



Instruction for Use

Fetal Sex Determination PCR kit

با روش

Real-Time PCR

Cat-No: BONFSD -M1-24



Doc. #: IFU-FSD-00 Doc. Version: 03 Revision Date: 1403-11-17

Version 03

فهرست مطالب

۲	شماره رفرانس
۳	اصول
۳	مقدمه
۵	نگهداری و انتقال کیت
۶	نکات احتیاط عمومی
۸	هشدارها و محدودیت‌ها
۹	عوامل تداخلی
۱۰	آماده‌سازی
۱۱	برنامه دمایی
۱۲	تعریف طیف سنجش فلورسنت در دستگاه‌ها
۱۴	آنالیز نتایج
۱۶	نکات آنالیز نتایج
۱۷	حساسیت آنالیتیکال
۱۷	نشانه‌ها
۱۸	اطلاعات تماس

شماره رفرانسی

- BONFSD-M1-24

شرح کیت

این کیت بر اساس واکنش زنجیره ای پلیمرز (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 به دست آمده توسط این محصول باید همراه با سایر داده‌های بالینی یا آزمایشگاهی تفسیر شوند.

اصول

تشخیص جنسیت جنین اولیه توسط واکنش زنجیره ای پلیمرز (PCR) بر اساس تکثیر مناطق خاص از ژنوم انسان می‌باشد. در واکنش Real-Time PCR محصول تکثیر شده از طریق فلورسنت شناسایی می‌شوند. مشاهده شدت فلورسنت در حین واکنش PCR (به صورت Real-Time) تشخیص محصولات در حال تکثیر را بدون نیاز به باز کردن مجدد لوله‌های واکنش پس از اجرای PCR ممکن می‌سازد. این کیت در قالب یک پلتفرم تک لوله‌ای 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 (HBB) 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 ۶ تا ۱۰ بارداری به ترتیب با فلوروفورهای HEX, TEXAS Red, FAM و CY5 می‌باشد.

مقدمه

به طور سنتی، تعیین جنسیت اولیه جنین با استفاده از فن‌های تهاجمی مانند نمونه برداری از پرزهای کوریونی یا آمنیوسنتز انجام می‌شود. با این حال، این روش‌ها هنوز هم خطر سقط جنین را در حدود ۱-۲٪ دارند و نمی‌توان تا هفته ۱۱ بارداری انجام داد. همچنین به دلیل رشد ناقص اندام تناسلی خارجی نمی‌توان جنسیت جنین را با سونوگرافی در سه ماهه اول تعیین کرد. بنابراین، بر اساس تجزیه و تحلیل مواد ژنتیکی جنین به دست آمده از سلول‌های جنینی در گردش خون مادر، تلاش‌های بیشتری برای ایجاد روش‌های تشخیصی قبل از تولد که خطری برای جنین ایجاد نمی‌کند، 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 استخراج شده از پلاسمای خون مادر در مراحل اولیه بارداری بدون تداخل حاملگی های 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، باهدف تعیین زودهنگام جنسیت جنین با استفاده از cffDNA و به عنوان تست غیرتهاجمی 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 هفته های ۶ تا ۱۰ بارداری می باشد.

اقدامات ضد آلودگی

به عنوان یک اقدام ضد آلودگی، از سر سمپلر DNase/RNase Free مقاوم در برابر آئروسول برای آماده سازی مراحل واکنش استفاده شود. به منظور از بین بردن تماس با DNA اگزوزن 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 μ l/tube $\times$ 1
FSD Positive Control	50 μ l/tube $\times$ 1
Nuclease Free Water	250 μ l/tube $\times$ 1

