راهنمای کیت

HLA-B51 RQ

پاییز ۱۴۰۴، ویرایش ۲/۱

جهت تشخیص HLA-B51 به روش Real-Time PCR

مخصوص تحقیقات

24 (Cat# HLA-B51RQ24)

48 (Cat# HLA-B51RQ48)

96 (Cat# HLA-B51RQ96)

NG-WI-ASL-47-201

RUO

شرکت نوین ژن پارس ویرا

تهران، خیابان ایرانشهر، پلاک ۵. کد پستی: ۱۵۸۱۶۳۳۳۳۶

Novin Gene

فهرست مندرجات:

۱. مقدمه ۳

۲. حیطه کاربرد ۳

۳. اطلاعات زمینه ای ۳

۴. اساس آزمایش ۴

۵. محتویات کیت ۵

۶. مدل های بسته بندی ۵

۷. شرایط نگهداری و حمل و نقل کیت ۵

۸. محدودیت کاربرد ۶

۹. سایر موارد مورد نیاز ۶

۱۰. احتیاط و نکات لازم ۷

۱۱. نمونه مناسب و شرایط نگهداری و انتقال آن ۷

۱۲. عوامل مزاحم ۸

۱۳. کنترل داخلی ۸

۱۴. استخراج DNA ۸

۱۵. دستورکار PCR و مراحل آزمایش ۹

۱۶. دستگاه ها و نرم افزارها ۹

۱۷. تنظیم دستگاه Rotor-Gene ۹

۱۸. تنظیم دستگاه StepOne ۱۱
۱۹. تنظیم سایر دستگاه ها ۱۲
۲۰. آنالیز نتایج Rotor-Gene ۱۲
۲۱. آنالیز نتایج StepOne ۱۵
۲۲. روش امحاء ۱۷
۲۳. پشتیبانی فنی ۱۷
۲۴. اطلاعات تماس ۱۸
۲۵. منابع. ۱۸
۲۶. توضیحات برچسب ..... ۱۹.

۱. مقدمه

کیت HLA-B51 RQ جهت تشخیص HLA-B51 در DNA انسانی می‌باشد و به روش Real-Time PCR طراحی شده است. در این روش، DNA به کمک پرایمرها و پروب اختصاصی شناسایی می‌شود. همچنین میکس این کیت حاوی سری ثانویه ای از پرایمرها و پروب جهت شناسایی یک ژن انسانی به عنوان کنترل داخلی می‌باشد. کنترل داخلی از گزارش منفی کاذب ناشی از استخراج نامناسب و یا مهار PCR جلوگیری می‌کند. این کیت جهت مصارف تحقیقاتی کاربرد دارد.

۲. حیطه کاربرد

کیت HLA-B51 RQ امکان بررسی نمونه بیمار را جهت تشخیص HLA-B51 در DNA انسانی با روش Real-Time PCR فراهم می‌کند. این کیت برای استفاده با دستگاه‌های Rotor-Gene، StepOne و MIC طراحی شده است.

۳. اطلاعات زمینه ای

HLA-B5 اشاره به سروتیپ آنتی ژن لوکوسیت انسانی (Human leukocyte antigen/HLA-B5) دارد که شامل تعدادی از آنتی ژن های سطحی است که توسط ژن های موجود بر روی کروموزوم ۶ کد گذاری می‌شود. در سال ۱۹۷۸ تحقیقات نشان داد این آنتی ژن از نظر ژنوتیپ به چند زیرشاخه تقسیم می‌شود که مهمترین آنها HLA-B51 و HLA-B52 می‌باشد. مطالعات بالینی نشان می‌دهد آنتی ژن سطحی HLA-B51 نقش مهمی در بروز بیماری بهجت (Behcet's Disease, BD) دارد و در ۸۰-۵۰٪ مبتلایان به این بیماری، HLA-B51 مثبت گزارش شده است، در حالی‌که آنتی ژن سطحی HLA-B52 و سایر زیرشاخه ها نقش قابل توجهی در بروز این بیماری ندارند. بر اساس تحقیقات اپیدمیولوژیک،

این بیماری در مدیترانه، خاورمیانه و آسیای شرقی شیوع بیشتری دارد. با توجه به نکات بالا تشخیص فاکتور HLA-B51 در فرایند تشخیص و مدیریت این بیماری دارای اهمیت بسیار است.

کیت HLA-B51 قابلیت تشخیص ۹۵٪ از توالی های زیرشاخه ی HLA-B51 را که در بانک اطلاعات IMGT / HLA Gene sequence alignment (release: 3.43.0 / 2021-01-18) ثبت شده است را دارد. این کیت ۵۰۰ زیرشاخه از ۵۲۵ زیرشاخه HLA-B51 را تشخیص می‌دهد. همچنین این کیت دارای اختصاصیتی معادل ۹۶ درصد بوده و با ۲۰ نوع از تیپ‌های دیگر غیر از HLA-B51 نیز واکنش نشان می دهد (برای کسب اطلاعات بیشتر با پشتیبانی فنی تماس حاصل نمایید).

۴. اساس آزمایش

در این کیت، شناسایی توالی مورد نظر با استفاده از روش واکنش زنجیره ای پلیمراز Polymerase Chain Reaction/PCR انجام می‌شود. طی این واکنش بخشی از ژنوم با استفاده از پرایمرهای اختصاصی شناسایی و تکثیر می‌شود. در روش Real-Time PCR توالی تکثیر شده با استفاده از پروب‌های فلورسنت قابل تشخیص می‌گردد. بنابراین، با بررسی میزان فلورسنت در طی واکنش می‌توان وجود عامل ژنتیکی را در نمونه تشخیص داد، بدون آنکه پس از پایان واکنش نیاز به انجام مراحل بعدی باشد. با توجه به اینکه در این روش نیازی به بررسی محصول واکنش با روش‌هایی مشابه الکتروفورز وجود ندارد، در نتیجه امکان ایجاد آلودگی با محصول PCR نیز برطرف می‌شود.

۵. محتویات کیت

این کیت شامل یک دفترچه راهنما، یک فلش کارت و مواد زیر می‌باشد:

برچسب	محتوا	حجم
HLA-B51 RQ Mix	میکس آماده برای PCR *	۴۸۰ میکرولیتر
Pos Ctrl	شاهد مثبت	۱۰۰ میکرولیتر
Neg Ctrl	شاهد منفی	۱۰۰ میکرولیتر
Water	آب مخصوص PCR	۲۰۰ میکرولیتر

* یک، دو یا چهار تیوب، به ترتیب برای کیت های ۲۴، ۴۸ و ۹۶ واکنشی

۶. مدل های بسته بندی

کیت در قالب های بیست وچهار، چهل و هشت، و نود و شش واکنش بیست و پنج میکرولیتری در دسترس می‌باشد.

