

RealSure SMA DTekt™ Kit

Cat. No.: KBC-110408

کیت غربالگری ناقلین آتروفی عضلی - عضلانی (SMA) با استفاده از
فناوری Real-Time PCR (روش TaqMan probe)



محصولی از شرکت دانش بنیان زیست فناوری کوثر

فهرست

۴	۱- ویژگی‌های شاخص کیت RealSure SMA DTekt™
۴	۱-۱- حیطه کاربرد
۴	۲-۱- اجزای کیت
۵	۳-۱- آنالیز نتایج
۶	۲- واکنش ریل تایم PCR (Real time PCR)
۶	۱-۲- شرایط حمل و نگهداری
۶	۲-۲- مواد و تجهیزات
۶	۱-۲-۲- شرایط آزمایشگاهی
۷	۲-۲-۲- مواد مورد نیاز برای انجام تست ریل تایم PCR تشخیص ناقلین SMA
۷	۳-۲-۲- دستگاهها و نمونههای سازگار با کیت RealSure SMA DTekt™
۸	۴-۲-۲- مقادیر مورد استفاده در Real Time PCR
۸	۵-۲-۲- پروتکل نحوه استفاده از کیت Realsure SMA DTekt™
۱۰	۳- دستگاه Real Time PCR
۱۰	۱-۳- دستگاه Mic qPCR Cyclor
۱۳	۲-۳- دستگاه Rotor-Gene Q
۱۹	۳-۳- دستگاه StepOne/StepOne Plus
۲۴	۴- تفسیر و آنالیز نتایج
۲۴	۱-۴- نرم افزار و روش آنالیز
۲۴	۲-۴- نحوه استفاده از نرم افزار SMAware
۲۴	۳-۴- راهنمای عمومی برای آنالیز نتایج RealSure SMA DTekt™
۲۶	۵- نتایج تست‌های آنالیتیکی، کلینیکال و پایداری کیت
۲۶	۱-۵- نتایج تست‌های دقت (Precision)
۲۶	۲-۵- نتایج تست‌های حساسیت و اختصاصیت آنالیتیکال
۲۶	۳-۵- نتایج بررسی‌های کلینیکال
۲۷	۴-۵- نتایج تست‌های پایداری Accelerated

۲۷	۵-۵- نتایج تست‌های تولید مجدد.....
۲۷	۵-۷- نتایج تست‌های in-use Stability.....
۲۸	۵-۸- نتایج تست‌های حمل و نقل.....
۲۸	۶- خطایابی.....
۲۹	۷- محدودیت‌ها و سلب مسئولیت.....
۳۰	۸- هشدار ایمنی.....
۳۱	۹- علائم (Symbol).....
۳۲	۱۰- منابع.....

۱- ویژگی‌های شاخص کیت RealSure SMA DTekt™

- کیت تشخیص افراد ناقل بیماری SMA با استفاده از فناوری Real Time PCR (روش TaqMan probe) و بر اساس تعیین تعداد نسخه‌های اگزون ۷ ژن SMN1
- شناسایی افراد ناقل واجد حذف اگزون ۷ ژن SMN1 در بیماری 5qSMA (معادل بیش از ۹۸٪ موارد ایجاد SMA)
- قابل استفاده با DNA استخراج شده از خون و دیگر بافت‌ها
- قابل استفاده در دستگاه‌های Real Time PCR

۱-۱- حیطه کاربرد

- کیت RealSure SMA DTekt™ برای تشخیص ناقلین SMA دارای حذف اگزون ۷ و ۸ ژن SMN1 بر روی نمونه DNA استخراج شده از خون به روش Real Time PCR می‌باشد.
- برای افراد با جهش بیشتر، این کیت میتواند به عنوان یک روش جایگزین MLPA استفاده شود.
- کیت RealSure SMA DTekt™ برای موارد زیر نمی‌تواند مفید باشد:

۱- افرادی که دارای موتاسیون نقطه ای باشند.

۲- افرادی که همزمان دارای دو نسخه از ژن SMN1 بر روی یک کروموزوم و فاقد ژن مزبور در کروموزوم دیگر یا به اصطلاح دارای حذف و اضافه شدگی همزمان یا del/dup باشند.

۳- افراد و یا بیمارانی که علت بیماری مرتبط با ژن SMN1 یا 5q SMA نباشد.

۱-۲- اجزای کیت

کیت RealSure SMA DTekt™ شرکت زیست فناوری کوثر شامل ۷ جز است (جدول ۱) که هیچ کدام از اجزاء کیت قابل جایگزینی با مواد شرکت‌های دیگر نیستند. این کیت در حجم‌های ۲۵، ۵۰ و ۱۰۰ واکنش عرضه می‌گردد. اجزای کیت شامل پروب‌ها، پرایمرها، بافر مخصوص، آنزیم KBC DNA HS-Taq Polymerase با ترکیب خاص و افزودنی‌ها یا Additives می‌باشند.

جدول ۱- اجزای کیت

برچسب تیوب	حجم در کیت ۲۵ واکنش (میکرولیتر)	حجم در کیت ۵۰ واکنش (میکرولیتر)	حجم در کیت ۱۰۰ واکنش (میکرولیتر)
KBC HS Taq DNA Polymerase	15	30	60

PCR Mix	175	350	700
Primer Mix	25	50	100
Control DNA SMA-N (Normal Control DNA-50ng/μL)	5	10	25
Control DNA SMA-C (Carrier Control DNA-50ng/μL)	5	10	25
Control DNA SMA-A (Affected Control DNA-50ng/μL)	5	10	25
KBC H2O	450	900	1400

۱-۳- آنالیز نتایج

نرم افزار SMAWare به عنوان ابزار آنالیز نتایج Real Time PCR به همراه کیت RealSure SMA DTekt™ عرضه می شود. این نرم افزار با آنالیز داده های بیش از هزار نمونه برای تشخیص ژنوتیپ افراد از نظر ژن SMN1 طراحی شده و محیط کاربری ساده ای را در اختیار کاربران قرار می دهد.

۲- واکنش ریل تایم PCR (Real time PCR)

۲-۱- شرایط حمل و نگهداری

- محتوای کیت در ۲۰- درجه‌ی سانتی گراد ذخیره شود.
- به دلیل وجود پروب‌های فلورسنت کیت باید در محل تاریک و دور از نور نگهداری شود. در زمان استفاده ترجیحاً به مدت کوتاهی در بیرون فریزر نگهداری شود.
- از ذوب و انجماد مکرر جلوگیری شود. بهتر است کیت را به مقادیر کمتر تقسیم^۱ و از آن‌ها استفاده کرد.
- بعد از ۱۸ ماه استفاده، نتایج ضعیف‌تر و با کیفیت کمتر دیده می‌شود.
- امکان جابجایی کیت در دمای اتاق وجود دارد. محتوای کیت به مدت نسبتاً طولانی می‌تواند کارکرد خود را بیرون از فریزر حفظ کند اما بهتر است بعد از استفاده کیت در فریزر و در صورت استفاده‌ی مکرر، در یخچال نگهداری شود.

۲-۲- مواد و تجهیزات

۲-۲-۱- شرایط آزمایشگاهی

کیت‌های Real Time که دارای پروب فلورسنت هستند، می‌توانند با مقدار کم DNA تکثیر شوند و حساسیت بسیار بالایی نسبت به آلودگی محیط دارند. به همین دلیل باید از آلوده نبودن محیط کار اطمینان حاصل شود. در صورت وجود احتمال آلودگی فضای آزمایشگاهی به DNA و یا محصول PCR می‌توانید با استفاده از [DNA ZAP](#) از شرکت زیست فناوری کوثر سطوح آزمایشگاهی را از DNA پاک کنید.

میکس پرایمر، میکس PCR و KBC HS Taq DNA polymerase باید در محیط جدا (محیط پیش از PCR) نگهداری شوند. در هر آزمایش باید از کنترل منفی و کنترل‌های موجود در کیت استفاده شود تا احتمال و منبع آلودگی بررسی شود و امکان مشاهده‌ی نتایج کاذب به حداقل برسد. برای اطمینان از صحت عملکرد کیت باید منبع آلودگی را تعیین و اقدامات احتیاطی را انجام دهید.

¹ Aliquot

۲-۲-۲- مواد مورد نیاز برای انجام تست ریل تایم PCR تشخیص ناقلین SMA

جدول ۲ - محتویات کیت

محتویات کیت RealSure SMA DTekt™		
رنگ در تیوب	برچسب تیوب	
	PCR Mix	۱
	Primer Mix	۲
	KBC HS Taq DNA Polymerase	۳
	Control DNA SMA- Normal	۴
	Control DNA SMA- Carrier	۵
	Control DNA SMA- Affected	۶
	KBC H2O	۷

موارد ضروری برای کار با کیت:

- مواد و تجهیزات استخراج DNA: استخراج DNA باید با استفاده از روش مورد تأیید انجام شود. برای ارزیابی عملکرد کیت RealSure SMA DTekt از کیت استخراج رسوبی "GeneDia Blood Extraction Kit" محصول شرکت "ژرفانگاران دنیای تشخیص" استفاده شد که IVD می باشد. همچنین نمونه های DNA استخراج شده از خون به روش های مرسوم مانند Salting out و Proteinase K نیز عملکرد کاملاً مناسبی دارند.
- تجهیزات و مواد مصرفی برای تکثیر DNA (مانند دستگاه Real Time PCR، سَمپلر، سر سَمپلر فیلتردار و ...)

۲-۲-۳- دستگاه ها و نمونه های سازگار با کیت RealSure SMA DTekt™

برای استفاده از این کیت به DNA استخراج شده از خون نیاز است. هرچند نمونه ی با کیفیت از سایر بافت ها نیز می توانند مورد استفاده قرار بگیرند، ولی این کیت برای نمونه های دیگر و یا روش مستقیم فعلاً توصیه نمی شود زیرا استفاده از این نمونه ها نیازمند انجام تعداد زیادی آزمایش است که در حال حاضر در حال انجام هستند.

کیفیت DNA استخراج شده در دقت عملکرد کیت تاثیر زیادی دارد و در نتیجه از بالا بودن کیفیت DNA مورد استفاده باید اطمینان حاصل شود. حداقل مقدار DNA لازم برای کاهش خطای کیت بین ۵۰ تا ۱۰۰ نانوگرم در هر واکنش است.

در حال حاضر این کیت با دستگاه Mic qPCR cyclor شرکت Biomolecular systems، دستگاه Rotor-Gene Q، شرکت Qiagen، و دستگاه های StepOne/StepOne Plus شرکت ThermoFisher Scientific و Roche، شرکت Diagnostics تنظیم شده و قابل استفاده است. برای اطلاعات بیشتر در این مورد با [پشتیبانی علمی](#) شرکت تماس بگیرید.

۴-۲-۲- مقادیر مورد استفاده در Real Time PCR

جدول ۳- مواد مورد استفاده در واکنش Real Time PCR

جزء	مقدار در ۱ واکنش (بر حسب میکرولیتر)
PCR Mix	۷
Primer Mix	۱
KBC HS Taq DNA Polymerase	۰/۵
DNA	*۱
KBC H2O	** ۱۰/۵
حجم کل	۲۰

* حجم ورودی نمونه را طوری تنظیم کنید که بین ۵۰ تا ۱۰۰ نانوگرم DNA الگو برای هر واکنش استفاده شود.

** به مقداری آب به واکنش اضافه کنید که حجم نهایی به ۲۰ میکرولیتر برسد.

۵-۲-۲- پروتکل نحوه استفاده از کیت Realsure SMA DTekt™

۱. مواد را در دمای اتاق قرار داده و اجازه دهید به طور **کامل ذوب شوند** (اطمینان حاصل کنید که تمامی مواد به خوبی ذوب شده‌اند).

۲. طبق **جدول ۳** یک مستر میکس شامل Primer Mix, PCR Mix, KBC HS Taq DNA Polymerase و آب برای واکنش خود آماده کنید. آماده‌سازی را می‌توان در دمای اتاق انجام داد.

۳. به آرامی مستر میکس را ورتکس و اسپین کنید.

۴. برای هر نمونه‌ای که می‌خواهید آنالیز کنید، مقدار ۱۹ میکرولیتر از مستر میکس را به هر تیوب مناسب با دستگاه Real Time PCR مورد استفاده خود منتقل کنید.

۵. مقدار ۵۰ تا ۱۰۰ نانوگرم DNA را به تیوب PCR اضافه کنید تا حجم آن به ۲۰ میکرولیتر برسد.

۶. تیوب‌ها را در دستگاه Real Time PCR قرار دهید.

