دفترچه راهنما

کیت شناسایی و سنجش کیفی

PAI-1

با روش

Real-Time PCR

Model : PAI-1-FXIII PCR kit

Doc. # : IFU-PAI-FXIII 01 Doc. Version : 00 Revision Date : 31-12-2022

فهرست مطالب

شماره رفرانس ۳
شرح کیت..... ۳
اصول..... ۳
اطلاعات پلی مورفیسم..... ۳
محتویات کیت ۴
نگهداری و انتقال کیت..... ۴
نکات احتیاط عمومی ۵
هشدارها و محدودیت‌ها..... ۷
عوامل تداخلی..... ۸
خالص‌سازی نوکلئیک اسید ۸
آماده سازی ۸
برنامه دمایی ۹
آنالیزنتایج Rotor-Gene ۱۱
جدول تفسیر نتایج ۱۲
نشانه ها ۱۳
اطلاعات تماس..... ۱۳

شماره رفرانس

- BONPAI-FXIII -24
- BONPAI-FXIII 96

شرح کیت

این کیت بر اساس واکنش زنجیره‌ای پلیمراز (PCR) به صورت Real-Time ساخته شده است. این محصول برای تشخیص پلی مورفیسم PAI-1 و FXIII در شرایط آزمایشگاهی تهیه شده است. نتایج تشخیصی به‌دست‌آمده توسط این محصول باید همراه با سایر داده‌های بالینی یا آزمایشگاهی تفسیر شوند.

اصول

تشخیص پلی مورفیسم توسط واکنش زنجیره‌ای پلیمراز (PCR) بر اساس تکثیر ناحیه واجد پلی مورفیسم ژن PAI-1 و FXIII انجام میگیرد. در واکنش Real-Time PCR محصول تکثیر شده از طریق فلوروسنت شناسایی می‌شوند. مشاهده شدت فلوروسنت در حین واکنش PCR (به صورت Real-Time) تشخیص محصولات در حال تکثیر را بدون نیاز به بازکردن مجدد لوله‌های واکنش پس از اجرای PCR ممکن می‌سازد.

اطلاعات پلی مورفیسم

مهارکننده ی عامل فعال ساز پلاسمینوژن ۱ (PAI-1) از مهمترین عوامل خنثی سازی و مهار سریع فعال ساز پلاسمینوژن بافتی (T-PA) در حین لیز فیبرین است. مقادیر بیش از حد PAI-1 با جلوگیری از تبدیل پلاسمینوژن به پلاسمین، باعث تجمع فیبرین در عروق خونی شده و با پایدارسازی لخته خون می تواند عامل خطری برای ترومبوز و ایست قلبی محسوب شود.

پلی مورفیسم PAI-1 4G/5G باعث افزایش بیش از حد PAI-1 در خون می شود. در این پلی مورفیسم، فرم سالم 5G بوده و با اتصال به فاکتور مهاری، میزان و غلظت PAI-1 را در خون تنظیم می کند. آلل 5G سبب رونویسی بیش از حد ژن PAI-1 می شود.

فاکتور XIII یا عامل تثبیت‌کننده فیبرین، نام یکی از پروتئین‌های دخیل در انعقاد خون است. فاکتور سیزده آنزیمی، پروتئینی است که پس از فعال شدن در پی یکسری واکنش‌های پی در پی

به انعقاد خون در مواقع لزوم کمک می‌نماید. فاکتور XIII در واقع یک ترانس‌گلوتامیناز است که به وسیله ترومبین و در حضور کوفاکتور کلسیم فعال می‌شود و با اثر بر رشته‌های فیبرین موجب ایجاد پیوندهای عرضی و شبکه فیبرینی لخته می‌شود. پلی مورفیسم رایج ژن FXIII، انتقال G > T در اگزون دوم ژن F13A1، منجر به جایگزین شدن لوسین (Leu) به والین (Val) در زیر واحد A می شود. تحقیقات نشان داده است که FXIII در حامل های Leu فعالیت بیشتری دارد، در حالی که هموزیگوت های Val کاهش فعالیت این عامل را نشان می دهند. پلی مورفیسم Val34Leu FXIII همچنین بر ساختار لخته فیبرین تأثیر می گذارد، به ویژه در حضور افزایش غلظت فیبرینوژن، و آن را بسیار سفت تر می کند. در مجموع، این پلی مورفیسم با کاهش فعالیت فاکتور FXIII می تواند سبب ناپایداری لخته خون شده موجب بروز تظاهرات بالینی مانند خونریزی مغزی، سقط جنین وخونریزی تاخیری می‌گردد.

