دفترچه راهنما

کیت شناسایی و سنجش کیفی

با روش FETAL SEX DETERMINATION

Real-Time PCR

Senmuv FETAL SEX DETERMINATION PCR kit

STEM CELL TECHNOLOGY
شرکت فناوری بن یاخته

Doc. #: IFU-FSD-00 Doc. Version: 00 Revision Date: 07-03-2023

Version 00

فهرست مطالب

شماره رفرانس ۳
شرح کیت ۳
اصول ۳
مقدمه ۳
محتویات کیت ۴
نگهداری و انتقال کیت ۵
نکات احتیاط عمومی ۶
هشدارها و محدودیت‌ها ۷
نمونه‌گیری و نگهداری ۷
عوامل تداخلی ۸
آماده سازی ۸
اضافه کردن الگو ۹
برنامه ریزی دمایی ۹
تعریف طیف سنجش فلورسنت در دستگاه‌های مختلف ۱۰
آنالیز نتایج ۱۲
حساسیت و اختصاصیت آنالیتیکال ۱۳
نکات آنالیز نتایج در دستگاه‌های مختلف ۱۳
نشانه ها ۱۴
اطلاعات تماس ۱۴

شماره رفرانس

- BONFETAL SEX DETERMINATION-24

- شرح کیت

این کیت بر اساس واکنش زنجیره‌ای پلیمراز (PCR) به صورت Real-Time ساخته شده است. این محصول برای تعیین جنسیت از نمونه‌ی پلاسما خون مادر در شرایط آزمایشگاهی تهیه شده و نتایج تشخیصی به‌دست‌آمده توسط این محصول باید همراه با سایر داده‌های بالینی یا آزمایشگاهی تفسیر شوند.

اصول

تشخیص جنسیت جنین اولیه توسط واکنش زنجیره‌ای پلیمراز (PCR) بر اساس تکثیر مناطق خاص ژنوم انسان می‌باشد. 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. این کیت در قالب یک پلتفرم تک لوله ای مولتی پلکس شامل چهار ست پرایمر و پروب برای ژن‌های چند کپی DAZ و DYS14 و ژن تک کپی SRY واقع بر کروموزوم Y انسانی و همچنین یک ژن کنترل داخلی برای ارزیابی وجود DNA کافی در استخراج طراحی شده است که قادر به تعیین جنسیت جنین با استفاده از **Cell-free fetal DNA (cffDNA)** از پلاسمای خون مادر در هفته ٦ تا ١٠ بارداری به ترتیب با فلوروفورهای HEX,TEX,Cy5 و FAM می باشد.

مقدمه

به طور سنتی، تعیین جنسیت جنین اولیه با استفاده از تکنیک‌های تهاجمی مانند نمونه‌برداری از پرزهای کوریونی یا آمنیوسنتز انجام می‌شود. با این حال، این روش ها هنوز هم خطر سقط جنین را در حدود ١-٢٪ دارند و نمی توان تا هفته ١١ بارداری انجام داد. همچنین به دلیل رشد ناقص اندام تناسلی خارجی نمی توان جنسیت جنین را با سونوگرافی در سه ماهه اول تعیین کرد.
بنابراین، بر اساس تجزیه و تحلیل مواد ژنتیکی جنین به دست آمده از سلول های جنینی در

گردش خون مادر، تلاش های بیشتری برای ایجاد روش های تشخیصی قبل از تولد که خطری برای جنین ایجاد نمی کند، انجام شده است. از این رو، با توجه به میزان اندک سلولهای جنینی در خون مادر، (یک سلول جنینی در هر 10^6 سلول مادر)، آزمایش تعیین جنسیت به روش مولکولی به منظور تشخیص غیرتهاجمی پیش از تولد اختلالات ارثی از پدر و همچنین تعیین جنسیت جنین بر روی cffDNA استخراج‌شده از پلاسمای خون مادر در مراحل اولیه بارداری بدون تداخل حاملگی‌های قبلی انجام می شود.

استفاده از cffDNA در پلاسمای خون مادر برای تعیین جنسیت جنین بر روی توالی هایی انجام می شود که در ژنوم مادر وجود ندارند مانند SRY، DYS14 و DAZ که واقع بر روی کروموزوم Y هستند.

کیت Fetal Sex Determination Senmurv، با هدف تعیین زودهنگام جنسیت جنین با استفاده از cffDNA و به عنوان تست غیر تهاجمی برای پیشگیری از خطر اختلالات مرتبط با کروموزوم جنسی، طراحی و تولید شده است. کاربرد استفاده از این کیت، با استفاده از cffDNA موجود در پلاسمای خون مادر، در هفته‌های ٦ تا ١٠ بارداری می باشد.

