


# HLA-B27 RealFast™ Assay

Kat. číslo 7-620

 -20°C/2-8°C



100 testů



Výrobce:

**ViennaLab Diagnostics GmbH**

Gaudenzdorfer Guertel 43-45

A-1120 Vienna, Austria

Phone: (+43-1) 8120156-0

[info@viennalab.com](mailto:info@viennalab.com)

[www.viennalab.com](http://www.viennalab.com)

## 1. Použití




HLA-B27 RealFast™ Assay je rychlý a přesný real-time PCR test pro detekci alely HLA-B27 a specifických variant genu *lidského leukocytového antigenu B (HLA-B)*, který je silně asociován se seronegativní spondyloartrózi. Kit je určen pro zjištění suspektní diagnózy ankylozující spondylitidy, reaktivní artritidy, juvenilní reumatoidní artritidy a anteriorní uveitidy. Kvalitativní test rozlišuje mezi přítomností a absencí HLA-B27 v genomové DNA a detekuje všechny pro nemoc relevantní HLA-B27 subtypy.

Referenční sekvence: HGVS: NG\_023187.1.

## 2. Úvod

HLA-B molekuly jsou proteiny buněčného povrchu, které hrají důležitou roli v imunitě. Frekvence variant HLA-B27 je vzácná a vyskytuje se přibližně u 8% běžné populace bělochů, zatímco u pacientů trpících ankylozující spondylitidou (AS) se vyskytuje ve více než 90%. Onemocnění, převážně se vyskytující u mužů ve věku 20 až 40 let, je charakterizováno zánětem sakroilického kloubu a progresivní tuhostí páteře. Vzhledem k vysoké korelaci s tímto onemocněním je genotypizace HLA-B27 vhodná pro diferenciální diagnostiku AS. Jiné podskupiny spondyloartrózy jsou také spojeny s HLA-B27, i když v menší míře.

## 3. Obsah kitu

RealFast™ 2x Genotyping Mix	1 zkumavka		bílé víčko	1000 µl
HLA-B27 Assay Mix	1 zkumavka		fialové víčko	550 µl
HLA-B27 Positive Control	1 zkumavka		zelené víčko	75 µl

RealFast™ 2x Genotyping Mix obsahuje HotStart Taq DNA polymerázu a dNTPs a optimalizovaný systém pufrů. HLA-B27 Assay Mix obsahuje gen-specifické primery a dvě alel-specifické, dvoubarevné hydrolytické sondy pro HLA-B27 a kontrolní gen. Pozitivní kontrola je součástí kitu.

Kit obsahuje reagenty pro 100 reakcí o objemu 20 µl každá.

## 4. Skladování a Stabilita

HLA-B27 RealFast™ Assay je dodávána na chladících blocích. Po dodání skladujte kit při -20°C. Pro rychlé použití je možné skladování při 2-8°C po dobu 1 měsíce. Kit odolá až 20 cyklům zmrazení/rozmrazení bez ztráty aktivity. Vyhněte se dlouhodobému působení intenzivního světla. Při správném skladování kitu bude zachována plná aktivita až do data expirace uvedeného na štítku.

## 5. Popis produktu

### 5.1. Princip testu

Test je založen na principu fluorogenní 5' nukleázy, známém také jako TaqMan® test. Každá reakce obsahuje genově specifický primer, který amplifikuje 184 bp fragment genu HLA-B27 a kontrolního genu, později použitého jako PCR kontrola. Dalšími komponentami jsou dvě dvojitě značené gen-specifické hydrolytické sondy, které hybridizují s cílovou sekvencí amplifikovaného fragmentu. Blízkost 5'-fluorescenčního reportéru a 3'-zhášeče na intaktních sondách zabraňuje reportéru fluoreskovat. Během prodloužené fáze PCR 5' - 3' exonukleázové aktivity Taq DNA polymerázy se 5'-fluorescenční reportér štěpí z hybridizované sondy. Fyzikální separace fluoroforu od barvicího činidla způsobujícího zhášení vytváří fluorescenční signál v reálném čase, který je úměrný kumulativnímu produktu PCR.

Ve vzorcích HLA-B27 se obě, **FAM-značená HLA-B27 sonda** a **HEX-značená PCR kontrola** hybridizuje s komplementárním řetězcem fragmentu genu. Silný fluorescenční signál je detekován ve **FAM** kanálu (520nm) a v **HEX** kanálu (556nm). Ve vzorcích negativních na HLA-B27 se pouze HEX-značená PCR kontrolní sonda hybridizuje na komplementární vlákno fragmentu kontrolního genu. V kanálu HEX je detekován silný fluorescenční signál a žádný nebo pouze výchozí signál je ve FAM kanálu.

