دفترچه راهنما

کیت شناسایی و سنجش کمی

HCDNASEQ Vero Cell با روش

Real-Time PCR

Doc. #: IFU-HCDNA-01 Doc. Version: 00 Revision Date: 03-07-2022

فهرست مطالب

شماره رفرانس ۳
شرح کیت ۳
اصول ۳
اطلاعات عمومی ۳
محتویات کیت ۴
نگهداری و انتقال کیت ۴
نکات احتیاط عمومی ۵
هشدارها و محدودیت ها ۶
کنترل ها ۶
نمونه گیری و نگهداری ۶
کنترل داخلی ۷
آماده سازی ۸
برنامه ریزی دمایی ۹
آنالیز نتایج ۹
نشانه ها ۱۱۱
اطلاعات تماس ۱۱۱

شماره رفرانس

- BONHCDNA-24
- BONHCDNA-48
- BONHCDNA-96

شرح کیت

کیت HCDNASEQ Vero Cell یک سیستم آماده مصرف برای تشخیص DNA سلول میزبان Vero از طریق واکنش زنجیره ای پلیمراز (PCR) روی دستگاه‌هایMIC PCR ، Step One Plus Rotor-Gene Q است. مستر A حاوی واکنش‌گرها و آنزیم‌هایی برای تکثیر اختصاصی قطعه ای به طول ۹۴ جفت باز از ژنوم Vero Cell بوده و برای تشخیص مستقیم امپلیکون مورد نظر از طریق کانال فلورسنت Cycling Green در دستگاه‌های Rotor-Gene 3000 و-Rotor Gene 6000، MIC PCR، Step One Plus طراحی گردیده است.

بعلاوه، کیت HCDNASEQ Vero Cellحاوی سیستم ثانویه تکثیر هترولوگ برای تشخیص احتمال وجود مهارکننده واکنش PCR است. این امر از طریق شناسایی کنترل داخلی (Internal Control) در کانال فلوروسنت Cycling Orange در دستگاه‌هایRotor-Gene 3000 ،-Rotor Gene 6000 ، MIC PCR، Step One Plus صورت می‌پذیرد. آستانه تشخیصی آنالیتیکال کیت HCDNASEQ Vero Cell در حضور IC کاهش نمی‌یابد. استانداردهای کیت شامل HCDNA QS 1–4 امکان تعیین کمی میزان DNA سلول Veroرا فراهم می‌آورد.

اصول

تشخیص HCDNA توسط واکنش زنجیره ای پلیمراز (PCR) بر اساس تکثیر مناطق خاص ژنوم ژنوم سلول Vero است. در واکنش Real-Time PCR محصول تکثیر شده از طریق رنگ‌های فلوروسنت شناسایی می‌شوند. مشاهده شدت فلوروسنت در حین واکنش PCR (به صورت Real-Time) تشخیص و کمی سازی محصولات در حال تکثیر را بدون نیاز به باز کردن مجدد لوله های واکنش پس از اجرای PCR ممکن می‌سازد.

اطلاعات عمومی

محصولات زیست دارویی، مانند واکسن ها، با استفاده از سلول های باکتریایی یا یوکاریوتی به عنوان میزبان تولید می شوند. سلولهای مورد استفاده برای تولید واکسن می توانند منبع طیف وسیعی از

ناخالصیهای پیچیده، ناهمگن و بالقوه مضر باشند و DNA سلول میزبان از جمله آنهاست. از آنجا که DNA سلول میزبان باقیمانده در واکسن ممکن است منجر به ایجاد تومور یا تحریک واکنش های ایمنی گردد. بنابراین، سازمانهای نظارتی از جمله WHO ، به ازای هر دوز واکسن تولید شده در سلولهای Vero، میزان حداکثر ۱۰ نانوگرم DNA باقی مانده را مجاز دانسته اند. کیت HCDNASEQ Quantitative Vero DNA Kit، به منظور بررسی و اندازه گیری کمی میزان باقیمانده سلولهای میزبان Vero در نمونه واکسن تولید شده و تخلیص شده به کار میرود.

محتویات کیت

Title	24 Tests	48 Tests	96Tests
	Volume per Vial	Volume per Vial	Volume per Vial
HCDNA Master A	340 µl/tube	680 µl/tube	1360 µl/tube
STD1: 24×10^{-4}	300 µl/tube	300 µl/tube	300 µl/tube
STD2 : 24×10^{-5}	300 µl/tube	300 µl/tube	300 µl/tube
STD3 : 24×10^{-6}	300 µl/tube	300 µl/tube	300 µl/tube
STD4 : 24×10^{-7}	300 µl/tube	300 µl/tube	300 µl/tube
Internal Control	300 µl/tube	300 µl/tube	300 µl/tube

نگهداری و انتقال کیت

کلیه محتویات این کیت باید در دمای ۲۰- درجه سانتی گراد و در تاریکی نگهداری گردد. همچنین به منظور انتقال و جابه جایی کیت از یخ خشک استفاده نمایید. بیش از سه مرتبه منجمد و ذوب کردن کیت به هیچ وجه توصیه نمی گردد زیرا می تواند باعث کاهش در حساسیت کیت گردد. نگهداری کیت در دمای ۴ درجه سانتی گراد هیچ گاه نباید بیشتر از یک ساعت شود.

