

راهنمای کیت Parvovirus B19 RQ

کیت Parvovirus B19 RQ به منظور تشخیص DNA پاروویروس B19 (Parvovirus B19) به روش Real-Time PCR با دستگاه Rotor-Gene، StepOne و MIC و به جهت مصارف تحقیقاتی طراحی شده است. این کیت همچنین حاوی کنترل داخلی می باشد که از گزارش منفی کاذب حاصل از ناکارآمدی استخراج DNA یا مهار PCR پیشگیری می کند.

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

برچسب	محتوا	حجم
PV-B19 Mix	میکس آماده برای PCR	۳۶۰ میکرولیتر
PV1	استاندارد ۱: صد هزار کپی در میکرولیتر	۱۵۰ میکرولیتر
PV2	استاندارد ۲: ده هزار کپی در میکرولیتر	۱۵۰ میکرولیتر
PV3	استاندارد ۳: یک هزار کپی در میکرولیتر	۱۵۰ میکرولیتر
PV4	استاندارد ۴: صد کپی در میکرولیتر	۱۵۰ میکرولیتر
PV5	استاندارد ۵: ده کپی در میکرولیتر	۱۵۰ 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 می باشد. 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) می باشد. در صورتی که

کنترل داخلی را به PV-B19 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 PV-B19 Mix اضافه نمایید. در صورت موفق بودن PCR کنترل داخلی منجر به تولید فلورسانس با تابش زرد (VIC/Yellow) و CT بین ۲۸ تا ۳۴ می‌شود.

روش استفاده: تعداد مورد نیاز لوله PCR روی بلوک سرد بگذارید. علاوه بر تعداد نمونه های مورد آزمایش، پنج لوله برای استانداردها 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 PV-B19 Mix اضافه کنید.**

در صورتی که مایلید کنترل داخلی را به PV-B19 Mix اضافه نمایید، مطابق توضیحات قسمت قبل 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، **استاندارد یا آب به هر لوله اضافه کنید.**

درپوش لوله ها را ببندید. سپس آن ها را مطابق شماره ها داخل دستگاه قرار دهید.

تنظیم دستگاه: برای تنظیم دستگاه Rotor-Gene یا StepOne از فایل تمپلیت مخصوص این کیت استفاده کنید. همچنین می‌توانید دستگاه را مطابق برنامه زیر تنظیم نمایید.

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 رنگ های FAM و VIC تنظیم شود. PV-B19 Mix موجود در کیت حاوی ROX با غلظت نهایی 300nM می‌باشد.

آنالیز نتایج: توجه داشته باشید که افزایش تابش FAM/Green مربوط به Parvovirus B19 و افزایش تابش VIC/Yellow حاصل از کنترل داخلی می‌باشد.

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

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

	Green/FAM	Yellow/VIC	Result
1	+	+/-	PV B19 Pos
2	-	+ CT 28-34	PV B19 Neg
3	-	-	Invalid
4	-	+ CT>34	Invalid



محاسبه تیترو ویروس: برای تبدیل نتایج به صورت کپی در میلی لیتر، از معادله زیر استفاده کنید:

$$\text{Result (copy/ml)} = \frac{\text{Result(copy/}\mu\text{l)} \times \text{elution volume}(\mu\text{l})}{\text{sample volume(ml)}}$$

محدوده خطی: محدوده خطی این کیت با استفاده از نمونه کلون شده حاوی بخشی از ژنوم پاروویروس B19 بررسی شده است و شامل بازه ده میلیون کپی در میکرولیتر تا یک کپی در میکرولیتر می‌باشد.

میزان حساسیت: حساسیت تشخیصی این کیت با استفاده از نمونه کلون شده حاوی بخشی از ژنوم ویروس Parvovirus B19 بررسی شده است و معادل چهار کپی در میکرولیتر می باشد.

توضیحات برچسب:

دستورالعمل برای استفاده را بررسی نمایید		تولید کننده		جهت مصارف پژوهشی	RUO
تاریخ انقضاء		تعداد $n >$ آزمون کافی		کدپهر (شماره بچ)	LOT
محدوده دمایی	 -30°C / $+10^{\circ}\text{C}$	شماره سریال	SN	شماره کاتالوگ	REF

جهت توضیحات بیشتر در مورد کیت های 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.