جدول ۱. محتویات کیت

نگهداری و انتقال کیت

- ✓ کلیه محتویات این کیت باید در دمای ۲۰- درجه سانتی گراد و در تاریکی نگهداری، همچنین به منظور انتقال و جابه جایی کیت از یونولیت با درب و یخ خشک استفاده نمایید.
- ✓ نگهداری کیت در دمای ۴ درجه سانتی گراد هیچ گاه نباید بیشتر از یک ساعت شود.
- ✓ این کیت نیاز به حمل بر روی بسته‌های یخ زده (Frozen Ice Pack) را دارد.
- ✓ همه مواد موجود در کیت تا تاریخ انقضا، همان طور که روی برچسب بسته بندی محصول مشخص شده است، در شرایط مشخص شده پایدار هستند.
- ✓ از چرخه های متعدد ذوب و انجماد (Freeze-Thaw) خودداری کنید زیرا سبب کاهش حساسیت و در نتیجه عدم کارایی کیت می شود.
- ✓ از قرار دادن مستقیم اجزای کیت در معرض نور، گرما یا رطوبت خودداری کنید.
- ✓ معرف ها را قبل از استفاده در دمای اتاق (۱۵ تا ۲۵ درجه سانتی گراد) ذوب کنید. پس از ذوب شدن مواد موجود در کیت، لوله ها را به طور مختصر سانتریفیوژ کنید تا مطمئن شوید که مواد موجود در کیت به طور یکنواخت مخلوط شده اند.

مواد و تجهیزات موردنیاز که باید توسط کاربر تدارک دیده شود:

1. کیت استخراج CffDNA (QIAamp DNA Blood Mini (Qiagen))
2. سمپلر قابل تنظیم در اندازه‌های مختلف و نوک سمپلر فیلتر دار
3. سانتریفوژ رومیزی
4. بلوک خنک‌کننده
5. وایتکس ۱۰ درصد
6. گان و دستکش
7. دستگاه باقابلیت خوانش در کانال Orange, Yellow (HEX), Green (FAM), Red (Cy5), (Texas Red)
8. نرم‌افزار دستگاه‌های مورد استفاده
9. استریپ و کپ مناسب دستگاه مورد استفاده

نکات احتیاط عمومی

1. لطفاً دستورالعمل را با دقت بخوانید و قبل از استفاده محصول با تمام اجزای کیت آشنا شوید و در حین کار دستورالعمل را دقیقاً دنبال کنید.
2. لطفاً قبل از استفاده، ابزارهای Real-Time PCR سازگار را بررسی کنید و فرآیند را با آن‌ها جلو ببرید.
3. تست توسط کارشناس خانم انجام شود که از ایجاد خطای مثبت کاذب جلوگیری گردد.
4. از کیت یا اجزای کیت پس از تاریخ انقضا استفاده نکنید.
5. در کیت آزمایش از ماده دیگری استفاده نکنید.
6. از سرمپلرهای فیلتردار و RNase & DNase free استفاده نمایید.
7. نگهداری و تخلیص نمونه‌های گرفته‌شده از مریض و محصولات حاصل از PCR باید در محلی کاملاً جدا از محل نگهداری و آماده‌سازی Master Mix صورت پذیرد.
8. همه مواد موردنیاز کیت قبل از شروع کار باید به‌طور کامل در دمای اتاق ذوب شود.

9. بعد از ذوب شدن، کلیه مواد را به خوبی پیپتاژ نمایید و به طور مختصر اسپین کنید. این امر برای جلوگیری از کاهش عملکرد کیت در طی زمان به طور کامل توصیه می شود.
10. تمام مراحل مربوط به تهیه Master Mix باید بر روی یخ یا جعبه های 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.
11. هنگام کار با مواد شیمیایی، همیشه روپوش مناسب آزمایشگاهی، دستکش یک بار مصرف و عینک های محافظ داشته باشید.
12. 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 کاملاً جدا کنید.
13. PCR بسیار حساس به آلودگی متقابل است، پس فرآیند کار را با دقت انجام دهید.
14. هنگام کار با نمونه ها و مواد موجود در کیت، برای جلوگیری از آلودگی، دستکش ها باید مرتباً تعویض شوند.
15. از تیپ های جداگانه و اختصاصی استفاده کنید. هنگام کار با نمونه ها و مواد موجود در کیت از میکروتیپ های فیلتر دار برای جلوگیری از ورود آلودگی DNA استفاده کنید.
16. لطفاً لوله های PCR را با دو دستکش یک بار مصرف بسته بندی کرده و به درستی دور بیندازید. لوله های PCR را پس از امپلی فای باز نکنید.
17. از مواد یک بار مصرف، بیش از یک بار استفاده نکنید.
18. مواد موجود در کیت که بلا استفاده هستند، کیت استفاده شده و زباله ها باید به درستی دور انداخته شوند.
19. پس از آزمایش، محل کار را پاک کنید، پیپت ها و تجهیزات را با اتانول ۷۵٪ و وایتکس ۱۰٪ اسپری کنید.