۷. شرایط نگهداری و حمل و نقل کیت

تمامی مواد کیت باید در دمای ۲۰- درجه زیر صفر حمل و نگهداری شوند. در این صورت این مواد تا پایان زمان انقضا کیت که روی کیت و نیز روی هر لوله درج شده است پایدار و قابل استفاده می باشند.

از ذوب و انجماد مکرر محتویات کیت بیش از سه بار خودداری کنید زیرا باعث کاهش حساسیت و عدم کارایی آن ها می‌شود.

همچنین برای حمل و نقل کیت از یخ خشک استفاده نمایید.

۸. محدودیت کاربرد

- این کیت تنها برای استفاده توسط کاربران حرفه‌ای و آموزش دیده طراحی شده است.
- تمامی مراحل کار بایستی مطابق دفترچه راهنمای کامل کیت انجام شود و هرگونه تغییری در آن منجر به بروز خطا در نتایج می‌گردد.
- از محتویات کیت نباید پس از گذشت تاریخ انقضای درج شده روی کیت استفاده شود.
- در صورت تغییر رنگ لیبل حرارتی (به صورتی یا قرمز) حتی به صورت جزئی کیت نباید مورد استفاده قرار گیرد.
- این کیت تنها برای مصارف تحقیقاتی طراحی شده و برای تشخیص طبی (IVD) مورد تایید نمی‌باشد.

۹. سایر موارد مورد نیاز

برای استفاده از این کیت به تجهیزات و اقلام زیر نیاز دارید:

- دستگاه Real-Time PCR به همراه تجهیزات جانبی آن
- سانتریفوژ مخصوص میکروتیوب
- ورتکس (Vortex Mixer)
- بلوک حرارتی رومیزی (Dry Block Heater)
- سمپلر متغیر و سر سمپلر فیلتردار (Nuclease free)
- کیت استخراج DNA
- تیوب ۱/۵ میلی لیتری و میکروتیوب مخصوص Real-Time PCR
- دستکش لاتکس یا نیتریل بدون پودر
- بلوک آلومینیومی (بلوک سرد)

۱۰. احتیاط و نکات لازم

برای پیشگیری از تولید نتایج کاذب به نکات زیر توجه کنید:

- هنگام کار با نمونه بیمار، همیشه فرض را بر آلوده بودن نمونه بگذارید و خطرات بالقوه آن را در نظر داشته باشید.
- در فضای pre-PCR یا Clean Room سه ناحیه را مشخص و از هم تفکیک کنید. این سه فضا شامل فضای نگهداری نمونه و استخراج، فضای آماده سازی مواد (برای افزودن میکس به لوله های PCR) و فضای آماده سازی واکنش (برای افزودن نمونه DNA به لوله PCR) می‌باشند. هر یک از سه فضای فوق باید وسایل مخصوص به خود، به ویژه سمپلر، را داشته باشند. از جابجایی وسایل بین این سه فضا پرهیز کنید.
- سطوح کار را همیشه قبل از شروع و پس از خاتمه کار با الکل ۷۰ درجه تمیز کنید.
- هنگام استفاده، مواد کیت را روی یخ خرد شده نگه دارید تا کاملاً ذوب شده و با چند تکان ملایم از مخلوط و یکنواخت شدن محتویات هر لوله اطمینان حاصل کنید. سپس برای چند ثانیه آن ها را در دور پایین سانتریفوژ کنید.
- در حین کار، محتویات کیت را همیشه روی یخ خرد شده نگهداری کنید. از استفاده از یخ های قالبی و سایر موارد به غیر از یخ خرد شده پرهیز کنید.
- در حین کار، میکروتیوب های PCR را روی بلوک سرد گذاشته، و از گذاشتن آنها بر روی یخ خرد شده خودداری کنید.

۱۱. نمونه مناسب و شرایط نگهداری و انتقال آن

نمونه مناسب برای آزمایش با این کیت، ۰/۵ میلی لیتر خون کامل (whole blood) و خون محیطی (peripheral blood) می‌باشد که در لوله استریل حاوی ماده ضد انعقاد جمع آوری شده است. ماده ضد انعقاد می‌تواند EDTA یا سیترات

باشد. خون کامل را می‌توان تا ۴۸ ساعت در دمای چهار درجه سانتیگراد نگهداری و به آزمایشگاه منتقل نمود. برای نگهداری نمونه به مدت طولانی تر، آن را به حجم های کوچک تقسیم نموده و سپس در دمای بیست درجه زیر صفر نگهداری نمود. در چنین شرایطی نمونه تا چند ماه پایدار می‌ماند.

۱۲. عوامل مزاحم

هپارین با غلظت بیش از ۱۰ واحد در میلی لیتر باعث مهار PCR می‌شود. به همین دلیل لوله حاوی هپارین به عنوان ضد انعقاد مناسب نیست و نباید استفاده شود. همچنین نمونه بیماران تحت درمان با هپارین نیز برای PCR مناسب نمی‌باشد.

مقادیر بالای بیلی‌روبین (تا حداکثر ۴/۵ میلی گرم در دسی لیتر) و چربی (تا حداکثر ۱۰۰۰میلی گرم در دسی لیتر) و نیز همولیز خون برای این آزمایش مزاحمتی ایجاد نمی‌کند.

۱۳. کنترل داخلی

برای ارزیابی کیفیت استخراج DNA و احتمال مهار PCR و جلوگیری از نتایج منفی کاذب، میکس واکنش علاوه بر HLA-B51، حاوی پرایمرها و پروب مخصوص یک ژن انسانی نیز می‌باشد. کنترل داخلی باید به تولید فلورسانس با تابش زرد (VIC) و CT بین ۲۰ تا ۳۵ منجر شود. برای توضیحات بیشتر به بخش آنالیز رجوع کنید.

