

راهنمای کیت Toxo RQ

کیت Toxoplasma Gondii RQ به منظور تشخیص DNA انگل آغازی توکسوپلازما به روش Real-Time PCR با دستگاه Rotor-Gene، StepOne و MIC 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
Toxo Mix	میکس PCR*	۳۶۰ میکرولیتر
Pos Ctrl	شاهد مثبت	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 Toxo Mix اضافه می نمایید، تنها می توانید مهار واکنش PCR را بررسی کنید. به این منظور به ازای هر واکنش PCR، یک میکرولیتر از کنترل داخلی را به Toxo Mix اضافه نمایید. در صورت موفق بودن PCR کنترل داخلی منجر به تولید فلورسانس با تابش زرد (VIC/Yellow) و CT بین ۲۸ تا ۳۲ در RotorGene و CT بین ۲۸ تا ۳۴ در StepOne می شود.

روش استفاده: تعداد مورد نیاز لوله PCR روی بلوک سرد بگذارید. علاوه بر تعداد نمونه های مورد آزمایش، یک 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 **Toxo Mix** اضافه کنید.

در صورتی که مایلید کنترل داخلی را به **Toxo Mix** اضافه نمایید، مطابق توضیحات قسمت کنترل داخلی آن 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 مثبت** یا آب به هر لوله اضافه کنید.

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

تنظیم دستگاه: برای تنظیم دستگاه آن 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 کانال های سبز و زرد تنظیم شود. Toxo Mix موجود در کیت حاوی ROX می باشد. غلظت نهایی ROX در واکنش 300nM می باشد.

آنالیز نتایج: توجه داشته باشید که افزایش تابش **FAM/Green** مربوط به **Toxoplasma** و افزایش تابش **زرد (Yellow)** حاصل از کنترل داخلی می باشد. هنگام آنالیز برای دستگاه روتورژن آستانه را برای هر دو کانال سبز و 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 سیگموئیدی و فاز لگاریتمی باشد و تنها در این حالت CT معتبر بوده و قابل استناد و تفسیر می باشد. در غیاب منحنی سیگموئیدی، 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 توکسوپلازما بررسی شده است و معادل ۴ کپی در میکرولیتر می باشد. یعنی در ۹۵٪ مواردی که تیتراژ در نمونه مورد آزمایش بیش از این میزان باشد، توسط این کیت تشخیص داده خواهد شد. در صورت کاهش تیتراژ نمونه به کمتر از این میزان همچنان کیت قادر به تشخیص خواهد بود اما با ضریب اطمینان به مراتب کمتر.

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.