محتویات کیت

Title	24 Tests	96 Tests
	Volume per Vial	Volume per Vial
Wild type Master mix	360 µl/tube × 1	720 µl/tube × 2
Mutant type Master mix	360 µl/tube × 1	720 µl/tube × 2
Positive Control	150 µl/tube × 1	300 µl/tube × 1
Internal Control	250 µl/tube × 1	500 µl/tube × 1

نگهداری و انتقال کیت

- ✓ کلیه محتویات این کیت باید در دمای۲۰- درجه سانتی‌گراد و در تاریکی نگهداری‌گردد، همچنین به منظور انتقال و جابه‌جایی کیت از یونولیت با درب و یخ‌خشک استفاده نمایید.
- ✓ از نگهداری کیت دردمای ۴ درجه سانتی‌گراد بیشتر از یک ساعت جدا خودداری نمایید.
- ✓ این کیت نیاز به حمل برروی بسته‌های یخزده (Frozen Ice Pack) را دارد.

- ✓ همه مواد موجود در کیت تا تاریخ انقضا، همان‌طور که روی برچسب بسته‌بندی محصول مشخص شده است، در شرایط مشخص شده پایدار هستند.
- ✓ از چرخه‌های متعدد ذوب و انجماد (Freeze-Thaw) خودداری کنید زیرا سبب کاهش حساسیت و درنتیجه عدم کارایی کیت می‌شود.
- ✓ از قراردادن مستقیم اجزای کیت در معرض نور، گرما یا رطوبت خودداری کنید.
- ✓ معرف‌ها را قبل از استفاده در دمای اتاق (۱۵ تا ۲۵ درجه سانتی‌گراد) ذوب کنید. پس از ذوب شدن مواد موجود در کیت، لوله‌ها را به طور مختصر اسپین نمایید تا مطمئن شوید که مواد موجود در کیت به طور یکنواخت مخلوط شده‌اند.

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

۱. کیت استخراج DNA از نمونه
۲. سمپلر قابل تنظیم در اندازه‌های مختلف و نوک سمپلر فیلتردار
۳. سانتریفوژ رومیزی
۴. بلوک خنک کننده
۵. وایتکس ۱۰ درصد
۶. گان و دستکش
۷. دستگاه با قابلیت خوانش در کانال‌های فلوروسنت مخصوص Cycling Green, Cycling Orange
۸. نرم‌افزار دستگاه مورد استفاده
۹. استریپ و کپ مناسب دستگاه مورد استفاده

نکات احتیاط عمومی

۱. لطفاً دستورالعمل را با دقت بخوانید و قبل از استفاده محصول با تمام اجزای کیت آشنا شوید و درحین‌کار دستورالعمل را دقیقاً دنبال کنید.
- ✓ لطفاً قبل از استفاده، ابزارهای Real-Time PCR سازگار را بررسی کنید و فرآیند را با آن‌ها جلو ببرید.
- ✓ از کیت یا اجزای کیت پس از تاریخ انقضاء استفاده نکنید.
- ✓ در کیت آزمایش از ماده دیگری استفاده نکنید.

۲. از سرسمپلرهای فیلتردار و RNase & DNase free استفاده کنید.
۳. نگهداری و تخلیص نمونه‌های گرفته شده، باید در محلی کاملا جدا از محل نگهداری و آماده سازی مسترمیکس صورت پذیرد.
٤. همه مواد مورد نیاز کیت قبل از شروع کار باید به طورکامل در دمای اتاق ذوب شود.
٥. بعد از ذوب شدن، کلیه مواد را به خوبی پیپتاژ نمایید و به‌طور مختصر اسپین کنید. این امر برای جلوگیری از کاهش عملکرد کیت در طی زمان به‌طورکامل توصیه می‌شود.
٦. تمام مراحل مربوط به تهیه مسترمیکس باید بر روی یخ یا جعبه‌های سرد (Cooling Box) انجام شود. استوک اصلی مربوط به مسترمیکس بعد از برداشتن مقدار مورد نیاز از آن باید به سرعت به فریزر منتقل شود.
۷. هنگام کار با مواد شیمیائی، روپوش مناسب آزمایشگاهی، دستکش یکبار مصرف، وعینک‌های محافظ داشته باشید.
۸. کیت حاوی کنترل مثبت است. برای جلوگیری از آلودگی که ممکن است باعث ایجاد مثبت کاذب شود، کنترل مثبت را از سایر مواد موجود در کیت کاملا جدا کنید.
۹. PCR بسیار حساس به آلودگی متقابل است، پس فرآیند کار را با دقت انجام دهید.
۱۰. هنگام کار با نمونه‌ها و مواد موجود در کیت، برای جلوگیری از آلودگی، دستکش‌ها باید مرتباً تعویض شوند.
۱۱. از تیپ‌های جداگانه و اختصاصی استفاده کنید. هنگام کار با نمونه‌ها و مواد موجود در کیت از میکروتیپ‌های فیلتردار برای جلوگیری از ورود آلودگی RNA و DNA استفاده کنید.
۱۲. لطفاً لوله‌های PCR را با دو دستکش یکبارمصرف بسته‌بندی کرده و به درستی دور بیندازید. لوله‌های PCR را پس از تکثیر باز نکنید.
۱۳. از استفاده ی مجدد مواد یکبار مصرف بپرهیزید.
۱٤. مواد موجود درکیت که بلا استفاده شده اند، کیت استفاده شده و زباله‌ها باید به درستی دور انداخته شوند.
۱٥. پس از آزمایش، محل کار را پاک کنید، پیپت‌ها و تجهیزات را با اسپری اتانول ۷٥٪ و وایتکس ۱۰٪ تمیز کنید.