۷. برنامه‌ی زمانی Real Time PCR را با استفاده از پارامترهای جدول ۴ وارد کنید.

۸. واکنش را آغاز کنید.

۹. پس از اتمام برنامه، آنالیز اطلاعات را بر اساس بخش **تفسیر نتایج** انجام دهید.

توجه: آنالیز نتایج و تکثیر به طور همزمان صورت می‌گیرد و نیازی به نگهداری محصول نیست.

جدول ۴ - برنامه‌ی Real Time PCR

Initial Step	95°C	20 min	30 Cycles
Denaturation	95°C	10 sec	
Annealing	59°C	20 sec	
Extension	72°C	20 sec	

نکته:

- از نمونه Control DNA SMA-N به عنوان کنترل سالم، Control DNA SMA-C به عنوان نمونه ناقل و Control DNA SMA-A به عنوان نمونه بیمار در هر ران دستگاه استفاده شود. همچنین برای اطمینان از نبود آلودگی در مسترمیکس در یک تیوب به جای DNA از ۱ میکرولیتر آب استریل به عنوان کنترل منفی (Non Template Control) استفاده کنید.

نکته‌ی بسیار مهم:

تیوب‌های حاوی محصولات PCR هرگز نباید در محیطی که کیت ست می‌شود (پیش از PCR)، یا نزدیک اجزا کیت باز شوند.

۳- دستگاه Real Time PCR

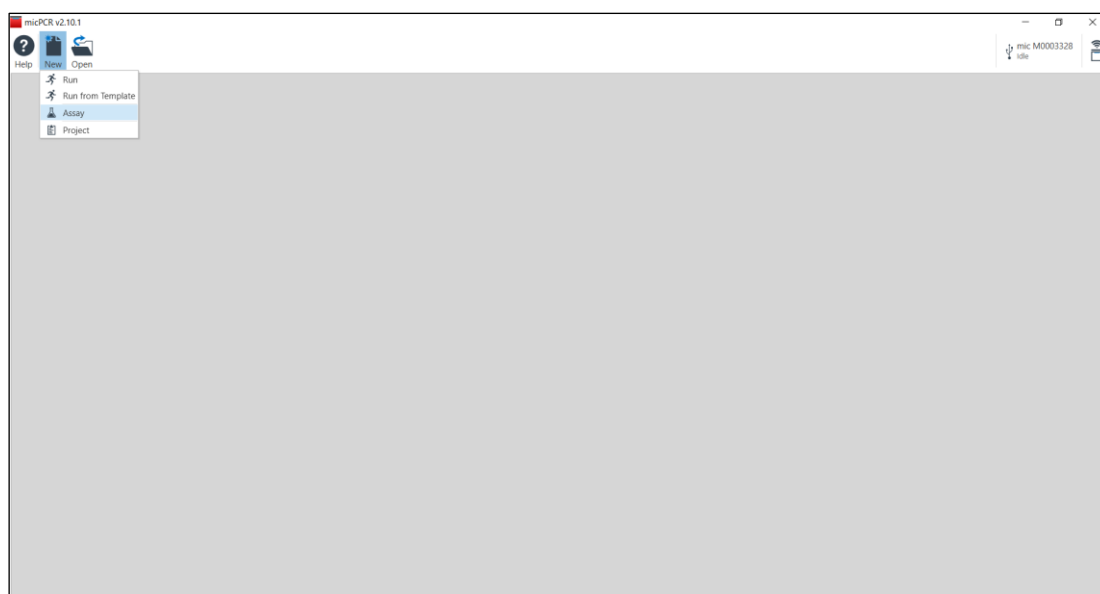
این کیت با دستگاه [Mic qPCR cyclor](#) شرکت BioMolecular systems، دستگاه [Rotor-Gene Q](#) شرکت Qiagen، و دستگاه‌های [StepOne/StepOne Plus](#) شرکت ThermoFisher Scientific و Roche Diagnostics ست آپ شده و قابل استفاده است و در حال بررسی با سایر برندها می‌باشد. با تکمیل شدن بررسی‌های سایر دستگاه‌ها، اطلاعات مربوط به آن‌ها نیز اضافه خواهد شد.

۳-۱- دستگاه Mic qPCR Cyclor

همان طور که در [دفترچه راهنمای این دستگاه](#) ذکر شده، برای استفاده از MIC qPCR Cyclor نیاز به کالیبراسیون نوری وجود ندارد.

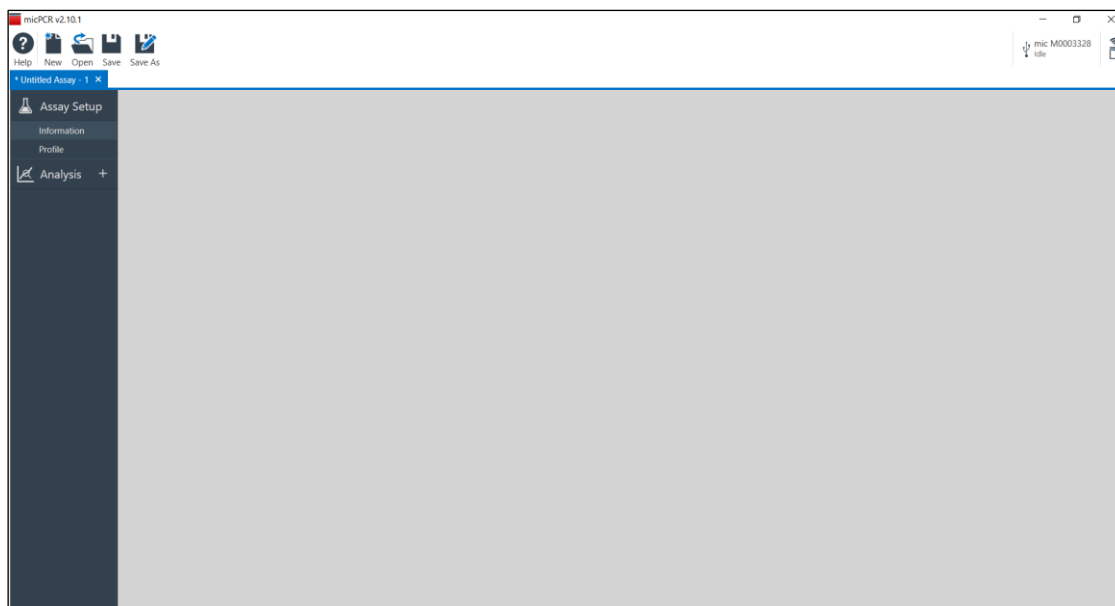
۳-۱-۱- تعریف و ایجاد Assay

برای انجام دادن تست تشخیص ناقلین SMA با استفاده از کیت شرکت زیست فناوری کوثر در دستگاه Mic qPCR Cyclor ابتدا لازم است یک Assay تعریف کرده و اطلاعات مربوط به تست را در آن ذخیره کنید. برای این کار از بخش مشخص شده در تصویر ۱ گزینه‌ی New و سپس Assay را انتخاب کنید.



تصویر ۱ - تعریف یک assay جدید در نرم افزار micPCR

صفحه‌ای مطابق تصویر ۲ نمایش داده می‌شود که در آن بخش‌های information و run profile وجود دارد.

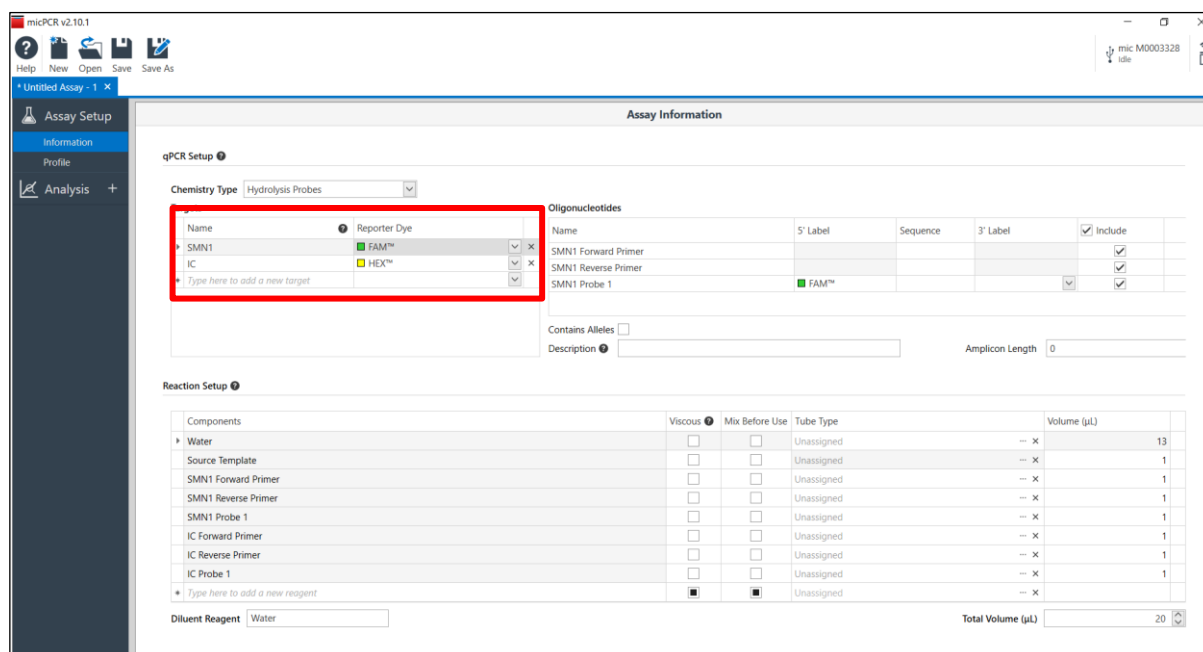


تصویر ۲ - صفحه assay جدید

در بخش information که در تصویر ۳ دیده می‌شود، نوع شیمی واکنش (که برای این کیت hydrolysis probe است) انتخاب می‌شود. علاوه بر این در بخش مشخص شده با کادر قرمز اسم ژن هدف و رنگ پروب مربوط به آن مطابق جدول زیر وارد می‌شود.

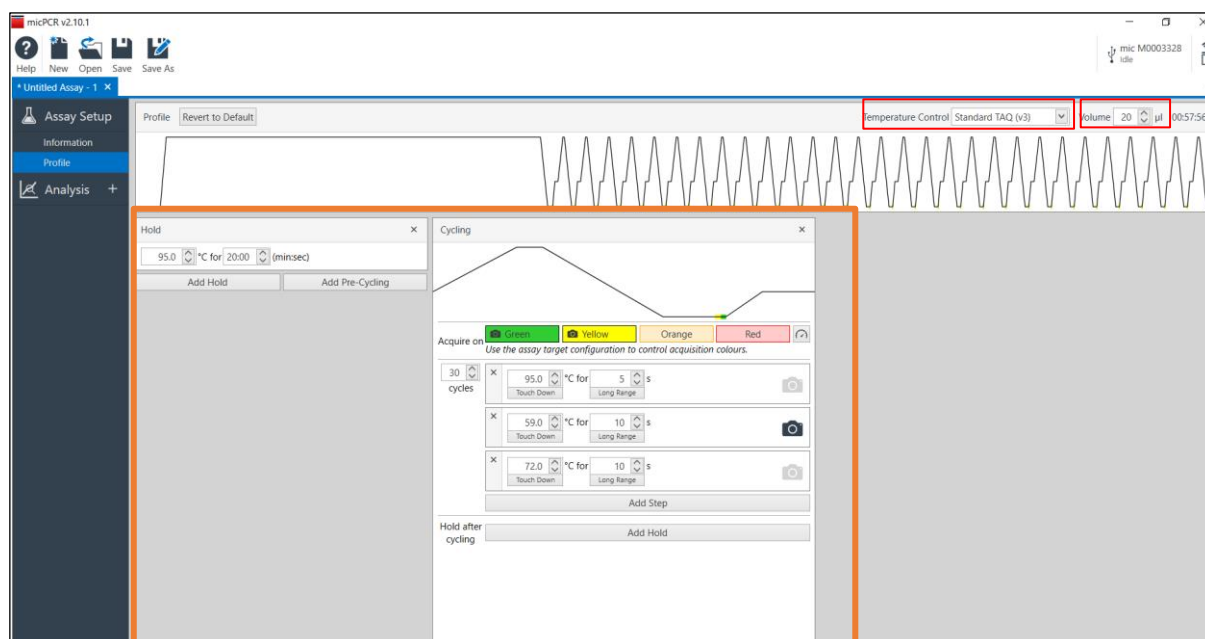
جدول ۵- رنگ پروب ژن‌های هدف در کیت RealSure SMA Dtekt™

Target Gene	Reporter Dye
SMA	FAM™
Internal Control Gene	HEX™



تصویر ۳ - انتخاب نوع شیمی واکنش، نام گذاری ژن هدف و مشخص کردن رنگ پروب

در بخش Run Profile برنامه‌ی دمایی را مطابق آنچه در بخش **۲-۲-۵** آمده وارد کنید. علاوه بر این حجم واکنش ۲۰ میکرولیتر و کنترل دمایی Standard TAQ باید انتخاب شود. همچنین خوانش (آیکون دوربین) باید بر روی قسمت Annealing انتخاب شود. در تصویر ۴، Run Profile مربوط به این کیت آورده شده است.

