

بسمه تعالی



خلاصه دستورالعمل کیت Fragile X Kit

۱. آماده سازی نمونه:

*: برای ماندگاری کیفیت کیت و جلوگیری از فرایند Freeze & Thaw بهتر است کلیه کیت در میکروتیوب های 0.2 ml الیکوت شود (هر تیوب 14µl) و در یک یا چند فالتون 50 ml که با آلومینوم فویل پوشانده شده است، در دمای -20 (فریز دخیره سازی دمای ثابت) درجه سانتیگراد نگهداری شود.

*: 21µl از نمونه DNA (OD: 40-60 ng/µl) به تیوب الیکوت شده افزوده و در دستگاه ترموسایکلر با شرایط زیر قرار دهید.

PCR Protocol:

Steps:		Tem.:°C	Time
Initial denaturing		95°C	5'
Denaturing	10 cycle	97°C	35"
Annealing		62°C	35"
Extension		68°C	4'
Denaturing	20 cycle	97°C	35"
Annealing		62°C	35"
Extension		68°C	4' + 20s/cycle*
Final Extension		72°C	10'
Hold		4°C	∞

*Follow the instruction manual of the thermal cycler to add 20 seconds extension time per cycle for this step.

۲. پس از انجام PCR، با شرایط زیر PCR Product در دستگاه کاپیلاری ABI قرار گیرد.

* در صورت ارسال PCR Product به مراکز دارنده دستگاه سکانس در جهت خوانش فرگمنت، حتما با شرکت کیمیاگران سانا اکسیر (کیسار) هماهنگی صورت گیرد.

PCR Product	2 µL
Hi-Di Formamide	11µL
(Liz 560 یا 500) Size Ladder	0.5 µL
Denaturing	95 °C
Hold	4°C

Run Parameters	Run Parameters
Capillary length	36 cm
Run temperature	60 °C
Injection voltage	1,5 kV
Injection time	20s
Run voltage	15 kV
Run time	2500 s

۳. با بدست آمدن نتایج از دستگاه کاپیلاری، با استفاده از نرم افزار Gene Marker نتایج آنالیز شود. با توجه به تعداد پیک های بدست آمده و تعداد آلل های نمونه تعداد تکرار های CGG، با استفاده از فرمول زیر یا محاسبه گردد. برای تسهیل این امر می توان از قسمت Applications>Fragile X analysis در نرم افزار Gene Marker فول ورژن شرکت کیسار استفاده نمود.

Configuration	c_0	m_0
3130, 3130nl	36 cm	229.4
3730, 3730xL	50 cm	231.9
3500, 3500xL	50 cm	232.6

$$CGG_n = \frac{Peak_n - c_n}{m_0}$$

۴. بر مبنای تعداد تکرار CGG به دست آمده، نمونه در دسته بندی زیر قرار می گیرند.

Negative:	< 45 repeats
Intermediate:	45-54 repeats
Premutation:	55-200 repeats with normal methylation pattern
Full Mutation:	> 200 repeats with abnormal methylation pattern

*: برای آنالیز دیتا و تفسیر نتایج به دستورالعمل جامع کیت Fragile x شرکت کیسار می توان مراجعه نمود.