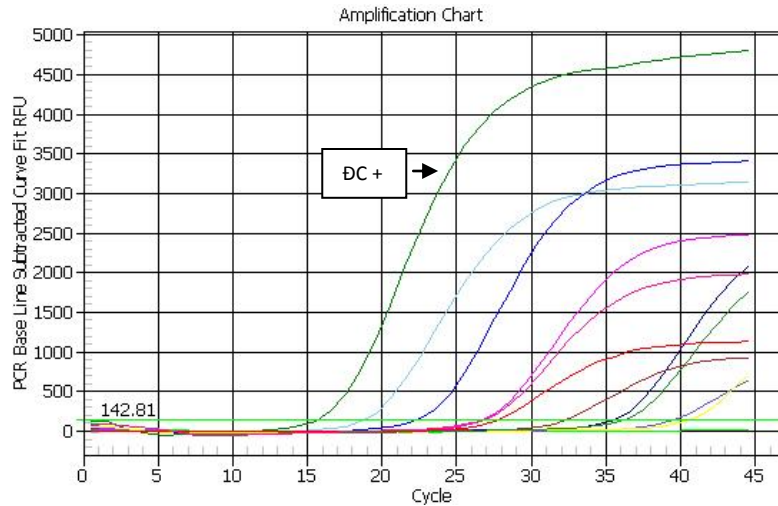


## ANAPURE MTB qPCR KIT (50 phản ứng)



**Biểu đồ tín hiệu khuếch đại ADN vi khuẩn lao trong mẫu bệnh phẩm khác nhau thể hiện bằng tín hiệu huỳnh quang FAM khi phát hiện bằng ANAPURE MTB qPCR KIT.**

### BẢO QUẢN & ĐỘ BỀN VỮNG

Bảo quản ở -20°C, tránh ánh sáng.

Thời gian sử dụng 12 tháng kể từ ngày sản xuất. Không sử dụng các thành phần khi đã quá hạn sử dụng.

### THÔNG TIN AN TOÀN

Sử dụng trang phục bảo hộ nhằm đảm bảo an toàn cho kĩ thuật viên khi thao tác và tránh nhiễm vào mẫu.

Sản phẩm của Công ty cổ phần ANABIO Research & Development, sản xuất theo TCCS 92: 2015/ANA.

**Địa chỉ:** Số 22, Lô 7, Khu đô thị Văn Khê, Hà Đông, Hà Nội,

Tel: 84-4-22253211; <http://anabio.com.vn>.

Tư vấn khoa học về bộ kit: 01644475945, e-mail: [techservice@anabio.com](mailto:techservice@anabio.com)



Thành phần	Cat. No.	Lượng
qPCR mix	MM	1 ống x 625 µl
MTB probes	PP02	1 ống x 425 µl
Nuclease-free Water	DW01	1 ống x 1 ml
Đối chứng dương MTB	PC02	1 ống x 1 ml

**ANAPURE MTB qPCR KIT** được chế tạo với mục đích phát hiện ADN của vi khuẩn lao *Mycobacterium tuberculosis* (MTB) với độ nhạy và độ đặc hiệu cao bằng phương pháp Realtime PCR sử dụng khuôn ADN tách chiết từ các mẫu xét nghiệm đờm và các loại dịch của người bệnh như: dịch rửa phế quản, dịch màng tim, dịch ổ khớp, dịch não tủy,....

Bộ kit cung cấp qPCR mix, MTB probes, Nuclease-free Water và đối chứng dương MTB đủ cho 50 phản ứng Realtime PCR.



ANABIO Copyright

Cat. No. PCR02-50



## ANAPURE MTB qPCR KIT (50 phản ứng)

### NGUYÊN LÝ

Phương pháp phát hiện dựa trên nguyên lý Real time PCR khuếch đại đoạn gen đặc hiệu IS6110 có kích thước 249 bp của *M. tuberculosis* (*M. tuberculosis* – *M. africanum* – *M. bovis* – *M. microti*), Probes dùng cho phản ứng Real time PCR được thiết kế theo công nghệ TaqMan MGB (Minor Groove Binder) probes (TaqMan<sup>®</sup> Chemistry) bản quyền của hãng Applied Biosystems. Dạng TaqMan này có ưu điểm để thực hiện phản ứng Real time PCR ở nhiệt độ cao làm tăng tính đặc hiệu của các probes.

