دستور العمل استفاده از

کیت تشخیص ویروس لکه سفید میگو
به روش Nested-PCR
(۱۹۲ واکنش)

مقدمه:

بیماری لکه سفید (White Spot Syndrome, WSS) یک بیماری ویروسی مهم میگو است که باعث مرگ و میر بالا و ضرر و زیان اقتصادی در صنعت پرورش میگو در مناطق مختلف جهان مانند جنوب شرق آسیا، آمریکای مرکزی و جنوبی می شود. در ایران نیز این بیماری مشکلات و ضرر و زیان زیادی در مزارع پرورش میگو ایجاد کرده است. ویروس عامل بیماری (White Spot Syndrome) گونه های مختلف میگو و سایر سخت پوستان مانند خرچنگ را بیمار و باعث مرگ و میر آنها می شود. برای تشخیص حیوانات آلوده و حاملین ویروس احتیاج به یک روش تشخیص حساس آزمایشگاهی است که با آن بتوان وضعیت مزرعه پرورش و یا حیوانات دیگر را بررسی و آزمایش نمود.

روشهای مولکولی متعددی از جمله PCR برای شناسائی عامل بیماری‌زا ابداع شده است. در حال حاضر روش PCR موثرترین ابزار تشخیص ویروس است. با استفاده از این کیت که بر اساس PCR دو مرحله ای (Nested-PCR) ساخته شده است، وجود ویروس در بافت های آلوده در مدت کوتاهی تشخیص داده می‌شود.

لوازم و مواد مورد نیاز:

- دستگاه ورتکس و spin
- سانتریفیوژ رومیزی برای لوله های میکروفیوژ
- دستگاه PCR (ترموسایکلر)
- دستگاه الکتروفورز و UV، آگاروز و بافرهای الکتروفورز DNA
- دستکش یک بار مصرف
- کیت یا محلول استخراج DNA
- سمپلر یا پیپت های ۱۰-۰/۵، ۱۰۰-۱۰ و ۱۰۰۰ میکرولیتری
- نوک سمپلر زرد و آبی استریل

محتویات کیت:

۱- ۱۹۲ عدد میکروتیوب ۰/۲ میلی لیتری با محتویات لیوفلیزه آبی رنگ
۲- دو عدد ویال با درب آبی رنگ حاوی ۱/۹ میلی لیتر بافرحلال PCR اول
۳- یک عدد ویال با درب سبز رنگ حاوی ۱ میلی‌لیتر بافرحلال PCR دوم
٤- یک عدد ویال با درب زرد رنگ حاوی ۱۵۰ میکرولیتر محلول کنترل مثبت با تعداد ۲۰ کپی از ژن (DNA) ویروس
۵- یک عدد ویال با درب قرمز رنگ حاوی ۱۵۰ میکرولیتر محلول کنترل مثبت با تعداد ۲۰۰۰ کپی از ژن (DNA) ویروس
٦- یک عدد ویال با درب سفید رنگ حاوی ۱۵۰ میکرولیتر کنترل منفی
۷- یک عدد ویال با درب مشکی رنگ حاوی ۱۰۰ میکرولیتر مارکر DNA

شرایط نگه داری کیت:

تمام اجزای کیت باید در دمای **۲۰- درجه سلسیوس** نگه داری شود. در این صورت مواد کیت تا تاریخ انقضاء کیت که بر روی آن قید شده است، پایدار و قابل استفاده می باشد.

نحوه انجام آزمایش:

آماده سازی نمونه و استخراج DNA ویروس:

از نمونه های بافتی میگو می‌توان استفاده نمود. نمونه ها می‌بایست در کنار یخ به آزمایشگاه حمل شده و تا قبل از آزمایش در دمای ۲۰- درجه سلسیوس نگه داری شود. کسب نتیجه مطلوب از این کیت منوط به تهیه DNA با کیفیت خوب و عاری از هر نوع آلودگی است.

کیت های مختلف استخراج DNA در بازار موجود می باشد. لطفا با توجه به دستورالعمل شرکت سازنده کیت، نسبت به استخراج DNA اقدام نمائید. (کیت استخراج DNA به همراه کیت ارائه می‌شود.)

لطفا قبل از شروع، تمام مراحل آزمایش را بدقت مطالعه نمایید.