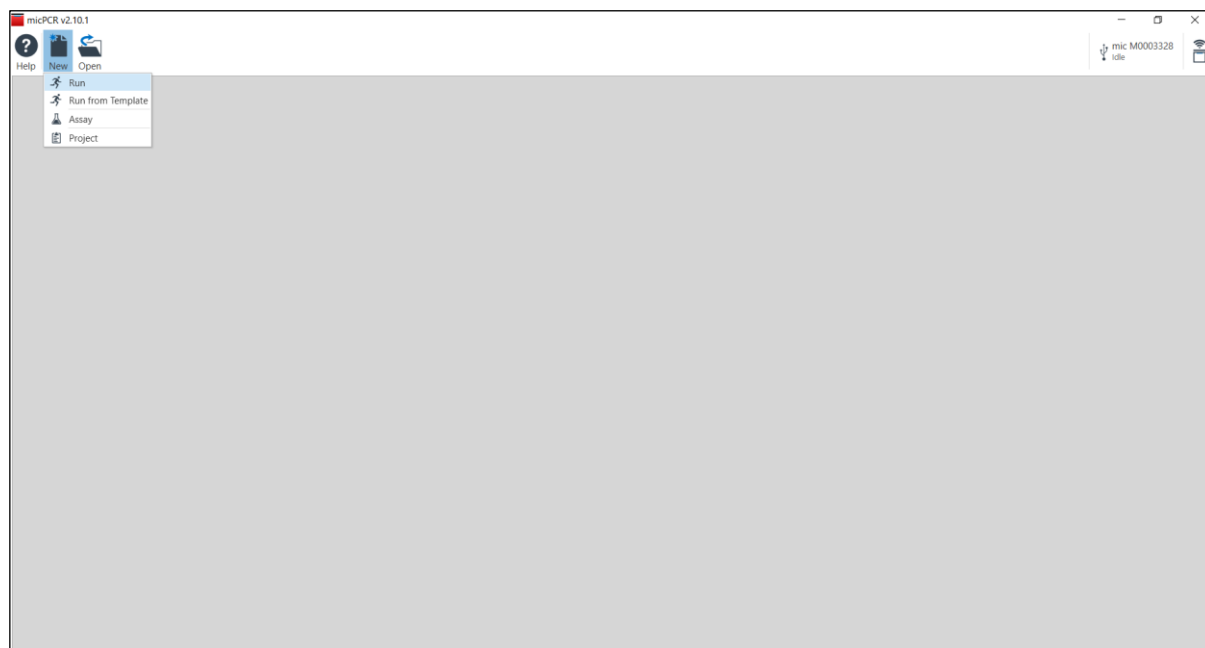


تصویر ۴ - بخش run profile برای تنظیم برنامه دمایی واکنش، حجم واکنش و کنترل دمایی

در نهایت Assay ایجاد شده را ذخیره کنید.

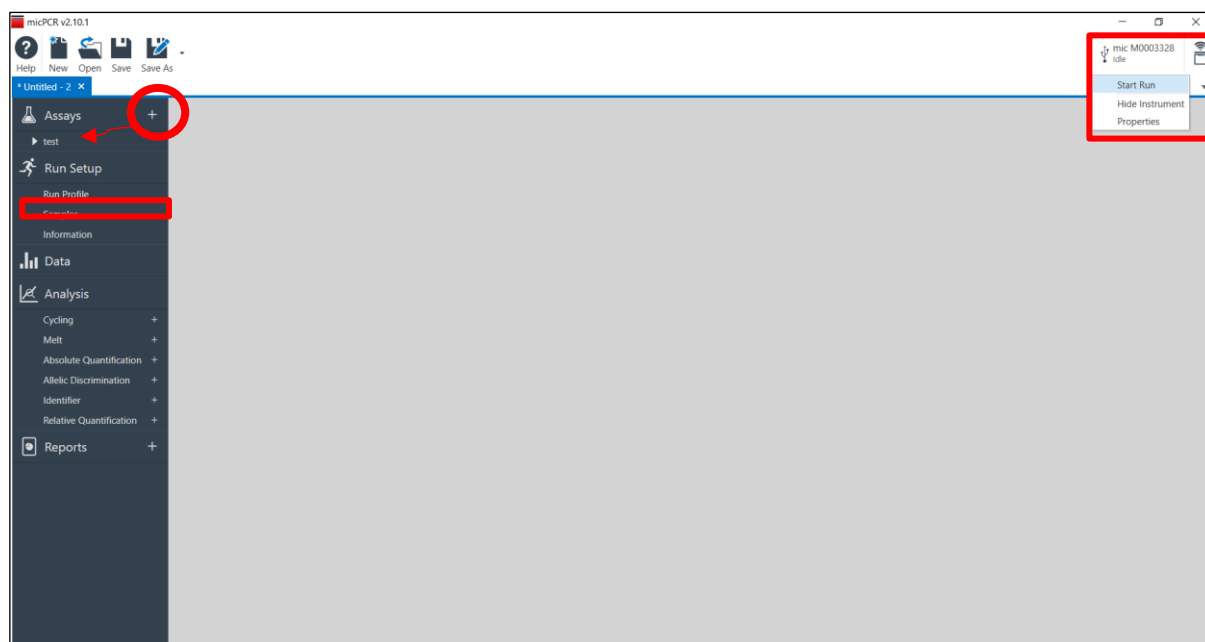
۳-۱-۲ - ایجاد یک Run جدید

از بخش مشخص شده در تصویر ۵ گزینه‌ی New و سپس Run را انتخاب کنید.



تصویر ۵ - انتخاب گزینه Run

با کلیک بر روی علامت + در کنار Assay، نام Assay مورد نظر را که در مرحله‌ی قبل ایجاد کردید انتخاب کنید.



تصویر ۶- انتخاب assay ذخیره شده

حال نام نمونه‌ها را در بخش samples وارد کنید.

در نهایت با کلیک بر روی گزینه‌ی نشان داده شده در تصویر ۶، انتخاب گزینه‌ی Start Run، ذخیره کردن فایل Run در پوشه‌ی مورد نظر و کلیک بر روی گزینه‌ی Start، ران تست را آغاز کنید.

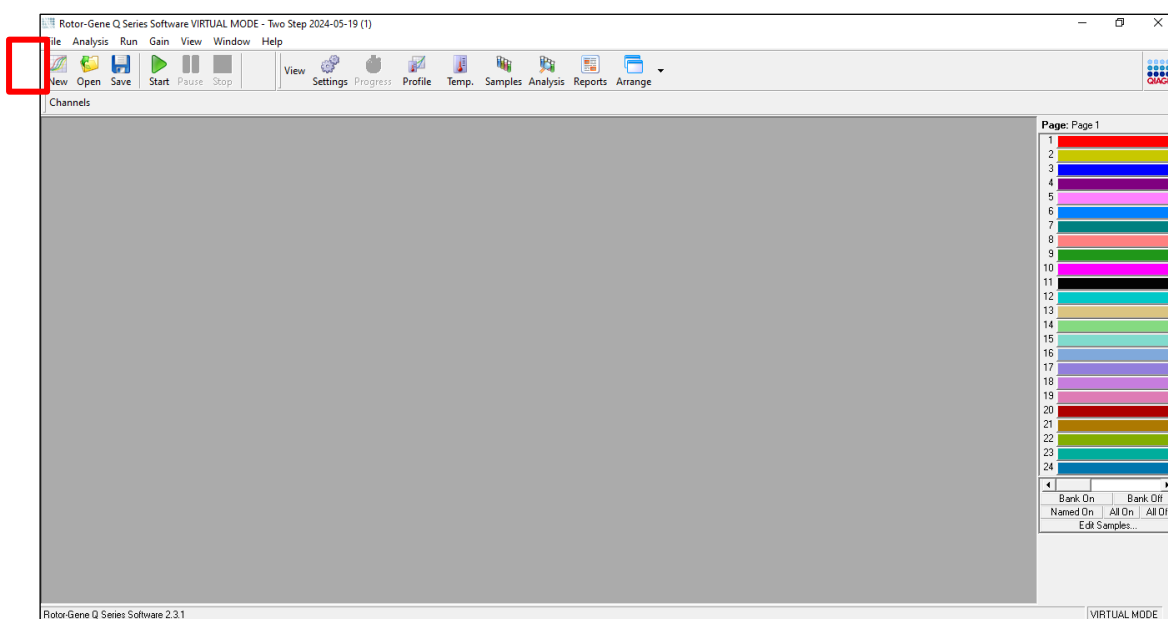
نکته: به ترتیب چینش نمونه‌ها در دستگاه توجه کنید. آنالیز نمونه‌ها توسط دستگاه بر اساس شماره‌گذاری نوشته شده در محل چاهک‌ها انجام می‌پذیرد.

۲-۳- دستگاه Rotor-Gene Q

۱-۲-۳- تعریف و ایجاد Assay

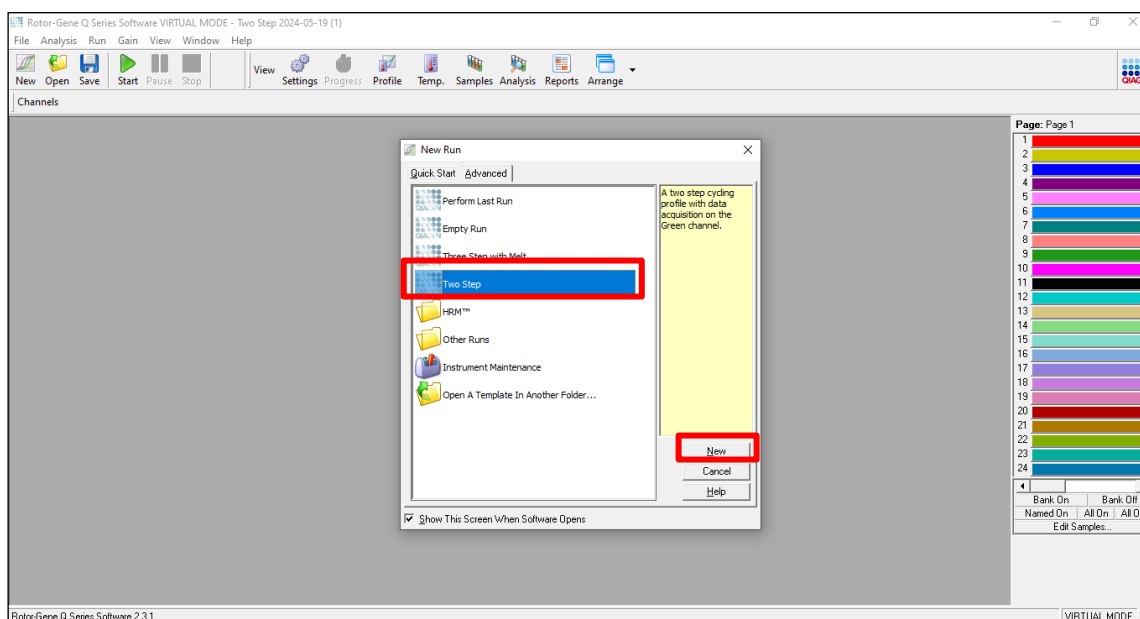
برای انجام دادن تست تشخیص ناقلین SMA با استفاده از کیت شرکت زیست فناوری کوثر در دستگاه Rotor-Gene Q به صورت زیر عمل کنید:

مطابق تصویر ۷ بر روی New کلیک کنید.