Khi có sản phẩm khuếch đại đặc hiệu, Taqman probes đặc hiệu với trình tự đích sẽ bắt cặp vào sản phẩm khuếch đại và sẽ bị phân giải bởi enzyme Taq polymerase (nhờ hoạt tính 5'-3' exonuclease) khi tổng hợp sợi bổ sung ở giai đoạn kéo dài. Sự thủy phân Taqman probes sẽ làm tách rời chất phát huỳnh quang (fluorophore) **FAM** ở đầu 5' khỏi chất hấp phụ huỳnh quang (Quencher) ở đầu 3' của probes, nhờ vậy ống phản ứng sẽ phát huỳnh quang khi bị chiếu tia cực tím hay laser và sự phát huỳnh quang này sẽ được ghi nhận bởi đầu đọc Real time của máy. Mẫu có chứa nhiều bản gen đích sẽ có chu kỳ ngưỡng (C<sub>t</sub> = chu kỳ mà đầu đọc Real time của máy bắt đầu ghi nhận được có tín hiệu huỳnh quang trong ống phản ứng) phát hiện sớm hơn mẫu có ít bản gen đích.

ADN nội chuẩn sử dụng cặp mồi và probes đặc hiệu khuếch đại đoạn gen mã hóa β-globulin của người trực tiếp trong mẫu bệnh phẩm theo cùng nguyên lý TaqMan MGB, Probes được gắn chất huỳnh quang **VIC** đảm bảo phản ứng Real time PCR không bị ức chế bởi các tác nhân trong quá trình tách chiết từ mẫu bệnh phẩm.

### HÓA CHẤT & CÁC THIẾT BỊ CẦN CHUẨN BỊ

- Ống dùng cho Real time PCR, pipet và đầu tip vô trùng
- Máy spin ống PCR, Máy ly tâm
- Máy Real time PCR có các kênh màu phát hiện FAM, VIC/HEX/JOE, nên sử dụng các hệ thống máy:
  - Real time PCR, ABI 7500.
  - Real time PCR, RotoGen – Q 6000
  - Agilent Technologies, Stratagene Mx3000P.

### PHƯƠNG PHÁP

(Lưu ý: Đọc trước toàn bộ quy trình trước khi tiến hành)

#### I. Chuẩn bị mẫu tách chiết thô:

Tiến hành tách chiết ADN tổng số của mẫu bệnh phẩm nghi ngờ có vi khuẩn lao theo hướng dẫn của bộ sinh phẩm: **MAGPURE BACTERIAL DNA NANO KIT** (Cat. No. MPN02).

#### Khuyến cáo:

Tiến hành tách chiết đồng thời 01 mẫu MTB đối chứng âm và 01 mẫu MTB đối chứng dương để kiểm soát hiệu quả tách chiết ADN vi khuẩn lao và hiệu quả phát hiện MTB của bộ sinh phẩm này.

**ANAPURE MTB qPCR KIT** cung cấp 01 đối chứng âm là **Nuclease-free Water** (Cat. No. DW01), 01 đối chứng dương MTB (Cat. No. PC02) là vaccine BCG được pha ở nồng độ thích hợp trong Nuclease-free Water.

Lưu ý làm ră đồng đối chứng dương và vortex kỹ trong **10-15 giây** trước khi dùng. Sử dụng **20 µl** đối chứng âm và **20 µl** đối chứng dương để tách chiết song song.

#### II. Chuẩn bị thành phần chạy Real time PCR

1. Ră đồng MTB probes, pipet lên xuống 5 lần để trộn đều.
2. Xác định số lượng phản ứng theo công thức:

$n$  = số lượng bệnh phẩm đã tách (bao gồm bệnh phẩm dương tính và âm tính MTB) + 01 Đối chứng âm đã tách + 01 Đối chứng dương đã tách.

**Chú ý:** Đối chứng âm và đối chứng dương đã được tách chiết song song với các mẫu bệnh phẩm trong bước chuẩn bị mẫu tách chiết thô.

3. Mỗi phản ứng Real time PCR có thành phần Master Mix như sau:

qPCR	12.5 µl
MTB probes	8.5 µl
Tổng thể tích	21 µl

Tính toán thể tích Real time PCR Master Mix (V) cần chuẩn bị như sau:

$V = 12,5 \mu\text{l qPCR} \times n + 8,5 \mu\text{l MTB probe} \times n$  (với  $n$  là số phản ứng)

Chia **20 µl** dung dịch Real time PCR Master Mix/ ống phản ứng.



ANABIO Copyright

Cat. No. PCR02-50



## ANAPURE MTB qPCR KIT (50 phản ứng)

### III. Chuẩn bị phản ứng PCR

- Mẫu tách chiết thô nếu bảo quản ở -20°C, cần rã đông ở nhiệt độ phòng trước, sau đó pipet lên xuống 5 lần.
- Bổ sung 5 µl mẫu tách chiết thô ADN từ bệnh phẩm, Đối chứng âm, Đối chứng dương vào mỗi ống phản ứng riêng biệt tương ứng, trộn đều bằng pipet lên xuống 5 lần, spin các ống trong 15 giây đảm bảo không còn các thành phần phản ứng bám trên thành ống.
- Thiết lập phương pháp chạy trên máy Real time PCR, đánh dấu vị trí mẫu, Đối chứng âm, Đối chứng dương theo vị trí ống thí nghiệm.