*در صورت استخراج DNA با استفاده از کیت استخراج همراه کیت از روش استخراج بروشور پیوست استفاده گردد.

* واکنش PCR کیت به صورت Nested و دو مرحله‌ای در یک ویال می‌باشد. بدین صورت که یک پری میکس PCR برای هر دو واکنش مصرف می‌شود.

روش کار:

۱- ابتدا میکروتیوب‌های ۰/۲ میلی لیتری با محتویات لیوفلیزه آبی رنگ را به تعداد موردنیاز از فریزر خارج کرده و بصورت نمونه های مورد بررسی، کنترل منفی و کنترل مثبت علامت گذاری نمایید.

۲- به هر میکروتیوب (شامل کنترل ها و نمونه ها) ۱۸/۵ میکرولیتر از بافر PCR اول اضافه و به خوبی یکنواخت کنید.

۳- ۱/۵ میکرولیتر از DNA استخراج شده از نمونه را به میکروتیوب حاوی بافر PCR اول اضافه کنید.

٤- ۱/۵ میکرولیتر از محلول کنترل منفی را به میکروتیوب کنترل منفی حاوی بافر PCR اول اضافه کنید.

۵- ۱/۵ میکرولیتر از محلول کنترل مثبت را به میکروتیوب کنترل مثبت حاوی بافر PCR اول اضافه کنید.

٦- مواد را بخوبی مخلوط کنید بطوریکه مواد لیوفلیزه کاملا حل گردد. لوله را spin کرده تا تمام مواد در ته لوله قرار گیرد. سپس در دستگاه PCR قرار دهید.

۷- برنامه حرارتی PCR را به شرح جدول مقابل تنظیم نمایید.

۸- بعد از اتمام ۱۵ سیکل واکنش PCR اول، ۵ میکرولیتر از بافر PCR دوم را به میکروتیوب ۰/۲ میلی‌لیتری موجود در دستگاه PCR اضافه نموده و بقیه واکنش PCR را انجام نمایید.

برنامه حرارتی PCR اول و Nested PCR

زمان	درجه حرارت (سلسیوس)	مراحل واکنش PCR		
۵ دقیقه	۹٤	واسرشت اولیه	۱ سیکل	PCR اول
۳۰ ثانیه	۹٤	واسرشت (Denaturation)	۱۵ سیکل	
۳۰ ثانیه	٤۷	اتصال (Annealing)		
۳۰ ثانیه	۷۲	بسط (Extension)		
۵ دقیقه	۷۲	بسط نهایی (Final extension)	۱ سیکل	
۳۰ ثانیه	۹٤	واسرشت اولیه	۱ سیکل	Nested PCR
۳۰ ثانیه	۹٤	واسرشت (Denaturation)	۳۵ سیکل	
۳۰ ثانیه	۵۲	اتصال (Annealing)		
۳۵ ثانیه	۷۲	بسط (Extension)		
۵ دقیقه	۷۲	بسط نهایی (Final extension)	۱ سیکل	

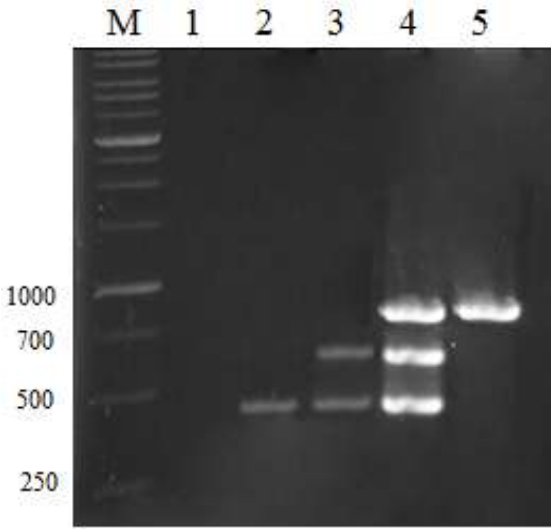
بعد از آزمایش PCR، ۱۵ µl از محصول واکنش PCR (شامل کنترل‌ها و نمونه ها) را همراه با ۳ میکرولیتر مارکر DNA مستقیما برروی ژل آگارز ۱٪ الکتروفورز نمایید (۹۰ ولت حدود ٤۵-٤۰ دقیقه). نتایج را پس از رنگ آمیزی ژل با اتیدیوم بروماید مشاهده نمایید. (توصیه می شود از مارکر DNA مناسب همانند Ladder 1kb و یا مارکر همراه کیت استفاده شود).