۱۴. استخراج DNA

برای استخراج از روش‌ها و کیت‌های مختلفی می‌توان استفاده نمود. ما استفاده از کیت‌های زیر را توصیه می‌کنیم:

- High Pure PCR Template Preparation Kit (Cat# 11796828001, Roche Applied Science, Mannheim, Germany)
- QIAamp DNA Blood Mini Kit (Cat. no. 51104, Qiagen GmbH, Hilden, Germany)

۱۵. دستورکار PCR و مراحل آزمایش

ابتدا تمامی لوله ها را روی یخ خرد شده قرار دهید تا بطور کامل محتویات آنها ذوب شوند. با چند تکان ملایم از مخلوط شدن آنها اطمینان حاصل کرده و برای چند ثانیه آنها را در دور پایین سانتریفوژ کنید.

تعداد مورد نیاز لوله روی بلوک آلومینیوم سرد بگذارید. علاوه بر تعداد نمونه ها، سه لوله نیز برای شاهد های مثبت و منفی و آب نیز در نظر بگیرید.

به هرلوله ۲۰ میکرولیتر از HLA-B51 RQ Mix و سپس ۵ میکرولیتر از DNA نمونه و یا شاهد یا آب اضافه کنید و درب لوله ها را ببندید. سپس آنها را مطابق شماره ها داخل دستگاه قرار دهید.

توجه: در صورت استفاده از دستگاه StepOne لوله ها را ابتدا به مدت کوتاهی سانتریفوژ نموده و سپس داخل دستگاه قرار دهید.

توجه: هنگام استفاده از دستگاه Rotor-Gene، رینگ محافظ را نیز در پایان اضافه کنید.

۱۶. دستگاه ها و نرم افزارها

کیت HLA-B51 RQ جهت کار با دستگاه های Rotor-Gene، StepOne و MIC طراحی شده است.

۱۷. تنظیم دستگاه Rotor-Gene

ابتدا اطمینان حاصل کنید که رینگ محافظ را روی روتور قرار داده اید!

دستگاه Rotor-Gene را توسط کابل مخصوص آن با کامپیوتر وصل کرده و آن را به برق وصل کنید تا چراغ آبی جلوی آن روشن شود.

فایل تمپلیت HLA-B51 را از فلش کارت همراه کیت باز نمایید (همچنین قابل دسترس از طریق اسکن QR Code روی جعبه کیت). توجه فرمایید فایل HLA-B51 0.2 یا HLA-B51 0.1 را با توجه به نوع لوله استفاده شده انتخاب کنید.

نکته: مطابق تصویر برای تنظیم ضریب تابش در منوی نرم افزار، گزینه View، سپس Gain Optimisation را انتخاب کنید. در پنجره باز شده در Auto-Gain Optimisation Setup ابتدا گزینه Optimise Acquiring را بزنید. تنظیمات را دقیقا مطابق تصویر صفحه بعد برای هر دو کانال انجام دهید. Tube Position را روی شماره ۱ تنظیم کنید (در نظر داشته باشید تیوب شماره یک باید حاوی میکس HLA-B51 باشد).

گزینه Perform Optimisation Before 1st Acquisition را فعال کنید و پنجره را ببندید.

در منوی بالای صفحه بر روی دکمه استارت (دکمه سبز رنگ) کلیک کنید. در پنجره باز شده نیز دکمه استارت را کلیک کنید و فایل آزمایش را در محل مورد نظر ذخیره کنید تا دستگاه روشن شود. در ستون نوع نمونه با عنوان type، برای نمونه بیمار unknown و برای کنترل مثبت Positive Control را انتخاب کنید. برای نمونه کنترل منفی نیز می‌توانید NTC یا Negative Control را انتخاب کنید.

۱۸. تنظیم دستگاه StepOne

نرم افزار دستگاه را باز کنید (StepOne software 2.*). از منوی Set Up روی دکمه Template کلیک کنید و فایل داخل فلش کارت همراه کیت را انتخاب کنید (همچنین قابل دسترس از طریق اسکن QR Code روی جعبه کیت). از منوی سمت چپ Plate Setup و سپس دکمه Assign Targets and Samples را انتخاب کنید. شاهدهای مثبت و منفی و چند نمونه از پیش تعریف شده اند. شاهدها و تعداد نمونه مورد نظر خود را در ردیف دلخواه کپی کنید. برای این کار از گزینه های کلیک راست (copy, paste, clear) می‌توانید استفاده کنید. همچنین با استفاده از منوی Define Targets and Samples می‌توانید تعداد

نمونه های مورد بررسی را اضافه کنید و نام نمونه ها را مطابق نام بیماران تغییر دهید. در پایان تنظیمات دکمه Start Run را کلیک کنید و فایل آزمایش را در محل مورد نظر ذخیره کنید تا دستگاه شروع به کار کند.

۱۹. تنظیم سایر دستگاه ها

چنانچه این کیت را برای استفاده با سایر دستگاه های Real-Time PCR استفاده می‌کنید، دستگاه را مطابق برنامه زیر تنظیم نمایید:

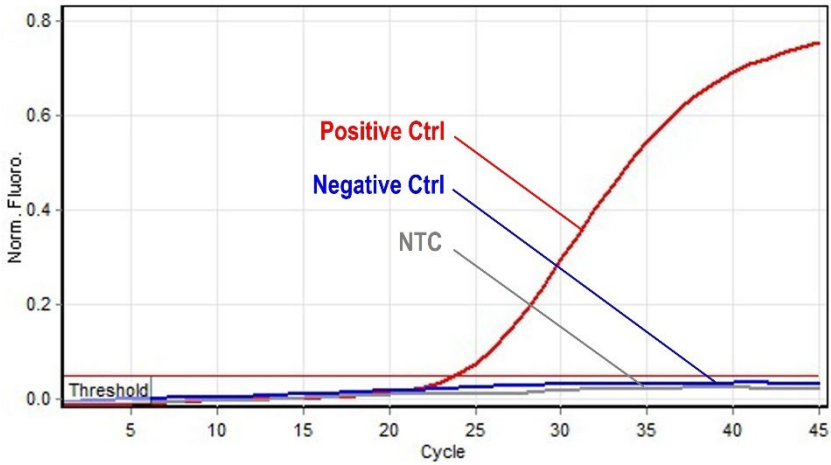
Step	Temperature and time	Cycles
1	**95°C x 3 min**	1
2	**95°C x 15 sec**	45
	60°C x 60 sec	

اندازه گیری تابش فلورسانس باید در دمای ۶۰ درجه و برای رنگ های FAM و VIC تنظیم شود. PCR Mix موجود در کیت حاوی ROX می‌باشند. غلظت نهایی ROXدر واکنش 300 nM می‌باشد.

