KBC SMN Hap Kit

تشخیص بیماری آتروفی عضلانی نخاعی به روش هاپلوتایپینگ

شماره کاتالوگ: K3087

روش آنالیز پیوستگی ژنی با کمک STR مارکرها (Linkage analysis by STR Markers):

این روش برمبنای تکثیر توالی های کوتاه تکرار شونده‌ای (STR) در اطراف ژنهای SMN1و SMN2 با کمک روش Multiplex PCR می باشد و نتیجه نهایی، با استفاده از کپیلاری الکتروفورز مشخص می‌گردد.

کیت KBC SMN Hap Kit :

این کیت محتوی ۵ مارکر STR با هتروزیگوسیتی بالا (در بالادست ژن SMN2 و پایین دست ژن SMN1) می‌باشد. آنالیز همزمان این مارکرها و بررسی هاپلوتایپ های بدست آمده به عنوان ابزار ارزشمندی در تشخیص پیش از تولد و تعیین ناقلی بیماری SMA به کار می رود.

دیگر قابلیت های این کیت:

- رفع شبه نمونه جنین با نمونه مادری در برخی از موارد (Ruling out maternal cell contamination)
- تشخیص خطای جابجایی نمونه (Sample authenticity)

و نیز تایید نتایج تعیین موتاسیون در کوتاه ترین زمان و حداکثر دقت در یک واکنش PCR می باشد.

شرایط نگهداری و روش استفاده:

- از آنجایی که پرایمرها با رنگ فلوئورسانت نشاندار شده‌اند؛ بنابراین از قرار دادن آن‌ها در مقابل نورمستقیم 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 جداول زیر، به ازای هر واکنش در هر مرحله از انجام PCR از مواد استفاده نمایید.
- مقدار لازم از DNA یا یک پانچ ۱/۲میلی‌متری 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. لازم به ذکر است در مرحله دوم ۰/۵میکرو لیتر از محصولPCR مرحله اول به عنوان الگو استفاده می شود.
- سپس به اندازه‌ای آب اضافه نمائید، که حجم نهایی ۲۰ میکرولیتر شود.
- همه مواد را ۲ ثانیه vortex و سپس spin نمایید (از vortex طولانی خودداری نمایید).

مرحله اول PCR			مرحله دوم PCR	
	نام ماده	مقدار لازم برای هر واکنش	نام ماده	مقدار لازم برای هر واکنش
	PCR Mix	5 µl	PCR Mix	5 µl
	Primer Mix 1 (dilution of 1:5)	1µl	Primer Mix 2 (dilution of 1:5)	1µl
	Taq DNA polymerase	0.5µl	Taq DNA polymerase	0.5µl

- برنامه PCR مرحله اول 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).

برنامه PCR مرحله اول					
Pre-Denaturation	Cycling			Final Extension	
95˚C	95˚C	62 ˚C	72˚C	72˚C	4˚C
5 min	1min	1min	1 min	15 min	∞
	30 cycles				

برنامه PCR مرحله دوم					
Pre-Denaturation	Cycling			Final Extension	
95˚C	95˚C	55 ˚C	72˚C	72˚C	4˚C
5 min	1min	1min	1 min	15 min	∞
	30 cycles				

- جهت حصول اطمینان از عملکرد مناسب PCR می توانید بعد از انجام PCR مرحله اول و دوم، حداقل 5 µl از محصول PCR را در ژل آگارز، 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 پلیمراز 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 استاندارهای 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 می‌نمایید، باز ننمائید. چگونگی دفع محصول PCR اضافی بستگی به قوانین خاص آزمایشگاه دارد.

انجام کپیلاری الکتروفورز و آنالیز نمونه‌ها:

- کیت **KBC SMN Hap Kit** 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.
- 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 LIZ ,PET ,NED, VIC, 6-FAM 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.

<u>برای تفسیر نمونه های این کیت، پنل آن را از شرکت زیست فناوری کوثر دریافت نمایید.</u>

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**