هشدارها و محدودیت‌ها

۱. تمامی مراحل آزمایش باید بر اساس اصول GLP[۱] توسط پرسنل آموزش دیده دارای پوشش حرفه ای و محافظ (PPE)[۲] انجام شود. آزمایش‌های بالینی بر نمونه‌های عفونی باید در هود کلاس دو (Class II Biological Safety Cabinet) در محیط BSL-2 (مطابق دستورالعمل: Interim Laboratory Biosafety Guideline For Handling and Processing Specimen Associated) انجام شود.

۲. پیشنهاد می‌شود هود و یا استیشن مورد استفاده قبل و بعد از کار با وایتکس ۱۰ درصد تمیز شود و همینطور بعد از کار لامپ UV زده شود.

۳. پیشنهاد می‌شود آماده‌سازی مخلوط واکنش از فضای اضافه کردن نمونه و کنترل مثبت جدا باشند زیرا ممکن است نتایج کاذب به وجود آید.

۴. پس از آماده‌سازی مخلوط واکنش، آن را در تاریکی نگهداری نمایید.

کنترل‌ها

۱. نمونه بیمار: 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. کنترل مثبت (PTC): از کنترل مثبت کیت به‌جای نمونه در یک واکنش استفاده شود.

نگهداری نمونه‌های گرفته شده

نمونه می‌تواند کمتر از ۸ ساعت در یخچال با محدوده دما از ۲ تا ۸ درجه سانتی‌گراد و برای نگهداری طولانی‌مدت آن، باید در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد منجمد شده و نگهداری شود.

تاریخ انقضای کیت

تاریخ انقضای کیت بر روی جعبه محصول درج شده است.

---

[۱] Good Laboratoty Practice

[۲] Personal Protective Equipment

عوامل تداخلی

EDTA (0.5M)، HCl (1N)، دانه‌های سیلیس (1µl)، خون (1µl)، اوره (۴۰ گرم در ۱۰۰ میلی‌لیتر) و بافر لیز عملکرد آزمایش را مهار می‌کنند. وجود مهارکننده در واکنش با ژن کنترل داخلی قابل ردیابی است.

خالص‌سازی نوکلئیک اسید

جداسازی اسید نوکلئیک باید توسط کیت‌های استخراج DNA موجود در بازار مطابق پروتکل‌های جداسازی مواد بالینی خاص انجام شود.
مواد نمونه باید از سلول‌های جدا شده از نمونه‌های بافت یا سواب استخراج شده باشد.
کیت استخراج DNA در این کیت گنجانده نشده است.

آماده سازی

این کیت حاوی دو میکس است. میکس wild جهت شناسایی الل‌های سالم، و میکس mutant جهت شناسایی الل‌های جهش یافته‌ی ژن PAI-1 و FXIII می‌باشند.
۱. ابتدا لوله‌ها را روی رک یخ بگذارید تا محتویات آن‌ها ذوب شوند و لوله‌های بافر واکنش و پرایمر پروب را به آرامی ورتکس کنید و به طور مختصر سانتریفیوژ کنید.
۲. برای هر نمونه ۲ لوله در نظر بگیرید. میزان ۱۵ میکرولیتر از میکس wild را به ۱ لوله و ۱۵ میکرولیتر از میکس mutant را به لوله دیگر PCR اضافه کنید.
نکته در هر بار انجام تست یک لوله به‌عنوان No Template Control (NTC) باید گذاشته شود. در NTC به‌جای نمونه استخراج شده از آب استفاده می‌شود که برای کنترل آلودگی واکنش کاربرد دارد.