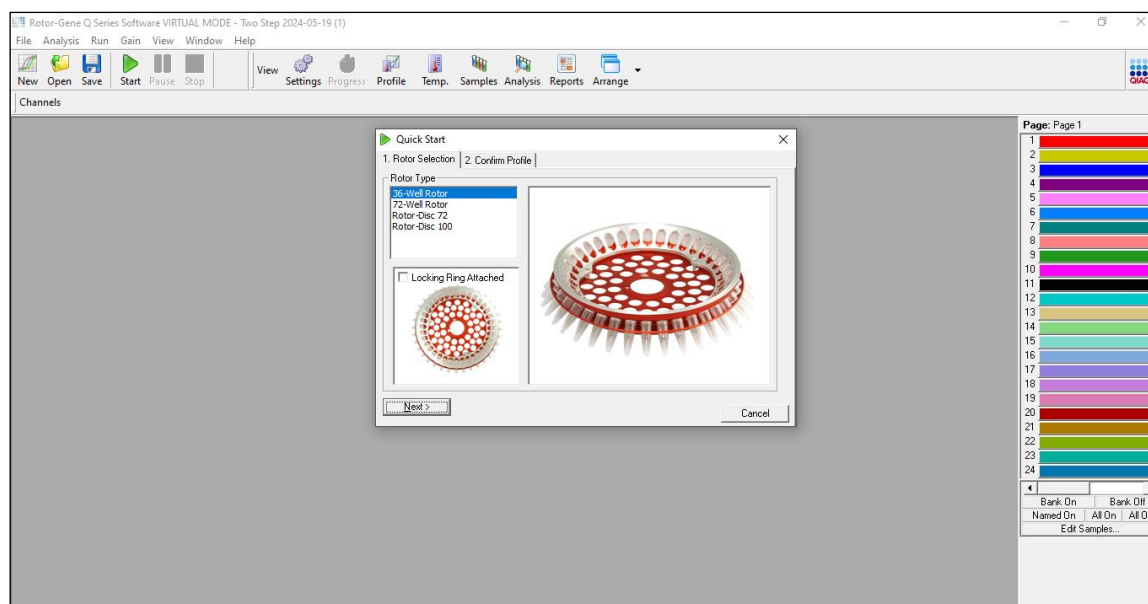
تصویر ۷ - انتخاب گزینه New در نرم افزار Rotor Gene Q Series Software

پس از کلیک بر روی New صفحه‌ای مطابق با تصویر ۸ نمایش داده خواهد شد. گزینه‌ی Two Step را انتخاب کرده و سپس بر روی New (مطابق با تصویر ۸) کلیک کنید.



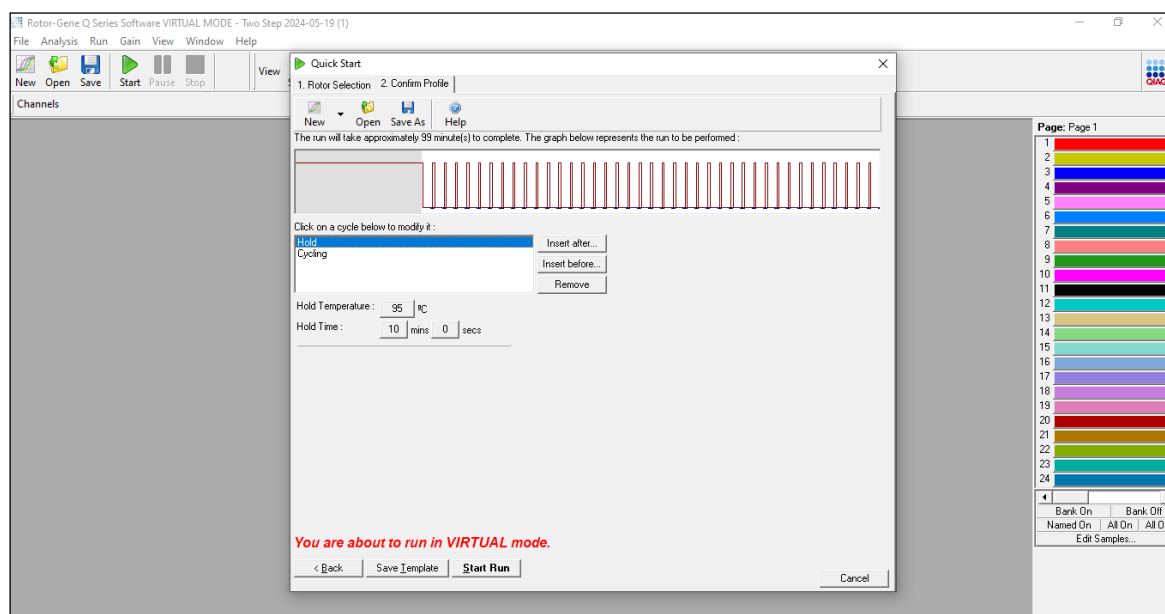
تصویر ۸ = انتخاب گزینه Two Step و سپس New در پنجره باز شده

در مرحله‌ی بعد نوع Rotor خود را با توجه به روتوری که در اختیار دارید تعیین کرده و Next را بزنید. (تصویر ۹)



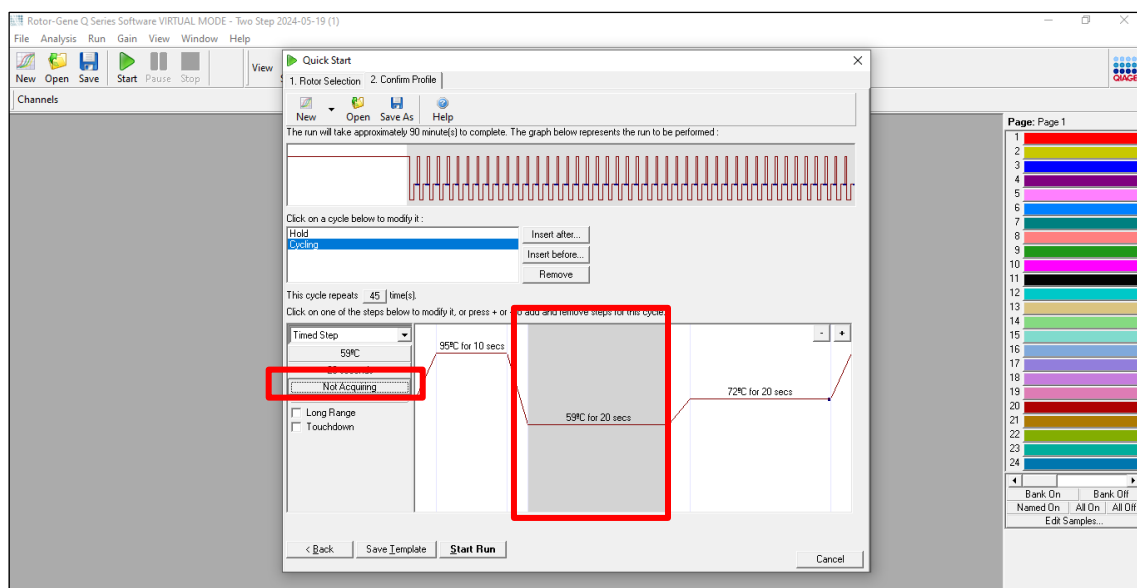
تصویر ۹ - انتخاب نوع Rotor

در این مرحله از شما خواسته می‌شود که برنامه واکنش PCR خود را تعریف کنید. این کار را مطابق با جدول ۴ انجام دهید. برای این کار ابتدا دما و زمان Hold را وارد نموده، سپس برنامه‌ی سه مرحله‌ای را مطابق با برنامه‌ی جدول ۴ وارد قسمت Cycling نمایید. (تصویر ۱۰)

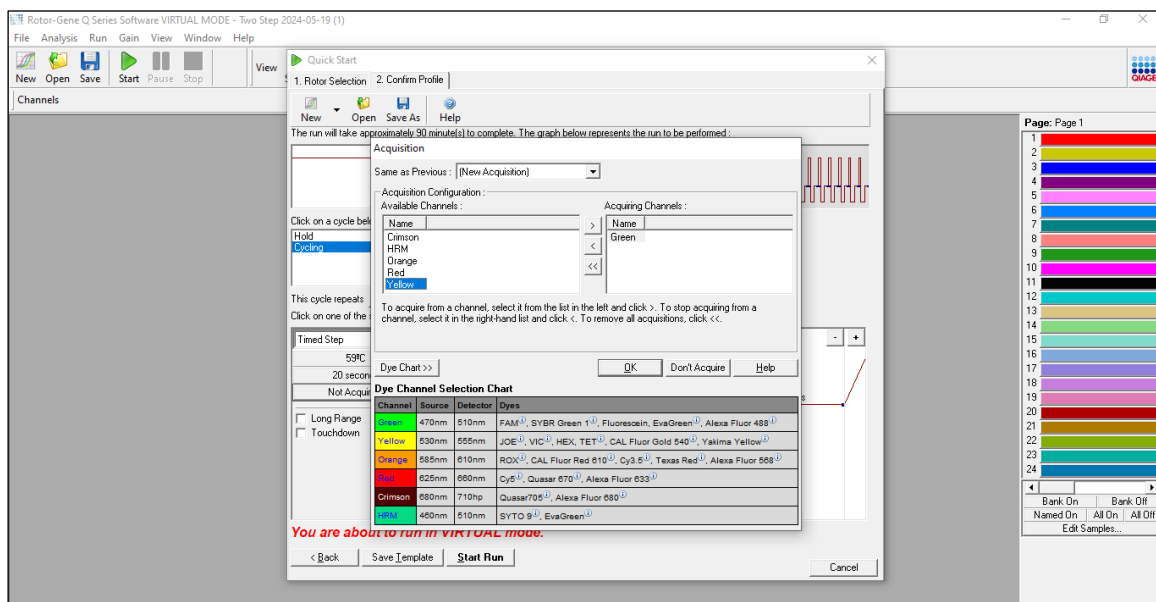


تصویر ۱۰ - تعریف برنامه واکنش، وارد کردن دما و زمان Hold

در زمان تنظیم Cycling حتما خوانش را در مرحله‌ی Annealing و در کانال‌های FAM و HEX تنظیم کنید. برای این کار در قسمت Cycling بخش مربوط به Annealing را انتخاب نموده، (تصویر ۱۱) سپس روی Not Acquiring کلیک کنید تا صفحه‌ای مطابق با تصویر ۱۲ نمایش داده شود. در این صفحه روی کانال‌های Green و Yellow دوبار کلیک کنید تا از قسمت Available channels به قسمت Acquiring channels وارد شده و سپس ok را بزنید.



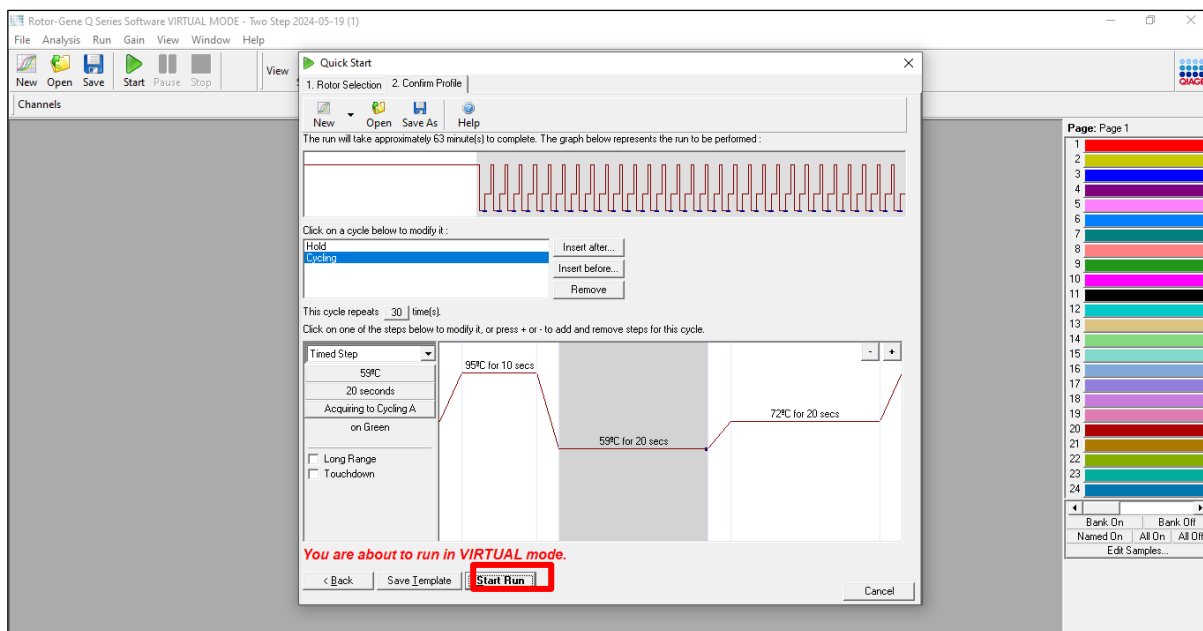
تصویر ۱۱- انتخاب بخش Annealing و سپس گزینہ Not Acquiring در قسمت Cycling



