

راهنمای کیت HLA-B52 RQ

کیت HLA-B52 RQ به منظور تشخیص ژن HLA-B52 در DNA انسانی به روش Real-Time PCR می‌باشد. این کیت قابلیت تشخیص همه‌ی ۱۹۰ زیرشاخه‌ی HLA-B52 را دارد به جز چهار زیرشاخه‌ی B52:02:01, B52:02:02, B52:16, B52:20. این کیت برای کار با دستگاه‌های Rotor-Gene, StepOne, MIC و به جهت مصارف تحقیقاتی طراحی شده است.

محتویات کیت: این کیت شامل یک راهنما و مواد زیر می‌باشد:

برچسب	محتوا	حجم
HLA-B52 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

تمامی مواد کیت باید در دمای ۱۰ تا ۳۰ درجه زیر صفر نگهداری شوند.

کنترل داخلی: برای ارزیابی کیفیت استخراج DNA و احتمال مهار PCR و جلوگیری از نتایج منفی کاذب، میکس واکنش علاوه بر HLA-B52، 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.

روش استفاده: تعداد مورد نیاز لوله PCR روی بلوک سرد بگذارید. علاوه بر تعداد نمونه‌های مورد آزمایش، ۱ لوله برای شاهد مثبت، ۱ لوله برای شاهد منفی و ۱ لوله برای آب نیز در نظر بگیرید.

به هر لوله ۲۰ میکرولیتر از **HLA-B52 RQ Mix** و سپس ۵ میکرولیتر از **DNA نمونه** و یا **شاهد**ها یا آب اضافه کنید و درپوش لوله ها را ببندید. سپس آن ها را مطابق شماره ها داخل دستگاه قرار دهید.

تنظیم دستگاه: برای تنظیم دستگاه Rotor-Gene یا StepOne از فایل تمپلیت مخصوص این کیت استفاده کنید. همچنین می‌توانید دستگاه را مطابق جدول 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. HLA-B52 Mix موجود در کیت حاوی ROX با غلظت نهایی 300 nM می‌باشد.

آنالیز نتایج: توجه داشته باشید که افزایش **تابش سبز (HLA-B52/FAM)** مربوط به **HLA-B52** 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 سیگموئیدی، نمونه منفی محسوب می شود و CT آن (در صورت وجود) فاقد ارزش می باشد.

نتایج را با توجه به نکات زیر تفسیر کنید :

- در **دستگاه روتورژن** 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 ۱۳ واحد باشد، نمونه از نظر HLA-B52 **مثبت** است.
- در **دستگاه استپ‌وان** در صورتی که نمونه در هر دو کانال **سبز** و **زرد** مثبت، و CT در کانال **زرد** بین ۲۰ تا ۳۵ باشد اختلاف CT در دو کانال **سبز** و **زرد** کمتر از ۱۰ واحد باشد، نمونه از نظر HLA-B52 **مثبت** است.
- در صورتی که نمونه در کانال **زرد** با CT ۲۰ الی ۳۵ مثبت باشد و در کانال **سبز** منفی باشد، نمونه از نظر HLA-B52 **منفی** است.
- در **دستگاه روتورژن** 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 ۱۳ واحد باشد ، نمونه از نظر HLA-B52 **منفی** است.
- در **دستگاه استپ وان** 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 ۱۰ واحد باشد ، نمونه از نظر HLA-B52 **منفی** است.
- در صورتی که نمونه در کانال **زرد** منفی باشد، بدون توجه به نتیجه در کانال **سبز**، نتیجه **نامعتبر** بوده و آزمایش باید **تکرار** شود. استخراج نامناسب یا خطا در تنظیم آزمایش می‌تواند دلیل چنین نتیجه ای باشد.

بر اساس نکات بالا نتایج به طور خلاصه در جدول صفحه بعد نشان داده شده است:

Green/FAM	Yellow/VIC	ΔCT : Green – Yellow	Result
+ CT: 20-40	+ CT: 20-35	$\Delta CT < 13$ in RG $\Delta CT < 10$ in StepOne	Positive
+ CT: 25-40	+ CT: 20-35	$\Delta CT > 13$ in RG $\Delta CT > 10$ in StepOne	Negative
-	+ CT: 20-35	-	Negative
- / +	-	-	Inconclusive

توضیحات برچسب:

دستورالعمل برای استفاده را بررسی نمایید		تولید کننده		جهت مصارف پژوهشی	RUO
تاریخ انقضاء		تعداد $<n>$ آزمون کافی		کدپهر (شماره بچ)	LOT
محدوده دمایی		شماره سریال	SN	شماره کاتالوگ	REF

جهت توضیحات بیشتر در مورد کیت‌های نوین ژن، دریافت فایل کامل دفترچه راهنمای کیت و فایل تمپلیت برای تنظیم دستگاه و آشنایی با نمایندگان فروش، به وبسایت ما به نشانی www.novingene.com مراجعه فرمایید یا QR Code موجود بر روی جعبه کیت را اسکن نمایید. جهت کسب اطلاعات بیشتر با پشتیبانی فنی تماس بگیرید.