اقدامات ضد آلودگی

به عنوان یک اقدام ضد آلودگی، از سر سمپلر DNase/RNase Free مقاوم در برابر آئروسل برای آماده سازی مراحل واکنش استفاده شود. به منظور از بین بردن تماس با DNA اگزوژن مرد، تنها اپراتورهای خانم در شرایط ایزوله مجاز به آماده سازی واکنش هستند.

محتویات کیت

Title	24 Tests
	Volume per Vial
FSD Master Mix	360 µl/tube × 1
FSD Positive Control	50 µl/tube × 1

Nuclease FreeWater	360 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.
- ✓ نگهداری کیت در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد هیچ‌گاه نباید بیشتر از یک‌ساعت شود.
- ✓ 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 سانتریفیوژ کنید 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 CffDNA -(QIAamp DNA Blood Mini (Qiagen))
۲. سمپلر قابل تنظیم در اندازه‌های مختلف و نوك سمپلر فیلتردار
۳. سانتریفوژ رومیزي
۴. بلوك خنك كننده
۵. وایتکس ۱۰ درصد
٦. گان و دستکش
۷. دستگاه با قابلیت خوانش در کانال Green,Yellow,Orange,Red
۸. نرم‌افزار دستگاه‌های 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.
- ✓ تست توسط کارشناس خانم انجام شود که از ایجاد خطای مثبت کاذب جلوگیری گردد.
- ✓ از کیت یا اجزای کیت پس از تاریخ انقضا استفاده نکنید.
- ✓ در کیت آزمایش از ماده دیگری استفاده نکنید.

۲. از سرسمپلرهای فیلتردار و RNase & DNase free استفاده کنید.

۳. نگهداری و تخلیص مواد مثبت برای نمونه‌های گرفته شده از بیمار، کنترل‌ها و محصولات حاصل از PCR باید در محلی کاملا جدا از محل نگهداری و آماده‌سازی Master Mix 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 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.

۷. هنگام کار با مواد شیمیائي، روپوش مناسب آزمایشگاهي، دستکش یکبار مصرف، وعینك‌هاي 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 DNA استفاده کنید.

۱۲. لطفاً لوله‌های PCR را پس از امپلیفای باز نکنید.
۱۳. از استفاده ی مجدد مواد یکبار مصرف بپرهیزید.
۱٤. مواد موجود درکیت که بلا استفاده شدند، کیت استفاده شده و زباله‌ها باید به درستی دور انداخته شوند.
۱۵. پس از آزمایش، محل کار را پاک کنید، پیپت‌ها و تجهیزات را با اسپری اتانول ۷۵٪ و وایتکس ۱۰٪ تمیز کنید.

هشدارها و محدودیت‌ها

۱. تمامی مراحل آزمایش باید بر اساس اصول GLP[1] توسط پرسنل خانم آموزش دیده دارای پوشش حرفه ای و محافظ (PPE)[2] 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 محل استخراج DNA، آماده‌سازی مخلوط واکنش از فضای آماده‌سازی و اضافه کردن نمونه و نمونه 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 مورد تست: 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.

نمونه‌گیری و نگهداری

نمونه مورد نیاز بایستی از پلاسما خون مادر باردار در هفته ۶-۱۰ استخراج گردد.
نمونه‌گیری باید در شرایط استریل صورت گیرد.

نگهداری نمونه‌های گرفته شده

۱. از ظرف های مخصوص و یکبار مصرف برای جمع آوری نمونه استفاده کنید.

[1] Good Laboratoty Practice
[2] Personal Protective Equipment

۲. برای جمع‌آوری خون یا پلاسما، از لوله‌های استریل حاوی مواد ضدانعقادی مانند EDTA یا سیترات استفاده کنید. توجه داشته باشید که نمونه‌های حاوی هپارین به دلیل اثر مهاری این ماده برای PCR مناسب نیستند.

۳. طی چند ساعت اولیه پس از خون‌گیری، پلاسما را جدا و تا زمان انجام آزمایش در دمای ۲۰- ℃ نگهداری کنید. سایر نمونه‌های مورد استفاده را نیز طی چند ساعت اولیه پس از نمونه‌گیری در دمای ۲۰- ℃ نگهداری و از فریز و ذوب کردن مکرر آن‌ها خودداری نمایید.