تصویر ۱۲- تنظیم نهایی در کانال FAM و HEX

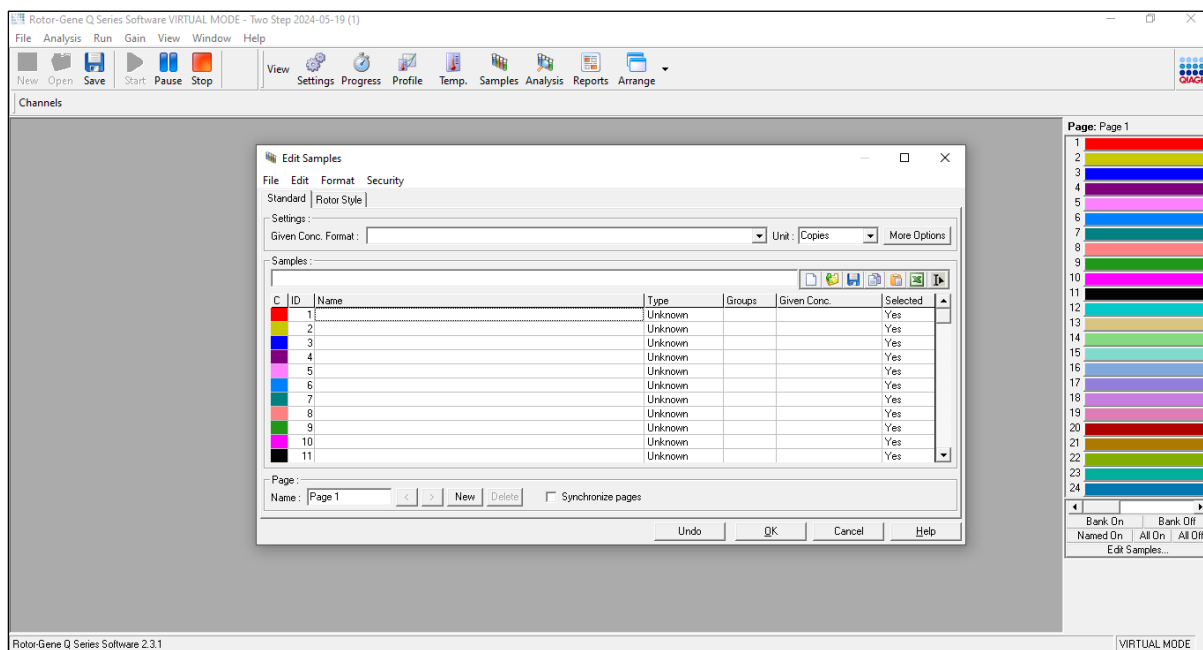
نکته‌ی مهم: حتما دقت کنید تا خوانش در هیچ مرحله‌ی دیگری تنظیم نشده باشد.

سپس Start Run را انتخاب کرده و محل ذخیره‌ی نتایج را برای نرم‌افزار مشخص کنید.



تصویر ۱۳ - انتخاب گزینه Start Run

سپس صفحه‌ی زیر برای شما نمایش خواهد شد که در آن می‌توانید نام، نوع، و رقت نمونه‌های خود را تعیین کنید.



تصویر ۱۴ - پنجره‌ی باز شده برای انتخاب نام، نوع و رقت نمونه‌ها

نکته‌ی مهم در مورد کار با دستگاه نرم‌افزار Rotor-Gene Q:

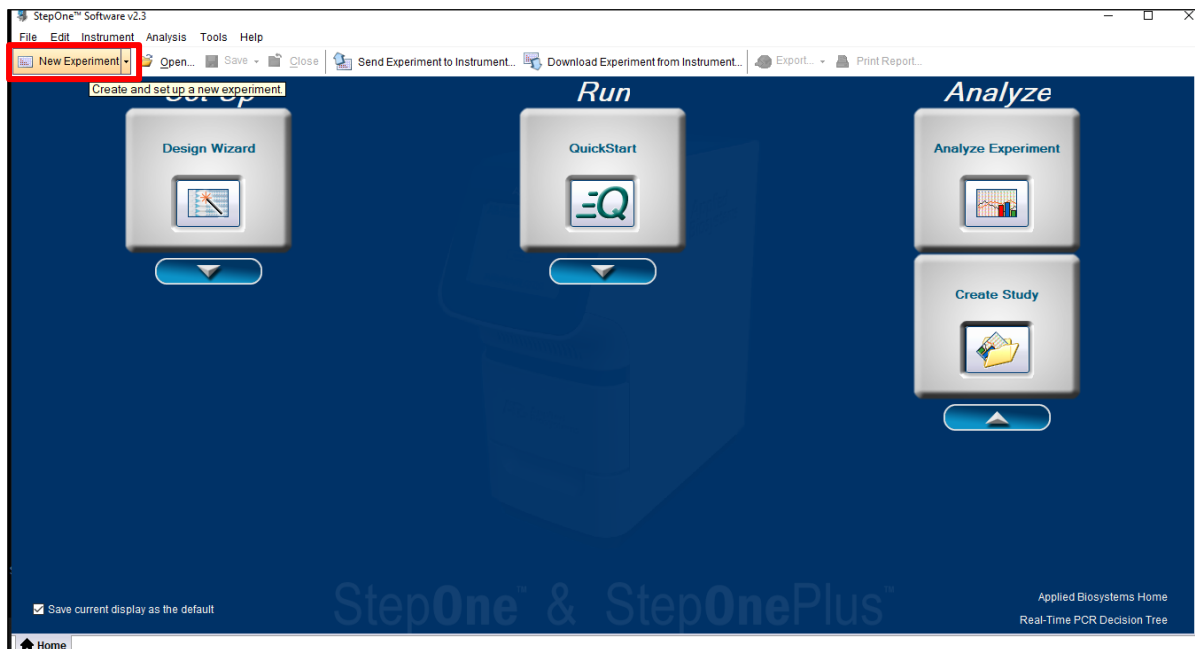
این دستگاه برای محاسبه‌ی صحیح Threshold به سریال رقت‌های استاندارد نیاز دارد. تیوب‌های حاوی نمونه‌ها با رقت‌های استاندارد به همراه کیت و بنا بر درخواست کاربران دستگاه Rotor-Gene Q در اختیار آن‌ها قرار خواهد گرفت. برای اطلاع از چگونگی تنظیم دستگاه و نحوه‌ی کار با نمونه‌های استاندارد لطفاً با [پشتیبانی علمی](#) شرکت زیست فناوری کوثر تماس بگیرید. همچنین در صورتی که قصد استفاده از این کیت در دستگاه Rotor-Gene Q را دارید در زمان ثبت سفارش این موضوع را مطرح فرمایید تا نمونه‌های استاندارد در کنار کیت برای شما ارسال شود.

Email: Technicalsupport@kawsarbiotech.com

۳-۳-دستگاه StepOne/StepOne Plus

۳-۳-۱- تعریف و ایجاد Assay

ابتدا بر روی New Experiment کلیک کنید تا صفحه‌ی Design your experiment باز شود. (تصویر ۱۵)



تصویر ۱۵ – صفحه‌ی کاربری نرم افزار دستگاه StepOne/StepOne Plus

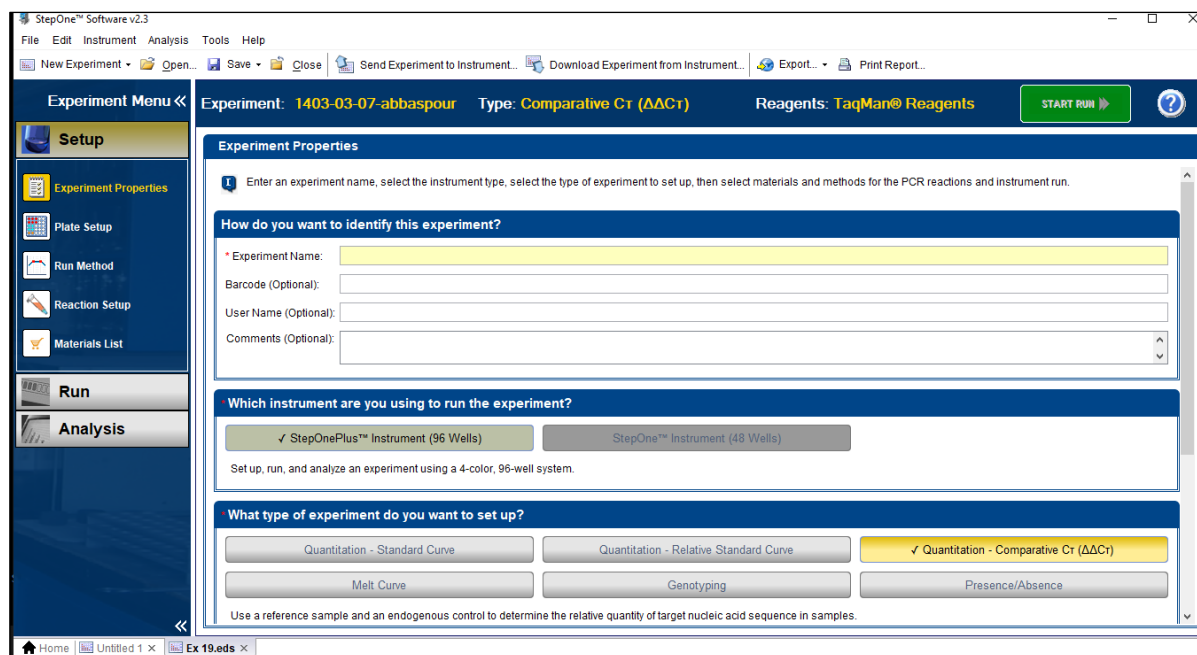
سپس در صفحه‌ی Experiment Properties (تصویر ۱۶) تنظیمات را به صورت زیر تعیین کنید:

در قسمت Experiment Name، نام آزمایش خود را وارد نمایید. در قسمت Which instrument are you using

to run the experiment نوع دستگاه خود را بر اساس دستگاهی که دارید انتخاب کنید.

در قسمت What type of experiment do you want to design گزینه‌ی Quantitation- Comparative

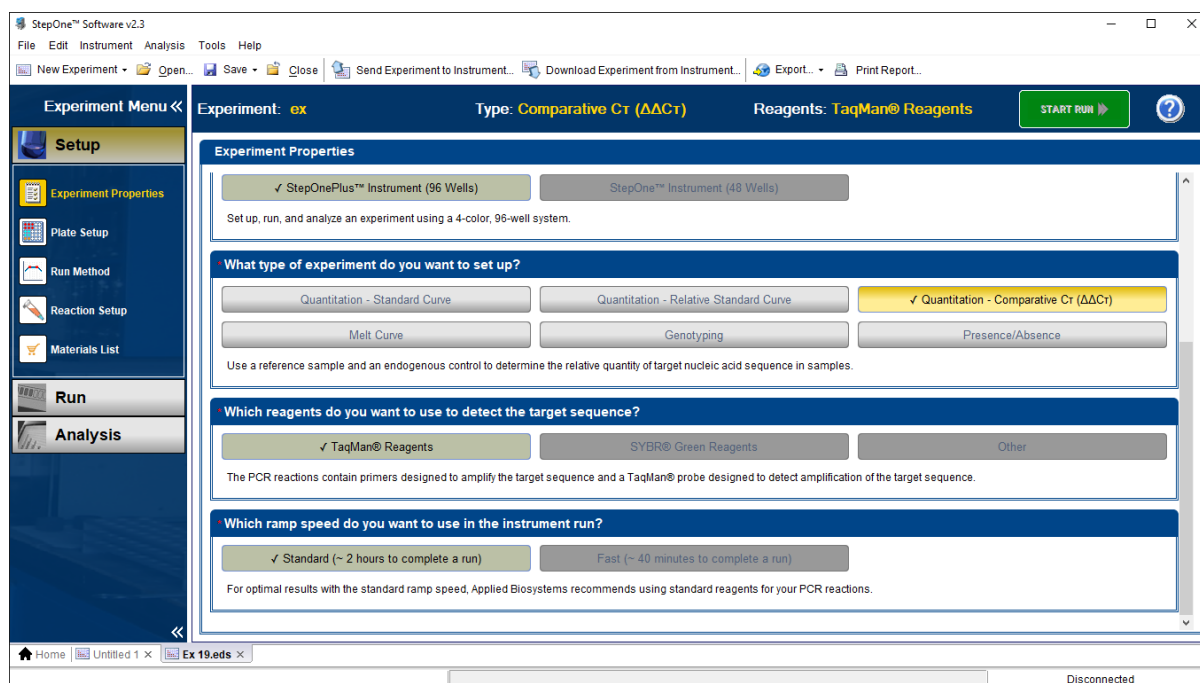
Ct را انتخاب کنید.



