

HLA B27 REAL TIME PCR KİTİ

Kat. No: 501R-10-01

GİRİŞ

HLA B27 (Human Leukocyte Antigen B27) kromozom 6 üzerinde yer alan ve MHC lokus B tarafından kodlanan sınıf I doku uygunluk antijenlerinden biridir. B27 pozitifliğinin birçok otoimmün hastalıkla ilişkili olduğu belirlenmiştir. En sık görüleni ankilozan spondilit'tir. Hastaların % 90-96'sında HLA B27 pozitif olduğu görülür. JRA (junenil romatoid artrit), Reaktif artrit (Reiter sendromu gibi) ve izole Akut Anterior Uveit HLA B27 pozitifliği ile ilişkili görülen diğer hastalıklardır. Ayrıca İnflamatuvar Barsak Hastalıkları ve bazı kronik hastalıklarda da pozitifliği saptanabilmektedir. Kit, **IMGT/HLA Gene FASTA 3.32.0 database'** da yer alan B27:07:01, B27:07:04, B27:24, B27:32 ve B27:70 dışındaki tüm HLA B27 alt tiplerini yüksek spesifite ile analiz eder (Bkz Tablo 1).

TEST SİSTEMİNİN PRENSİBİ

Test prensibi, Taq DNA polimerazın 5'-3' exonuclease aktivitesine dayanmaktadır. Probenin 5' ucunda bir reporter boya ve 3' ucunda da bir quencer boya bulunmaktadır. Quencer boya reporter boyanın ışmasını baskılamakta aynı zamanda da probun primer gibi davranarak uzamasına engel olmaktadır. PCR esnasında enzim aktivitesi ile birlikte reporter ve quencer arasında bulunan prob parçalanarak ayrılır ve baskılanmanın ortadan kalkmasıyla ışımaya meydana gelir. Bu işlem sadece hedef bölge üzerinde hibridize olmuş problemlerde gerçekleşir. Amplifikasyon miktarı arttıkça, reporter boyanın açığa çıkmasıyla birlikte ışımaya doğrusal olarak artmakta ve bu artış cihaz tarafından eş-zamanlı olarak tespit edilmektedir.

ÜRÜN ÖZELLİKLERİ

Kit, HLA B27 bölgesine uygun sekans spesifik primerler ve prob ile hazırlanmıştır ve 5' nükleaz PCR yöntemine uygun kimyasalları içerir. Her hasta için HLA B27 bölgesine uygun, bir master miks ile çalışılır. Miks iki farklı primer-prob seti içermektedir. HLA B27 bölge analizi için FAM işaretli boya kullanılmıştır. Ayrıca miks içinde, PCR çalışmasını kontrol eden (İnternal kontrol) HEX/JOE boyası ile işaretli internal kontrol mevcuttur. Kullandığınız kit sistemi **"ready to use"** özelliğine sahiptir. Kit, Taq Polimeraz dahil Real Time PCR reaksiyonu için gerekli tüm komponentleri içermektedir. Kit, 1 ng/µl tespit limiti (LOD) ile çok yüksek hassasiyet sağlar.

SİSTEM İÇERİĞİ

Bileşen	20 Test	50 Test
• HLA B27 PCR Master Miks	400 µl	1000 µl
• Pozitif Kontrol DNA*	20 µl	40 µl
• Negatif Kontrol DNA*	20 µl	40 µl

*Kontrol DNA'lar plazmid içermektedir ve Plazmid DNA'ların amplifikasyon pikleri örnek DNA piklerine göre hafif farklılıklar gösterebilir.

SAKLAMA KOŞULLARI

- Tüm bileşenler – 20°C de ve karanlıkta saklanmalıdır.
- Tüm bileşenler, ürün kutusunun üzerinde belirtilen son kullanma tarihine kadar kullanılabilir.
- Sürekli eritip çözdürmek, ürünün hassasiyetinde azalmalara neden olabilir.

DNA İZOLASYONU

Örnekler steril, EDTA'lı (mor kapaklı) tüplere alınmalı, örnek alındıktan sonra kanın pıhtılaşmasına engel olmak amacıyla tüp hafifçe karıştırılmalıdır. Alınan kan örnekleri izolasyon aşamasına kadar +4°C'de saklanmalı, kan örnekleri bir aydan fazla bir süre bekletilecek ise -20°C'de muhafaza edilmelidir.

Kitimiz, MN NucleoSpin®Blood kitine göre optimize edilmiştir. İzolasyonun son aşamasında, elde edilen DNA'nın **150 µl elüsyon solüsyonu** ile sulandırılması tavsiye edilmektedir.

