Delta qCMV Real-time PCR Kit

REF DD040-002-24

24 tests

دستورالعمل

کیت تشخیص کمی سایتومگالوویروس بر اساس تکنیک ریل تایم پی‌سی‌آر

DELTA BIOTECHNOLOGY
دلسا تشخیص آریا (دلتا)

۱) کاربرد کیت

کیت Delta qCMV Real-time PCR به منظور انجام یک تست تشخیصی In vitro کمّی بر پایه‌ی تکنیک Probe-based real-time PCR طراحی شده است که برای تعیین تعداد (Viral load) سایتومگالوویروس (CMV) در نمونه‌های بالینی حاصل از پلاسما و خون استفاده می‌شود.

۲) اساس تست

در این روش، یک ناحیه در ژن *UL54* برروی ژنوم CMV بعنوان هدف تشخیصی در فرآیند PCR تکثیر می‌شود. برای این منظور، ابتدا DNA ژنومی با استفاده از یک کیت تجاری معتبر استخراج می‌شود و بدنبال آن، واکنش تکثیر هدف ژنومی انجام می‌شود. به‌منظور شناسایی ناحیه‌ی هدف از یک ست پرایمر و پروب اختصاصی الیگونوکلئوتیدی دارای فلوروکروم و کوئنچر استفاده می‌شود. یک پروب که دارای فلوروکروم **FAM** است جهت شناسایی ژن ***UL54* ویروس CMV** و پروب دیگر دارای فلوروکروم **HEX** است که جهت شناسایی بخشی از یک ژن Housekeeping انسانی بعنوان **کنترل داخلی (Endogenous control)** استفاده می‌شود. حین انجام PCR در صورت وجود ژنوم هدف، پرایمرها و پروب‌های اختصاصی به نواحی مربوطه متصل می‌شوند. به‌منظور تکثیر DNA هدف، آنزیم پلیمراز فعال شده و شروع به سنتز رشته‌های جدید می‌کند. در حین سنتز رشته‌های جدید، این آنزیم با استفاده از فعالیت اگزونوکلئازی باعث هیدرولیز پروب‌های متصل شده به نواحی هدف مربوطه شده و در نتیجه کوئنچر از فلوروکروم جدا شده و در نتیجه رنگ‌های فلوروسنت مختلف آزاد می‌شوند که دستگاه Real-time PCR قادر به خوانش و ثبت آن‌ها می‌باشد. در نهایت بعد از پایان واکنش PCR نتایج با استفاده از نرم افزار مربوطه آنالیز می‌شوند. لازم به ذکر است که کنترل داخلی، جهت ارزیابی فرآیند نمونه‌گیری و استخراج ژنوم ویروسی کاربرد دارد.

۳) محتوای کیت

کیت حاضر برای انجام ۲۴ تست تشخیصی است و دارای اجزای زیر می‌باشد:

	ریجنت‌ها*	مقادیر
۱	CMV Master Mix	۱ تیوب X ۳۶۰ میکرولیتر
۲	CMV Standards (A, B, C and D)	۴ تیوب X ۱۰۰میکرولیتر
۳	No Template Control (NTC)	۱ تیوب X ۱۰۰ میکرولیتر

* **توجه:**

- ✓ تمامی اجزای کیت در دمای ۱۵- تا ۲۵- درجه سانتیگراد نگهداری شوند.
- ✓ تاریخ انقضای کیت بر روی آن درج شده است.
- ✓ تا حد امکان از ذوب و فریز شدن اجزای کیت خودداری شود (کمتر از ۵ بار).
- ✓ در صورت نگهداری کیت در دمای ۴ درجه سانتیگراد، در کمتر از یک هفته استفاده شود.
- ✓ در صورت نیاز از هرکدام از اجزا بر اساس نیاز الیکوت تهیه شود.
- ✓ محلول Mastermix حاوی پرایمر و پروب نشاندار شده با مواد فلوروسنت است و تا حد امکان در معرض نور مستقیم قرار نگیرد.
- ✓ حتما قبل از استفاده از هرکدام از محلول‌های موجود در کیت، ورتکس/ اسپین انجام شود.