تفسیر نتایج:

در صورت صحت انجام آزمایش PCR و الکتروفورز، در نمونه کنترل مثبت، حاوی ۲۰ کپی از ویروس، یک باند ٤١٤ جفت بازی و در نمونه کنترل مثبت حاوی ۲۰۰۰ کپی از ویروس یک باند ٦٢٠ جفت بازی علاوه بر باند ٤١٤ جفت بازی دیده می‌شود.

در صورت آلوده بودن میگو به ویروس بیماری لکه سفید با تعداد بالا، یک باند ۸۰۹ جفت بازی(کنترل داخلی PCR) و دو باند ٦٢٠ جفت بازی و ٤١٤ جفت بازی مشاهده می‌شود. اگر نمونه حاوی ۲۰ کپی از ویروس باشد، یک باند ۸۰۹ جفت بازی و یک باند ٤١٤ جفت بازی دیده می‌شود و در صورت سالم بودن نمونه، فقط باند ۸۰۹ جفت بازی مشاهده خواهد شد. لذا نتایج نمونه های کلینیکی با توجه به نتایج نمونه های کنترل مثبت و کنترل منفی قابل تفسیر خواهد بود.

شکل ۱: الکتروفورز محصول PCR نمونه آزمایشی روی ژل آگارز ۱درصد



ستون M: **مارکر وزن مولکولی DNA (Ladder 1Kb)**

ستون ۱ : کنترل منفی

ستون ۲ : کنترل مثبت با تعداد ۲۰کپی از ویروس

ستون ۳ : کنترل مثبت با تعداد ۲۰۰۰کپی از ویروس

ستون ٤ : نمونه بیمار با تعداد ۲۰۰۰کپی از ویروس

ستون ٥ : نمونه سالم

حساسیت کیت:

نتایج آزمایش‌های تعیین حساسیت کیت نشان می‌دهد که روش مورد استفاده در کیت، توانایی تشخیص ۲۰ ویروس در نمونه را دارد به طوریکه اگر تعداد ویروس در هر واکنش ۲۰ عدد باشد باند ٦٢٠ جفت بازی در محصول PCR دیده نمی‌شود و فقط باند ٤١٤ جفت بازی دیده می‌شود و آلودگی نمونه به ویروس کم خواهد بود. ولی اگر بیشتر از ۲۰۰۰ عدد ویروس در هر واکنش وجود داشته باشد، علاوه بر باند ٤١٤ جفت بازی، باند ٦٢٠ جفت بازی نیز دیده می‌شود و نمونه به ویروس با تعداد بالا آلوده خواهد بود.

نکات قابل توجه:

*در تمام مراحل کار باید از دستکش یکبار مصرف و وسائل استریل استفاده شود.

*از مواد تاریخ گذشته و از مواد سایر کیت های تشخیصی نباید در این کیت استفاده شود.

*روش کار بدقت اجرا شده و به منظور کاهش احتمال آلودگی نمونه-ها (cross contamination) در هنگام آزمایش چند نمونه بطور همزمان، نهایت دقت به عمل آید.

رفع اشکال:

- در صورت وجود باندهای DNA غیر اختصاصی بر روی ژل، میزان DNA الگو را به نسبت ۱/۵ (۱ به ۵) با آب مقطر استریل (ddH_2O) رقیق کرده و مجددا آزمایش نمایید.
- در صورت عدم وجود باند DNA از مقدار بیشتر (۵ میکرولیتر) DNA استخراج شده در آزمایش PCR مجدد استفاده کنید.
- آماده سازی واکنش در درجه حرارت آزمایشگاه ممکن است باعث بروز باندهای غیر اختصاصی گردد. لذا توصیه می شود تمام مراحل آزمایش بر روی یخ خرد شده انجام پذیرد.

این محصول تحت لیسانس مؤسسه تحقیقات شیلات ایران توسط شرکت مهندسی زیست فناوران نجم تولید و توزیع می گردد. لطفا سؤالات و نظرات خود را با ما در میان بگذارید. تلفن تماس: ۰۲۱۴۴۵۸۰۴۳۸، ۰۹۱۲۶۸۰۲۹۸۸