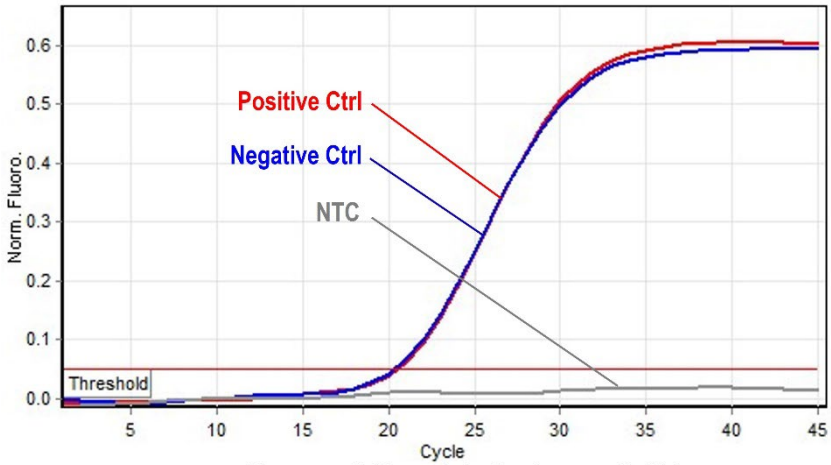
۲۰. آنالیز نتایج Rotor-Gene

برای آنالیز نتایج به راهنمای Rotor-Gene مراجعه کنید. به طور خلاصه از منوی Analysis، Quantitation را انتخاب کرده و روی Green دوبار کلیک کنید. سپس آستانه را روی ۰/۰۵ قرار دهید. فرآیند فوق را برای کانال Yellow نیز تکرار کنید. برای مشاهده نمودار مورد انتظار شاهدهای مثبت و منفی و کنترل داخلی تصاویر ۱ و ۲ را ملاحظه فرمایید.

توجه داشته باشید که افزایش **تابش سبز (Green)** مربوط به **HLA-B51** و افزایش **تابش زرد (Yellow)** حاصل از **کنترل داخلی** می‌باشد.



شکل ۱. منحنی کنترل های HLA-B51 در کانال سبز دستگاه روتورژن



شکل۲. منحنی کنترل داخلی در کانال زرد دستگاه روتورژن

توجه داشته باشید نمونه تنها زمانی مثبت در نظر گرفته می‌شود که دارای منحنی سیگموئیدی و فاز لگاریتمی باشد و تنها در این حالت CT معتبر بوده و قابل استناد و تفسیر می‌باشد. در غیاب منحنی سیگموییدی، نمونه منفی محسوب می‌شود و CT آن (در صورت وجود) فاقد ارزش می‌باشد.

نتایج را با توجه به نکات زیر تفسیر کنید:

- در صورتی که نمونه در هر دو کانال **سبز** و **زرد** مثبت، و CT در کانال **زرد** بین ۲۰ تا ۳۵ باشد و اختلاف CT در دو کانال **سبز** و **زرد** کمتر از ۷ واحد باشد، نمونه از نظر HLA-B51 **مثبت** است.
- در صورتی که نمونه در کانال **زرد** با CT ۲۰ الی ۳۵ مثبت باشد و در کانال **سبز** منفی باشد، نمونه **منفی** است.
- در صورتی که نمونه در کانال **زرد** با CT ۲۰ الی ۳۵ مثبت باشد و در کانال **سبز** نیز با CT ۲۵ الی ۴۰ مثبت باشد و اختلاف CT کانال **سبز** و **زرد**، بیشتر از ۷ واحد باشد، نمونه **منفی** است.
- در صورتی که نمونه در کانال **زرد** منفی باشد، نتیجه **نامعتبر** بوده و آزمایش باید **تکرار** شود. استخراج نامناسب یا خطا در تنظیم آزمایش می‌تواند دلیل چنین نتیجه ای باشد.

خلاصه تفسیر نتایج آزمایش در جدول صفحه بعد آمده است.

Green/FAM	Yellow/VIC	ΔCT: Green – Yellow	Result
+ CT: 20-40	+ CT: 20-35	ΔCT < 7 in RG ΔCT < 7 in StepOne	Positive
+ CT: 25-40	+ CT: 20-35	ΔCT > 7 in RG ΔCT > 7 in StepOne	Negative
–	+ CT: 20-35	–	Negative
– / +	–	–	Inconclusive

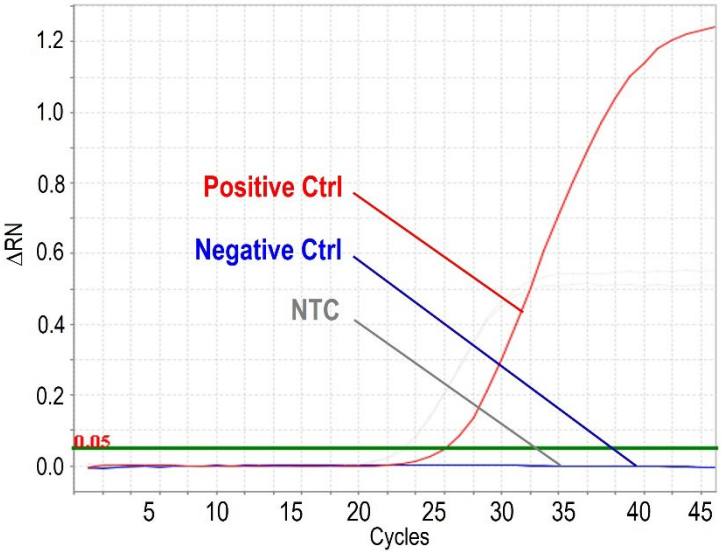
۲۱. آنالیز نتایج StepOne

برای آنالیز نتایج به راهنمای StepOne مراجعه کنید. به طور خلاصه دکمه Analysis را کلیک کنید. برای HLA-B51/FAM آستانه (threshold) را روی ۰/۰۵ و برای Albumin/VIC آستانه را روی ۰/۰۵ قرار دهید.