## 5.2. Kompatibilita s Real-time PCR přístroji

HLA-B27 RealFast™ Assay je validován s použitím přístroje AB 7500 Fast.

Kit je kompatibilní s různými dalšími real-time PCR přístroji umožňujícími detekci fluorescence FAM a HEX:

- ✓ AB 7500 Fast (Applied Biosystems®)
- ✓ CFX96™ (Bio-Rad)
- ✓ LightCycler® 480 (Roche)
- ✓ Mx3005P™ (Agilent Technologies)
- ✓ Rotor-Gene® 6000 (Qiagen)

**Poznámka:** RealFast™ Genotyping QuickGuides pro přípravu a analýzu experimentu na různých typech přístrojů lze stáhnout z [www.viennalab.com](http://www.viennalab.com). Pokud používáte ABI 7500 Fast, nastavte passive reference na „None“!

Kit je dodáván **bez ROX**. Pro použití s real-time PCR přístroji, které vyžadují ROX pro normalizaci dat (např. Applied Biosystems®: StepOne, 7300, 7900/900HT), přidejte ROX ve finální koncentraci 1μM do 2x Genotyping mixu.

## 5.3. Výkonnostní specifikace kitu

Stanovení **sensitivity** bylo provedeno na 66 vzorcích pozitivních na HLA-B27 alelu s CE referenčním kitem. HLA-B27 RealFast™ kit stanovil všech 66 vzorků jako pozitivních, což odpovídá 100% pravdivě pozitivních hodnot.

Stanovení **specificity** bylo provedeno na 130 vzorcích negativních na HLA-B27 alelu s CE referenčním kitem. HLA-B27 RealFast™ kit stanovil všech 130 vzorků jako negativních, což odpovídá 100% pravdivě negativních hodnot.

Limit detekce: 0,2 ng genomové DNA (v reakci)

Doporučení koncentrace DNA: 2 – 20 ng/μl genomové DNA

## 6. Nutný materiál, který není součástí kitu

Real-time PCR přístroj s filtry pro FAM (520 nm) a HEX (556 nm), s přístrojem kompatibilní reakční zkumavky, jednorázové bezpudrové rukavice, vortex, mini-centrifuga pro 2.0 ml zkumavky, stojánky na zkumavky, set kalibrovaných mikropipet (0,5 – 1000 μl), sterilní špičky s filtrem, molecular grade voda, DNA izolační kit, mrazák, koš na biohazardní odpad.

## 7. Protokol experimentu

### 7.1. Izolace DNA

Reagencie pro izolaci DNA nejsou součástí kitu.

Lze použít DNA izolovanou z různých zdrojů (např. z plné krve, suché kapky, bukalního stěru nebo slin). Ujistěte se, že je izolovaná DNA vhodná k amplifikaci vzhledem k její koncentraci, čistotě a integritě. Pro přesné stanovení genotypu by mělo být množství DNA v reakci v rozmezí od 10 do 100 ng u všech vzorků.

### 7.2. PCR kontroly

**Vždy** přidejte **Netemplátovou kontrolu (NTC)** do každého experimentu, aby bylo možné vyloučit případnou kontaminaci. Je vhodné analyzovat NTC (použijte PCR-grade vodu místo DNA) v duplikátu.

**Vždy** přidejte HLA-B27 **Positive-Control** jako pozitivní referenční signál k Vaším neznámým vzorkům.

**Poznámka:** Positive control je potenciálním zdrojem kontaminace. Pracujte s ní opatrně.

### 7.3. Příprava HLA-B27 RealFast™ Master Mixu

Po rozmrznutí lehce zvortexujte a krátce stočte všechny roztoky. PCR mix připravujte při laboratorní teplotě. Připravte si dostatek **Master Mixu** pro všechny Vaše reakce (N vzorků + pozitivní kontroly + negativní kontrola/y) plus alespoň jedna další reakce navíc pro korekci pipetovací chyby:

Roztok	Na 1 reakci	např. na 24+1 reakcí
RealFast™ 2x Genotyping Mix	10 µl	250 µl
HLA-B527 Assay Mix	5 µl	125 µl
<b>Master Mix</b>	<b>15 µl</b>	<b>375 µl</b>

Dávkujte **15 µl Master Mixu** do každé zkumavky. Přidejte **5 µl** přečištěné **DNA** nebo **Kontroly** do finálního reakčního objemu 20 µl.