اضافه کردن الگو

پس از آماده سازی محلول‌ها و انتقال آن به تیوب‌های واکنش، ابتدا نمونه کنترل منفی (NTC) را آماده کنید. برای این کار، ۵ میکرولیتر از آب بدون نوکلئاز را به تیوب کنترل منفی اضافه نمایید. پس از انتقال به منطقه کار با اسید نوکلئیک، ۵ میکرولیتر از نمونه‌های تحت تست را به تیوب‌های مربوطه اضافه نمایید (جدول ۲). سپس تیوب‌ها را در دستگاه ترمال سایکلر قرار داده و نمونه‌ها را نام‌گذاری کنید.

Reaction Setup	Volume
Master Mix	15 µl
Sample or Control	5 µl
Final Volume	20 µl

جدول شماره ۲. آماده سازی مواد

برنامه دمایی

دستورالعمل برای دستگاه‌های Real-Time PCR دارای دو کانال Green و Orange شده است. پس از تنظیم‌کردن دستگاه مطابق برنامه زیر، واکنش را راه اندازی کنید. درصورت استفاده از دستگاه ABI StepOne گزینه‌رنگ‌رفرنس‌داخلی(Passive Refrence) را حذف کنید. برای آگاهی از نحوه تعریف کانال در دستگاه Rotor Gene به کاتالوگ دستگاه مراجعه کنید. مقادیر دمایی هر قسمت در جدول ۳ آورده شده است.

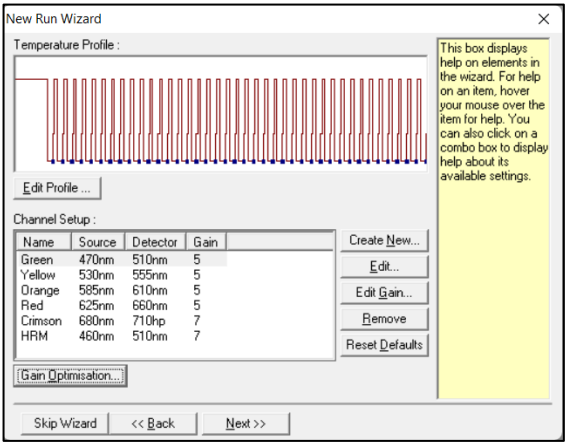
	Temperature	Hold	Cycle
Pre-Denaturation	95 °C	4 min	1
Denaturation	95 °C	15 sec	45
Annealing and Acquisition on Channel Green and yellow	60°C	45 sec	

جدول شماره ۳. برنامه دمایی دستگاه

تعریف طیف سنجش فلورسنت در دستگاه ها

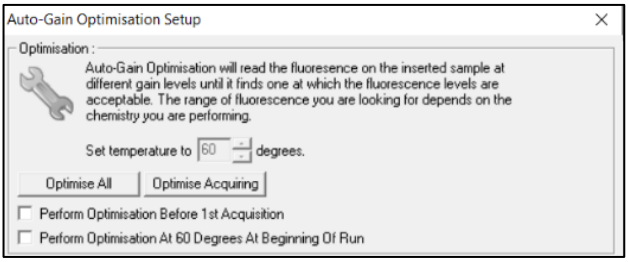
دستگاه **Rotor-Gene**

بدین منظور در دستگاه Rotor-gene گزینه‌ی Gain Optimization را انتخاب کنید (شکل ۱).



شکل ۱. تنظیمات دستگاه

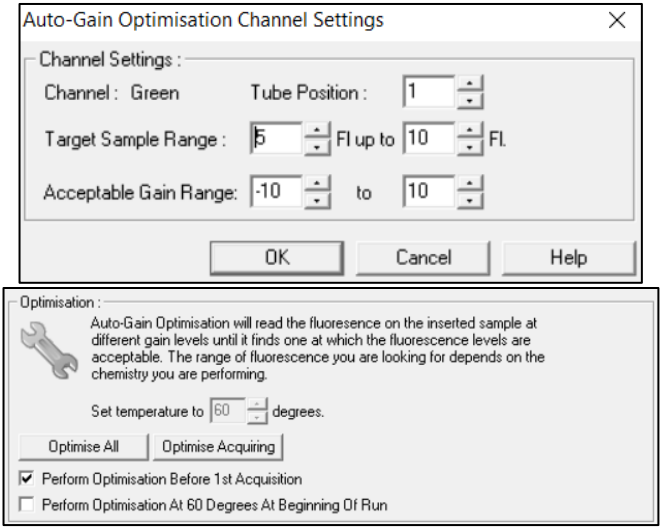
در این صفحه با انتخاب گزینه‌ی Optimise Acquiring برای کانال سبز بازه‌ی Target sample range از ۵ تا ۱۰ (حالت پیش‌فرض دستگاه) انتخاب شود (شکل ۲).