هشدارها و محدودیت‌ها

1. تمامی مراحل آزمایش باید بر اساس اصول GLP^۱ توسط کارکنان آموزش دیده دارای پوشش حرفه‌ای و محافظ^۲ (PPE) انجام شود. آزمایش‌های بالینی بر نمونه‌های عفونی باید در هود کلاس دو (Class II Biological Safety Cabinet) در محیط BSL-2 انجام شود.
2. 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.
3. پیشنهاد می‌شود ۳ مکان مجزا برای استخراج DNA، آماده‌سازی مخلوط واکنش و اضافه کردن نمونه و نمونه استاندارد در نظر گرفته شود تا از ایجاد نتایج مثبت کاذب جلوگیری شود.
4. پس از آماده‌سازی مخلوط واکنش، آن را در تاریکی نگهداری نمایید.

نمونه‌گیری

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

نگهداری نمونه‌های گرفته‌شده

1. از ظرف‌های مخصوص و یک‌بار مصرف برای جمع‌آوری نمونه استفاده کنید.
2. برای جمع‌آوری خون یا پلاسما، از لوله‌های استریل حاوی مواد ضد انعقادی مانند EDTA یا سیترات استفاده کنید. توجه داشته باشید که نمونه‌های حاوی هپارین به دلیل اثر مهاري این ماده برای PCR مناسب نیستند.
3. طی چند ساعت اولیه پس از خون‌گیری، پلاسما را جدا و تا زمان انجام آزمایش در دمای °C ۲۰- نگهداری کنید. سایر نمونه‌های مورد استفاده را نیز طی چند ساعت اولیه پس از نمونه‌گیری در دمای °C ۲۰- نگهداری و از فریز و ذوب کردن مکرر آن‌ها خودداری نمایید.
4. در صورت حمل و نقل نمونه، نمونه را در شرایط سرد و همراه یخ منتقل کنید.

^۱Good Laboratory Practice

^۲Personal Protective Equipment

تاریخ انقضای کیت

تاریخ انقضای کیت بر روی جعبه محصول درج شده است.

عوامل تداخلی

حضور EDTA (0.5M)، HCl (1N)، دانه‌های سیلیس (1μl)، خون (1μl)، اوره (۴۰ گرم در ۱۰۰ میلی‌لیتر) و بافر لیز موجب مهار واکنش PCR می‌شود. توجه شود که در هنگام نمونه‌گیری از هیپارین استفاده نشود. وجود مهارکننده در واکنش با ژن کنترل داخلی قابل‌ردیابی است.

خالص‌سازی نوکلئیک اسید

جداسازی اسیدنوکلئیک 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 هفته‌های 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 محتویات لوله‌ها را به آرامی پیپتاژ و یا ورتکس کنید و به طور مختصر سانتریفیوژ کنید.

۲. مقدار ۱۵ میکرو لیتر از FSD Master Mix را به لوله‌های PCR اضافه کنید.

۳. پس از انتقال مستر میکس به تیوب‌های واکنش، ابتدا نمونه کنترل منفی (NTC) را آماده کنید. برای این کار، ۵ میکرو لیتر از آب بدون نوکلئاز را به تیوب کنترل منفی اضافه نمایید و درب آن را ببندید. سپس لوله‌ها را به منطقه کار با اسید نوکلئیک انتقال دهید، ۵ میکرو لیتر از کنترل مثبت و ۵ میکرو لیتر از نمونه‌های بیمار را به تیوب‌های مربوطه اضافه نمایید. در حین تهیه PCR لازم است همه اجزا در دمای ۲ تا ۸ درجه سانتی‌گراد نگهداری شوند (جدول ۲).

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

جدول ۲. مقادیر مورد استفاده در هر واکنش

برنامه دمایی

دستورالعمل برای دستگاه Rotor-Gene توصیف شده است. دیگر دستگاه‌های Real-Time PCR دارای کانال‌های Red (CY5), Orange (ROX or Texas Red), Green (FAM) و Yellow (HEX) نیز مناسب برای استفاده از این کیت هستند. پس از تنظیم کردن دستگاه مطابق برنامه زیر (جدول شماره ۳)، واکنش را راه‌اندازی کنید. برای آگاهی از نحوه تعریف کانال در دستگاه به کاتالوگ دستگاه مراجعه کنید.