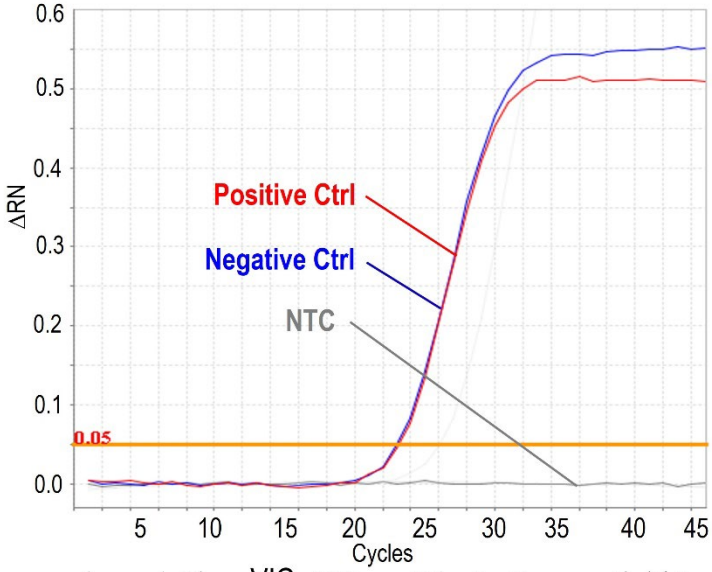
برای مشاهده نمودار مورد انتظار شاهدهای مثبت و منفی و کنترل داخلی تصاویر در دستگاه StepOne، تصاویر ۳ و ۴ را ملاحظه فرمایید.

توجه داشته باشید که افزایش **تابش سبز (HLA-B51 /FAM)** مربوط به **HLA-B51** و افزایش **تابش زرد (Albumin/VIC)** حاصل از کنترل داخلی می‌باشد.

توجه داشته باشید نمونه تنها زمانی مثبت در نظر گرفته می شود که دارای منحنی سیگموئیدی و فاز لگاریتمی باشد و تنها در این حالت CT معتبر بوده و قابل استناد و تفسیر می‌باشد. در غیاب منحنی سیگموییدی، نمونه منفی محسوب می شود و CT آن (در صورت وجود) فاقد ارزش می باشد.



شکل۳. منحنی شاهدهای HLA-B51 در کانال FAM دستگاه استپ وان



شکل۴. منحنی کنترل داخلی در کانال VIC دستگاه استپ وان

نتایج را با توجه به نکات زیر تفسیر کنید:

- در صورتی که نمونه در هر دو کانال **سبز** و **زرد** مثبت، و CT در کانال **زرد** بین ۲۰ تا ۳۵ باشد و اختلاف CT دو کانال **سبز** و **زرد** کمتر از ۷ واحد باشد، نمونه از نظر HLA-B51 **مثبت** است.
- در صورتی که نمونه در کانال **زرد** با CT ۲۰ الی ۳۵ مثبت باشد و در کانال **سبز** منفی باشد، نمونه **منفی** است.
- در صورتی که نمونه در کانال **زرد** با CT ۲۰ الی ۳۵ مثبت باشد و در کانال **سبز** نیز با CT ۲۵ الی ۴۰ مثبت باشد و اختلاف CT کانال **سبز** و **زرد**، بیشتر از ۷ واحد باشد، نمونه **منفی** است.
- در صورتی که نمونه در کانال **زرد** منفی باشد، نتیجه **نامعتبر** بوده و آزمایش باید **تکرار** شود. استخراج نامناسب یا خطا در تنظیم آزمایش می‌تواند دلیل چنین نتیجه ای باشد.

خلاصه تفسیر نتایج آزمایش در جدول صفحه ۱۵ آمده است.

۲۲. روش امحاء

محتویات کیت فاقد خطرات بیولوژیکی یا شیمیایی بوده و می‌توان آنها را مستقیما به سطل زباله انتقال داد. اما نمونه های عفونی آزمایشگاه را در محلول هیپوکلریت سدیم ۵٪ به مدت حداقل یک شبانه روز قرار دهید و سپس آنها را به سطل زباله منتقل کنید.

۲۳. پشتیبانی فنی

برای پشتیبانی فنی می‌توانید با شماره تلفن یا آدرس ایمیل زیر تماس حاصل فرمایید:

۰۹۹۳۶۲۲۳۲۴۱
Info@novingene.com

۲۴. اطلاعات تماس

شرکت نوین ژن پارس ویرا

آدرس: تهران، خیابان ایرانشهر، پلاک ۵. کد پستی: ۱۵۸۱۶۳۳۳۳۶

تلفن تماس:

۰۲۱-۸۸۸۳۷۳۹۳

۰۹۹۰۱۸۱۳۱۲۴

ایمیل: info@novingene.com

وبسایت: www.novingene.ir

۲۵. منابع

- Arber, N., Klein, T., Meiner, Z., Pras, E. and Weinberger, A., 1991. Close association of HLA-B51 and B52 in Israeli patients with Behçet's syndrome. Annals of the rheumatic diseases, 50(6), pp.351-353.
- Mackay IM. Real-time PCR in the microbiology laboratory. Clin. Microbiol. Infect. 2004; 10 (3): 190 – 212.
- Mahdi, B.M. ed., 2019. Human leukocyte antigen (Hla). BoD–Books on Demand.

۲۶. توضیحات برچسب

RUO	جهت مصارف پژوهشی		تولید کننده		دستورالعمل برای استفاده را بررسی نمایید
LOT	کدبهر (شماره بچ)	Σ	تعداد <n> آزمون کافی		تاریخ انقضاء
REF	شماره کاتالوگ	SN	شماره سریال	-10°C -30°C	محدوده دمایی

برای دریافت اطلاعات و منابع بیشتر، به وبسایت ما به نشانی www.novingene.ir مراجعه فرمایید یا با پشتیبانی تماس بگیرید.

HLA-B51 RQ
Kit Manual

Autumn 2025, Version 2.1

For Real-Time PCR Detection of HLA-B51
For Research Use Only

24 (Cat# HLA-B51RQ24)
48 (Cat# HLA-B51RQ48)
96 (Cat# HLA-B51RQ96)
NG-WI-ASL-47-201

RUO

NovinGene ParsVira
No. 5, Iranshahr St, Tehran, Iran 1581633336.

Novin Gene

Table of Contents

1. Introduction 3
2. Intended Use 3
3. Background Information 3
4. Test Principle 4
5. Kit Content 4
6. Packaging models 4
7. Storage and Stability 5
8. Product Use Limitations 5
9. Additionally Required Materials 5
10. General Precautions 6
11. Specimen, Storage and Transport 6
12. Interfering Substances 6
13. Internal Control 7
14. DNA Isolation 7
15. PCR Protocol 7
16. Devices and software 8
17. Programming Rotor-Gene 8
18. Programming StepOne 9
19. Programming Other Machines 9

20. Data Analysis: Rotor-Gene 10
21. Data Analysis: StepOne 13
22. Disposal Method 15
23. Technical Support 15
24. Contact Information 15
25. References 16
26. Symbols 16

1. Introduction

HLA-B51 RQ kit provides a ready-to-use Real-Time polymerase chain reaction (PCR) test designed for detecting HLA-B51 sequence. All required reagents are included in the PCR Mix provided in the kit. This Mix also contains a different series of primers and probe for detecting a housekeeping gene sequence as an Internal Control (IC). IC prevents false negative results due to extraction or presence of PCR inhibitors.
This kit is intended for Research Use Only!

