

• **کیت IRFiling برای تعیین طر حواره ژنوم انسانی**

کاربردها و نحوه عملکرد کیت (V1.3) KBC IRFiling

کیت (V1.3) KBC-IRFiling برای تعیین روابط خویشاوندی به کار می رود. در این کیت به منظور بالا بردن دقت شناسایی هر گونه آلودگی و خطا در تشخیص از 17 مارکر (STR) استفاده شده است. از آنجا که زمان و هزینه در امر تعیین هویت اهمیت به سزایی دارد، در این کیت طراحی به گونه ای صورت گرفته تا کل آزمایش در یک مرحله و همزمان یا به صورت مولتیپلکس صورت گیرد. تمامی محل ها کاملا اختصاصی و به نحوی طراحی شده اند که از نظر اندازه (size) متفاوت باشند. محل های مختلف با 4 رنگ متفاوت قرمز (PET)، مشکی (NED)، سبز (VIC)، آبی (FAM) که در اکثر دستگاه های الکتروفورز قابل شناسایی هستند، نشاندار شده است. هتروزیگوسیتی بالا، عدم وجود پلی مورفیسم در محل اتصال پرایمرها و محدوده سایزهای آلی این مارکرها در جمعیت ایرانی بررسی شده اند و بهترین محلها انتخاب شده اند.

این کیت بر روی نمونه های DNA تخلیص شده از خون، مایع آمنیون، پزهای کوریونی جفت (CVS)، DNA آزاد داخل مایع آمنیون، کارت نگهداری خون و DNA خون افراد بالغ و تازه متولد (کارت نگهداری خون شرکت زیست فناوری کوثر) قابل استفاده می باشد.

شرایط نگهداری:

- با توجه به این که پرایمرها با رنگ فلوروسانت نشاندار شده اند بنابراین باید از قرار دادن آنها در مقابل نور مستقیم خودداری شود.
- این کیت به مدت شش ماه در دمای -20 درجه سانتیگراد قابل نگهداری می باشد.
- چنانچه دفعات انجماد و ذوب این کیت زیاد باشد، کیفیت نتایج کاهش خواهد یافت (بنابراین بهتر است مواد را در حجم های کمتر نگهداری نمایید).

	نام ماده	مقدار لازم برای هر واکنش
1	PCR Mix	7 µl
2	Primer Mix	1 µl
3	IR Taq	1µl
4	Patient's DNA	1-2 µl(100- 200 ng)
5	d H2O	10 µl

روش استفاده:

1. ابتدا همه مواد موجود در کیت را در دمای اتاق قرار دهید تا ذوب شوند.
2. سپس مطابق جدول بالا به ازای هر واکنش از هر ماده استفاده نمایید.

نکته مهم: این کیت محتوی مواد حساس به گرما از جمله پرایمر، آنزیم و dNTP می باشد، لذا آماده سازی نمونه ها باید روی یخ انجام شود.

با توجه به نوع و مقدار DNA مورد استفاده حدود 100-200 نانوگرم از DNA را به یک میکروتیوب 200 میکرولیتری اضافه کرده، سپس به اندازه ای آب اضافه نمائید که حجم نهایی 20-25 میکرولیتر شود. هر آزمایشگاهی با توجه به روش و کیفیت استخراج DNA برای دست یافتن به بهترین نتیجه ممکن است مقادیر متفاوتی از آب یا DNA استفاده نماید (البته روش ارائه شده در اکثر موارد مناسب می باشد). در صورتی که محتویات درون تیوب تبخیر می شوند می توانید از یک قطره mineral oil استفاده نمائید (این ماده را می توانید از شرکت زیست فناوری کوثر تهیه فرمائید).

3- برنامه PCR مطابق جدول زیر به دستگاه ترموسایکلر داده شود.

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

نمونه ها را در دستگاه چیده و درب آنها را محکم ببندید (بهتر است از تیوب هایی با درب محکم ضد تبخیر استفاده نمائید).

نکات مهم:

- اگرچه محصول PCR یک شب در دمای اتاق ماندگاری دارد، اما با توجه به فلوروسانت 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 کپیاری الکتروفورز زمان صرف شود، ممکن است کیفیت نتایج کاهش بیاید.
- 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.
- واکنش های فلوروسانت زنجیره ای پلیمر از جمله واکنش های حساس به مقدار بسیار اندکی DNA می باشند. 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 تیوب های حاوی محصول PCR را در مجاورت مواد و محلول های کیت و محلی که مواد را برای واکنش PCR آماده می نمایند، باز ننمائید. چگونگی دفع محصول PCR اضافی بستگی به قوانین خاص آزمایشگاه دارد.

انجام کپیاری الکتروفورز و آنالیز نمونه ها:

کیت **KBC IRFiling** برای استفاده توسط دستگاه ABI ساخته شده است که قدرت تفکیک 5 رنگ را داشته باشد (Five-dye fragment analysis) مانند دستگاه 3130XL, Genetic Analyzer 3130 و دستگاه های 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 می نماید.

دستگاه را با LIZ, PET, NED, VIC, 6FAM کالیبره نموده و پس از آماده سازی نمونه ها آنها را Run نموده و کپیاری الکتروفورز را انجام دهید.

آدرس: خیابان ولیعصر، بالاتر از فاطمی، خیابان مجلسی، مرکز ژنومیکس و بیوتکنولوژی کوثر، پلاک 41

Tel: 02188939150-02188930143-5

Site: www.kawsar.ir

Email: kawsar_biotech@yahoo.com