

KBC HorseFiling Kit

کیت تعیین اصالت اسب

شماره کاتالوگ: K3079



تعیین هویت اسب:

تعیین نسب حیوانات یکی از شاخص‌های مهم در تجارت، ورزش و زادآوری می‌باشد. امروزه پرورش دهندگان اسب، تکنیک‌های مولکولی (مارکرهای DNA) را برای دستیابی به نتایج دقیق‌تر، جایگزین شیوه‌های کلاسیک و مشاهدات فنوتیپی قرار داده‌اند. به همین منظور، تعداد ۹ جایگاه STR با توجه به هتروزیگوسیتی بالای مشاهده شده در نژادهای مختلف، توسط انجمن بین‌المللی ژنتیک حیوانات (ISAG) برای اسب تعیین شده است.

کیت KBC HorseFiling:

- این کیت دارای ۲۲ مارکر STR می‌باشد که بر روی ۱۷ کروموزوم از ژنوم اسب قرار دارند که به صورت همزمان در یک واکنش PCR تکثیر می‌شوند. کیت‌های تجاری موجود واجد ۱۷ جایگاه STR می‌باشند. کیت KBC HorseFiling به جهت افزایش دقت در تعیین ژنوتیپ، دارای ۵ جایگاه بیشتر می‌باشد. نمونه DNA می‌تواند از خون، موی جدا شده از یال و یا دم اسب باشد.
- قابلیت تکثیر مستقیم DNA (بدون نیاز به انجام مراحل استخراج) از منابع مختلف شامل: بزاق، پیاز مو، نمونه خون پانچ شده از کارت نگهداری DNA (DBC)، کیت KBC-HorseFiling را به صورت محصولی اختصاصی، سریع و قدرتمند در تعیین الگوی ژنوتیپی اسب مشخص می‌کند.
- نتایج آلی به دست آمده توسط کیت KBC HorseFiling با کیت‌های تجاری مشابه یکسان است.

شرایط نگهداری و روش استفاده:

- از آنجایی که پرایمرها با رنگ فلوروسانت نشاندار شده‌اند؛ بنابراین از قرار دادن آن‌ها در مقابل نور مستقیم خودداری شود.
- چنانچه دفعات انجماد و ذوب این کیت زیاد باشد، کیفیت نتایج کاهش خواهد یافت، بنابراین بهتر است مواد را در حجم‌های کمتر نگهداری نمایید.
- **نکته مهم:** این کیت محتوی مواد حساس به گرما از جمله پرایمر، آنزیم و dNTP می‌باشد، لذا آماده سازی نمونه‌ها باید روی یخ انجام شود.
- ابتدا همه مواد موجود در کیت را در دمای اتاق قرار دهید، تا ذوب شوند.
- همه مواد را ۲ ثانیه vortex و سپس spin نمایید (از vortex طولانی خودداری نمایید).
- سپس مطابق جدول زیر، به ازای هر واکنش از مواد استفاده نمایید.
- مقدار لازم از DNA یا یک پانچ ۱/۲ میلی‌متری از کارت نگهداری خون را به یک میکروتیوب ۲۰۰ میکرولیتری اضافه نمایید. هر آزمایشگاهی با توجه به روش و کیفیت استخراج DNA برای دست یافتن به بهترین نتیجه ممکن است مقادیر متفاوتی از DNA استفاده نماید.
- کیت حاوی نمونه کنترل مثبت می‌باشد که در صورت نیاز ۱ ماکرولیتر از آن استفاده شود.
- سپس به اندازه‌ای آب اضافه نمائید، که حجم نهایی ۱۸ ماکرولیتر شود.
- همه مواد را ۲ ثانیه vortex و سپس spin نمایید (از vortex طولانی خودداری نمایید).

	نام ماده	مقدار لازم برای هر واکنش
●	PCR Mix	5 μ l
●	Primer Mix	1 μ l
●	Taq Polymerase	1 μ l

- برنامه PCR را مطابق با جدول زیر به دستگاه ترموسایکلر داده و نمونه‌ها را در دستگاه قرار دهید (بهتر است از تیوب هایی با درب محکم ضد تبخیر استفاده نمائید).