2. Intended Use

HLA-B51 RQ kit is intended for detecting HLA-B51 in human DNA. Detection is achieved using Real-Time PCR and is compatible with Rotor-Gene, StepOne and MIC machines.

3. Background Information

Human leukocyte antigen B-5 (HLA-B5) is a serotype and includes several class I surface antigens which encoded by the B locus in the major histocompatibility complex (MHC) on chromosome 6. In 1978, studies showed that HLA-B5 antigen is of a heterogenous nature and divided into subtypes. Two important subtypes are HLA-B51 and HLA-B52. According to clinical studies HLA-B51 is associated with Behcet's diseases (BD) and 50-80% of patients with BD have HLA-B51 while HLA-B52 and other subtypes have no substantial role in this disease. As a result, tests for HLA-B51 are valuable in the diagnosis and control of this disease. HLA-B51 kit is intended for detection of HLA-B51 in human DNA.

This kit detects 95% of HLA-B51 subtypes listed in the IMGT / HLA Gene database (release: 3.43.0 / 2021-01-18) (Equal to 500 subtypes of 525 HLA-B51 subtypes), This kit also detects 20 non-

B51 alleles which results in a specificity of 96% (please contact technical support for further information).

4. Test Principle

The sequence is detected using PCR, where primers specific to the target genome amplify its unique sequence. Real-Time PCR facilitates the detection of the amplified product through fluorescent-labeled probes. Therefore, monitoring fluorescence provides a means for detecting the target without requiring post-amplification analysis. This eliminates the possibility of PCR product contamination.

5. Kit Content

The kit contains a manual, a flash card and the following reagents:

Label	Content	Quantity
HLA-B51 RQ Mix	PCR Mix*	480 µl
Pos Ctrl	Positive Control	100 µl
Neg Ctrl	Negative Control	100 µl
Water	PCR Grade Water	200 µl

*1, 2 or 4 tubes for 24, 48 or 96 reaction kits.

6. Packaging models

The kit is available in 24, 48, and 96 reactions of 25 microliters.

7. Storage and Stability

The kit components should be shipped and stored at -20°C and are stable until the expiration date mentioned. Avoid repeated freeze-thaw more than three times to prevent reduced sensitivity.

8. Product Use Limitations

- This kit is intended to be used only by specially instructed and trained personnel.
- The User manual should be strictly followed, and any modification will invalidate the results.
- The kit and its contents should not be used past the expiration date on the package.
- The kit and its contents should not be used if there is any sign of pink or red color on the Warm Mark label.
- This kit is for Research use only and is not validated for IVD (in vitro diagnostics) applications.

9. Additionally Required Materials

To use this kit, you need the following items:

- Real-Time PCR machine and accessory computer
- Tabletop microtube centrifuge
- Vortex Mixer
- Dry Block Heater
- Adjustable pipetters and nuclease free filtered tips
- DNA extraction kit
- Nuclease free 1.5ml microtubes and PCR microtubes
- Disposable powder-free gloves
- Cold block

10. General Precautions

To prevent false results, always pay attention to the following points:

- Treat all samples as potentially infectious.
- Within the pre-PCR work area, assign three separate spaces for: a) Sample storage and extraction, b) Reagent preparation where the PCR mix is aliquoted into tubes, and c) Reaction preparation area for addition of templates to the tubes.
- Always wipe the working surfaces with 70% Ethanol before and after work.
- Thaw kit components on crushed ice completely, mix by flickering followed by a quick spin and store on crushed ice after.
- Keep PCR Mix at -20°C at all times. Take it out just before use and return it to freezer immediately after.
- Do not place PCR tubes on crushed ice. Use cold blocks instead.

11. Specimen, Storage and Transport

Whole blood (0.5ml) and peripheral blood are the preferred samples. Peripheral blood should be collected in sterile condition in proper and sterile tubes. We recommend EDTA or Citrate as anticoagulant. Whole blood should be shipped and stored at +4°C (stable for a few days). For longer terms, sample should be aliquoted and stored at -20°C which is stable for a few months.

12. Interfering Substances

Heparin (more than 10 IU/ml) affects the PCR. Blood collected in heparin containing tubes and samples of heparinized patients must not be used.

Elevated levels of bilirubin (≤4.5 mg/dl) and lipids (≤1000 mg/dl) and hemolytic samples do not influence the extraction and PCR.

13. Internal Control

To examine DNA extraction quality as well as the presence of PCR inhibitors and to prevent false negative results, primers and probe for an Internal Control (a housekeeping gene) are included in the PCR Master Mix. Internal control should generate a CT of 20-35. See analysis section for more details.

14. DNA Isolation

DNA isolation can be performed using different kits from various manufacturers. We recommend using following:

- High Pure PCR Template Preparation Kit (Cat. no. 11796828001, Roche Applied Science, Mannheim, Germany).
- QIAamp DNA Blood Mini Kit (Cat. no. 51104, Qiagen GmbH, Hilden, Germany.

15. PCR Protocol

Thaw the reagents on crushed ice completely, followed by a brief mixing and a quick spin. Place the required number of microtubes on a cold block. Consider one tube for each sample, plus one for each control and one for the NTC.

Pipette 20µl of HLA-B51 RQ Mix directly to each tube followed by adding 5ul of controls or sample DNA.

Cap the tubes and visually inspect to make ensure all are caped securely. Place the tubes in the machine.

Note: Working with StepOne instrument, spin tubes briefly before loading on the block.

Note: If using Rotor-Gene attach the locking ring too.

16. Devices and software

HLA-B51 RQ kit is designed to work with Rotor-Gene, StepOne and MIC.

