

DİREKT HLA B27 REAL TIME PCR KİTİ

Kat. No: 501R-10-03

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, HLA B27' yi DNA izolasyonuna gerek olmadan tam kandan direkt tespit edebilir. 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. Proben 5' ucunda bir reporter boya ve 3' ucunda da bir quencer boya bulunmaktadır. Quencer boya reporter boyanın ışımısını 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 HLA B27 bölgesi için Direkt miks çalışılır. Miks iki farklı primer-prob seti içermektedir. HLA B27 bölge analizi için FAM işaretli boya kullanılmıştır. Ayrıca miksin 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.

SİSTEM İÇERİĞİ

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

*Kontroller 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

Kit, DNA izolasyonuna gerek duymadan tam kandan direkt olarak çalışmaya uygundur.

TEST PROSEDÜRÜ

- Miksi çözünmesi için oda sıcaklığına bırakılır
- Mikx çözüldükten sonra hafif pipetaj yaparak karıştırılır.
- Her bir örnek için, beyaz PCR Plate / tüpe **20 µl Direkt Miks** bölünür.
- Periferik tam kan tüpü ters düz edilerek karıştırılır.
- Daha sonra Direkt Mikslerin olduğu her tüpe **0.5 µl örnek kanı** eklenir.
- Optik kapaklar kapatılır ve aşağıda belirtilen programla çalıştırılır.

PCR PROGRAMI

95 °C	5 dk.	Taq Aktivasyonu
95 °C	10 sn.	35-40 Döngü *
63°C	1 dk.	

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

***Programdaki döngü sayısı kullanılan cihaza ve/veya kullanılan PCR tüplerine göre değişiklik gösterebilir.**

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.

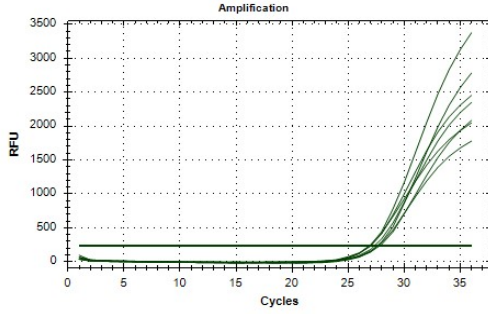
Bu sistemin çalışabileceği cihazlar:

Bio-Rad CFX96, Opus 96
ABI Prism® 7500/7500 Fast
Roche LightCycler® 480 System
Rotor Gene Q
Mic qPCR Cycler
Long Gene

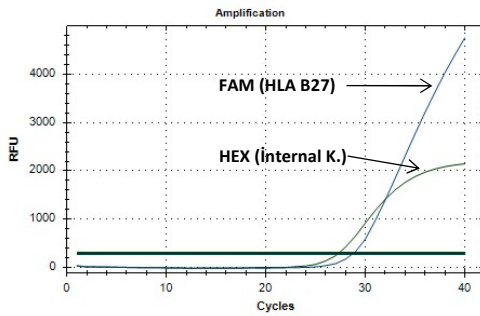
ANALİZ

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 edilmektedir. DNA eklenmiş tüm kuyularda internal kontrol pikleri gözlenmelidir (Şekil 1). İnternal kontrol ve B27 amplifikasyon piklerinin ct aralıkları **25 ≤ x ≤ 34** olmalıdır (Şekil 1-2). FAM boyasında amplifikasyon piki var ise testin sonucu **"HLA B27 Pozitif"** olarak değerlendirilmelidir. Pozitif örnekler için; İnternal Kontrol ve HLA B27 pikleri üstüste veya birbirine yakın olmalıdır (Şekil: 2).

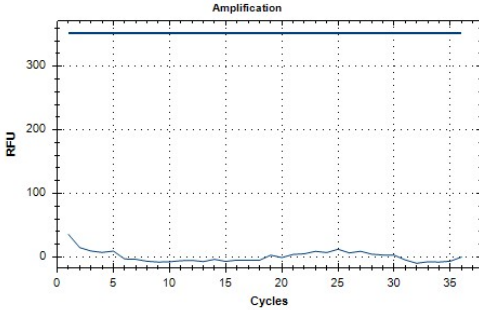
FAM boyasında pik yok ise testin sonucu **"HLA B27 Negatif"** olarak değerlendirilmelidir (Şekil: 3).



Şekil 1: İnternal Kontrol (HEX/JOE Boyası)



Şekil 2: HLA B27 Pozitif Örnek (FAM ve HEX Boyaları)



Şekil 3: HLA B27 Negatif Örnek (FAM Boyası)

OLASI PROBLEMLER

Eğer internal kontrol negatifse,

- Örnek eksikliği,
- Örnekte ciddi PCR inhibitörü varlığı söz konusudur.

Lütfen testi tekrar ediniz.

Daha fazla sorularınız için bizimle temasa geçin. tech@snp.com.tr

UYARILAR

- Saklama koşullarına uygun olarak saklanmalıdır.
- Oda sıcaklığında unutulmuş PCR Direkt mikserleri kullanılmamalıdır.
- PCR Direkt miksi oda sıcaklığında tamamen eritilip, baş aşağı edilerek hafifçe karıştırıldıktan sonra tüplere bölünmelidir.
- PCR Direkt 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 Altı tipleri			
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 Kyoum 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: 22.03.2025