

آماده سازی اجزای واکنش آماده سازی مسترمیکس

حجم نمونه تخلیص شده مورد استفاده شده در این تست باید ۱۰ میکرولیتر باشد که براساس این حجم نمونه مورد آزمایش به جدول ۲ مراجعه کنید. مقادیر لازم برای آماده سازی هر لوله تست یا استاندارد و کنترل منفی در جداول 3، 4 و 5 آورده شده است. در صورت استفاده از کنترل داخلی، موضوع بحث بعدی در مورد کنترل داخلی را مطالعه کنید.

نکته: آماده سازی مسترمیکس برای هر تست را تازه انجام دهید و Pro HBV Mix را تا زمانی که احتیاج به انجام تست ندارید به QR-ROMAX, 4X اضافه نکنید.

واکنش Real Time-PCR مورد استفاده قرار گیرد.

قبل از شروع کار

قبل از اولین استفاده، محصول و اجزای آن را از نظر تعداد و حجم بررسی کنید. از محصول معیوب یا ناقص استفاده نکنید، عملکرد آن ممکن است تحت تاثیر قرار گیرد. از انواع دیگر نمونه جز پلاسمای انسانی استفاده نکنید! استفاده از انواع دیگر نمونه‌ها ممکن است عملکرد محصول را به خطر بیندازد.

استفاده نادرست از اجزاء و نمونه‌های محصول ممکن است منجر به آلودگی شده که نتایج نادرست تشخیص آزمایشگاهی را به همراه دارد.

حتما از سر سمپلرهای فیلتردار و RNase free & DNase استفاده کنید.

محتویات Viga Quantitative HBV Molecular Diagnostic Kit

100 واکنش	25 واکنش	اجزای کیت
875µl	220µl	Pro HBV Mix
625µl	160µl	QR-ROMAX, 4X IC
500µl	125µl	*QS1 (1×10 ⁴ IU/µl)
250µl	65µl	*QS2(1×10 ³ IU/µl)
250µl	65µl	*QS3(1×10 ² IU/µl)
250µl	65µl	*QS4(1×10 ¹ IU/µl)
1500µl	1500µl	Water (Molecular Biology grade)

مقدار نمونه مورد نیاز برای شروع واکنش

ابتدا باید 2-5 سی سی خون کامل بیمار داخل لوله حاوی ضد انعقاد EDTA اضافه شود. پس از جداسازی پلاسما و استخراج DNA طبق پروتکل کیت استخراج، مقدار 10 میکرولیتر DNA استخراج شده برای

Viga Quantitative HBV Molecular Diagnostic Kit

Store at -15°C to -30°C in darkness

100 rxn

Cat NO: MD003055

25 rxn

Cat NO: MD003056

By ROJE

Edition, 02/2022

2022 ROJETechnologies, all rights reserved

پروتکل

برنامه ریزی دمایی و تنظیم شدت
فلورسانس دستگاه
Real-Time PCR

جدول 5: برنامه دمایی Real Time-RT-PCR

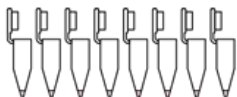
PCR

مرحله	زمان	دما	تعداد سیکل
فعال شدن آنزیم پلیمرز	5 دقیقه	95 درجه سانتی گراد	1
واسرشته شدن	10 ثانیه	95 درجه سانتی گراد	5
اتصال و تکثیر اسید نوکلئیک	60 ثانیه	58 درجه سانتی گراد	40
واسرشته شدن	10 ثانیه	95 درجه سانتی گراد	
اتصال و تکثیر اسید نوکلئیک (اندازه-گیری میزان فلورسانس در کانال های سبز، زرد)	60 ثانیه	58 درجه سانتی گراد	

Step 1: Prepare DNA
Add 0.1 µl internal control/µl final elution to isolated nucleic acid



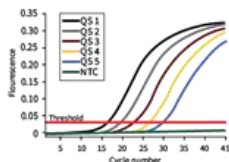
Step 2: Mix 15 µl Master Mix and 10 µl prepared DNA



Step 3: Run the Real-Time PCR program



Step 4: Interpret the result



شکل ۱: اضافه کردن کنترل داخلی به نمونه در حال تخلیص به منظور بررسی واکنش PCR. لازم به ذکر است که در حالت بالا مستر میکس شامل Pro HBV و QR-ROMAX, 4X می باشد. برای توضیحات بیشتر، به نحوه آماده سازی مستر میکس مراجعه کنید.

حجم به ازای هر تیوب نمونه مجهول	Pro HBV Mix + QR-ROMAX, 4X per reaction
10µl	15µl

جدول 4: مقادیر لازم برای آماده سازی هر لوله کنترل منفی در جدول زیر آورده شده است.

حجم به ازای هر تیوب نمونه آب	Pro HBV Mix + QR-ROMAX, 4X per reaction
10µl	15µl

نکته: لازم به ذکر است که در هر بار انجام تست یک لوله به عنوان No Template Control (NTC) باید گذاشته شود.

بر اساس جدول فوق در NTC به جای نمونه استخراج شده، آب استفاده می شود. تیوب NTC برای کنترل آلودگی واکنش استفاده می شود.

جدول 1: آماده سازی اجزای واکنش به ازای یک واکنش (کنترل داخلی در مرحله تخلیص برای تایید جداسازی DNA و بررسی مهار PCR اضافه شده است)

حجم	اجزاء واکنش
8/75µl	Pro HBV Mix
6/25µl	QR-ROMAX, 4X
10µl	Purified DNA

جدول 2: مقادیر لازم برای آماده سازی هر لوله استاندارد در جدول زیر آورده شده است.

Pro HBV Mix + QR-ROMAX, per 4X reaction	حجم به ازای هر تیوب	نمونه استاندارد
15µl	10µl	QS1
15µl	10µl	QS2
15µl	10µl	QS3
15µl	10µl	QS4

جدول 3: مقادیر لازم برای آماده سازی هر لوله تست در جدول زیر آورده شده است.

Step 1: Preparing Master Mix



Step 2: Add 15 µl Master Mix to new tube



Step 3: Add 1 µl internal control to step 2



Step 4: Transfer 15 µl of prepared mixture to a new tube



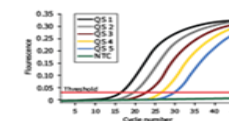
Step 5: Add 10 µl isolated nucleic acid to step 4



Step 6: Run the Real-Time PCR program



Step 7: Interpret the result



شکل ۲: اضافه کردن کنترل داخلی به طور مستقیم به مسترمیکس. باید توجه شود در این حالت هیچ گونه کنترلی بر روی مرحله تخلیص نخواهد بود. به نحوه آماده سازی مسترمیکس مراجعه کنید.