	Temperature	Hold	Cycle
Pre-Denaturation	95 °C	3 min	1
Denaturation	95 °C	15 sec	45
Annealing and Acquisition on Channel Green (FAM) and Yellow (HEX) and Orange (Texas Red) and Red (Cy5)	60 °C	30 sec	
Extension	72 °C	20 sec	

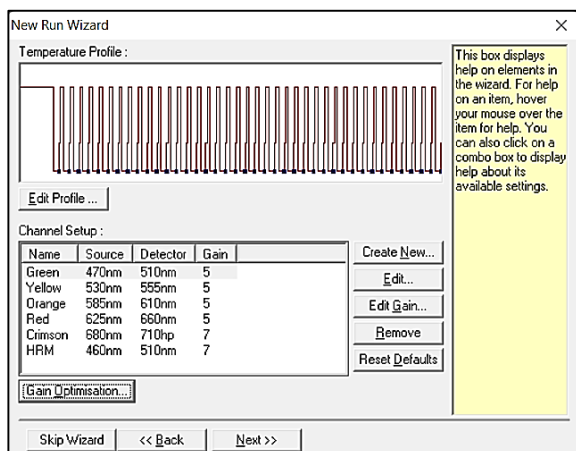
جدول ۳. تنظیم برنامه دستگاه ریل تایم

علاوه بر تعریف دمایی دستگاه که در قسمت بالا آمده است دستگاه باید برای طیف سنجش فلورسنت نیز تنظیم گردد. علاوه بر این، لازم به ذکر است که کانال Yellow کیت در صورت عدم خوانش رنگ یا فلوروفور HEX در دستگاه Real-Time PCR مورد استفاده، قابلیت ستاپ و تنظیم با فلورفورهای VIC یا Joe نیز دارا است که می‌توانید برای پشتیبانی فنی و اطلاعات بیشتر با تلفن‌های شرکت تماس حاصل فرمایید.

تعریف طیف سنجی فلورسنت در دستگاه‌ها

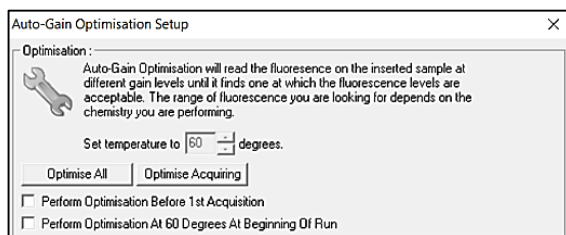
دستگاه Rotor-Gene

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



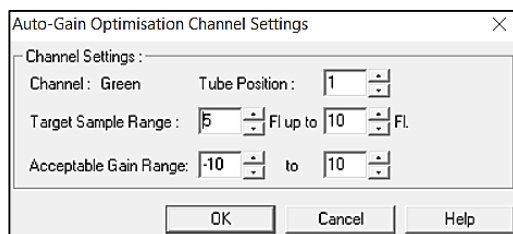
شکل ۱. تنظیمات دستگاه Rotor-Gene برای Gain Optimization

در این صفحه با انتخاب گزینه‌ی Optimize Acquiring برای هر ۴ کانال سبز، زرد، قرمز و نارنجی بازه‌ی Target sample range از ۵ تا ۱۰ (حالت پیش فرض دستگاه) انتخاب شود (شکل ۲).



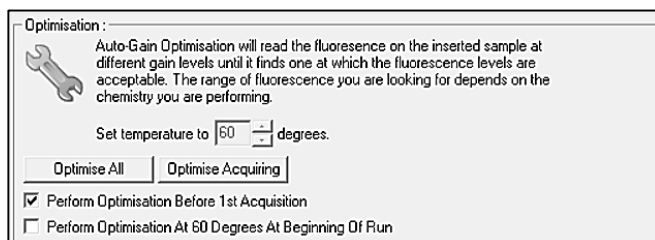
شکل ۲. تنظیمات دستگاه Rotor-Gene برای Auto Gain Optimization

همچنین Gain دستگاه باید بر مبنای تیوب اول که حاوی FSD Master Mix به همراه کنترل مثبت یا FSD Positive Control است، انجام شود (شکل ۳).



شکل ۳. تنظیمات دستگاه Rotor-Gene برای Auto Gain Optimization

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



شکل ۴. تنظیمات دستگاه Rotor-Gene برای Auto Gain Optimization

آنالیز نتایج

آنالیز نتایج توسط نرم افزار مربوطه و بر اساس دستورالعمل دستگاه انجام شود. در ۴ کانال رنگی Green و Yellow و Orange و Red و یا فلورفورهای FAM و HEX و ROX و Cy5 آستانه را در بازه‌ی مناسب قرار دهید.

