فهرست مندرجات

۱.مقدمه ۲

۲. محتویات کیت ۳

۳. شرایط نگهداری و پایداری کیت ۳

۴. سایر موارد مورد نیاز ٤

۵. نکات قابل توجه ٤

۶. نمونه مناسب و شرایط نگهداری و انتقال آن ٥

۷. عوامل مزاحم ۶

۸. استخراج DNA ۶

۹. کنترل داخلی ۶

۱۰. دستورکار PCR ۷

۱۱. تنظیم دستگاه Rotor-Gene ۷

۱۲. تنظیم دستگاه StepOne ۸

۱۳. تنظیم سایر دستگاه ها ۹

۱۴. آنالیز نتایج Rotor-Gene ۹

۱۵. آنالیز نتایج StepOne ۱۱

۱۶. محاسبه تیتر ویروس ۱٤

۱۷. محدوده خطی ۱٤

۱۸. میزان حساسیت ۱٤

کیت **HBV RQ** جهت کار با دستگاه های Rotor-Gene و StepOne و به منظور تشخیص و کمیت سنجی DNA ویروس هپاتیت ب در پلاسما می باشد. این کیت جهت مصارف تحقیقاتی می باشد.

۱. مقدمه

هپاتیت ب (Hepatitis B) یک بیماری عفونی ناشی از ویروسی با همین نام است (Hepatitis B Virus/HBV). این بیماری در تقریباً تمام کشورهای جهان وجود دارد و یکی از مشکلات عمده بهداشت جهانی بشمار می رود. در حال حاضر حدود ۲ میلیارد نفر در دنیا به این ویروس مبتلا می باشند که در نزدیک به ۳۵۰ میلیون نفر آنها بیماری به صورت مزمن بوده و ناقل این عفونت محسوب می گردند.

تحقیقات نشان می دهند که مطمئن ترین روش برای بررسی و مدیریت درمان این بیماری، ارزیابی میزان ویروس در خون بیمار می باشد. بر این اساس می توان مرحله بیماری را تعیین نمود و موفقیت درمان را نیز سنجید و در عین حال گونه های جدید ویروس را که به درمان مقاوم می باشند به سرعت تشخیص داد.

کیت حاضر امکان بررسی نمونه جهت تشخیص و تعیین تیتر ویروس هپاتیت ب را به روش Real-Time PCR فراهم می کند که در حال حاضر در مقایسه با سایر روش های ارزیابی میزان ویروس، دارای بیشترین حساسیت و وسیع ترین دامنه اندازه گیری می باشد. در این روش با استفاده از پروب های نشاندار شده به رنگ های فلورسنت می توان محصول PCR را بررسی نمود. بر همین اساس می توان تعداد ویروس را در نمونه مورد بررسی تعیین نمود بدون این که پس از پایان واکنش نیاز به انجام مراحل بعدی باشد. با توجه به این که در این روش

نیازی به بررسی محصول PCR وجود ندارد، احتمال ایجاد آلودگی نیز به لحاظ تئوری وجود نخواهد داشت.

این کیت برای استفاده با دستگاههای Rotor-Gene و StepOne طراحی شده است. این کیت همچنین حاوی کنترل داخلی می باشد که از گزارش منفی کاذب حاصل از مهار PCR پیشگیری می کند.

۲. محتویات کیت

این کیت شامل یک دفترچه راهنما، یک لوح فشرده و مواد زیر می باشد:

برچسب	محتوا	حجم
HBV Mix	میکس آماده برای PCR *	۳۶۰ میکرولیتر
HBV S1	استاندارد۱: یکصد هزار واحد در میکرولیتر	۱۵۰ میکرولیتر
HBV S2	استاندارد۲: ده هزار واحد در میکرولیتر	۱۵۰ میکرولیتر
HBV S3	استاندارد ۳: یک هزار واحد در میکرولیتر	۱۵۰ میکرولیتر
HBV S4	استاندارد ۴: یکصد واحد در میکرولیتر	۱۵۰ میکرولیتر
HBV S5	استاندارد ۵: ده واحد در میکرولیتر	۱۵۰ میکرولیتر
water	آب مخصوص PCR	۲۰۰ میکرولیتر