مواد و تجهیزات مورد نیاز که باید توسط کاربر تدارک دیده شود:

۱. کیت استخراج DNA
۲. سمپلر قابل‌تنظیم و نوک سمپلر فیلتردار DNase free
۳. سانتریفوژ رومیزی

۴. بلوک خنک کننده
۵. وایتکس ۱۰ درصد
۶. گان و دستکش
۷. لوله های ۰,۲ میکرولیتر
۸. دستگاه Rotor-Gene ، MIC PCR، Step One Plus با کانال‌های فلوروسنت مخصوص Cycling Green و Cycling Orange
۹. نرم افزار Rotor-Gene Q نسخه ۱,۷,۹۴ نرم‌افزار Rotor-Gene 6000 نسخه ۱,۷,۶۵, ۱,۷,۸۷, ۱,۷,۹۴ و نرم افزار Rotor-Gene 3000 نسخه ۶,۰,۲۳ و یا بالاتر.
۱۰. استریپ و کپ ml ۰,۱ برای استفاده در روتور ۷۲ چاهکی یا لوله‌های ml ۰,۲ برای روتورهای ۳۶ چاهکی

نکات احتیاط عمومی

۱. نگهداری و تخلیص نمونه‌های مورد بررسی، کنترل‌ها و محصولات حاصل از PCR باید در محلی‌کاملا جدا از محل نگهداری و آماده‌سازی MasterMix صورت پذیرد.
۲. همه مواد مورد نیاز کیت قبل از شروع کار باید به طورکامل در دمای اتاق ذوب شود.
۳. بعد از ذوب شدن، کلیه مواد (به ویژه استانداردهای کیت) را به خوبی پیپتاژ نمایید و به طور مختصر اسپین کنید. این امر برای جلوگیری از کاهش عملکرد کیت در طی زمان به طور کامل توصیه می‌شود.
۴. تمام مراحل مربوط به تهیه MasterMix باید بر روی یخ یا جعبه‌های سرد (Cooling Box) انجام شود. استوک اصلی مربوط به Master Mix بعد از برداشتن مقدار مورد نیاز از آن باید به سرعت به فریزر منتقل شود.

هشدارها و محدودیت ها

۱. پیشنهاد می شود هود و یا استیشن مورد استفاده قبل و بعد ازکار با وایتکس ۱۰ درصد تمیز شودو همین طور بعداز کارلامپ UV زده شود .
۲. پیشنهاد می شود محل استخراج DNA ، آماده سازی مخلوط واکنش از فضای اضافه کردن نمونه واکسن و نمونه استاندارد جدا باشند زیرا ممکن است نتایج مورد قبول به اشتباه خارج از محدوده گزارش شود.

۳. پس از آماده سازی مخلوط واکنش، آن را درتاریکی نگهداری نمایید .

کنترل ها

۱. نمونه: از محتویات اسید نوکلئیک حاصل از استخراج DNA استفاده شود.
۲. کنترل منفی (NTC): همواره یک نمونه کنترل منفی حاوی آب بجای نمونه استفاده شود.
۳. استاندارد (STD): از استاندارد کیت بجای نمونه در یک واکنش استفاده گردد.

آماده سازی نمونه و نگهداری

۱. به منظور تشخیص و تعیین مقدار HCDNA باید DNA را با استفاده کیت تخلیص DNA، استخراج نمایید. قبل از استخراج، نمونه واکسن را به مدت ۵ دقیقه درg۱۳۰۰-۸۰۰ سانتریفوژ کنید تا عوامل مزاحم جدا شده و از سوپ رویی جهت استخراج استفاده کنید.
۲. نتایج منفی کاذب می‌توانند به دلیل حضور افزایش غلظت مهار کننده های واکنش PCR ، استخراج DNA غیر استاندارد ، انتقال نامناسب نمونه و یا غلظت کم نمونه، حضور آلوم و یا مهارکننده های دیگر ناشی گردد.

۶. نوکلئیک‌اسیدهای استخراج شده باید در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد یا پایین‌تر نگهداری شوند.
۷. نمونه DNA ای که در دمای -۲۰ و یا پایین‌تر فریز نشده است قابل استفاده برای آزمایش نمی‌باشد.