✓ آستانه یا Threshold برای کانال‌های Green (FAM) و Yellow (HEX) بر روی مقدار 0.02 قرار دهید.

✓ آستانه برای کانال‌های Orange (Texas Red) و Red (CY5) بر روی مقدار 0.04 قرار دهید.

نتایج را با توجه به جدول تفسیر نتایج که در ادامه آورده شده است تفسیر کنید.

جدول تفسیر نتائج

Result	SRY /Green (FAM)	DAZ/Yellow (HEX)	DYS/Orange (Texas red)	HBB/Red (CY5)
Male 	Positive	Positive	Positive	Positive
Male 	Positive	Negative	Positive	Positive
Male 	Negative	Positive	Positive	Positive
Male 	Positive	Positive	Negative	Positive
Likely male Repeat test two weeks later	Negative	Positive	inconclusive	Positive
Repeat test two weeks later	Negative	Negative	Positive	Positive
Female 	Negative	Negative	Negative	Positive
Female 	Negative	Negative	inconclusive	Positive
unacceptable	Positive/ Negative	Positive/ Negative	Positive/ Negative	Negative

جدول ٤. تفسیر نتائج

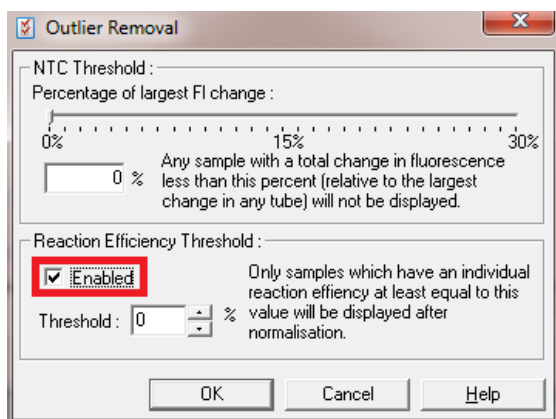
نکات آنالیز نتایج در دستگاه‌های مختلف

دستگاه Rotor-Gene

آنالیز اطلاعات در دستگاه Rotor-gene ۶۰۰۰ و Rotor-gene ۳۰۰۰ باید توسط نرم‌افزار دستگاه و بر اساس دستورالعمل دستگاه صورت گیرد.

۱. از منوی Analysis, Quantitation را انتخاب کرده و روی یک رنگ، به‌طور مثال Green، دو بار کلیک کنید.

۲. در صورت وجود نویز با کلیک بر گزینه‌ی Outlier Removal، ترشلد NTC را بر ۵٪ تنظیم کرده و ترشلد افیشنسی واکنش را به شکل زیر فعال کنید (شکل شماره ۵).



شکل ۶. تنظیمات دستگاه

حساسیت آنالیتیکال

کیت SENMURV Gender detection امکان تعیین جنسیت در LOD برابر با ۰/۱ نانوگرم در میکرو لیتر را با اختصاصیت و دقت ۹۰٪ ممکن می‌سازد.

پشتیبان فنی

برای پشتیبانی فنی لطفاً با تلفن‌های شرکت تماس حاصل فرمایید .

✓ ۰۹۹۳۶۶۹۳۹۴۱ (آقای قره داغی)

نشانه‌ها

	Research Use Only	برای مصارف پژوهشی
	Catalog Number	کد کالا
	Batch Number	شماره بچ تولیدشده
	Temprature Limitation	محدودیت دمایی
	Conculta Instruction For Use	مطالعه دستورالعمل
	Content sufficient for <n> tets	تعداد تست
	Use by	تاریخ انقضا
	Manufacturer	آدرس

شرکت فناوری بن یاخته- گروه سین مورو

دفتر مرکزی: تهران، سعادت آباد، میدان فرهنگ، بلوار ۲۴ متری سعادت آباد، خیابان
حیدر نیا (دوم شرقی)، پلاک ۹، شرکت فناوری بن یاخته

کد پستی: ۱۹۹۷۷۷۵۵۵۵ تلفن تماس: ۰۲۱۲۲۰۸۲۱۲۰

Web Site: www.Senmurv.co

Email: info@senmurv.ir