

PSGene HLA-B27 Detection Kit

محتویات کیت

محتویات	تعداد/حجم
HLA-B*27 mix (For 24 Reactions)	2×216 μl

کیت حاضر، جهت تشخیص ژن HLA-B27 به روش PCR-SSP می‌باشد.

شرایط نگهداری کیت

- کیت را در دمای 15°C تا 25°C نگهداری کنید.
- از قرار دادن ویال‌های کیت در معرض نور جدا خودداری نمایید.
- از ذوب و انجماد مکرر کیت خودداری کنید زیرا باعث کاهش حساسیت و کارایی کیت می‌شود.
- از مصرف کیت‌های تاریخ گذشته خودداری نمایید.

مواد و وسایل مورد نیاز که در کیت موجود نیست

- هود لامینار
- سمپلر (متغیر)
- سرسمپلرهای فیلتردار Nuclease free
- ورتکس (Vortex Mixer)
- مینی فیوژ (Minifuge)
- دستگاه ترموسایکلر (Thermal Cycler)
- ژل آگارز (۰.۵٪)
- ترانس لومیناتور (Transilluminator)

استخراج DNA

- جهت استخراج DNA از کیت‌های مختلف استخراج DNA ژنومیک می‌توان استفاده نمود.
- از آنجایی که غلظت و خلوص DNA استخراج شده تاثیر زیادی در نتیجه تست دارد، لذا پس از استخراج DNA حتما با استفاده از نانودارپ غلظت و خلوص آن را بررسی نمایید.

RNA purity	
OD ₂₆₀ /OD ₂₈₀ ratio	1.8 to 2.1
OD ₂₆₀ /OD ₂₃₀ ratio	2.0 to 2.2

⚠ غلظت بهینه DNA مورد استفاده در واکنش ۲۰-۴۰ ng/μl می‌باشد.

آماده‌سازی واکنش

به تعداد نمونه‌هایی که می‌خواهید مورد بررسی قرار دهید، میکروتیوب مخصوص PCR بردارید.

در هر میکروتیوب ۱۸ میکرولیتر HLA-B*27 mix را اضافه نمایید.

به هر میکروتیوب ۲ میکرولیتر از DNA مربوط به بیمار را اضافه کنید.

در هر ران کاری علاوه بر نمونه‌ها 1 واکنش را جهت NTC در نظر بگیرید به میکروتیوب NTC نیز به جای نمونه ۲ میکرولیتر Nuclease free water اضافه نمایید.

تنظیمات دستگاه Thermal Cycler

دستگاه را مطابق با برنامه زیر تنظیم نمایید:

Step	Temperature	Time	Cycles
Initial activation	95°C	15 min	1
Pre-cycling	95°C	20 sec	10
	65°C	60 sec	
Amplification cycles	95°C	20 sec	20
	61°C	40 sec	
	72°C	30 sec	

آنالیز نتایج

- جهت آنالیز نتایج PCR به روش الکتروفورز مراحل زیر را انجام دهید:

۱- ژل آگارز 2 % تهیه نمایید.

۲- محصول PCR مربوط به هر بیمار را در چاهک های ژل اضافه کنید و DNA ladder با سایز 100 bp یا ۵۰ را نیز در یک چاهک ژل اضافه نمایید.

۳- پس از انجام الکتروفورز، ژل را توسط دستگاه ترانس لومیناتور مشاهده کنید.

الف) باند 430 bp مربوط به تکثیر ژن کنترل داخلی بوده و مشاهده آن نشان دهنده تکثیر محصول PCR می‌باشد. در صورت عدم مشاهده این باند آزمایش باید تکرار گردد.

ب) مشاهده باند 430 bp به صورت تنها نشان دهنده منفی بودن نمونه می‌باشد.

ج) مشاهده باند 145 bp یا 205 bp و یا هر دو همراه با باند 430 bp نشان دهنده مثبت بودن نمونه و وجود ژن HLA-B27 می‌باشد.