Pre-Denaturation	Cycling			Final Extension	
95 °C	95 °C	63 °C	70 °C	70 °C	4 °C
5 min	1min	90 Sec	2 min	17 min	∞
30 cycles					

جهت حصول اطمینان از عملکرد مناسب PCR می توانید پیش از انجام کپیلاری الکتروفورز حداقل 5 µl از محصول PCR را در ژل الکتروفورز نمائید.

نکات مهم:

- اگرچه محصول PCR یک شب در دمای اتاق ماندگاری دارد، اما با توجه به فلوئورسانت بودن محصول، بهتر است قبل از الکتروفورز آنرا در محیطی تاریک و در یخچال نگهداری نمایید.
- اگر بیش از یک هفته پس از اتمام واکنش PCR تا آغاز انجام کپیلاری الکتروفورز زمان صرف شود، ممکن است کیفیت نتایج کاهش بیابد.
- با توجه به نوع و مقدار DNA مورد استفاده، ممکن است لازم شود تعداد سیکل برنامه را تغییر دهید تا بهترین نتیجه را به دست آورید.
- واکنش‌های فلوئورسانت زنجیره‌ای پلیمرز از جمله واکنش‌های حساس به مقدار بسیار اندکی DNA می‌باشند. بنابراین محل تخلیص DNA، آماده سازی مواد برای PCR و استفاده از محصول PCR باید از هم جدا باشند و شرایط مناسب برای انجام PCR طبق استانداردهای ملی و بین المللی رعایت شود و فضای پیش و پس از PCR از هم جدا شوند و در هر مرحله از واکنش از کنترل منفی نیز استفاده شود.
- **اخطار:** هرگز درب تیوب‌های حاوی محصول PCR را در مجاورت مواد و محلول‌های کیت و محلی که مواد را برای واکنش PCR آماده می‌نمائید، باز ننمائید. چگونگی دفع محصول PCR اضافی بستگی به قوانین خاص آزمایشگاه دارد.

انجام کپیلاری الکتروفورز و آنالیز نمونه‌ها:

- کیت **KBC HorseFiling** برای استفاده توسط دستگاه ABI ساخته شده است که قدرت تفکیک ۵ رنگ را داشته باشد (Five-dye fragment analysis)، مانند دستگاه Genetic Analyzer 3130 , 3130XL و دستگاه‌های جدیدتر شرکت ABI.
- **نکته:** پیش از انجام کار اطمینان حاصل نمائید که نرم افزار ABI Data Collection مورد استفاده شما از Five-dye fragment analyzer پشتیبانی نماید.
- دستگاه را با 6-FAM, VIC, NED, PET, LIZ, کالیبره نموده و پس از آماده سازی نمونه ها، آن ها را در دستگاه Genetic Analyzer قرار دهید.
- از GeneScan™ 500 LIZ™ dye Size Standard برای خوانش نمونه ها استفاده شود.
- برای آماده سازی نمونه های برای ورود به دستگاه به ازای هر نمونه ۹/۵ ماکرولیترا از HiDi Formamid و ۰/۵ ماکرولیترا از GeneScan™ 500 LIZ™ dye Size Standard به همراه ۱ تا ۲ ماکرولیترا از محصول PCR را در ۹۵ درجه HOT کرده و سپس ICE کنید.
- **برای تفسیر نمونه های این کیت، پنل آن را از شرکت زیست فناوری کوثر دریافت نمایید.**

آدرس: خیابان ولیعصر، بالاتر از فاطمی، خیابان مجلسی، شرکت زیست فناوری کوثر، پلاک ۴۱
تلفن: ۰۲۱-۸۸۹۳۹۱۵۰

وب سایت: www.kawsarbiotech.com
ایمیل: kawsar_biotech@yahoo.com