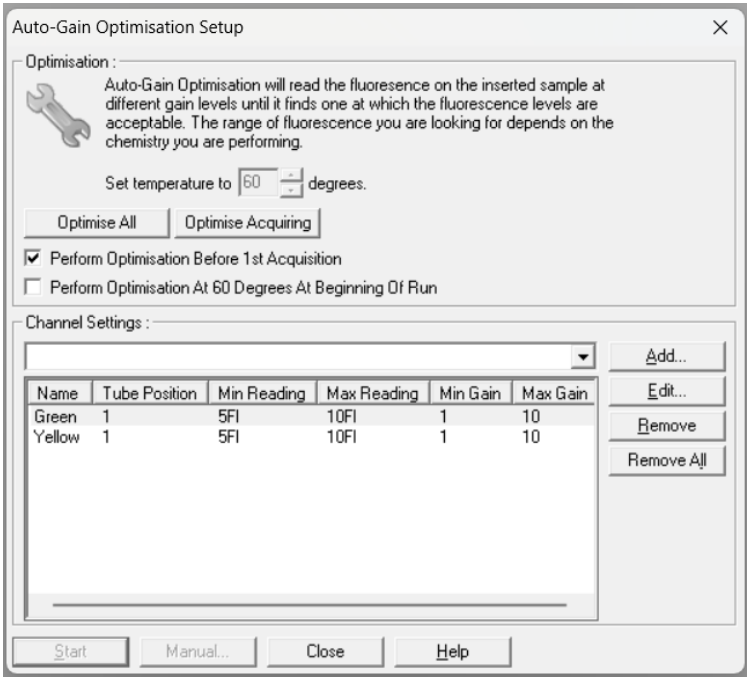
17. Programming Rotor-Gene

- Before you start the machine, make sure you have attached the locking ring on the rotor!

Open the HLA-B51 template file for Rotor-Gene (provided in the flash card, or accessible by kit QR code); HLA-B51 0.1 is for strip tubes and HLA-B51 0.2 is for 0.2ml tubes.

Note: For Gain Optimisation, in the View menu select the Gain Optimisation. Adjust the setting according to the below image. Make sure to set the Tube Position to number 1 for all channels (note that Tube number 1 should contain HLA-B51 Mix).

Click on the Start button (Green button on the top menu). On the pop-up window click Start again and save the file to start the machine.



18. Programming StepOne

Open the StepOne software (V 2.*). On the Set Up menu, click on Template (provided in the flash card, or accessible by kit QR code). Click on Plate Setup. Controls and few samples are defined. You may change plate setup using right-click options (copy, paste, clear). You may also add or remove samples on “Define Targets and Samples” menu. When finished, click on “Start Run” and save the experiment to the desired location. Instrument will start shortly.

19. Programming Other Machines

If you apply this kit to other Real-Time PCR machines, program it according to the following table:

Step	Temperature and time	Cycles
1	**95°C x 3 min**	1
2	**95°C x 15 sec**	45
	60°C x 60 sec	

Fluorescence should be collected at 60°C for FAM and VIC dyes. PCR Mix contains ROX with the final concentration of 300nM in the reaction.

20. Data Analysis: Rotor-Gene

Before analyzing results, make sure that in the sample menu, Patient samples are defined as "unknown" and Negative control or no template control as "Negative Control" or "NTC" respectively.
To analyze data briefly, click on Analysis menu and then under Quantitation tab double click on Cycling A. Green. Manually put threshold at 0.05. Repeat the above for the Yellow Channel. Figures 1 and 2 represent typical graphs for Rotor-Gene.
To interpret the results, please note that: Signal in the **Green** channel is due to **HLA-B51**, and a signal in the **Yellow** channel is due to the **IC**.

Note that a sample is considered Positive only if it has a sigmoid graph and log phase, and only then CT is reliable and can be used. In the absence of a sigmoid graph and log phase, the sample is considered Negative, and CT, if present, is not reliable.

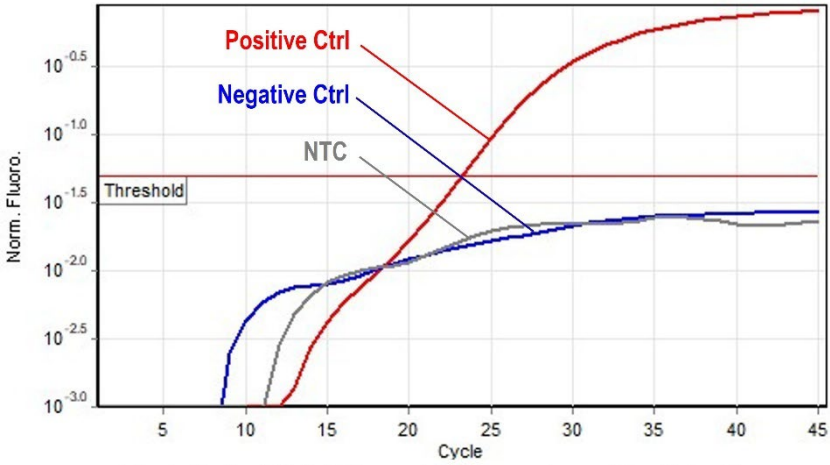


Fig 1. Typical HLA-B51 graph in Green channel for Rotor-Gene

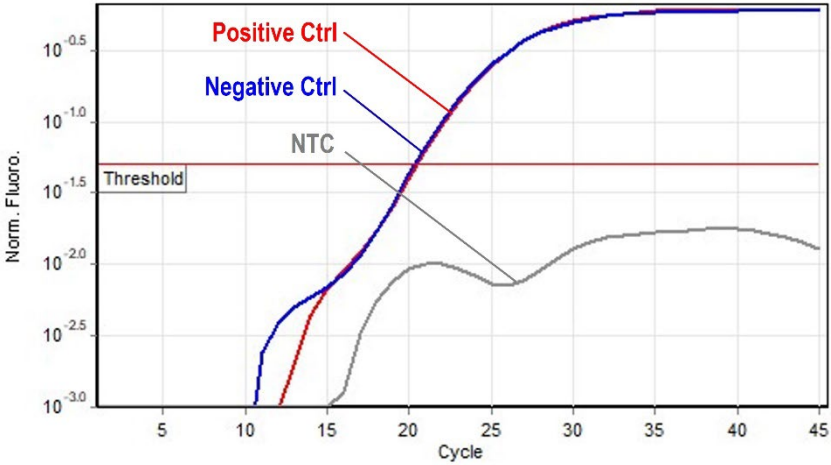


Fig 2. Typical IC graph in Yellow channel for Rotor-Gene

Consider the following points when analysing:

- If a sample is positive in the Green and the Yellow channels with sigmoid graphs and delta-CT between the two channels is less than 7 cycles, then the sample is **Positive** for HLA-B51.
- A sample is **Negative** for HLA-B51 if it is negative in the Green channel while it is positive for the Yellow channel with a sigmoid graph and CT of 20-35.
- A sample is **Negative** for HLA-B51 if it is positive in the Green channel with CT of 25-40 while it is positive for the Yellow channel with a sigmoid graph and CT of 20-35 and delta-CT between the Green and the Yellow is more than 7 cycles.
- Results are **inconclusive** and the test should be repeated if a sample is negative in the Yellow channel.

