

بسمه تعالی

خلاصه دستورالعمل کیت DM1 (DMPK) Kit

1. 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 آلومینیوم فویل پوشانده شده است، در دمای -20 (فریز دخیره سازی دمای ثابت) درجه سانتیگراد نگهداری شود.

❖ بدین صورت ابتدا در جهت یکدست شدن محتویات کیت، میکروتیوب کیت را 20 ثانیه در دست بگیرید که به **دمای محیط** برسد و 15 ثانیه با استفاده از ورتکس Mix نماید. سپس با استفاده از CoolRack به میکروتیوب های 0.2، به هریک 14µl اضافه نمایید.

***: 1 µl از نمونه DNA (OD: 50-100 ng/µl) به تیوب الیکوت شده (بر روی CoolRack) افزوده و در دستگاه ترموسایکلر با شرایط زیر قرار دهید.
❖ در این مرحله اضافه کردن **20 ثانیه به هر سیکل** در مرحله Extension دوم اهمیت بالایی دارد.

PCR Protocol:

Steps:	Tem.:°C	Time
Initial denaturing	95°C	5'
Denaturing	97°C	35"
Annealing	62°C	35"
Extension	68°C	4'
Denaturing	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.**

2. 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.

	Run Parameters	Run Parameters	
PCR Product	2 µL	Capillary length	36 cm
Hi-Di Formamide	11 µL	Run temperature	60 °C
(Liz 560 یا 500) Size Ladder	0.5 µL	Injection voltage	1.5 kV
Denaturing	95 °C	Injection time	20s
Hold	4°C	Run voltage	15 kV
		Run time	3500 s

3. با بدست آمدن نتایج از دستگاه کاپیلاری، با استفاده از **فایل آنالیز DM1** در قسمت Applications>Fragile X analysis در نرم افزار Gene Marker فول ورژن تعداد تکرار CTG مشخص خواهد شد.

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

Normal:	5-34 CTG
Mutable normal (Premutation):	35-49 CTG
Full-penetrance:	>50 CTG