TEST PROSEDÜRÜ

- Miksi çözünmesi için oda sıcaklığına bırakılır
- Mix çözüldükten sonra hafif pipetaj yaparak bir örnek için, her optik kapaklı tüp veya strip'e, **20 µl master miks (Ready to use)** bölünür.
- Daha sonra her tüpe **5 µl örnek DNA** 'sı eklenir.
- Optik kapaklar kapatılır ve aşağıda belirtilen programla çalıştırılır.

PCR PROGRAMI

95 °C	3 dk.	Taq Aktivasyonu
95 °C	15 sn.	30 Döngü
60 °C	1 dk.	

Floresan boya olarak **FAM ve HEX/JOE** seçilmelidir.

Eğer:

- ABI Prism® sistemi kullanıyorsanız, lütfen pasif referans olarak **"none"** seçeneğini seçiniz.
- Mic qPCR Cycler kullanıyorsanız, lütfen **"Adjust Gain Settings"** kısmında **Green Auto Gain** değerini **20'** ye, **Yellow Auto Gain** değerini **10'** a ayarlayın.

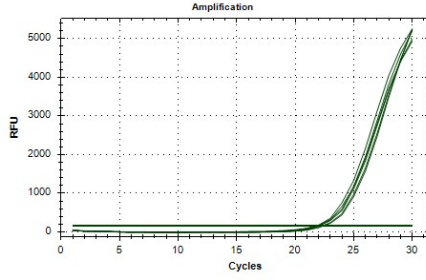
Bu sistemin çalışabileceği cihazlar:

ABI Prism® 7000/7300/7500/7900
Bio-Rad CFX96
Roche LightCycler® 480 System
Rotor Gene Q
Mic qPCR Cycler

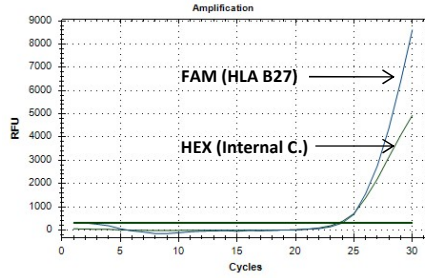
ANALİZ

PCR işlemi bittikten sonra, sonuçlarınızı FAM ve HEX/JOE boyasında analiz edebilirsiniz. Aşağıdaki analiz resimleri Bio-Rad CFX96 cihazına aittir. İnternal Kontrol pikleri HEX/JOE boyası ile analiz edilmelidir. DNA eklenmiş tüm kuyularda internal kontrol pikleri gözlenmelidir. CT değeri ise **20 ≤ ct ≤ 26** aralığında olmalıdır (Şekil 1). FAM boyasında amplifikasyon piki var ise testin sonucu **"HLA B27 Pozitif"** olarak değerlendirilmelidir. CT değeri ise hem pozitif DNA örnekleri için hem de Pozitif kontrol için **22 ≤ ct ≤ 27** aralığında olmalıdır (Şekil: 2-3). Bu aralıklar kullanılan cihaza, threshold değerine ve kullanılan PCR tüpüne göre farklılık gösterebilir. Pozitif örneklerde FAM ve HEX pikleri birbirine yakın veya üstüste olabilir. Aradaki fark 4 ct den fazla olmamalıdır.

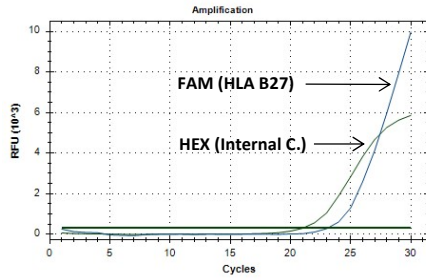
FAM boyasında pik yok ise testin sonucu **"HLA B27 Negatif"** olarak değerlendirilmelidir (Şekil: 4).



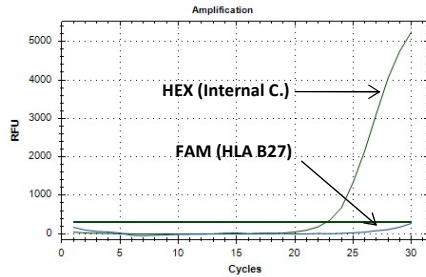
Şekil 1: İnternal kontrol (HEX/JOE Boyası)



Şekil 2: HLA B27 Master Miks – Pozitif kontrol (FAM and HEX Dye)



Şekil 3: HLA B27 Master Miks – Pozitif DNA örneği (FAM and HEX Dye)



Şekil 4: HLA B27 Master Miks – Negatif DNA örneği (FAM and HEX Dye)

OLASI PROBLEMLER

Eğer internal kontrol negatifse.

- DNA eksikliği,
- Test'te inhibitör varlığı söz konusudur.

Eğer pikler gec başlıyorsa.

- Örneğinin DNA'sı saf değildir veya az miktarda inhibitör içeriyor olabilir.
- Yeterli miktarda DNA elde edememiş olabilirsiniz.