Interpretation of results is summarized in the following table.

Green/FAM	Yellow/VIC	ΔCT: Green – Yellow	Result
+ CT: 20-40	+ CT: 20-35	ΔCT < 7 in RG ΔCT < 7 in StepOne	Positive
+ CT: 25-40	+ CT: 20-35	ΔCT > 7 in RG ΔCT > 7 in StepOne	Negative
–	+ CT: 20-35	–	Negative
– / +	–	–	Inconclusive

21. Data Analysis: StepOne

Analyse data according to StepOne manual. Briefly, click on Analyse and set the threshold for the FAM and the VIC at 0.05. Please note that signal in the FAM channel is due to HLA-B51, and a signal in the VIC channel is due to the IC.

Note that a sample is considered Positive only if it has a sigmoid graph and log phase, and only then CT is reliable and can be used. In the absence of a sigmoid graph and log phase, the sample is considered Negative, and CT, if present, is not reliable.

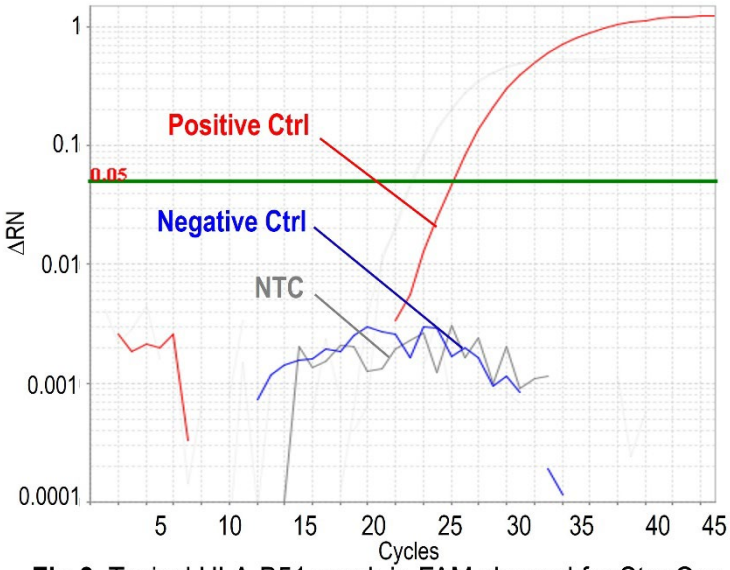


Fig 3. Typical HLA-B51 graph in FAM channel for StepOne

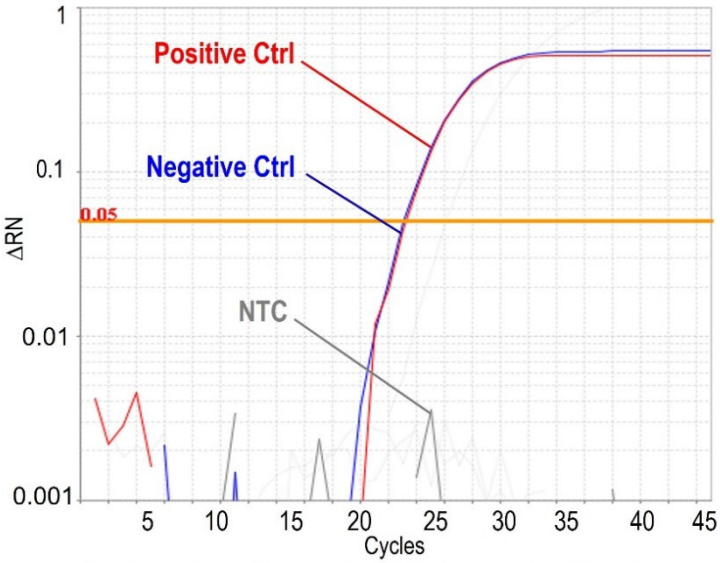


Fig 4. Typical IC graph in VIC channel for StepOne

Consider the following points when analysing:

- If a sample is positive in both the FAM and the VIC channels with sigmoid graphs and delta-CT between the channels is less than 7 cycles, then the sample is **Positive** for HLA-B51.
- A sample is **Negative** for HLA-B51 if it is negative in the FAM channel while it is positive in the VIC channel with a sigmoid graph and CT of 20-35.
- A sample is **Negative** for HLA-B51 if it is positive in the FAM channel with CT of 25-40 while it is positive for VIC channel with a sigmoid graph and CT of 20-35 and delta-CT between FAM and VIC is more than 7 cycles.
- Results are **Inconclusive** and the test should be repeated if a sample is negative in VIC channel.

Interpretation of results is summarized in the page 12, Table.

22. Disposal Method

The contents of the kit do not require any special treatment before disposal and can be directly discarded. Infectious specimens should be maintained in 5% Sodium Hypochlorite overnight and then discarded.

23. Technical Support

For technical support, contact us via
Phone: +98-9936223241
Email: info@novingene.com

24. Contact Information

NovinGene ParsVira
Address: No. 5, Iranshahr St, Tehran, Iran 1581633336.

Tel: +98 21-88837393
+98 990-1813124
Email: info@novingene.com
Website: www.novingene.com

25. References

- Arber, N., Klein, T., Meiner, Z., Pras, E. and Weinberger, A., 1991. Close association of HLA-B51 and B52 in Israeli patients with Behçet's syndrome. Annals of the rheumatic diseases, 50(6), pp.351-353.
- Mackay IM. Real-time PCR in the microbiology laboratory. Clin. Microbiol. Infect. 2004; 10 (3): 190 – 212.
- Mahdi, B.M. ed., 2019. Human leukocyte antigen (Hla). BoD–Books on Demand.

26. Symbols

RUO	Research use only		Manufacturer		Consult instructions for use
LOT	Lot number	Σ	Content sufficient for <n> tests		Use-by date
REF	Catalogue number	SN	Serial number	-10°C -30°C	Temperature limit

For more information and resources please visit our website; www.novingene.com