۴. در صورت حمل و نقل نمونه، نمونه را در شرایط سرد و همراه یخ منتقل کنید.

تاریخ انقضای کیت

تاریخ انقضای کیت بر روی جعبه محصول درج شده است.

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 جداسازی موجود در بازار مطابق پروتکل‌های جداسازی مواد بالینی خاص انجام شود. کیت استخراج DNA در این کیت گنجانده نشده است.

آماده‌سازی

این کیت حاوی یک میکس جهت شناسایی و تعیین جنسیت جنین در هفته های ۶ تا ۱۰ بارداری با استفاده از cffDNA از پلاسمای خون خانم باردار است.

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 اسپین کنید.

۲. برای هر نمونه۱ لوله در نظر بگیرید. میزان ۱۵ میکرولیتر از Master Mix را به ۱ لوله 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. سپس تیوب‌ها را در دستگاه ترمال سایکلر قرار داده و نمونه‌ها را نام‌گذاری کنید.

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

برنامه ریزی دمایی

دستورالعمل برای دستگاه‌های Real-Time PCR دارای کانال Green,Red, Yellow,Orangeتوصیف شده است. پس از تنظیم‌کردن دستگاه مطابق برنامه زیر، واکنش را راه اندازی کنید. برای آگاهی از نحوه تعریف کانال در دستگاه Rotor Gene به کاتالوگ دستگاه مراجعه کنید. مقادیر دمایی هر قسمت در جدول زیر آورده شده است.

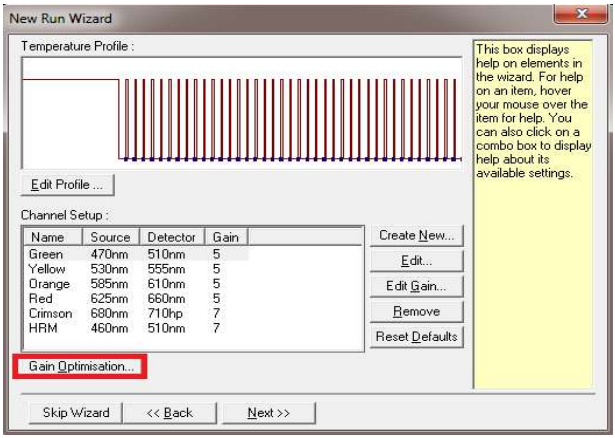
	Temperature	Hold	Cycle
Pre-Denaturation	95 ℃	3 min	1
Denaturation	95 ℃	15 sec	35
Annealing and Acquisition on Channel Green and Yellow and Orange and Red	60 ℃	30 sec	
Extention	72 ℃	20 sec	

علاوه بر تعریف دمایی دستگاه که در قسمت بالا آمده است دستگاه باید برای طیف سنجش فلورسنت نیز تنظیم‌گردد. اندازه‌گیری تابش فلورسانس باید برای رنگ Green و Yellow,Orange,Red تنظیم شود.

تعریف طیف سنجش فلورسنت در دستگاه‌های مختلف:

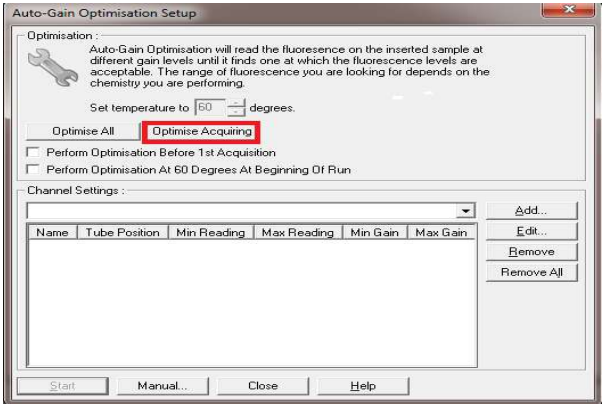
دستگاه Rotor-Gene:

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

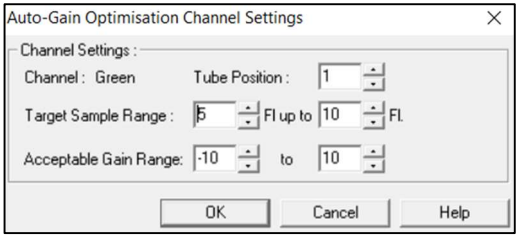


شکل ۱. تنظیمات دستگاه

در این صفحه با انتخاب گزینه‌ی Optimise Acquiring برای کانال Green و Yellow و Orange و Red بازه ی Target sample range از ۵ تا ۱۰ (حالت پیش فرض دستگاه) انتخاب شود (شکل ۲). همچنین Gain دستگاه باید برمبنای تیوب عدد نوشته شده در کادر Tube Position صحیح انتخاب شده باشد (شکل ۳).