Lütfen sorularınız için bizimle temasa geçin. tech@snp.com.tr

UYARILAR

- Saklama koşullarına uygun olarak saklanmalıdır.
- Oda sıcaklığında unutulmuş PCR master mikserleri kullanılmamalıdır.
- PCR master miksi oda sıcaklığında tamamen eritilip, baş aşağı edilerek hafifçe karıştırıldıktan sonra tüplere bölünmelidir.
- PCR master mikserlerin raf ömrü 12 aydır. Kullanmadan önce üretim tarihine dikkat edilmelidir.
- Yalnızca in-vitro tanı amaçlı kullanılabilir.

Tablo 1: Kitin tespit ettiği HLA B27 alt tiplerinin listesi.

HLA B27 Altıtipleri			
B*27:01	B*27:05:18:01	B*27:118	B*27:207
B*27:02:01:01	B*27:05:18:02	B*27:123	B*27:208
B*27:02:01:02	B*27:05:23	B*27:131	B*27:209
B*27:02:01:03	B*27:05:31	B*27:137	B*27:210
B*27:02:01:04	B*27:05:32	B*27:142	B*27:211
B*27:02:01:05	B*27:05:33	B*27:144:01	B*27:212N
B*27:02:01:06	B*27:05:34	B*27:146	B*27:213
B*27:02:01:07	B*27:05:35	B*27:150	B*27:214
B*27:02:01:08	B*27:05:36	B*27:157	B*27:216
B*27:02:05	B*27:05:37	B*27:158	B*27:217
B*27:02:06	B*27:05:39	B*27:162	B*27:218
B*27:03	B*27:05:40	B*27:163	B*27:219
B*27:04:01	B*27:05:41	B*27:165	B*27:220
B*27:05:02:01	B*27:05:42	B*27:169	B*27:221
B*27:05:02:02	B*27:05:43	B*27:170	B*27:222
B*27:05:02:03	B*27:05:44	B*27:173	B*27:223N
B*27:05:02:04Q	B*27:05:45	B*27:174	B*27:224
B*27:05:02:05	B*27:05:46	B*27:175	B*27:227
B*27:05:02:06	B*27:05:48	B*27:176N	B*27:229
B*27:05:02:07	B*27:05:49	B*27:177	B*27:230
B*27:05:02:08	B*27:05:5	B*27:178:01	B*27:231
B*27:05:02:09	B*27:05:51	B*27:178:02	B*27:232
B*27:05:02:10	B*27:05:52	B*27:179	B*27:233
B*27:05:02:11	B*27:05:53	B*27:180	B*27:234
B*27:05:02:12	B*27:05:54	B*27:181	B*27:235
B*27:05:02:13	B*27:05:55	B*27:182	B*27:236
B*27:05:02:14	B*27:05:56	B*27:184	B*27:237
B*27:05:02:15	B*27:06:01:01	B*27:185Q	B*27:238
B*27:05:02:16	B*27:06:01:02	B*27:186	B*27:239
B*27:05:02:17	B*27:08	B*27:187	B*27:240
B*27:05:02:18	B*27:09	B*27:188	B*27:241
B*27:05:02:19	B*27:10	B*27:189	B*27:242
B*27:05:02:20	B*27:12:01:01	B*27:190	B*27:243N
B*27:05:02:21	B*27:12:01:02	B*27:191	B*27:244
B*27:05:02:22	B*27:12:01:03	B*27:192	B*27:245
B*27:05:02:23	B*27:13:01	B*27:193	B*27:246N
B*27:05:02:24	B*27:14	B*27:194	B*27:247
B*27:05:02:25	B*27:15	B*27:195	B*27:248
B*27:05:02:26	B*27:17	B*27:196	B*27:249
B*27:05:02:27	B*27:19:01:01	B*27:197	B*27:250
B*27:05:02:28	B*27:19:01:02	B*27:200	B*27:251
B*27:05:02:29	B*27:20	B*27:201	B*27:252
B*27:05:02:30	B*27:21:02	B*27:202	B*27:253Q
B*27:05:02:31	B*27:25	B*27:203	B*27:254N
B*27:05:02:32	B*27:30	B*27:204:01:01	B*27:255
B*27:05:03	B*27:90:04	B*27:204:01:02	
B*27:05:05	B*27:91	B*27:205	
B*27:05:07	B*27:101	B*27:206	

KAYNAKLAR

1. Danilo Garcia Ruiz, Mário Newton Leitão de Azevedo and Omar Lupi. "HLA-B27 frequency in a group of patients with psoriatic arthritis". An Bras Dermatol. 2012;87(6):847-50.
2. Jae Kyoun Ahn and Yeoung Geol Park. "Human Leukocyte Antigen B27 and B51 Double-Positive Behçet Uveitis." Arch Ophthalmol. 2007;125(10):1375-1380. doi:10.1001/archophth.125.10.1375.

Düzenleme Tarihi: 11.05.2023