

**کیت QF-PCR شرکت کوثر**

**تشخیص سریع اختلالات عددی شایع کروموزومی (آنیوپلوئیدی) قبل از تولد**

**کاربردها و نحوه عملکرد کیت KBC-Aneuquick VII**

کیت KBC-Aneuquick VII تشخیص سریع اختلالات عددی شایع کروموزومی (آنیوپلوئیدی در کروموزوم های ۱۳، ۱۸، ۲۱، X و Y) را با دقت و سرعت بالا (حدود ۴۸ ساعت) امکان پذیر می نماید. به کمک این کیت بر اساس واکنش فلورسانت کمی زنجیره پلیمرز Quantitative fluorescent polymerase chain reaction (QF-PCR) نمونه های DNA تخلیص شده از خون، مایع آمنیون، پرزهای کوریونی جفت (CVS) و DNA آزاد داخل مایع آمنیونی را میتوان مورد ارزیابی قرار داد. این کیت محتوی ۲۵ مارکر Short tandem repeat (STR) می باشد، که این مارکرها در یک واکنش چندگانه زنجیره پلیمرز (multiplex PCR) تکثیر می شوند و نتایج این کیت با استفاده از کیپلاری الکتروفورز مشخص می شوند.

**شرایط نگهداری:**

با توجه به این که پرایمرها با رنگ فلوروسانت نشاندار شده اند بنابراین باید از قرار دادن آن ها در مقابل نور مستقیم خودداری شود.

این کیت به مدت شش ماه در دمای ۲۰- درجه سانتیگراد قابل نگهداری می باشد. چنانچه دفعات انجماد و ذوب این کیت زیاد باشد، کیفیت نتایج کاهش خواهد یافت (بنابراین بهتر است مواد را در حجم های کمتر نگهداری نمایید).

	نام ماده	مقدار لازم برای هر واکنش
1	PCR Mix	5 µl
2	Primer Mix	1 µl
3	AQ Taq	2 µl
4	Patient's DNA	100 - 200 ng
5	d H2O	10 µl

**روش استفاده:**

ابتدا همه مواد موجود در کیت را در دمای اتاق قرار دهید تا ذوب شوند. سپس مطابق جدول بالا ب ازای هر واکنش از هر ماده استفاده نمایید. نکته مهم: این کیت محتوی مواد حساس به گرما از جمله پرایمر، آنزیم و dNTP می باشد، بنابراین آماده سازی نمونه ها باید روی یخ انجام شود.

با توجه به نوع و مقدار DNA مورد استفاده حدود 100-200 نانوگرم از DNA را به یک میکروتیوب ۲۰۰ میکرولیتری اضافه کرده، سپس به اندازه های آب اضافه نمایید که حجم نهایی ۲۰-۲۵ میکرولیتر شود. هر آزمایشگاهی با توجه به روش و کیفیت استخراج DNA برای دست یافتن به بهترین نتیجه ممکن است مقادیر متفاوتی از آب یا DNA استفاده نماید (البته روش ارائه شده در اکثر موارد مناسب می باشد). در صورتی که محتویات درون تیوب تبخیر می شوند می توانید از یک قطره mineral oil استفاده کنید (این ماده را می توانید از شرکت زیست فناوری کوثر تهیه فرمائید).

۳- برنامه PCR مطابق جدول زیر به دستگاه ترموسایکلر داده شود.

Pre-Denaturation	Cycling			Final Extension	
95°C	95°C	63 °C	70°C	70°C	4°C
5 min	1min	90 Sec	2 min	20 min	∞
30 cycles					

نمونه ها را در دستگاه چیده و درب آن ها را محکم ببندید (بهتر است از تیوب هایی با درب محکم ضد تبخیر استفاده کنید).

نکات مهم:

اگرچه محصول PCR یک شب در دمای اتاق ماندگاری دارد، اما با توجه به فلوروسانت بودن محصول، بهتر است قبل از الکتروفورز آنرا در محیطی تاریک و در یخچال نگهداری نمایید. اگر بیش از یک هفته پس از اتمام واکنش PCR تا آغاز انجام کیپلاری الکتروفورز زمان صرف شود، ممکن است کیفیت نتایج کاهش بیابد. بهتر است در انجام هر سری از واکنش ها، یک کنترل داخلی با ژنوتیپ شناخته شده (علاوه بر نمونه های مورد آزمایش) نیز آزمایش و آنالیز شود. با توجه به نوع و مقدار DNA مورد استفاده، ممکن است لازم شود تعداد سیکل برنامه را تغییر دهید تا بهترین نتیجه را به دست آورید.

واکنش های فلوروسانت کمی زنجیره ای پلیمرز (QF-PCR) از جمله واکنش های حساس به مقدار بسیار اندکی DNA می باشند. بنابراین محل تخلیص DNA، آماده سازی مواد برای PCR و استفاده از محصول PCR باید از هم جدا باشند و شرایط مناسب برای انجام PCR طبق استانداردهای ملی و بین المللی رعایت شود و فضای پیش و پس از PCR از هم جدا شوند و در هر مرحله از واکنش از کنترل منفی نیز استفاده شود. خطرات: هرگز درب تیوب های حاوی محصول PCR را در مجاورت مواد و محلول های کیت و محلی که مواد را برای واکنش PCR آماده می نمایید، باز نکنید. چگونگی دفع محصول PCR اضافی بستگی به قوانین خاص آزمایشگاه دارد.

**انجام کیپلاری الکتروفورز و آنالیز نمونه ها:**

KBC-Aneuquick VII برای استفاده توسط دستگاه ABI ساخته شده است که قدرت تفکیک ۵ رنگ را داشته باشد (Five-dye fragment analysis) مانند دستگاه 3130XL, Genetic Analyzer 3130 و دستگاه های جدیدتر شرکت ABI. نکته: پیش از انجام کار اطمینان حاصل کنید که نرم افزار ABI Date Collection مورد استفاده شما از Five-dye fragment analyzer پشتیبانی نماید. دستگاه را با LIZ, PET, NED, VIC, 6FAM کالیبره نموده و پس از آماده سازی نمونه ها آنها را دستگاه RUN نموده و کیپلاری الکتروفورز را انجام دهید.

آدرس: خیابان ولیعصر، بالاتر از فاطمی، خیابان مجلسی، مرکز ژنومیکس و بیوتکنولوژی کوثر، پلاک ۴۱