*۱، ۲ یا ۴ عدد، به ترتیب برای کیت های ۲۴، ۴۸ و ۹۶ واکنشی

۳. شرایط نگهداری و پایداری کیت

تمامی مواد کیت باید در دمای ۲۰ درجه زیر صفر حمل و نگهداری شوند. در این صورت این مواد تا پایان زمان انقضا کیت که روی کیت و نیز روی هر لوله درج شده است پایدار و قابل استفاده می باشند.

از ذوب و انجماد مکرر این مواد و بیش از سه بار خودداری کنید زیرا که باعث کاهش حساسیت و عدم کارایی آن ها می شود.

۴. سایر موارد مورد نیاز

برای استفاده از این کیت به تجهیزات و اقلام زیر نیاز دارید:

- دستگاه Real-Time PCR به همراه تجهیزات جانبی آن
- سانتریفوژ مخصوص میکروتیوب
- ورتکس (Vortex Mixer)
- بلوک حرارتی رومیزی (Dry Block Heater)
- سمپلر متغیر و سر سمپلر فیلتردار (Nuclease free)
- کیت استخراج DNA
- تیوب ۱/۷ میلی لیتری و میکروتیوب مخصوص Real-Time PCR
- دستکش لاتکس یا نیتریل بدون پودر

۵. نکات قابل توجه

برای پیشگیری از تولید نتایج کاذب به نکات زیر توجه کنید:

- هنگام کار با نمونه بیمار، همیشه فرض را بر آلوده بودن نمونه بگذارید و خطرات بالقوه آن را در نظر داشته باشید.
- در فضای pre-PCR یا Clean Room سه ناحیه را مشخص و از هم تفکیک کنید. این سه فضا شامل فضای نگهداری نمونه و استخراج، فضای آماده سازی مواد (برای افزودن میکس به لوله های PCR) و فضای آماده سازی واکنش (برای افزودن نمونه DNA به لوله PCR) می باشند. هر یک

از سه فضای فوق باید وسایل مخصوص به خود، به ویژه سمپلر، را داشته باشند. از جابجایی وسایل بین این سه فضا پرهیز کنید.

- سطوح کار را همیشه قبل از شروع و پس از خاتمه کار با الکل ۷۰ درجه تمیز کنید.
- هنگام استفاده، مواد کیت را روی یخ خرد شده نگه دارید تا کاملاً ذوب شده و با چند تکان ملایم از مخلوط و یکنواخت شدن محتویات هر لوله اطمینان حاصل کنید. سپس برای چند ثانیه آن ها را در دور پایین سانتریفوژ کنید.
- در حین کار، محتویات کیت را همیشه روی یخ خرد شده نگه داری کنید. از استفاده از یخ های قالبی و سایر موارد به غیر از یخ خرد شده پرهیز کنید.

۶. نمونه مناسب و شرایط نگه داری و انتقال آن

نمونه مناسب برای آزمایش هپاتیت ب با این کیت، پلاسمای خون محیطی (peripheral blood) می باشد که در لوله استریل حاوی ماده ضد انعقاد جمع آوری شده است. ماده ضد انعقاد می تواند EDTA یا سیترات باشد. خون کامل را می توان تا ۷۲ ساعت در ۴ درجه نگهداری و به آزمایشگاه منتقل نمود. هنگام دریافت نمونه در آزمایشگاه باید پس از سانتریفوژ پلاسمای آن را جدا نموده و در دمای ۲۰ درجه زیر صفر نگهداری نمود. نمونه پلاسما در چنین شرایطی تا چندین هفته پایدار بوده و تیتر ویروس در آن ثابت می ماند.

