

راهنمای کیت Aspergillus RQ2

کیت Aspergillus RQ2 به منظور تشخیص DNA چهار نوع از گونه های کپک قارچی آسپرژیلوس شامل گونه‌ی فامیگاتوس (*A. fumigatus*)، فلاووس (*A. flavus*)، ترئوس (*A. terreus*) و نیگر (*A. niger*) با روش Real-Time PCR طراحی شده است (بدون تفکیک گونه ها از یکدیگر). این کیت برای استفاده با دستگاه های MIC، Rotor-Gene و StepOne و جهت مصارف تحقیقاتی طراحی شده است.

محتویات کیت: این کیت شامل یک راهنما و مواد زیر می باشد:

برچسب	محتوا	حجم
ASPG 2C Mix	میکس آماده برای PCR *	۳۶۰ میکرولیتر
A.fum Pos Ctrl	شاهد مثبت برای گونه فامیگاتوس	۱۰۰ میکرولیتر
A.fla Pos Ctrl	شاهد مثبت برای گونه فلاووس	۱۰۰ میکرولیتر
A.ter Pos Ctrl	شاهد مثبت برای گونه ترئوس	۱۰۰ میکرولیتر
A.nig Pos Ctrl	شاهد مثبت برای گونه نیگر	۱۰۰ میکرولیتر
Internal Ctrl	کنترل داخلی *	۲۵۰ میکرولیتر
Water	آب مخصوص PCR	۲۰۰ میکرولیتر

تمامی مواد کیت باید در دمای ۱۰ تا ۳۰ درجه زیر صفر نگهداری شوند.

کنترل داخلی: برای ارزیابی احتمال استخراج نامناسب یا مهار واکنش و جلوگیری از نتایج منفی کاذب، این کیت حاوی کنترل داخلی می‌باشد. برای استفاده در مرحله استخراج، کنترل داخلی را پس از افزودن بافر lysis به نمونه، اضافه کنید. میزان مورد نیاز از کنترل داخلی ده درصد حجم حلال نهایی (elution buffer) می‌باشد. در صورتی که کنترل داخلی را به ASPG 2C Mix اضافه می‌نمایید، تنها می‌توانید مهار واکنش PCR را

بررسی کنید. به این منظور به ازای هر واکنش PCR، یک میکرولیتر از کنترل داخلی را به ASPG 2C Mix اضافه نمایید. در صورت موفق بودن PCR کنترل داخلی منجر به تولید فلورسانس با تابش زرد (VIC/Yellow) و CT بین ۲۷ تا ۳۴ می‌باشد.

روش استفاده: تعداد مورد نیاز لوله PCR روی بلوک سرد بگذارید. علاوه بر تعداد نمونه‌های مورد آزمایش، چهار لوله برای کنترل مثبت و یک لوله برای کنترل منفی (آب) نیز در نظر بگیرید.

در صورتی که کنترل داخلی را در حین استخراج وارد کرده اید، به هر لوله مستقیماً ۱۵ میکرولیتر از **ASPG 2C Mix** اضافه کنید.

در صورتی که مایلید کنترل داخلی را به **ASPG 2C Mix** اضافه نمایید، مطابق توضیحات بخش کنترل داخلی دفترچه راهنما، کنترل داخلی را به میکس افزوده و ۱۵ میکرولیتر از مخلوط حاصل را به هر لوله منتقل کنید.

در پایان ۱۰ میکرولیتر از DNA استخراج شده، **شاهد** یا آب به هر لوله اضافه کنید. درپوش لوله‌ها را ببندید. سپس آن‌ها را مطابق شماره‌ها داخل دستگاه قرار دهید.

تنظیم دستگاه: برای تنظیم دستگاه Rotor-Gene از فایل تمپلیت مخصوص این کیت استفاده کنید یا دستگاه خود را مطابق جدول زیر تنظیم کنید.

Step	Temperature and time	Cycles
1	95°C x 3 min	1
2	95°C x 15 sec	45
	60°C x 60 sec	

اندازه گیری تابش فلورسانس باید در دمای ۶۰ درجه و برای کانال‌های سبز، زرد تنظیم شود. میکس موجود در کیت حاوی ROX می‌باشد. غلظت نهایی ROX در واکنش 300nM می‌باشد.

آنالیز نتایج: توجه داشته باشید که افزایش **تابش سبز (Green)** مربوط به **Aspergillus** و افزایش **تابش زرد (Yellow)** حاصل از **کنترل داخلی** می باشد. هنگام آنالیز برای دستگاه روتورژن آستانه را برای کانال سبز روی ۰/۰۵ و برای کانال زرد روی ۰/۱ قرار دهید. برای آنالیز نتایج روی دستگاه استپ وان آستانه را برای کانال FAM روی ۰/۱ و برای کانال VIC روی ۰/۰۵ قرار دهید.



همچنین نمونه تنها زمانی مثبت در نظر گرفته می شود که دارای منحنی سیگموییدی و فاز لگاریتمی باشد و تنها در این حالت CT معتبر بوده و قابل استناد و تفسیر می باشد. در غیاب منحنی سیگموییدی، نمونه منفی محسوب می شود و (CT آن) در صورت وجود فاقد ارزش می باشد.

بر اساس نکات بالا نتایج به طور خلاصه در جدول زیر نشان داده شده است:

Green	Yellow	Result
+	+/-	Positive
-	+	Negative
-	-	Inconclusive

میزان حساسیت: حساسیت تشخیصی این کیت با استفاده از نمونه کلون شده حاوی بخشی از ژنوم آسپرژیلوس بررسی شده است. میزان حساسیت برای گونه های فامیگاتوس، ترئوس و نیگر معادل ۲ کپی در میکرولیتر و برای گونه فلاووس معادل ۹ کپی در میکرولیتر می باشد. یعنی در ۹۵٪ مواردی که تیترا آسپرژیلوس در نمونه مورد آزمایش بیش از این میزان باشد، توسط این کیت تشخیص داده خواهد شد. در صورت کاهش تیترا نمونه به کمتر از این میزان همچنان کیت قادر به تشخیص خواهد بود اما با ضریب اطمینان به مراتب کمتر.

توضیحات برچسب:

دستورالعمل برای استفاده را بررسی نمایید		تولید کننده		جهت مصارف پژوهشی	RUO
تاریخ انقضاء		تعداد <n> آزمون کافی		کدبهر (شماره بچ)	LOT
محدوده دمایی	 -30°C / -10°C	شماره سریال	SN	شماره کاتالوگ	REF

جهت توضیحات بیشتر در مورد کیت‌های نوین ژن، دریافت فایل کامل دفترچه راهنمای کیت و فایل تمپلیت برای تنظیم دستگاه و آشنایی با نمایندگان فروش، به وبسایت ما به نشانی www.novingene.com مراجعه فرمایید یا QR Code موجود بر روی جعبه کیت را اسکن نمایید. جهت کسب اطلاعات بیشتر با پشتیبانی فنی تماس بگیرید.