تصویر ۱۶ - صفحه‌ی Experiment Properties نرم افزار دستگاه StepOne/StepOne Plus

در قسمت Which reagents do you want to use to detect the target sequence, گزینه TaqMan Reagents را انتخاب کنید. (تصویر ۱۷)

در قسمت Which ramp speed do you want to include in the instrument run, گزینه standard را انتخاب کنید. (تصویر ۱۷)



تصویر ۱۷ - ادامه‌ی صفحه‌ی Experiment Properties نرم افزار دستگاه StepOne/StepOne Plus

در قسمت Plate Setup

در صفحه Define Targets and Samples نیاز است دو مورد تعریف شود (تصویر ۱۸):

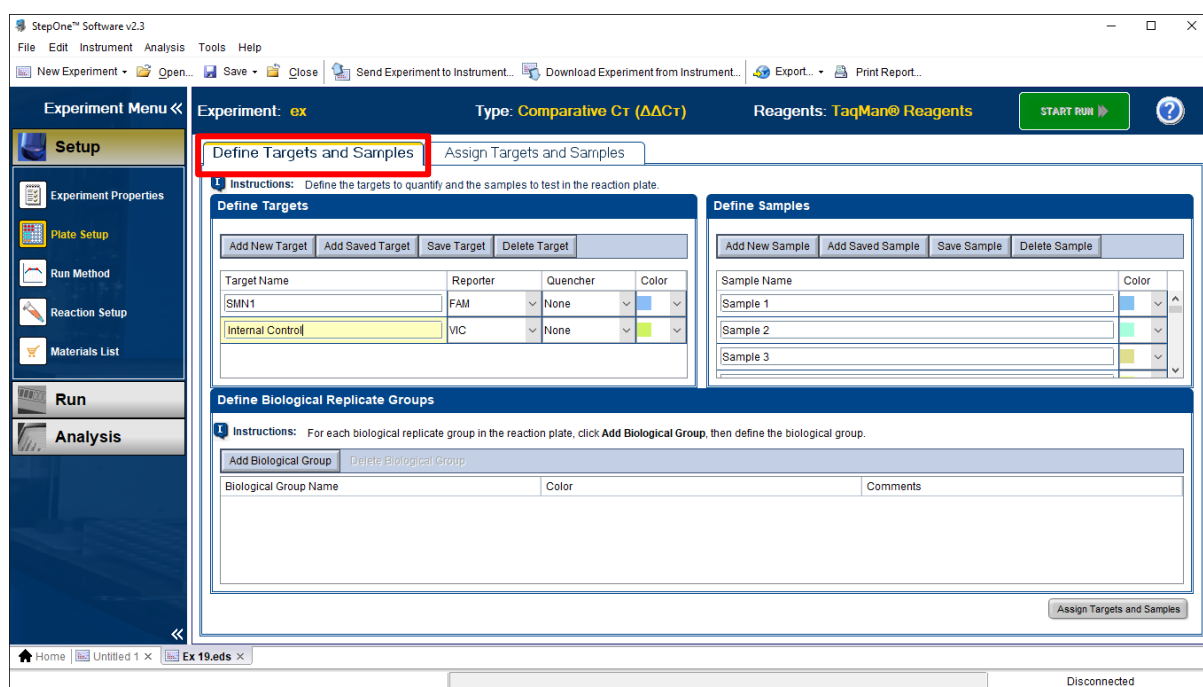
۱. Internal Control:

Reporter را بر روی FAM و Quencher بر روی None تنظیم نمایید.

۲. SMN:

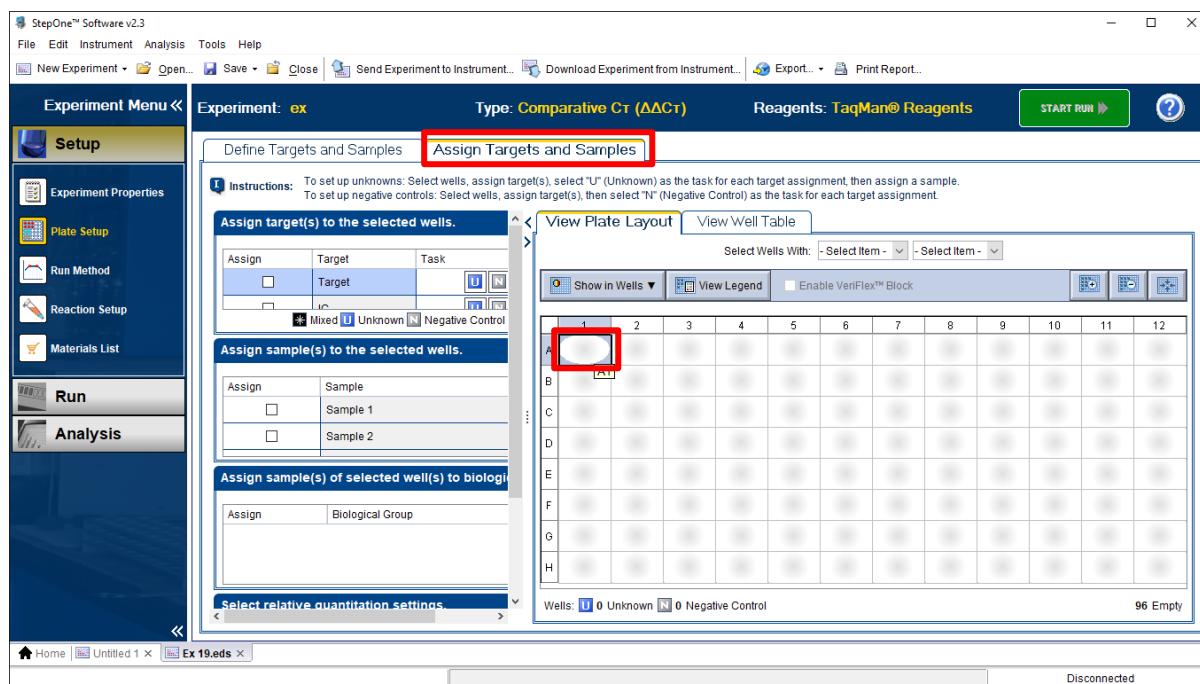
Reporter را بر روی VIC و Quencher بر روی None تنظیم نمایید.

و در قسمت Define Samples نام نمونه‌های خود را تعریف نمایید.



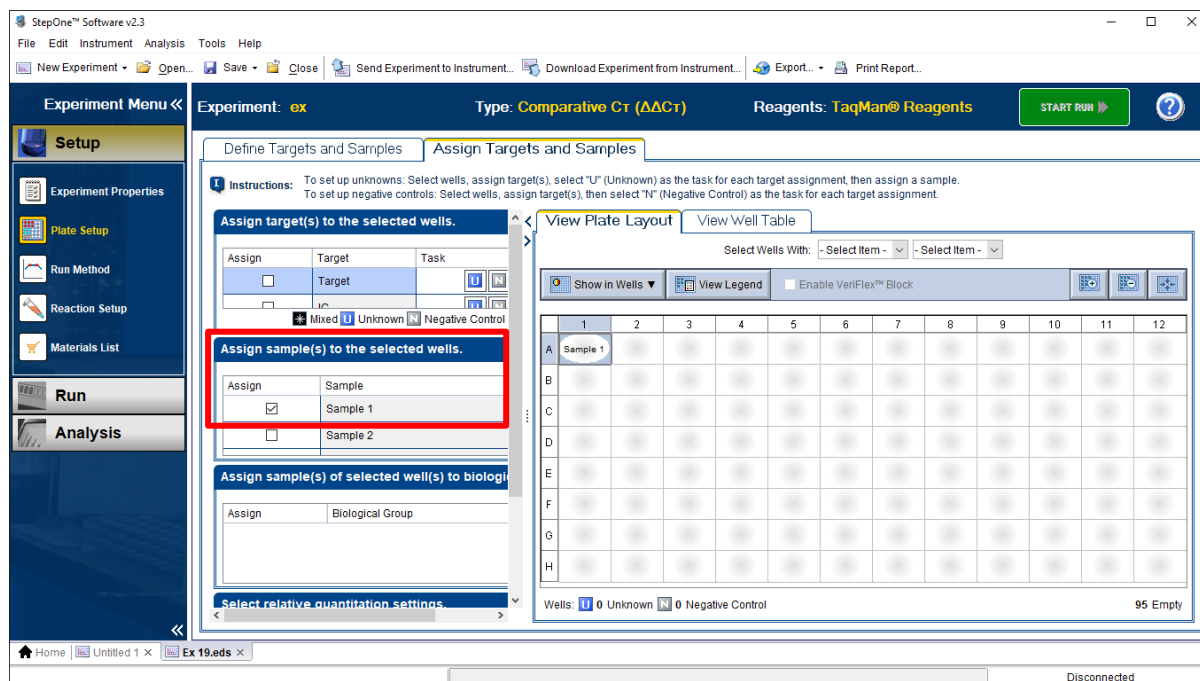
تصویر ۱۸ - قسمت Plate Setup صفحه Define Targets and Samples

در صفحه‌ی Assign Targets and Samples (تصویر ۱۹) در قسمت View Plate Layout چاهک مورد نظر خود را با کلیک کردن بر روی آن انتخاب نموده:



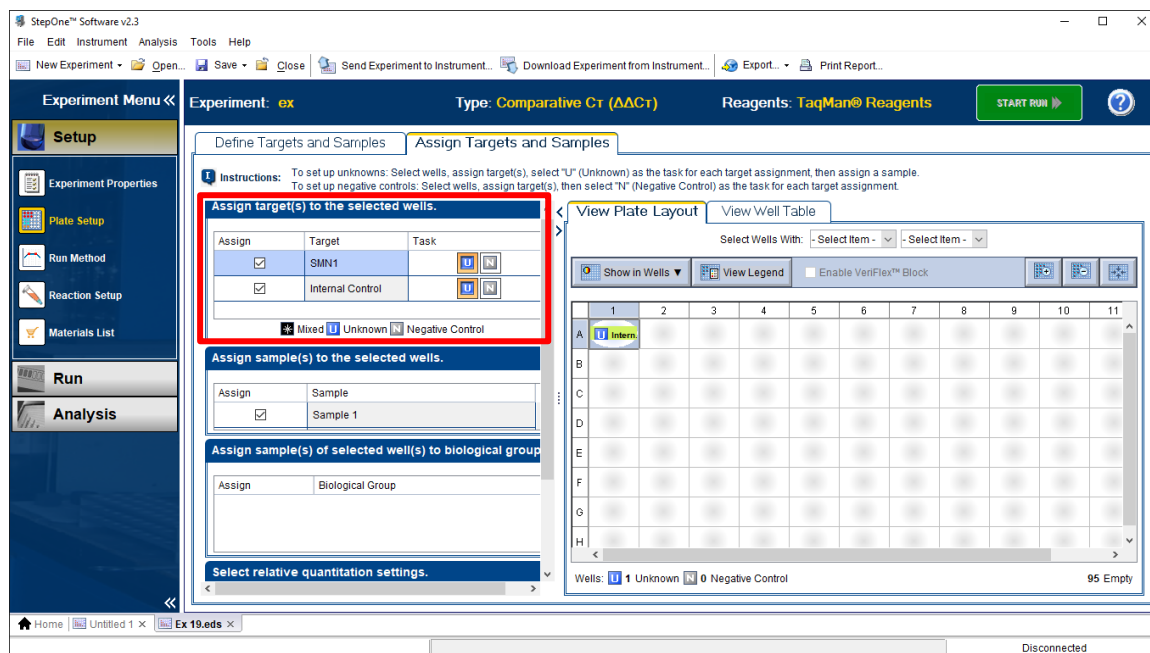
تصویر ۱۹ - قسمت Plate Setup صفحه‌ی Assign Targets and Samples

و سپس در قسمت Assign sample(s) to the selected wells با کلیک بر روی نمونه‌ی مورد نظر، آن را به چاهک انتخاب شده اختصاص دهید. مثلاً در تصویر ۲۰، Sample 1 به چاهک A1 اختصاص داده شده است:



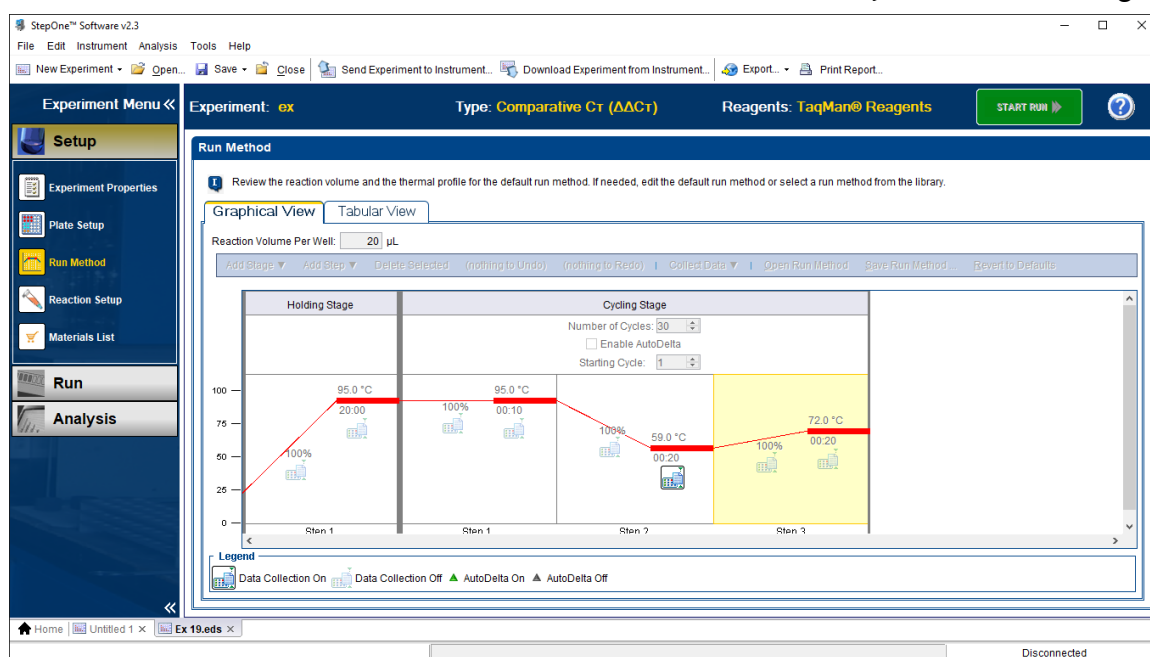
تصویر ۲۰ - مثالی از اختصاص دادن یک نمونه به یک چاهک.

سپس در قسمت Assign Target(s) to the selected wells، بر روی SMN1 و Internal Control کلیک نمایید تا دستگاه را برای خوانش این دو Target در آن چاهک تنظیم کنید. (تصویر ۲۱)



تصویر ۲۱ - مثالی از اختصاص دادن تارگت‌ها به یک چاهک.

این فرآیند را برای تک تک نمونه‌های خود تکرار نموده، سپس رنگ رفرنس را روی None تنظیم کنید. در قسمت Run Method از شما خواسته می‌شود که برنامه واکنش PCR خود را تعریف کنید. این کار را مطابق با جدول ۴ انجام دهید. دقت کنید که Data Collection باید فقط روی مرحله‌ی Annealing تنظیم شود. همچنین Reaction volume per well را روی ۲۰ میکرولیتر تنظیم نمایید. و سپس روی آیکون Start Run کلیک کنید تا واکنش PCR آغاز گردد. (تصویر ۲۲)



تصویر ۲۲ - قسمت Run Method.

۴ - تفسیر و آنالیز نتایج

۴-۱- نرم افزار و روش آنالیز

برای آنالیز نتایج کیت RealSure SMA DTekt™ نیازی به انجام مراحل Post Amplification نیست. آنالیز نتایج بسیار سریع و آسان بوده و بعد از به دست آمدن C_t هر کانال قابل انجام است.

در کنار کیت RealSure SMA DTekt™ نرم افزار SMAWare نیز در اختیار کاربر قرار می گیرد. SMAWare یک راهکار نرم افزاری نوآورانه برای غربالگری دقیق ناقلین SMA است که با آنالیز داده های حاصل از کیت RealSure SMA DTekt™ امکان تحلیل دقیق و کمی حذف های اگزون ۷ ژن SMN1 را فراهم می کند. این نرم افزار نتایج را سریع تر، با هزینه کمتر و به صورت مطمئن تر، بدون نیاز به تجهیزات گران قیمت، ارائه می دهد. SMAWare نه تنها ناقلین را شناسایی می کند، بلکه بین افراد سالم، ناقل و مبتلا تفاوت قائل می شود.

۴-۲- نحوه استفاده از نرم افزار SMAWare

برای استفاده از نرم افزار [راهنمای کاربری نرم افزار](#) موجود در [صفحه ی مستندات محصول](#) در سایت شرکت زیست فناوری کوثر را مطالعه نمایید.

استفاده از نرم افزار بسیار آسان است و فقط باید اطلاعات دریافتی از نرم افزار را در اکسل استاندارد نتایج وارد کرده و در نرم افزار باز کنید. برای دریافت اکسل استاندارد نتایج به [صفحه ی مستندات محصول](#) در سایت شرکت زیست فناوری کوثر مراجعه نمایید.

توجه نمایید که ضروری است که اطلاعات مربوط به نمونه های کنترل سالم، ناقل و مبتلا را در نرم افزار وارد نموده تا به مرحله ی باز کردن اکسل استاندارد نتایج برسید. در غیر این صورت امکان ادامه ی آنالیز وجود ندارد.

نکته ی مهم: استفاده از نرم افزار بدون متصل بودن قفل فیزیکی به کامپیوتر ممکن نیست. قبل از شروع کار با نرم افزار از متصل بودن قفل فیزیکی آن به پورت USB اطمینان حاصل کنید. برای تهیه ی قفل نرم افزار با بخش فروش یا پشتیبانی علمی شرکت زیست فناوری کوثر تماس بگیرید یا از راه ایمیل زیر با ما در تماس باشید.

Email: Technicalsupport@kawsarbiotech.com

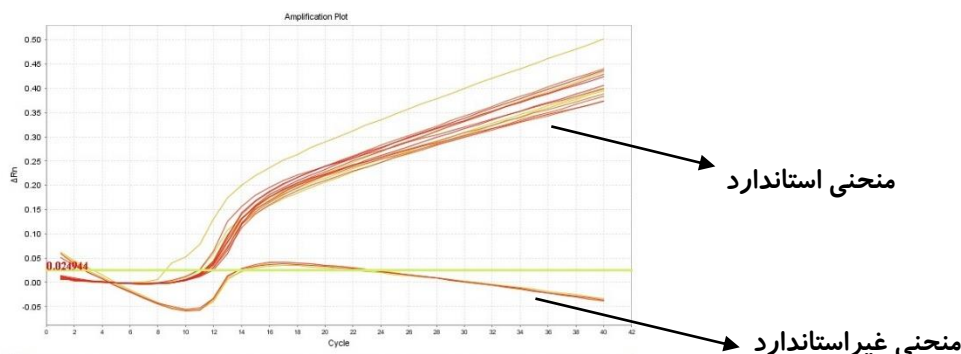
۴-۳- راهنمای عمومی برای آنالیز نتایج RealSure SMA DTekt™

برای آموزش جزئیات نحوه ی کار با نرم افزار دستگاه Real Time PCR به دستورالعمل آن دستگاه مراجعه کنید.

۴-۳-۱- معیارهای تفسیر

علاوه بر نرم افزار SMAware که تعداد نسخ ژن SMN1 را بر اساس C_t تعیین می کند، معیارهای دیگری نیز وجود دارند که کیفیت و صحت واکنش ریل تایم PCR را نشان می دهند. این معیارها عبارتند از:

۱- شکل منحنی های تکثیر: درستی شکل سیگموئیدی نمودار اهمیت زیادی در صحت C_t اعلام شده توسط دستگاه دارد. در تصویر ۲۳ نمونه ای از منحنی استاندارد و غیراستاندارد نمایش داده شده است. C_t حاصل از منحنی غیراستاندارد قابل اعتماد نیست و نیاز به تکرار آزمایش وجود دارد.



تصویر ۲۳- نمونه ای از شکل منحنی استاندارد و غیراستاندارد

۲- مقادیر Baseline و Threshold: توصیه می شود که این مقادیر به صورت دستی تنظیم **نشوند** و از گزینه ی Auto set threshold (که به صورت پیش فرض انتخاب شده) استفاده شود.

۳- بررسی مقادیر Efficiency و R^2 محاسبه شده توسط نرم افزار MIC برای هر نمونه: Efficiency حدود ۰/۸ یا بالاتر و R^2 بالاتر از ۰/۹۸ مقادیر مناسبی برای هر واکنش هستند.

۴- در صورت استفاده از نمونه های استاندارد و رسم منحنی استاندارد نیز موارد زیر در بررسی کیفیت آزمایش انجام شده کمک کننده هستند:

- شیب نمودار و Efficiency تکثیر
- R^2 نمودار
- داده های پرت
- عرض از مبدا نمودار

۵- نتایج تست‌های آنالیتیکی، کلینیکال و پایداری کیت

۵-۱- نتایج تست‌های دقت (Precision)

این بخش شامل قابلیت تکرارپذیری و تولید مجدد بوده و نشان‌دهنده‌ی میزان تطابق نتایج تست یک نمونه در دفعات مختلف و با تغییر عواملی همچون کاربر تست، دستگاه، Lot کیت و روز انجام است.

برای بررسی تکرارپذیری نتایج کیت شرکت زیست فناوری کوثر، ۶ غلظت مختلف (در محدوده‌ی LOD کیت) از ۶ نمونه شامل دو نمونه‌ی نرمال، دو نمونه‌ی ناقل و دو نمونه بیمار با دو Lot متفاوت و در ۵ روز تست شدند. این بررسی مشابه بودن C_t های هر ژن و هر نمونه را در تکرارهای مختلف نشان داد. با توجه به منابع موجود، انحراف معیار کمتر از ۵/۰ و ضریب تغییرات (CV) به‌عنوان شاخصی از تکرارپذیری بین لات نامبرهای مختلف و با مقدار کمتر از ۵ درصد نشان‌دهنده عملکرد پایدار و قابل اعتماد کیت است.

۵-۲- نتایج تست‌های حساسیت و اختصاصیت آنالیتیکال

۵-۲-۱- حساسیت آنالیتیکال

حساسیت آنالیتیکال نشان‌دهنده‌ی حداقل مقدار DNA الگو است که در درجه‌ی اول کیت قابلیت تکثیر و تشخیص (Limit Of Detection) آن را داشته و در درجه‌ی دوم به درستی میزان (Limit Of Quantification) آن را تشخیص بدهد.

نتایج این آزمایش نشان داد که این کیت قابلیت تشخیص وجود و تکثیر ژن SMN1 را با حداقل غلظت ۶ نانوگرم برای نمونه سالم، ۲۵ نانوگرم برای ناقل و ۶ نانوگرم برای نمونه بیمار دارد. با این حال بهینه ترین غلظت DNA مقدار ۵۰ نانوگرم است که توصیه می‌شود تست های کیت RealSure SMA DTekt™ با این مقدار انجام گیرد.

۵-۲-۱- اختصاصیت آنالیتیکال

اختصاصیت آنالیتیکال به این معناست که کیت تنها ژن هدف را تکثیر کرده و نواحی ژنومی دیگر تاثیری در نتیجه‌ی تشخیصی آن نمی‌گذارند.

با توجه به وجود ژن SMN2 که همولوگ ژن SMN1 بوده، تنها ۵ نوکلئوتید با آن تفاوت دارد و تعداد نسخ آن تاثیری در بیماری‌زایی ندارد، اختصاصیت آنالیتیکال در این کیت از اهمیت بسیاری برخوردار است. به همین دلیل تعداد زیادی نمونه‌ی بیمار (فاقد ژن SMN1) که دارای نسخه‌های متعدد SMN2 بودند با استفاده از این کیت بررسی شدند. به دست نیامدن C_t در کانال SMN1 در این نمونه‌ها گویای آن است که کیت به طور اختصاصی ژن SMN1 را تکثیر کرده و تعداد نسخ SMN2 در نتیجه‌ی تشخیصی آن تاثیری نداشته است.