حداقل نمونه توصیه شده برای آزمایش ۲۰۰ میکرولیتر پلاسما می باشد که نیازمند نیم میلی لیتر خون کامل می باشد.

۷. عوامل مزاحم

هپارین با غلظت بیش از ۱۰ واحد در میلی لیتر باعث مهار PCR می شود. به همین دلیل لوله حاوی هپارین به عنوان ضد انعقاد مناسب نیست و نباید استفاده شود. همچنین نمونه بیماران تحت درمان با هپارین نیز برای PCR مناسب نمی باشد.

مقادیر بالای بیلیروبین (تا حداکثر ۴/۵میلی گرم در دسی لیتر) و چربی (تا حداکثر ۱۰۰۰ میلی گرم در دسی لیتر) و نیز همولیز خون برای این آزمایش مزاحمتی ایجاد نمی کند.

۸. استخراج **DNA**

برای استخراج DNA از نمونه پلاسما از روش ها و کیت های مختلفی می توان استفاده نمود. ما استفاده از کیت های زیر را توصیه می کنیم:

- High Pure Viral Nucleic Acid Kit (Cat# 11858874001, Roche Applied Science, Mannheim, Germany)
- QIAamp DNA Blood Mini Kit (Cat. no. 51104, Qiagen GmbH, Hilden, Germany)
- QIAampUltraSens ® Virus Kit (Cat. no. 53704, Qiagen GmbH, Hilden, Germany)
- QIAampMiniElute Virus Spin Kit (Cat. no. 57704, Qiagen GmbH, Hilden, Germany)

۹. کنترل داخلی

برای ارزیابی احتمال مهار PCR و جلوگیری از نتایج منفی کاذب، کیت حاوی کنترل داخلی می باشد. کنترل داخلی به صورت مخلوط با میکس در کیت قرار دارد و در صورت موفق بودن PCR منجر به تولید فلورسانس با تابش زرد

(VIC/Yellow) و CT بین ۲۶ تا ۳۰ در دستگاه روتورژن و ۲۸ تا ۳۴ در دستگاه StepOne می شود. در این حالت کنترل داخلی موفق بودن واکنش را نشان می دهد.

۱۰.دستورکار PCR

ابتدا تمامی لوله ها را روی یخ خرد شده قرار دهید تا بطور کامل محتویات آنها ذوب شوند. با چند تکان ملایم از مخلوط شدن مواد داخل آنها اطمینان حاصل کرده و برای چند ثانیه آنها را در دور پایین سانتریفوژ کنید.

تعداد مورد نیاز لوله PCR روی بلوک سرد بگذارید. علاوه بر تعداد نمونه های مورد آزمایش، ۵ لوله برای استانداردها و یک لوله برای کنترل منفی نیز در نظر بگیرید.

به هر لوله ۱۵ میکرولیتر از HBV Mix اضافه کنید. سپس ۱۰ میکرولیتر از DNA استخراج شده و یا استاندارد یا آب به هر لوله اضافه کنید و درپوش لوله ها را ببندید. سپس آن ها را مطابق شماره ها داخل دستگاه قرار دهید.

توجه: در صورت استفاده از دست StepOne لوله ها را ابتدا به مدت کوتاهی سانتریفوژ نموده و سپس داخل دستگاه قرار دهید.

توجه: هنگام استفاده از دستگاه روتورژن، رینگ محافظ را نیز در پایان اضافه کنید.

۱۱.تنظیم دستگاه Rotor-Gene

ابتدا اطمینان حاصل کنید که رینگ محافظ را روی روتور قرار داده اید!

