

راهنمای کیت HBV RQ

کیت HBV RQ جهت کار با دستگاه های Rotor-Gene و StepOne و به منظور تشخیص و کمیت سنجی DNA ویروس هپاتیت ب در پلاسما به روش Real-Time PCR می باشد. این کیت جهت مصارف تحقیقاتی طراحی شده است.

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

حجم	محتوا	برچسب
۳۶۰ میکرولیتر	میکس آماده برای PCR	HBV Mix
۱۵۰ میکرولیتر	استاندارد ۱: یکصد هزار واحد در میکرولیتر	HBV S1
۱۵۰ میکرولیتر	استاندارد ۲: ده هزار واحد در میکرولیتر	HBV S2
۱۵۰ میکرولیتر	استاندارد ۳: یک هزار واحد در میکرولیتر	HBV S3
۱۵۰ میکرولیتر	استاندارد ۴: یکصد واحد در میکرولیتر	HBV S4
۱۵۰ میکرولیتر	استاندارد ۵: ده واحد در میکرولیتر	HBV S5
۲۵۰ میکرولیتر	کنترل داخلی	HBV IC
۲۰۰ میکرولیتر	آب مخصوص PCR	Water

تمامی مواد کیت باید در دمای ۱۰ تا ۳۰ درجه زیر صفر نگهداری شوند.

کنترل داخلی: برای ارزیابی احتمال استخراج نامناسب یا مهار واکنش و جلوگیری از نتایج منفی کاذب، این 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) می باشد. در صورتی که کنترل داخلی را به HBV Mix اضافه می نمایید، به ازای هر واکنش، یک میکرولیتر از کنترل داخلی را به HBV Mix اضافه نمایید.

روش استفاده: تعداد مورد نیاز لوله PCR روی بلوک سرد بگذارید. علاوه بر تعداد نمونه های مورد آزمایش، ۵ لوله برای استانداردها و یک لوله برای کنترل منفی نیز در نظر بگیرید. به هر لوله ۱۵ میکرولیتر از **HBV Mix** اضافه کنید. سپس ۱۰ میکرولیتر از DNA استخراج شده، **استاندارد** یا آب به هر لوله اضافه کنید. درپوش لوله ها را ببندید. سپس آن ها را مطابق شماره ها داخل دستگاه قرار دهید.

تنظیم دستگاه: برای تنظیم دستگاه Rotor-Gene یا StepOne از فایل تمپلیت مخصوص این کیت استفاده کنید. همچنین می توانید دستگاه را مطابق برنامه زیر تنظیم نمایید.

Step	Temperature and time	Cycles
1	95°C x 10 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 و VIC تنظیم شود. HBV Mix موجود در کیت حاوی ROX با غلظت نهایی 300nM میباشد.

آنالیز نتایج: توجه داشته باشید که افزایش تابش **FAM/Green** مربوط به **HBV** و افزایش تابش **VIC/Yellow** حاصل از کنترل داخلی می باشد. **همچنین نمونه تنها زمانی مثبت در نظر گرفته می شود که دارای منحنی سیگموئیدی و فاز لگاریتمی باشد و تنها در این حالت CT معتبر بوده و قابل استناد و تفسیر می باشد. در غیاب منحنی سیگموئیدی، نمونه منفی محسوب می شود و (CT آن) در صورت وجود فاقد ارزش می باشد.**

بر اساس نکات بالا نتایج به صورت خلاصه در جدول زیر نشان داده شده است:

	Green/FAM	Yellow/VIC	Result
1	+	-	HBV Pos
2	+	+	HBV Pos
3	-	+ (CT 28-34)	HBV Neg
4	-	-	Invalid
5	-	+ (CT>34)	Invalid

محاسبه تیتر ویروس: برای تبدیل نتایج به صورت واحد در میلی لیتر، از معادله زیر استفاده کنید:

$$\text{Result(IU/ml)} = \frac{\text{Result(IU/}\mu\text{l)} \times \text{elution volume}(\mu\text{l})}{\text{sample volume(ml)}}$$

محدوده خطی: محدوده خطی این کیت با استفاده از نمونه کلون شده حاوی بخشی از ژنوم ویروس هپاتیت ب بررسی شده است و شامل بازه ده میلیون واحد در میکرولیتر تا یک واحد در میکرولیتر می باشد.

میزان حساسیت: حساسیت تشخیصی این کیت با استفاده از نمونه کلون شده حاوی بخشی از ژنوم ویروس هپاتیت ب بررسی شده و معادل ۰/۱۵ واحد در میکرولیتر می باشد.

برای توضیحات بیشتر و دریافت فایل کامل دفترچه راهنمای کیت و فایل
 نمایندگی برای تنظیم دستگاه، به وبسایت ما به نشانی www.novingene.com
 مراجعه فرمایید یا با پشتیبانی تماس بگیرید.