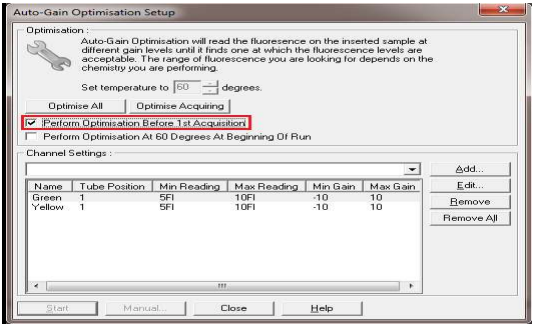


شکل ۲. تنظیمات دستگاه



شکل ۳. تنظیمات دستگاه

پس از انتخاب بازه‌ی مناسب برای هر کانال، گزینه‌ی Perform Optimization Before 1st Acquisation را انتخاب کرده، و پنجره را ببندید (شکل ۴).



شکل ٤. تنظیمات دستگاه

آنالیز نتایج

آنالیز نتایج توسط نرم افزار مربوطه و بر اساس دستورالعمل دستگاه انجام شود. در کانال رنگی سبز ، زرد، نارنجی و قرمز آستانه را روی گزینه‌ی ۰٫۰۲ قرار دهید. تفسیر آنالیز نتایج بر اساس جدول زیر است:

جدول تفسیر نتایج

Result	SRY/Green	DAZ/Yellow	DYS/Orange	HBB/Cy5
Male ♂	**Positive**	**Positive**	**Positive**	**Positive**
Male ♂	**Positive**	**Negative**	**Positive**	**Positive**
Male ♂	**Negative**	**Positive**	**Positive**	**Positive**
Male ♂	**Positive**	**Positive**	**Negative**	**Positive**
Repeat test two weeks later	**Negative**	**Negative**	**Positive**	**Positive**
Female ♀	**Negative**	**Negative**	**Negative**	**Positive**
unacceptable	**Positive/ Negative**	**Positive/ Negative**	**Positive/ Negative**	**Negative**

حساسیت آنالیتیکال

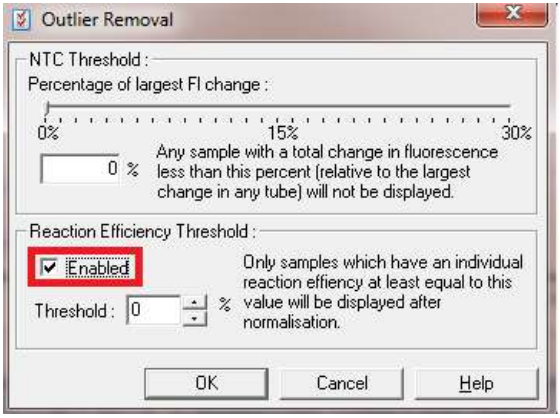
کیت SENMURV Gender detection امکان تعیین جنسیت در با LOD برابر با ۰/۱ نانوگرم در میکرولیتر و با اختصاصیت ۱۰۰٪ ممکن می‌سازد.

نکات آنالیز نتایج در دستگاه‌های مختلف:

دستگاه Rotor-Gene:

آنالیز اطلاعات در دستگاه Rotor-gene 6000 و Rotor-gene 3000 باید توسط نرم‌افزار دستگاه و بر اساس دستورالعمل دستگاه صورت گیرد.

۱. از منوی Quantitation، Analysis را انتخاب کرده و روی یک‌رنگ، به طور مثال Green، دوبار کلیک کنید.
۲. با کلیک بر گزینه ی Outlier Removal، Reaction Efficiency Threshold را فعال کنید (شکل ۶).



شکل ۶. تنظیمات دستگاه

نشانه ها

مفهوم	نشانه	مفهموم	نشانه
دور از نور و گرما		کنترل مثبت	
برای مصارف پژوهشی		تعداد تست	
شماره بچ تولید شده		کد کالا	
محدودیت دمایی		تاریخ انقضا	
مطالعه دستورالعمل		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 پشتیبان فنی : ۰۹۳۰۱۸۲۱۶۰۱

تلفن های تماس : ۰۲۱۲۲۰۸۲۱۲۰

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