### IV. Thực hiện phản ứng Real time PCR

- Thiết lập chế độ nhiệt như sau:

Step	UNG Incubation	AmpliTaq Gold Actvation	PCR	
	HOLD <sup>a</sup>	HOLD	CYCLE (45 cycles)	
			Denature	Anneal/Extend
Temperature	50°C	95°C	95°C	60°C
Time	2 min	10 min	15 sec	1 min
Volume	25 µl			

**Chú ý:** Bước ủ 50°C trong 2 phút là bắt buộc để hoạt hóa Amperase UNG.  
Bước ủ 95°C trong 10 phút là bắt buộc để hoạt hóa enzyme Hot Taq.

- Lựa chọn kênh màu để:  
Phát hiện gen đích của vi khuẩn lao: - Reporter Dye: chọn kênh **FAM**  
- Quencher Dye: chọn None  
Phát hiện gen đích nội chuẩn: - Reporter Dye: chọn kênh **VIC/JOE/HEX**  
- Quencher Dye: chọn None
- Thiết lập các ống phản ứng  
Chọn "Unknown" cho các mẫu xét nghiệm và các mẫu đối chứng.

### V. Kiểm soát chất lượng

- Mẫu có giá trị Ct ≤ 40.0 là mẫu dương tính. Mẫu không có giá trị Ct là âm tính,

- Mẫu có giá trị Ct > 40 là mẫu nghi ngờ nên cần tiến hành kiểm tra lại bằng phương pháp chạy điện di sản phẩm PCR, hoặc tách chiết lại ADN khuôn từ mẫu bệnh phẩm và chạy lại Real time PCR để khẳng định kết quả.

### VI. Phân tích kết quả:

Sau khi hoàn thành bước PCR, kết quả được phân tích theo trình tự sau:

#### 1. Kiểm tra nguy cơ ngoại nhiễm và độ nhạy của phản ứng tách chiết:

Kết quả đối chứng âm không có bất kì tín hiệu khuếch đại nào khi đọc bằng 2 kênh **FAM** và **VIC** trong khi đó đối chứng dương **chỉ** cho tín hiệu khuếch đại **FAM**.

Nếu có bất kì tín hiệu khuếch đại nào ở ống đối chứng âm hoặc có tín hiệu **VIC** của ống đối chứng dương, chứng tỏ có sự nhiễm chéo trong quá trình tách chiết, do đó không thể đọc kết quả của các mẫu cho tín hiệu kênh **FAM**.

Nếu đối chứng dương không có tín hiệu khuếch đại **FAM** chứng tỏ độ nhạy của phản ứng bị giảm vì không khuếch đại được ADN MTB có sẵn trong mẫu đối chứng dương.

#### 2. Xác định các mẫu dương tính với MTB

Xác định các mẫu dương tính với MTB bằng cách đọc bằng kênh **FAM** và **VIC** từng ống cùng với đối chứng âm và đối chứng dương. Mẫu được đọc là dương tính MTB khi có đồng thời tín hiệu khuếch đại **FAM** và **VIC** và có giá trị Ct, tức là đường biểu diễn tín hiệu khuếch đại này cắt được đường nền.

**Chú ý:** Có một số mẫu có Ct thấp dưới 12 và đường biểu diễn tín hiệu khuếch đại không ngóc lên được. Đây là các ống mà camera ghi nhận được tín hiệu từ rất sớm nhưng tín hiệu không tăng theo các chu kì sau. Với các mẫu này, thử tăng trị số baseline cycle vượt quá Ct của nó, mẫu có thể trở nên âm tính. Tuy nhiên, để đảm bảo kết quả không bị âm tính giả, nên pha loãng mẫu 5-10 lần trước khi chạy Real time PCR.

#### 3. Xác định các mẫu âm tính với MTB

Xác định các mẫu âm tính với MTB bằng cách đọc bằng kênh **FAM** và **VIC** từng ống cùng với đối chứng âm và đối chứng dương. Đọc kết quả từng mẫu một.

- Nếu mẫu không có tín hiệu **FAM** nhưng vẫn có tín hiệu **VIC**, đọc kết quả là: Mẫu âm tính MTB.
- Nếu mẫu có tín hiệu khuếch đại khi đọc bằng kênh **FAM** nhưng đường biểu diễn không cắt được đường nền và có tín hiệu khuếch đại khi đọc bằng kênh **VIC**, đọc kết quả là: MTB trong mẫu dưới ngưỡng phát hiện.
- Nếu mẫu đồng thời không có tín hiệu khuếch đại khi đọc bằng kênh **FAM** và **VIC**, đọc kết quả là: Mẫu bị ức chế. Trường hợp này nên tách chiết và chạy PCR lại một lần nữa.