۴) سایر تجهیزات و مصرفی‌های لازم

	دستگاه / مصرفی	تعداد	توضیحات
۱	ورک استیشن (کابینت PCR)	۲ عدد	یکی برای تهیه PCR mix و دیگری برای اضافه کردن DNA ویروسی و کنترل‌های کیت است.
۲	ست سمپلر با حجم‌های مختلف	۲ ست	هر یک ست در زیر هر ورک استیشن قرار داده شود.
۳	مینی اسپین / ورتکسر	۲ عدد	هر کدام در زیر هر ورک استیشن قرار داده شود.
٤	مینی اسپین با روتور استریپ خور یا سانتریفیوژ پلیت خور	۱ عدد	به منظور سانتریفوژ کردن استریپ تیوب‌ها یا پلیت حاوی واکنش PCR قبل از قرار دادن در دستگاه Real-time PCR استفاده می‌شود.
۵	دستگاه Real-time PCR	۱ عدد	دستگاه دارای قابلیت خوانش در حداقل ۲ کانال FAM و HEX یا معادل طول موج آن‌ها باشد.
٦	کول رک (کرایو رک)	به تعداد لازم	برای حمل و نگهداری بافرها و نمونه‌های DNA در حین کار استفاده می‌شود.
۷	استریپ تیوب یا پلیت مخصوص Real-time PCR	به تعداد لازم	بر اساس نوع دستگاه Real-time PCR از نوع سفید یا شفاف استفاده می‌شود.
۸	اسپری حاوی محلول از بین برنده نوکلئازها (RNaseZAP)	به مقدار لازم	به منظور تمیز کردن سطوح و تمامی وسایل استفاده می‌شود.
۹	سر سمپلر فیلتر دار در حجم‌های مختلف	به تعداد لازم	باید عاری از DNase و RNase باشند.

۵) نمونه‌ی بالینی مورد استفاده

تشخیص اختصاصی بر اساس شناسایی CMV در خون یا پلاسمای درون لوله‌های حاوی EDTA انجام می‌شود. نمونه‌گیری بر اساس رفرنس زیر انجام شود:

https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2292973/pdf/1403-07.pdf

- ✓ نمونه‌های گرفته شده را می‌توان تا قبل از ۲۴ ساعت در دمای ۲- تا ۸- درجه‌ی سانتیگراد نگهداری نمود. در غیر اینصورت، نمونه‌ها در دمای ۲۰- یا ۷۰- درجه‌ی سانتیگراد نگهداری شوند.
- ✓ DNA ویروسی استخراج شده از نمونه‌های بالینی را می‌توان به مدت طولانی در دمای ۲۰- یا ۷۰- درجه‌ی سانتیگراد نگهداری نمود.
- ✓ کارایی و پرفورمنس کیت حاضر بستگی به مقدار و کیفیت DNA استخراج شده دارد. بنابراین، پیشنهاد می‌شود از یک کیت یا یک روش استخراج DNA مناسب (چه دستی و چه اتوماتیک) استفاده شود.

٦) ایمنی زیستی

- ❑ در حین کار با نمونه‌های بالینی حتما از وسایل حفاظتی (مثل دستکش، گان، ماسک و عینک محافظ) استفاده شود.
- ❑ کار با نمونه‌های بالینی، حتما در زیر هود میکروبیولوژیکی کلاس ۲ یا بالاتر انجام گیرد.
- ❑ تمامی مراحل انجام کار باید توسط افراد آموزش دیده انجام شود.
- ❑ دور ریختن بافرها، ریجنت‌ها و نمونه‌ها بر اساس مقررات و گایدلاین‌های مربوطه انجام شود:

https://currentprotocols.onlinelibrary.wiley.com/doi/epdf/10.1002/9780471729259.mc01a01s13

۷) پروتکل انجام تست

قبل از انجام تست تمامی اجزای کیت به مدت ۱۵ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتیگراد قرار داده شوند تا به آرامی ذوب شوند. استفاده از کرایورک به منظور نگهداری محلول‌ها در این مرحله پیشنهاد می‌شود. سپس برای حل کردن و هموژن کردن محلول‌ها از ورتکس استفاده شود. در مرحله بعد تمامی محلول‌ها اسپین شوند تا در صورتی که قطرات محلول روی درب تیوب‌ها باشد به ته میکروتیوب کشیده شود.

۷-۱) در زیر یک ورک استیشن، به ازای هر نمونه مقدار **۱۵ میکرولیتر** از CMV Master mix را درون هر چاهک از پلیت مخصوص Real-time PCR (یا هر تیوب از استریپ تیوب ۸تایی) اضافه نمایید.

۷-۲) در زیر یک ورک استیشن دیگر مقدار **۵ میکرولیتر** از هر یک از DNAهای استخراج شده‌ی ویروسی را به میکس مرحله‌ی قبل اضافه و اسپین نمایید.

نکات:

- ✓ در این مرحله، بطور موازی مقدار ۵ میکرولیتر از هر کدام از استانداردهای A، B، C و D و همچنین کنترل منفی No Template Control (NTC) موجود در کیت را نیز به‌صورت جداگانه به چاهک حاوی میکس واکنش اضافه شوند.
- ✓ در حین انجام کار به‌منظور حفظ کیفیت DNAهای استخراج شده، پس از خارج کردن آن‌ها از فریزر، آن‌ها را برروی کرایورک مخصوص حمل و نگهداری نمایید.

۷-۳) واکنش‌ها را به دستگاه Real-time PCR منتقل کرده و برنامه‌ی آورده شده در جدول زیر را اجرا نمایید.