- ایمنی زیستی در آزمایشگاه های میکروبیولوژی و زیست-پزشکی چاپ پنجم
http://www.cdc.gov/biosafety/publications

کنترل داخلی

این کیت به همراه یک کنترل‌داخلی برای مصرف‌کننده نهایی تهیه شده است. این امر به کاربر نهایی اجازه می‌دهد تا هم فرآیند تخلیص را چک کند و هم احتمال وجود مواد مهارکننده PCR را بررسی نماید. به طور کل در این حالت کنترل‌داخلی موجود در کیت را به مقدار ۰,۱ میکرولیتر به ازاء هر ۱ میکرولیتر از حجم حل کردن نهایی HCDNA اضافه می شود. برای مثال اگر ژنوم

تخلیص‌شده را در ۵۰ میکرولیترآب حل‌می‌کنیم باید درهنگام تخلیص نمونه ی واکسن مربوط به آن به نمونه ی واکسن ۵ میکرولیترکنترل داخلی اضافه می شود. به بیان دیگر حجم کنترل اضافه شده تنها تابعی از میزان الوشن (Elution) نهایی می باشد. این کنترل داخلی را می توان به طور مستقیم به بافر لیز اضافه نمود. این نکته قابل‌ذکراست که اضافه‌کردن کنترل‌داخلی به بافر لیز یا مخلوط بافر لیز و نمونه ی واکسن باید به صورت تازه صورت‌گیرد. همچنین کنترل داخلی به هیچ عنوان نباید به خود نمونه به صورت مستقیم و در غیاب بافر لیز اضافه شود. همچنین می‌توان کنترل داخلی را تنها در طی مرحله PCR اضافه کرد که در این حال هیچ گونه کنترلی بر روی مرحله تخلیص وجود نخواهد داشت. در این حالت ۱ میکرولیتر کنترل داخلی به ۱۴میکرولیتر MasterMix-HcDNA اضافه شده و سپس از این مخلوط مقدار ۱۴ میکرولیتر با ۶ میکرولیتر از نمونه تخلیص شده مخلوط می گردد.

آماده‌سازی

آماد سازی با دو روش صورت میگیرد :

۱. در صورتیکه کنترل‌داخلی را درمرحله استخراج و طی مراحل‌آماده سازی‌اضافه‌کرده‌اید، مقادیر لازم برای آماده سازی MixMaster برای هر واکنش را برای هرتست طبق جدول‌زیرآماده کنید . پس از آماده سازی محلول‌ها و انتقال آن به تیوب‌های واکنش، ابتدا نمونه کنترل منفی (NTC) را آماده کنید. برای این کار، ۶ میکرولیتر از آب بدون نوکلئاز را به تیوب کنترل منفی اضافه نمایید. پس از انتقال به هود مختص نمونه، ۶ میکرولیتر از نمونه استاندارد و ۶ میکرولیتر از نمونه‌های HCDNA را به تیوب‌های مربوطه اضافه نمایید. سپس تیوب‌ها را در دستگاه ترمال سایکلر قرار داده و نمونه‌ها را نام‌گذاری کنید.

Number of Reactions (rxns)	Volume
Master A	14µl
Sample or Control	6 µl
FinalVolume	20 µl

۲. اگر از IC به عنوان یک کنترل مهار RT-PCR استفاده شود، اما نه به عنوان یک کنترل برای روش آماده سازی نمونه، Master Mix را مطابق توضیح تهیه نمایید:

در این حالت ابتدا ۱ میکرولیتر از کنترل داخلی را به ۱۴ µl مستر A اضافه کنید و به آرامی پیپتاژ نمایید. سپس از این مخلوط، میزان ۱۴ میکرولیتر برای هر واکنش استفاده نمایید. سپس به روشی که در بالا ذکر شد نمونه اضافه می شود.

Number of Reactions (rxns)	Volume
Master A+ IC	14µl
Sample or Control	6 µl
FinalVolume	20 µl

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 می‌شود. تیوب NTC برای کنترل آلودگی واکنش کاربرد دارد.\

برنامه ریزی دمایی

به منظور انجام تست باید برنامه دمایی زیر برای دستگاه تعریف شود. سنجش طیف نشری (Acquisition) باید هم در کانال سبز (مربوط به سیگنال دریافتی از ژنوم HCDNA) و هم در کانال نارنجی (مربوط به سیگنال دریافتی از کنترل داخلی) انجام شود.

مقادیر دمایی هر قسمت در کادر زیر آورده شده است.

علاوه بر تعریف دمایی، دستگاه باید برای طیف سنجش فلورسنت نیز تنظیم گردد.