دستگاه Rotor-Gene را توسط کابل مخصوص آن به کامپیوتر وصل کرده و آن را به برق بزنید تا چراغ آبی جلوی آن روشن شود.
در لوح فشرده همراه کیت روی فایل HBV 0.2 و یا HBV-strip (با توجه به نوع لوله استفاده شده) دوبار کلیک کنید تا برنامه باز شود.
در منوی بالای صفحه دکمه استارت (دکمه سبز رنگ) را کلیک کنید. روی پنجره باز شده نیز دکمه استارت را کلیک کنید و فایل آزمایش را در پوشه مورد نظر ذخیره کنید تا دستگاه روشن شود.
در پنجره نمونه ها (samples) نام هر نمونه را وارد کنید. در ستون نوع نمونه با عنوان type، برای نمونه بیمار unknown و برای استانداردها standard را انتخاب کنید. سپس غلظت استانداردها را در ستون سمت راست با عنوان given concentration وارد کنید. برای نمونه کنترل منفی نیز می توانید NTC یا Negative Control را انتخاب کنید.

۱۲.تنظیم دستگاه **StepOne**

نرم افزار دستگاه را باز کنید (*.StepOne software 2). از منوی Set Up روی دکمه Template کلیک کنید و فایل داخل لوح فشرده همراه کیت را انتخاب کنید.

از منوی سمت چپ Plate Setup و سپس دکمه Assign Targets and Samples را انتخاب کنید. یک کنترل منفی به همراه پنج استاندارد و ده نمونه از پیش تعریف شده اند. استانداردها، کنترل منفی و تعداد نمونه مورد نظر خود را در ردیف دلخواه کپی کنید. برای اینکار از گزینه های کلیک راست (copy, paste, clear) می توانید استفاده کنید. همچنین با استفاده از منوی Define Targets and Samples می توانید تعداد نمونه های مورد بررسی را نیز اضافه کنید و نام نمونه ها را نیز مطابق نام بیماران تغییر

دهید. در پایان تنظیمات دکمه Start Run را کلیک کنید و فایل آزمایش را در محل مورد نظر ذخیره کنید تا دستگاه شروع به کار کند.

۱۳.تنظیم سایر دستگاه ها

چنانچه این کیت را برای استفاده با سایر دستگاه های Real-Time PCR استفاده می کنید، دستگاه را مطابق برنامه زیر تنظیم نمایید:

Step	Temperature and time	Cycles
1	**95°C x 10 min**	1
2	**95°C x 15 sec**	45
	60°C x 60 sec	

اندازه گیری تابش فلورسانس باید در دمای ۶۰ درجه و برای رنگ های FAM و VIC تنظیم شود.

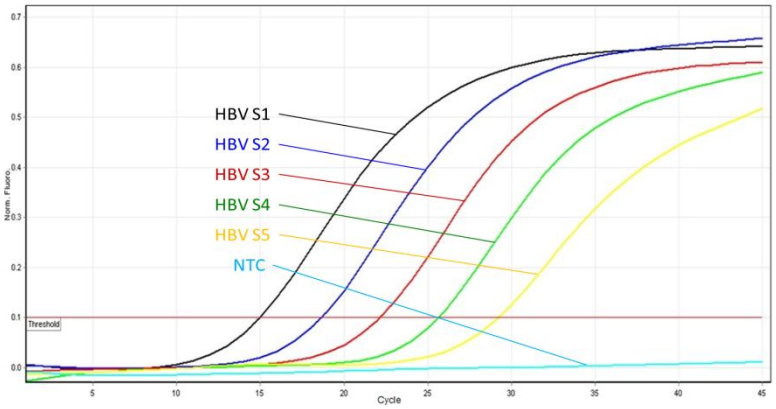
HBV Mix موجود در کیت حاوی ROX است. غلظت نهایی ROX در واکنش 300nM میباشد.

