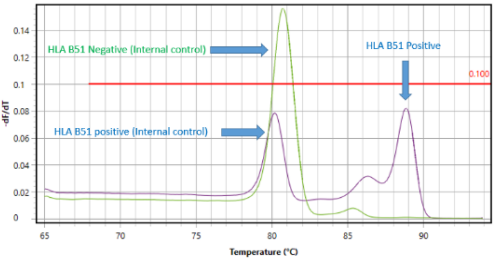
آنالیز نمونه ها بر اســاس بررســی منحنی تکثیر و منحنی ذوب نمونه ها انجام می شود.

نتایج را با درنظر گرفتن نکات زیر تفسیر کنید:

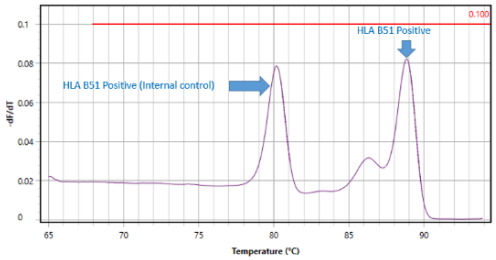
1- نمونه های مثبت دارای پیک ذوب واضح در محدوده دمایی 90-85 و نیز پیک کنترل داخلی در محدوده دمایی 85-80 هستند.
2- نمونه های منفی تنها دارای پیک ذوب در محدوده دمایی 85-80 هستند. این پیک مربوط به پرایمر کنترل داخلی می باشد و برای ارزیابی احتمال استخراج نامناسب یا مهار واکنش و جلوگیری از نتایج منفی کاذب به کار می رود .
3- در صورتی که هیچ پیک ذوبی در محدوده‌های دمایی 90-85 و 85-80 وجود نداشته باشد؛ واکنش قابل تفسیر نیست و باید تکرار شود.



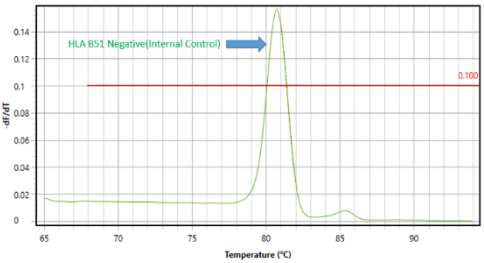
تصویر1: منحنی تکثیر نمونه های مثبت و منفی



تصویر2 : منحنی ذوب نمونه های مثبت و منفی



تصویر3: منحنی ذوب نمونه های مثبت HLA-B51 در محدوده دمایی مشخص



تصویر4: منحنی ذوب کنترل داخلی در نمونه های منفی HLA-B51 در محدوده دمایی مشخص

آدرس:ایران، مشهد، پژوهشکده بوعلی،اتاق های تمیز مرکز رشدفناوری سلامت

همراه: 07 14 383 915 98+

تلفن:495 55 372 98+

Web address: www.simbiolab.co

E-mail: info@simbiolab.co