

عنوان محصول:

کیت شناسایی کیفی جنسیت جنین به روش Real time PCR

حیطه ی کاربرد:

این کیت جهت شناسایی کیفی جنسیت جنین در نمونه های cell free DNA طراحی گردیده است.

اصول آزمایش کیت :

کیت شناسایی کیفی جنسیت جنین بر مبنای روش Real time PCR با استفاده از پروب های رنگی مختلف MGB طراحی شده است. این روش مبتنی بر تکثیر همزمان قطعات DNA ژن SRY واقع بر کروموزوم Y انسانی و یک ژن مشترک در بین جنس زن و مرد و یک ژن انسانی به عنوان ژن کنترل داخلی مبتنی بر پروب های MGB به ترتیب با فلوروفورهای FAM، Cy5، Texas Red/Cy5، HEX طراحی شده است که قادر به تعیین جنسیت جنین با استفاده از Cell-free fetal DNA (cffDNA) از پلاسمای خون مادر در هفته ۶ تا ۱۰ بارداری می باشد.

جدول ۱: محتویات کیت

۹۶ تستی	۴۸ تستی	۲۴ تستی	برچسب	معرف
4 x 240 µl/Vial	2 x 240 µl/Vial	240 µl/Vial	SD	مخلوط واکنش
500 × 1 µl/Vial	500 × 1 µl/Vial	250 µl/Vial	PC	کنترل مثبت

وسایل مورد نیاز که در کیت موجود نیست :

- دستگاه ارزیابی و کالیبر Real-time PCR با حداقل ۳ کانال HEX/VIC/JOE (زرد)، FAM (سبز)، CY5/Quasar ۶۷۰ (قرمز) یا Texas Red (نارنجی)
- هود زیستی کلاس II یا PCR Work station
- فریزر -۲۰ درجه
- تمام نمونه های بیولوژیکی موجود در این کیت غیرفعال شده اند و خطری برای سلامتی ندارند.
- نوک سمپلر (۱۰ میکرولیتر، ۱۰۰ میکرولیتر و ۱۰۰۰ میکرولیتر. نوک سمپلر استریل فیلتر دار ترجیح داده می شود)
- کیت استخراج DNA
- میکروتیوب عاری از RNase و DNase (۱/۵ میلی

لیتری و ۲/۰ میلی لیتری)

۸. میکروسانتریفیوژ

۹. سمپلرهای متغیر

۱۰. مواد مصرفی: دستکش یکبار مصرف فاقد پودر، روپوش های آزمایشگاهی، خودکار علامت گذاری آزمایشگاهی و رول دستمال کاغذی

نگهداری کیت :

- کیت پس از تحویل باید در دمای -۲۰ درجه سانتی گراد و در تاریکی نگهداری شوند. حفظ دما در مدت زمان نگهداری محصول الزامی است. (حداکثر زمان نگهداری کیت به شرط حفظ دمای نگهداری، به مدت ۳ ماه خواهد بود).
- نگهداری کیت در دمای ۴ درجه سانتیگراد هیچ گاه نباید بیشتر از یکساعت شود.
- با افزایش دفعات ذوب کردن مجدد مواد، از حساسیت کیت کاسته می شود.
- کلیه معرف ها و اجزاء کیت تا تاریخ انقضاء مندرج بر روی جعبه کیت به شرط نگهداری در دمای مذکور پایدار هستند. هرگز فراتر از تاریخ انقضاء مندرج بر روی جعبه از کیت استفاده نکنید (تاریخ تولید و انقضاء روی جعبه کیت درج شده باشد).
- پایداری کیت در شرایط Freeze & Thaw تا ۳ مرتبه کنترل شده است؛ بنابراین از ذوب و یخ زدگی چندین باره محلول ها (بیش از ۳ مرتبه) خودداری شود.
- اجزاء کیت ها با سری ساخت متفاوت را با یکدیگر مخلوط نسازید و از جابه جایی درب معرف ها بپرهیزید.

جمع آوری و آماده سازی نمونه:

- نوع نمونه: نمونه مورد نیاز بایستی از پلاسما خون مادر باردار در هفته ۱۰-۶ استخراج گردد.
- شرایط نمونه گیری: نمونه برداری با رعایت پروتکل های تهیه نمونه عفونی در شرایط استریل انجام شود. برای جمعآوری خون یا پلاسما، از لولههای استریل حاوی مواد ضدانعقادی مانند EDTA یا سیترات استفاده کنید. توجه داشته باشید که نمونه های حاوی هپارین به دلیل اثر مهاري این ماده برای PCR مناسب نیستند.
- حمل و نقل نمونه: نمونه ها باید روی سه عدد یک یخ آبی (Ice pack) داخل یونولیت محفظه بسته حمل شوند.
- شرایط نگهداری نمونه: طی چند ساعت اولیه پس از خونگیری، پلاسما را جدا و تا زمان