شکل ۲. تنظیمات دستگاه

همچنین Gain دستگاه باید برمبنای تیوب اول انجام شود.

پس از انتخاب بازه‌ی مناسب برای هر کانال، گزینه‌ی Perform Optimization Before 1st Acquisation را انتخاب کرده، و پنجره را ببندید (شکل ۳).



شکل ۳. تنظیمات دستگاه

آنالیزنتایج Rotor-Gene

آنالیز نتایج توسط نرم افزار مربوطه و بر اساس دستورالعمل دستگاه انجام شود. در کانال رنگی سبز و زرد، آستانه را روی گزینه‌ی Auto قرار دهید.

آنالیز نتایج بر اساس محاسبه‌ی اختلاف Ct بین دو لوله‌ی Wildو Mutant انجام می‌شود.

۱. چنانچه نمونه در کانال سبز دارای منحنی سیگموئیدی و فاز لگاریتمی باشد:

الف: اگر لوله‌ی Wild حداقل 1 واحد Ct کمتر از لوله‌ی Mutant باشد، فرد برای پلی مورفیسم PAI-1 4G/5G هموزیگوت سالم است.

ب: اگر لوله‌ی Mutant حداقل 1 واحد Ct کمتر از لوله‌ی Wild باشد، فرد برای پلی مورفیسم PAI-1 4G/5G هموزیگوت بیمار است.

ج: اگر اختلاف Ct بین دو لوله سالم و بیمار کمتر از 1 واحد باشد، فرد برای پلی مورفیسم PAI-1 4G/5G هتروزیگوت است.

2. چنانچه نمونه در کانال زرد دارای منحنی سیگموئیدی و فاز لگاریتمی باشد:

الف: اگر سیگنال فقط در لوله‌ی Wild مشاهده شد، و یا Ct در لوله‌ی Wild حداقل ۵ واحد Ct کمتر از لوله‌ی Mutant باشد، فرد برای پلی مورفیسم FXIII هموزیگوت سالم است.

ب: اگر سیگنال فقط در لوله‌ی Mutant مشاهده شد، و یا Ct در لوله‌ی Mutant حداقل ۵ واحد Ct کمتر از لوله‌ی Wild باشد، فرد برای پلی مورفیسم FXIII هموزیگوت بیمار است.

ج: اگر سیگنال در هر دو لوله مشاهده شد، اختلاف Ct بین دو لوله سالم و بیمار کمتر از ۵ واحد باشد، فرد برای پلی مورفیسم PAI- FXIII هتروزیگوت است.

از آنجا که هر فرد یکی از آلل‌های نرمال و یا جهش یافته و یا هر دوی آنها را دارا می باشد، بنابراین همیشه نتیجه آزمایش باید حداقل برای یکی از انواع نرمال یا جهش یافته مثبت باشد. بنابراین، این آلل ها در واقع به عنوان کنترل داخلی ایفای نقش می کنند. در صورتی که برای نمونه ای، سیگنالی در کانال سبز یا زرد دیده نشود و یا منحنی مربوط به آن سیگموئیدی نباشد، آزمایش نامعتبر بوده و باید دوباره تکرار شود.

جدول تفسیر نتایج

Chanel	Wild Mix	Mutant Mix	ΔCt ($Ct_2 - Ct_1$)	Result	
PAI-1	Ct،	Ct،	1 < ΔCt	5G/5G	هموزیگوت سالم
			ΔCt < -1	4G/4G	هموزیگوت جهش‌یافته
			-1 < ΔCt < 1	5G/4G	هتروزیگوت، سالم
FXIII	Ct،	Ct،	5 < ΔCt	GG	هموزیگوت سالم
			ΔCt < -5	TT	هموزیگوت جهش‌یافته
			-5 < ΔCt < 5	GT	هتروزیگوت سالم

نشانه ها

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

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

Web Site: www.Senmurv.co Email: info@senmurv.ir