راهنمای کیت Ureaplasma RG

کیت Ureaplasma RG به منظور تشخیص DNA باکتری های اوره آ پلاسما پاروووم و اوره‌آ پلاسما اوره‌آ لیتیکوم جهت مصارف تحقیقاتی به روش Multiplex Real-Time PCR طراحی شده است. این کیت همچنین حاوی کنترل داخلی می‌باشد که از گزارش منفی کاذب حاصل از ناکارآمدی استخراج DNA یا مهار PCR پیشگیری می‌کند.

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

برچسب	محتوا	حجم
Ureaplasma Mix	میکس PCR برای تشخیص Ureaplasma parvum and Ureaplasma urealyticum	۳۶۰ میکرولیتر
STI Pos Ctrl	شاهد مثبت	۱۵۰ میکرولیتر
Internal Control	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 و یا مهار PCR و جلوگیری از نتایج منفی کاذب، 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) می‌باشد. در صورتی که کنترل داخلی را به Ureaplasma Mix اضافه می نمایید، به ازای هر واکنش، یک میکرولیتر از کنترل داخلی را به Ureaplasma Mix اضافه نمایید. در صورت موفق بودن PCR منجر به تولید فلورسانس با تابش زرد (VIC/Yellow) و CT بین ۲۷ تا ۳۲ می‌شود. در این حالت کنترل داخلی موفق بودن PCR را نشان می‌دهد.

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 Ureaplasma Mix اضافه کنید.

در صورتی که مایلید کنترل داخلی را به Ureaplasma Mix اضافه نمایید، با توجه به 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، کنترل مثبت یا آب به هر لوله اضافه کنید.

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

تنظیم دستگاه: برای تنظیم دستگاه Rotor-Gene از فایل تمپلیت مخصوص این کیت استفاده کنید و سایر دستگاه های Real-Time PCR را می‌توانید 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، VIC و ROX تنظیم شود.

توجه داشته باشید که در این آزمایش *ROX* نباید به عنوان رنگ مرجع *(reference dye)* انتخاب شود.

آنالیز نتایج: توجه داشته باشید که افزایش **تابش سبز (Green)** مربوط به **Ureaplasma urealyticum** و افزایش **تابش نارنجی (Orange)** حاصل از **Ureaplasma parvum** و افزایش **تابش زرد (Yellow)** مربوط به **کنترل داخلی** می‌باشد.

هنگام آنالیز برای دستگاه Rotor-Gene برای کانال های سبز، زرد و نارنجی روی ۰/۱ تنظیم نمایید.

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	Orange	Yellow	Result
+	-	+	Pos for Ureaplasma urealyticum
-	+	+	Pos for Ureaplasma parvum
-	-	+	Negative
-	-	-	Inconclusive

میزان حساسیت: حساسیت تشخیصی این کیت با استفاده از نمونه کلون شده حاوی بخشی از ژنوم بررسی شده است. برای اوره آ پلاسما پاروم معادل ۷/۷ کپی در میکرولیتر می‌باشد و برای اوره‌آ پلاسما اوره‌آ لیتیکوم معادل ۷/۵ کپی در میکرولیتر می‌باشد. یعنی در ۹۵٪ مواردی که تیتر عامل عفونت زا در نمونه مورد آزمایش بیش از این میزان باشد، توسط این کیت تشخیص داده خواهد شد. در صورت کاهش تیتر نمونه به کمتر از این میزان همچنان کیت قادر به تشخیص خواهد بود اما با ضریب اطمینان به مراتب کمتر.

توضیحات برچسب:

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

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.