سیکل	مرحله	دما (درجه سانتیگراد)	زمان (ثانیه)
x ۱	فعال شدن آنزیم پلیمراز	۹۵	۳۰۰
x ۴۵	باز شدن رشته‌های DNA الگو	۹۵	۱۵
	جفت شدن پرایمرها و سنتز رشته های جدید	۶۰	۴۵ *
x ۱	خنک شدن	۲۵	۳۰

* خوانش فلوروسنت در کانال‌های **FAM** و **HEX** در این مرحله انجام شود و در صورت نیاز Passive reference dye (ROX) در حالت خاموش قرار داده شود (بعنوان مثال در دستگاه‌های ساخت کمپانی Applied Biosystems یا دستگاه‌های مشابه).

۷-۴) بعد از انجام PCR، ابتدا اعتبار نتایج بدست آمده بصورت کیفی ارزیابی شود (جدول زیر).

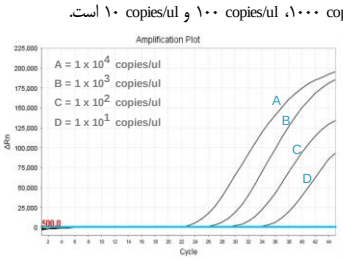
کنترل یا استانداردهای موجود در کیت	HEX	FAM
CMV Standards (A, B, C and D)	±	+
No Template Control (NTC)	-	-

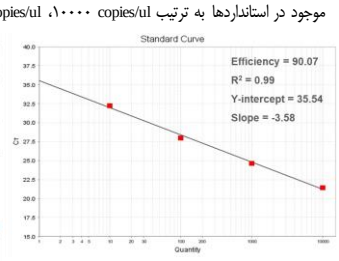
○ مقادیر Ct (Cq) مساوی یا کمتر از ۳۷ بعنوان مثبت و مقادیر بزرگتر از ۳۷ بعنوان منفی در نظر گرفته شوند.

۷-۵) تفسیر کیفی نتایج آزمایش انجام شده بر روی نمونه بر اساس جدول زیر انجام شود.

تفسیر کیفی	HEX	FAM
وجود DNA ژنومی CMV (جواب تست مثبت است)	±	+
عدم وجود DNA ژنومی CMV (جواب تست منفی است)	+	-
نمونه گیری به درستی انجام نشده است (تکرار آزمایشات) استخراج ژنوم به درستی انجام نشده است (تکرار آزمایشات) احتمال وجود مهارکننده‌ی PCR در نمونه‌ی استخراج شده (تکرار آزمایشات)	-	-

۷-۶) جهت ارزیابی اعتبار نتایج بصورت کمّی باید کارآیی PCR (E) باید بین ۹۰ تا ۱۱۰ باشد و R^2 باید بزرگتر از ۰/۹۸ باشد. پیشنهاد می‌شود جهت محاسبه‌ی دقیق این مقادیر ابتدا ترشهلد از حالت اتومات خارج شده و خط ترشهلد به صورت دستی تنظیم شود. به‌منظور انجام تفسیر کمّی ابتدا با استفاده از Ctهای بدست آمده از چهار استاندارد A، B، C و D، منحنی استاندارد رسم شود (مشابه شکل زیر). لازم به ذکر است که مقادیر ویروس موجود در استانداردها به ترتیب 10^{5} copies/ul، 10^{4} copies/ul، 10^{3} copies/ul و 10^{2} copies/ul است.





سپس بر اساس منحنی استاندارد و Ct بدست آمده از نمونه‌ی بالینی مورد آزمایش (مجهول) مقدار لود ویروسی یا N_0 (کپی / میکرولیتر) با استفاده از فرمول زیر محاسبه شود:

$$N_0 = 10^{(Ct-b)/m}$$

N_0 = غلظت یا لود ویروس (کپی نامبر / میکرولیتر) — b = عرض از مبدا (Y intercept) — m = شیب (Slope)

در نهایت با استفاده از فرمول زیر مقدار لود ویروسی بر اساس کپی در میلی‌لیتر خون یا پلاسما محاسبه شود:

$$\text{Viral load (copies/ml)} = \frac{N_0\ (\text{copies/ul}) \times \text{Elution volume (ul)}}{\text{Sample volume (ml)}}$$

Elution volume (ul): حجم Elution buffer اضافه شده در مرحله‌ی آخر استخراج DNA

Sample volume (ml): حجم پلاسما (خون) مورد استفاده در مرحله‌ی اول استخراج DNA

○ بطور معمول، حجم پلاسما یا خون مورد استفاده در مرحله‌ی اول استخراج ۵۰ میکرولیتر و حجم Elution ۰/۲ میلی‌لیتر (۲۰۰ میکرولیتر) در نظر گرفته می‌شود. مقادیر این حجم‌ها باید بر اساس پروتکل استخراج DNA انتخاب شوند.

REF کاتالوگ نامبر	RUO استفاده تحقیقاتی
LOT لات نامبر	تاریخ انقضا
دستورالعمل	محدوده های نگهداری
تعداد تست‌ها	کمپانی تولید کننده

آدرس: کاشان، دانشگاه علوم پزشکی، مرکز رشد فناوری
شماره تماس: ۰۳۱۹۱۰۱۰۶۵۱ ۰۲۱۹۱۰۱۰۶۵۱
وبسایت: www.deltabiotechno.com