آماده سازی مخلوطهای کیت:

۱. قبل از شروع کار اطمینان حاصل نمایید که دمای کلیه اجزاء کیت به دمای اتاق رسیده باشد.
۲. معرف ها و نمونه ها را قبل از آزمایش بخوبی مخلوط نمایید.
۳. فرایند پیتینگ از اهمیت بسیار بالایی برخوردار است. پیتینگ ناکافی باعث تغییر غلظت مناسب مسترمیکس و پرایمر و پروب ها خواهد شد.
۴. در هر بار انجام آزمایش کنترل مثبت کیت باید استفاده شود تا کارائی واکنش مورد ارزیابی قرار گیرد.
۵. در کلیه مراحل انجام آزمایش و متعاقب هر مرحله پیتینگ، تیوب ها از نظر وجود حباب بررسی شوند. در صورت وجود حباب با ضربه آهسته به تیوب از محیط خارج شوند.
۶. هر نوع نمونه یا ماده کنترلی که حاوی رنگ باشد، با این کیت سازگار نبوده و آزمایش بروی آنها ممکن است منجر به نتایج کاذب شود.

دستورالعمل انجام آزمایش:

آماده سازی قبل از واکنش:

از کیت های استخراج با حساسیت مناسب ژنومی استفاده شود. لازم به ذکر است این محصول در بردارنده کیت استخراج DNA نیست ولی با بیشتر کیت های تخلیص اسید نوکلئیک سازگار می باشد.

آماده سازی واکنش:

اسید نوکلئیک مستقیماً در واکنش qPCR مورد استفاده قرار می گیرد. ابتدا در محل مناسب و استریل، محتویات کیت را از داخل بسته بندی خارج کرده و اجازه دهید تا در دمای اتاق خوب شوند. مراحل مطابق با مراحل زیر انجام می شود:

۱- در کلیه آزمایشات برای هر بیمار ۱ میکروتیوب همراه با میکروتیوب های کنترل مثبت و منفی و NTC نام گذاری نمایید.

۲- جهت انجام آزمایش، مواد و واکنش-گر را روی یخ قرار دهید.

۳- ۱۰ میکرولیتر از هر کدام از SD به تمامی میکروتیوب های نام گذاری شده اضافه کنید.

۴- ۱۰ میکرولیتر آب مقطر استریل را به میکروتیوب NTC اضافه کنید.

۵- ۱۰ میکرولیتر کنترل منفی به میکروتیوب هایی که برای آن نام گذاری شده است اضافه کنید.

۶- ۱۰ میکرولیتر از کنترل مثبت در یک فضای دور از محوطه آماده سازی سایر مخلوطهای واکنش به تیوب واکنش کنترل مثبت اضافه کنید.

انجام آزمایش دردمای C-۲۰ نگهداری کنید. سایر نمونه های مورد استفاده را نیز طی چند ساعت اولیه پس از نمونه گیری دردمای C-۲۰ نگهداری و از فریز و ذوب کردن مکرر آنها خودداری نمایید. در صورت حمل و نقل نمونه، نمونه را در شرایط سرد و همراه یخ منتقل کنید.

هشدارها و ایمنی:

۱. کیت فقط برای تشخیص آزمایشگاهی کاربرد دارد. از نتایج این کیت به تنهایی جهت تشخیص تأیید یا رد عفونت نباید استفاده نمود بنابراین باید تفسیر نتایج با توجه به تمامی داده های آزمایشگاهی و بالینی انجام شود.

۲. قبل از آغاز سنجش، دستورالعمل پیش رو را با دقت مطالعه نموده و اطمینان حاصل کنید که تمامی نکات آن را بخوبی فرا گرفته اید.

۳. در طی انجام مراحل استخراج یا آماده سازی مخلوط واکنش، دستکش های خود را بین هر مرحله مرتب تعویض کنید تا از ایجاد آلودگی های کاذب در روند آزمایش جلوگیری شود. مراحل کار باید طبق شرایط استاندارد آزمایشگاه در پیشگیری از ایجاد آلودگی و عفونت انجام گیرد و همچنین شرایط دفع زباله های عفونی این تست به مانند دیگر عوامل بیماری زا می باشد.

۴. تمامی وسایل که در آزمایشگاه PCR مورد استفاده قرار می گیرند باید قبل و بعد از انجام تست با هیپوکلریت سدیم ۱۰٪ و الکل ۷۰٪ ضد عفونی شوند و از جابه جایی این وسایل بین بخش های مختلف پرهیز کنید. در واقع هر بخش باید وسایل، مواد و مخصوصاً سمپلر مختص به خود را داشته باشد. در زمان انجام تست از نوک سمپلر فیلتر دار استفاده شود.