	Temperature	Hold	Cycle
Pre-Denaturation	95 °C	3 min	1
Denaturation	95 °C	15 sec	40
Annealing and Acquisition on Channel Green and Orange	58°C	40 sec	

توجه نمایید که پس از انجام ریل تایم، ران انجام شده شرایط زیر را داشته باشد:

Specification	
R^2	> 0.99
PCR Efficiency	100% ± 10%
Precision	≤ 10% CV

آنالیز نتایج

تعیین میزان ژنوم HCDNA تخلیص شده

استانداردهای تامین‌شده در این کیت معادل یک نمونه تخلیص‌شده با مقدار ژنوم HCDNA کاملا مشخص است. از آنجا که از هر نمونه تخلیص شده مقدار ۶ میکرولیتر از ژنوم تخلیص شده با ۱۴ میکرولیتر از MasterMix مخلوط می‌شود باید همین روند به طور مشابه برای نمونه‌های استاندارد نیز اعمال گردد. برای ترسیم منحنی استاندارد هر چهار استاندارد موجود در کیت در هر بار انجام تست باید به همراه نمونه‌های مجهول مورد آنالیز قرار گیرد تا بتوان به واسطه منحنی استاندارد کشیده‌شده میزان HCDNA در نمونه‌های مجهول تعیین‌گردد. برای انجام این‌امر باید استانداردها به عنوان استاندارد در برنامه تعریف شوند و مقدار معادل استاندارد بر اساس فرمول زیر محاسبه شده و در نرم افزار دستگاه وارد شود. استانداردهای تامین شده در کیت به صورت ng/µl می‌باشد.
برای تعیین مقدار HCNDA موجود در واکسن از رابطه زیر استفاده کنید:

$$\text{Final Residual DNA (ng/ µL)} = \frac{\text{Volume (Eluate)[µl]}\ X\ residual\ DNA\ [\frac{ng}{\mu l}]}{\text{Sample Input [µL]}}$$

- ✓ در نهایت میزان Final Residual DNA در میزان نهایی دوز واکسن ضرب کنید تا Final Residual DNA به ازای هر دوز مشخص شود.
- ✓ قبل از انجام آنالیز تعیین غلظت باید نتایج کانالها را بررسی نمایید تا از صحت انجام تست اطمینان حاصل نمایید:

۱- سیگنال فلورسانس در کانال (A.FAM=green) کاملا مشخص است.

نتیجه تست برای HCDNA مثبت است و نمونه تخلیص شده از نمونه ی واکسن حاوی HCDNA بوده است. در این حالت، وجود سیگنال فلورسانس در کانال Orange اهمیت ندارد زیرا در صورت بالا بودن غلظت اولیه ژنوم HCDNA سیگنال درکانال Orange می‌تواند بسیار ضعیف باشد یا اصلا وجود نداشته باشد. در این حالت می توانید آنالیزهای تعیین غلظت را انجام دهید و میزان DNA باقیمانده را گزارش نمایید.

۲- هیچ سیگنال فلورسانسی در کانال (A.FAM=Green channel) مشاهده نمی‌شود. در همین حین سیگنال در کانال Orange مربوط به کنترل داخلی قابل مشاهده است. این حالت نشان دهنده عدم وجود HCDNA در نمونه واکسن می‌باشد. همچنین مثبت بودن سیگنال حاصل از کانال Orange وجود هر گونه مهار کننده واکنش PCR را منتفی می‌کند.

۳- هیچ سیگنال فلورسانسی در کانالA.FAM و کانال Orange قابل مشاهده نیست.

در این حالت هیچ گونه نتیجه گیری در مورد تست نمی‌توان انجام داد. احتمال وجود مهارکننده در تست شما وجود دارد. بنابراین تست باید دوباره تکرار شود.

برای پشتیبانی فنی لطفا با تلفن های شرکت تماس حاصل فرمایید .

پشتیبان فنی

برای پشتیبانی فنی لطفا با تلفن های شرکت تماس حاصل فرمایید .

نشانه ها

برای مصارف پژوهشی	Research Use Only	
کد کالا	Catalog Number	
شماره بچ تولید شده	Batch Number	
محدودیت دمایی	Temprature Limitation	
مطالعه دستورالعمل	Concult Instructon For Use	
تعداد تست	Content sufficent for <n> tets	
تاریخ انقضا	Use by	
آدرس	Manufacturer	

اطلاعات تماس

شرکت فناوری بن یاخته -گروه سین مورو

دفتر مرکزی : تهران، سعادت آباد، میدان فرهنگ، بلوار ۲۴ متری سعادت آباد، خیابان حیدرنیا (دوم شرقی)، پلاک ۹، شرکت فناوری بن یاخته

کد پستی : ۱۹۹۷۷۷۵۵۵۵ تلفن : ۲۲۰۸۲۱۲۰ پشتیبان فنی : ۰۹۳۰۱۸۲۱۶۰۱

تلفن های تماس : ۰۲۱۲۲۰۸۲۱۲۰