۵-۳- نتایج بررسی‌های کلینیکال

برای انجام این تست از ۱۸۴ نمونه سالم و ۱۱۵ نمونه ناقل استفاده شد که دو مرتبه با دو کیت RealSure SMA DTekt با شماره لات متفاوت انجام شد. (۲۹۹ نمونه دو مرتبه با دو لات نامبر مختلف بررسی شد). همچنین ۱۰۰

نمونه بیمار دو مرتبه با دو کیت به شماره لات متفاوت نیز آزمایش شد. نتایج این تست نشان داد حساسیت و اختصاصیت کلینیکال کیت به ترتیب برابر ۹۹.۵۷ درصد و ۹۸.۹۱ درصد است.

۴-۵- نتایج تست‌های پایداری Accelerated

تست‌های پایداری تسریع شده (Accelerated) در دماهای ۳۷، ۲۲ و ۴ درجه‌ی سانتی‌گراد نشان داده‌اند که این کیت تا ۱۸ ماه پس از تولید قابلیت تشخیص و صحت عملکرد خود را حفظ می‌کند. پس از این مدت روند رو به افول عملکرد کیت آغاز می‌شود. بنابراین توصیه می‌شود که علاوه بر نگهداری کیت در دمای ۲۰- درجه‌ی سانتی‌گراد، تا قبل از تاریخ انقضای کیت از آن استفاده نمایید.

توصیه:

بهتر است جهت جلوگیری از احتمال بروز آلودگی در استفاده متعدد از کیت، آن را در حجم‌های کمتر الیکوت کرده و در هر بار استفاده یکی از آن‌ها را مصرف کنید. بدین ترتیب علاوه بر کاهش احتمال آلودگی، پایداری و عملکرد محصول نیز کمتر تحت تاثیر یخ زدن و یخ زدایی قرار می‌گیرد.

۵-۵- نتایج تست‌های تولید مجدد

قابلیت تولید مجدد، تغییرات احتمالی نتایج را در شرایط مختلف همچون روز انجام تست، محل، run، سری ساخت، کاربر و ابزار و تحت عنوان Between-run (inter-batch) نشان می‌دهد. جهت بررسی قابلیت تولید مجدد و تایید عملکرد کیت، ۲ شماره ساخت مختلف با ۶ نمونه ثابت (۲ نمونه سالم، ۲ نمونه بیمار و ۲ نمونه ناقل) و در ۵ روز مختلف توسط دو کاربر با کیت RealSure SMA DTekt™ تست گردید. نتایج تست نشان می‌دهد قابلیت تشخیصی کیت با وجود تغییر شرایط حفظ شده است.

۷-۵- نتایج تست‌های in-use Stability

تست in use بررسی می‌کند که کیت تا چه زمانی بعد از اولین باز شدن بسته بندی و یا استفاده، می‌تواند در شرایط توصیه‌شده نگهداری شود بدون اینکه عملکرد یا کیفیت آن دچار افت شود. این تست در دمای ۲۰ درجه سانتی‌گراد زیر صفر و با شرایط فریز-دفریز صورت پذیرفته است. جهت بررسی پایداری in use محصول، و تایید عملکرد کیت، ۱ شماره ساخت با چهار نمونه ثابت (۲ نمونه سالم و ۲ نمونه ناقل) آزمایش شد به این صورت که محصول هر روز به مدت ده دقیقه در دمای محیط قرار گرفته و سپس دوباره در فریزر قرار داده می‌شد.

نتایج گویای آن است که کیت RealSure SMA DTekt تا ۵۰ بار فریز دفریز (Freeze-thaw) شدن عملکرد خود را حفظ خواهد کرد اما با توجه به اینکه بیشترین حجم تولیدی کیت ۱۰۰ واکنش است و برای انجام تست با این محصول حداقل ۵ واکنش (نمونه کنترل نرمال، بیمار و ناقل کیت به همراه یک کنترل منفی و حداقل یک نمونه مورد بررسی) در هر بار استفاده مورد نیاز است، در بیشترین حالت ۲۰ دفعه می‌توان از این کیت استفاده کرد که در این زمان و با ۲۰ دفعه فریز و دفریز شدن محصول، عملکرد آن تغییری نخواهد کرد و خطا در تشخیص مشاهده نمی‌شود.

۵-۸- نتایج تست‌های حمل و نقل

با توجه به نتایج حاصل از تست‌های تسریع شده دمای ۳۷°C که از دمای تعیین شده ۲۰°C- برای کیت بالاتر می‌باشد، می‌توان نتیجه گرفت که کیت RealSure SMA DTekt در صورت حمل محصول در دماهای بالاتر از دمای نگهداری محصول حتی دمای محیط، نیز قابلیت عملکرد مطلوب خود را به مدت طولانی حفظ می‌نماید. با این حال توصیه به حفظ زنجیره سرد برای ارسال به مشتری می‌شود.

۶- خطایابی

در صورت نیاز به راهنمایی یا هرگونه مشکلات فنی و تکنیکی با پشتیبانی علمی شرکت زیست‌فناوری کوثر تماس بگیرید.

Email: technicalsupport@kawsarbiotech.com

مشکل دیده شده	دلیل و راه حل احتمالی
هیچ تکثیری انجام نشود	کمبود DNA الگو: اطمینان حاصل کنید که غلظت DNA در واکنش در محدوده بهینه‌ای است که توسط پروتکل کیت توصیه شده است. در صورت لزوم، DNA تازه را استخراج کرده و مقدار آن را با دقت اندازه‌گیری کنید.
	کالیبر نبودن دستگاه و مشکلات فنی دستگاه نیز می‌تواند باعث ایجاد خطا شود و با وجود به انجام رسیدن واکنش دستگاه خوانش انجام ندهد، مطمئن شوید دستگاه به صورت دوره‌ای چکاپ شده باشد.
	مطمئن شوید میکروتیوب پرایمر میکس در اثر خطا آلوده نشده باشد و مدت طولانی در اثر برخورد نور نباشد بهتر است از میکروتیوب اصلی، استوک‌های با حجم کمتر در میکروتیوب‌های مانع نور تهیه فرمایید تا در اثر خطا همه پرایمر میکس آلوده نشود.
وجود سیگنال پس زمینه زیاد	آلودگی بافرها و مواد مصرفی PCR: از بافر و مواد تازه استفاده کنید و مطمئن شوید که آلودگی وجود ندارد. توصیه می‌شود مستر میکس در یک محیط تمیز (Pre-PCR) تهیه شود.
	آلودگی DNA الگو: DNA را رقیق کنید تا غلظت قطعات DNA غیر انتخابی در واکنش کاهش یابد. غلظت DNA الگو را بهینه کنید تا بهترین تکثیر و کمترین سیگنال پس زمینه حاصل شود.
	آلوده بودن دستگاه: ممکن است در اثر نشت از میکروتیوب در تست‌های قبل دستگاه به DNA آلوده شده باشد و باعث شود سیگنال اضافی در برخی چاهک‌ها دیده شود.

تکثیر ناقص یا منحنی تکثیر مسطح ^۲	بهینه نبودن شرایط واکنش: هر آزمایشگاه نیاز است کیت را مطابق دستگاه خود بهینه سازی کند و دما و شرایط واکنش را بر اساس تنظیم نماید.
---	---

۷ – محدودیت‌ها و سلب مسئولیت

هر نتیجه‌ای که از کیت RealSure SMA DTekt™ یا هر کیت تشخیصی دیگری به دست می‌آید، باید توسط فرد متخصص تفسیر شود. شرکت زیست فناوری کوثر هیچگونه مسئولیتی را در قبال استفاده نادرست و تفسیر نادرستی که توسط هر آزمایشگاهی انجام می‌شود، بر عهده نخواهد گرفت. نتایج به دست آمده از کیت RealSure SMA DTekt™ یا هر کیت تشخیصی دیگر باید تنها برای نشان دادن وضعیت کلینیکی کلی استفاده شود، بنابراین شرکت زیست فناوری کوثر نمی‌تواند مسئول هر تصمیم بالینی باشد که توسط آزمایشگاه کاربر یا مشتری گرفته شود.

کیت RealSure SMA DTekt™ تنها به منظور تشخیص ناقلین بیماری آتروفا عضلانی عصبی طراحی شده است.

لطفاً توجه داشته باشید که کیت RealSure SMA DTekt™ برای استفاده تحقیقاتی طراحی شده است و کاربر تمام مسئولیت استفاده آن در بررسی بالینی را بر عهده دارد. توصیه می‌شود هنگام استفاده از هر گونه کیت PCR از جمله کیت RealSure SMA DTekt™ راهنمایی‌های بهترین عملکرد را مطالعه کنید.

² Plateau

۸- هشدار ایمنی

- کیت RealSure SMA DTekt™ باید توسط شخص حرفه‌ای و واجد شرایط استفاده شود.
- تکنسین آزمایشگاه یا فردی که فرایند استخراج DNA، Run کردن نمونه بر روی ژل، آماده‌سازی نمونه برای خوانش در دستگاه ریل تایم PCR و غیره را فراهم می‌نماید، باید قبل از شروع کار برای جلوگیری از اثرات زیان‌بار مواد شیمیایی، دستورالعمل هر یک از موارد ذکر شده را مطالعه نماید.
- تمام اجزاء کیت را همان گونه که در راهنمای کاربر (MSDS) شرح داده شده ذخیره کنید.
- محل کار قبل و بعد از فرایند PCR باید جدا باشد.
- تماس با مواد شیمیایی را کم کنید. برای جلوگیری از بروز آلودگی، از روپوش آزمایشگاه، عینک ایمنی و دستکش یکبار مصرف مخصوص استفاده نمایید.
- برای جلوگیری از بروز آلودگی، میز کار و کلیه وسایل را با آب ژاول ۱۰٪ و الکل ۷۰٪ تمیز نمایید.
- قوانین مربوط به ذخیره سازی، نگهداری و دفع مواد شیمیایی را رعایت فرمایید.
- قوانین جاری کشوری در خصوص تشخیص قبل از تولد و نیز کار در آزمایشگاه را رعایت کنید.
- راهنمای ایمنی زیستی در محیط آزمایشگاه را رعایت کنید. چنین دوره‌هایی در انستیتو پاستور ایران برگزار می‌شود.
- برای اطلاعات بیشتر می‌توانید به سایت زیر مراجعه نمایید:

https://www.dartmouth.edu/~ehs/chemical/lab_calendar_2006.pdf

۹- علائم (Symbol)

علائم	توضیحات
	نام و آدرس تولید کننده
	صرفاً تحقیقاتی
	تعداد تست موجود
	شماره سری تولید
	حد بالا و پایین دمای نگهداری
	شماره کاتالوگ تولید کننده
	تاریخ تولید
	تاریخ انقضاء
	کد DNA کنترل
	دستورالعمل استفاده
	برگه اطلاعات
	بارکد محصول

١٠ - منابع

1. Artika, I. M., Dewi, Y. P., Nainggolan, I. M., Siregar, J. E., & Antonjaya, U. (2022). Real Time Polymerase Chain Reaction: Current Techniques, Applications, and Role in COVID-19 Diagnosis. *Genes*, 13(12), 2387. <https://doi.org/10.3390/genes13122387>.
2. Bio Molecular Systems. (2015). Mic Instrument User Manual. Retrieved from [chromeextension://efaidnbmnnnibpcajpcglclefindmkaj/<https://www.sopachem.com/lifesciences/wp-content/uploads/2016/02/Mic-User-Manual-version-1.2.pdf>]
3. Rotor-Gene Q real-time PCR cyciler; <https://www.qiagen.com/us/products/discovery-and-translational-research/epigenetics/dna-methylation/methylation-specific-pcr/rotor-gene-q?catno=9001640>
4. StepOne/StepOne Plus Real-Time PCR Systems; https://www.thermofisher.com/de/de/home/life-science/pcr/real-time-pcr/real-time-pcr-instruments/step-one-real-time-pcr-systems.html?gclid=Cj0KCQjw7Py4BhCbARIsAMMx-KFJlxzJuAzYKSIIgZxaor5CX_s9x6GmETssEY1VNkeGHFsc6TfQ_gaAu3DEALw_wcB&ef_id=Cj0KCQjw7Py4BhCbARIsAMMx-KFJlxzJuAzYKSIIgZxaor5CX_s9x6GmETssEY1VNkeGHFsc6TfQ_gaAu3DEALw_wcB:G:s&s_kwcid=AL!3652!3!606132911642!p!!g!!step%20one%20qpcr!17574808769!139287691618&cid=gsd_pcr_sbu_r03_co_cp1491_pjt9629_gsd00000_Ose_gaw_rs_lgn_&gad_source=1