۵. از تماس تمام معرف ها با نور مستقیم جلوگیری شود.

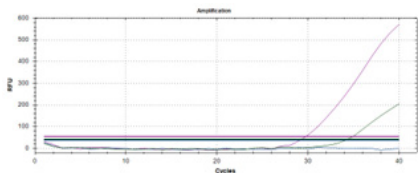
۶. کیت را هنگام نگهداری و حین حمل و نقل به حالت ایستاده قرار دهید.

۷. پیش از استفاده از کیت، ویال ها رو از لحاظ نشئی یا آسیب بررسی کنید.

۸. محلول های استفاده نشده را مطابق با قوانین و مقررات کشوری دور بیندازید.

۹. قبل از استفاده کیت، محتویات آنرا از فریزر خارج کرده و اجازه دهید در دمای محیط به طور کامل ذوب شوند، پیش از استفاده به مدت کوتاهی با دور پائین سانتریفیوژ یا اسپین نمایید.

۱۰. تمام مراحل مربوط به تهیه مسترمیکس باید روی یخ یا جعبه های سرد انجام شود.



تصویر ۲: نتیجه روی یک نمونه مثبت جنس زن. تنها در ۲ کانال سبز و قرمز تکثیر صورت گرفته است.

جدول نمادها:

	Catalog number	شماره رفرنس
	Batch code	سری ساخت
	In vitro diagnostic medical device	فرآورده تشخیصی و بالینی
	Data of manufacture	تاریخ تولید
	Expiry date	تاریخ انقضا
	Temperature limitation	دمای نگهداری
	Read instructions befor use	مطالعه بروشور
	Sufficient for n tests	محتویات برای n تست کافیست
	Caution consult accompanying documents	توجه به مدارک همراه
	Manufacturer	آدرس شرکت
	Keep away from sunlight	در جای تاریک نگهداری شود

۷- ۱۰ میکرولیتر از DNA نمونه بیماران را به میکروتیوب هایی که برای آن نام گذاری شده است اضافه کنید.
۸- محتویات میکروتیوب ها را خوب مخلوط کرده و یا Spin کوتاه انجام دهید.

جدول ۲: مقادیر واکنش

مواد مورد نیاز برای هر تست	میزان مورد نیاز برای هر تست
مخلوط واکنش	۱۰ میکرولیتر
الگو (کنترل منفی، DNA بیمار، کنترل مثبت)	۱۰ میکرولیتر
حجم نهائی واکنش	۲۰ میکرولیتر

جدول ۳: مشخصات واکنش حرارتی

پس از انجام تنظیمات و انتخاب کانال خوانش، فایل را ذخیره کرده و دستگاه را با برنامه دمائی و زمانی زیر راه اندازی کنید.

تعداد سیکل	زمان	دما (°C)	مراحل
۱	۵ min	۹۵	Initial Denaturation
۴۰	۱۰ sec	۹۵	Denaturation
۴۰	۲۰ sec	۶۶*	Annealing / Extension (FAM/HEX /CY5)

* دمایی است که برای خوانش فلورسنت دستگاه تنظیم می گردد.

آنالیز و تفسیر نتایج:

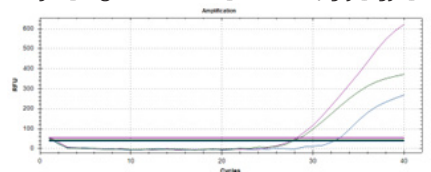
تمامی کنترل های آزمایش باید پیش از تفسیر نتایج بیمار، بررسی شوند. اگر کنترل ها شامل کنترل مثبت و منفی مورد تأیید نیستند، نباید نتایج آزمایش بیماران تفسیر گردد.

جدول ۴: تفسیر نتایج و کنترل ها

CY5	Green	HEX	Result
POSITIVE	POSITIVE	POSITIVE	MALE
POSITIVE	POSITIVE	NEGATIVE	MALE
POSITIVE	NEGATIVE	POSITIVE	FEMALE
POSITIVE/NEGATIVE	POSITIVE/NEGATIVE	NEGATIVE/POSITIVE	unacceptable

حساسیت کیت:

امکان تعیین جنسیت با LOD برابر با ۱۰ نانوگرم در میکرولیتر و با اختصاصیت ۱۰۰٪ ممکن میسازد.



تصویر ۱: نتیجه روی یک نمونه مثبت جنس مرد. هر ۳ کانال تکثیر صورت گرفته است.