Pro minimalizování rizika kontaminace, vždy pipetujte templát v následujícím pořadí: první NTC, potom vzorky a poslední pozitivní kontroly.

Okamžitě uzavřete zkumavky.

**Poznámka:** Zabraňte vzniku bublin ve finálním reakčním mixu a nesahejte na povrch víček nebo sealing filmu bez rukavic. Obojí může mít vliv na měření fluorescence. Krátce stočte je-li to nutné.

### 7.4. PCR program

Programujte real-time PCR přístroj dle manuálu výrobce pro alelickou diskriminaci/genotypovací experiment. Vložte vzorky do cycleru a spusťte následující program:

**AB 7500 Fast, CFX96™, LightCycler® 480,**

**Mx3005P® a ostatní přístroje s Peltier blokem:**

Počet cyklů	Teplota	Čas	Krok
1	95°C	3 min	Počáteční denaturace
40	95°C	15 s	Denaturace
	60°C	1 min	Annealing/Extenze – <b>Data acquisition</b> ve FAM a HEX kanálu

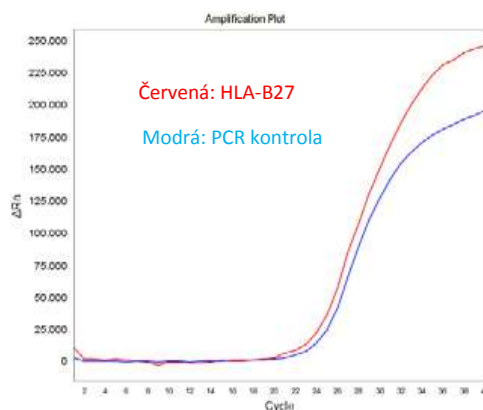
**Rotor-Gene® 6000:**

Počet cyklů	Teplota	Čas	Krok
1	95°C	3 min	Počáteční denaturace
40	95°C	15 s	Denaturace
	36well rotor:56°C 72well rotor:60°C	1 min	Annealing/Extenze – <b>Data acquisition</b> ve FAM a HEX kanálu

## 8. Analýza dat / Interpretace výsledků

Přítomnost nebo absence HLA-B27 alely je definována přítomností nebo nepřítomností signálu v kanálu **FAM**. Úspěšná PCR amplifikace může být ověřena amplifikací kontrolního genu (PCR kontrola) detekovaného v kanálu **HEX**. Proto genomové DNA vzorky pozitivní na HLA-B27 alelu a také HLA-B27 positive control vykazují amplifikaci v obou HEX a FAM kanálech. HLA-B27 negativní vzorky vykazují amplifikaci pouze v HEX kanálu. Míra fluorescence odpovídá amplifikačním křivkám a je zobrazena v amplifikačních datech v real-time PCR softwaru.

Typ vzorku	Amplifikace ve FAM kanálu (520 nm)	Amplifikace v HEX kanálu (556 nm)
HLA-B27 pozitivní	<b>ANO</b>	<b>ANO</b>
HLA-B27 negativní	<b>NE</b>	<b>ANO</b>
HLA-B27 Positive control	<b>ANO</b>	<b>ANO</b>
NTC	<b>NE</b>	<b>NE</b>



Amplifikační křivky HLA-B27 pozitivního vzorku

Některé softwary potřebují pro přesnou analýzu nastavit Treshold manuálně.

Doporučení pro nastavení Tresholdu ( $C_q$ ):

Nastavte hodnotu tresholdu pro kanál FAM a HEX přesně nad fluorescenční signál pozadí generovaný netemplátovou kontrolou (NTC).

## 9. Varování a opatření

- Určeno pro *in vitro* diagnostiku.
- Při používání reagensí a vzorků vždy používejte jednorázové bezpudrové rukavice a vhodný laboratorní oděv.
- Přípravu PCR reakce provádějte v prostoru odděleném od prostoru pro přípravu nukleových kyselin a prostoru pro analýzu PCR produktů.
- Používejte pipety určené pro přípravu PCR reakcí, používejte filtrované špičky.
- Používejte reakční zkušavky kompatibilní s přístrojem s opticky čistými víčky nebo sealery.
- Nemíchejte reagentie z různých šarží.
- Nepoužívejte expirované kity nebo jejich součásti.