۱۴.آنالیز نتایج **Rotor-Gene**

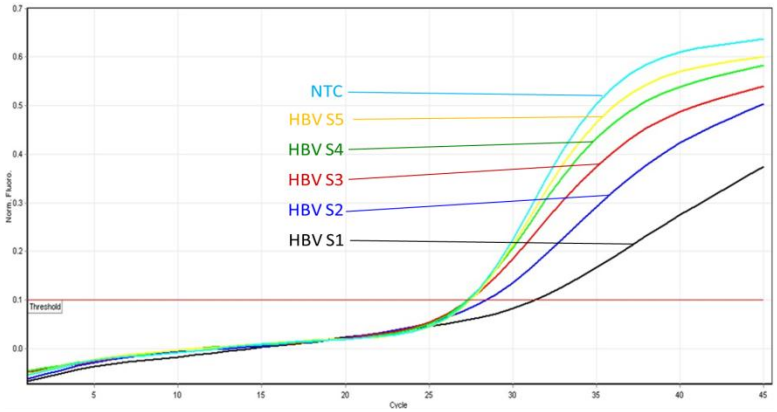
برای آنالیز نتایج به راهنمای Rotor-Gene مراجعه کنید. به طور خلاصه از منوی Analysis، Quantitation را انتخاب کرده و روی Green دوبار کلیک کنید. در پنجره autofind threshold حداقل را روی ۰/۰۲ یا بالاتر از فلورسانس زمینه قرار داده و دکمه OK را بزنید تا پس از رسم منحنی استاندارد نتایج در جدول پایین صفحه نشان داده شوند. همچنین میتوانید به طور ساده آستانه را روی ۰/۱ قرار دهید. سپس در منوی Analysis مجددا Quantitation و سپس Yellow را کلیک کنید. در پنجره

autofind threshold دکمه cancel را بزنید و threshold را روی ۰/۱ قرار دهید.

برای مشاهده نمودار مورد انتظار استانداردها، کنترل منفی و کنترل داخلی تصاویر یک و دو را ملاحظه فرمایید.



تصویر یک: منحنی استانداردهای HBV در کانال سبز دستگاه Rotor-Gene



تصویر دو: منحنی کنترل داخلی در کانال زرد دستگاه Rotor-Gene

توجه داشته باشید که افزایش **تابش سبز (Green)** مربوط به **HBV** و افزایش **تابش زرد (Yellow)** حاصل از **کنترل داخلی** می باشد.

توجه داشته باشید نمونه تنها زمانی مثبت در نظر گرفته می شود که دارای منحنی سیگموییدی و فاز لگاریتمی باشد و تنها در این حالت CT معتبر بوده و قابل استناد و تفسیر می باشد. در غیاب منحنی سیگموییدی، نمونه منفی محسوب می شود و (CT آن) در صورت وجود فاقد ارزش می باشد.

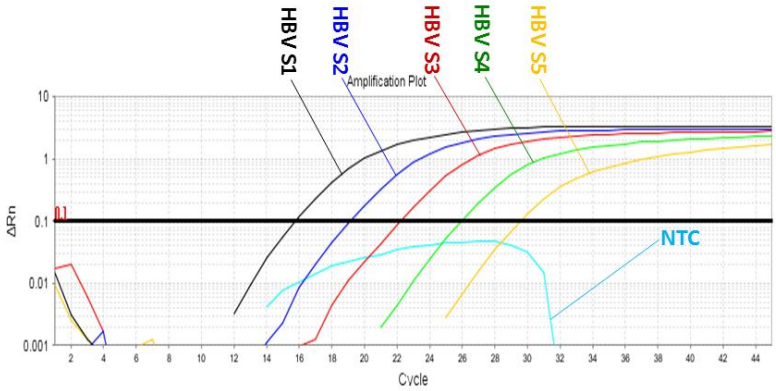
نتایج را با توجه به نکات زیر تفسیر کنید:

- در صورتی که نمونه در کانال سبز مثبت و CT کمتر از ۴۰ باشد، بدون در نظر گرفتن نتیجه آن در کانال زرد می توان آن را **مثبت** تلقی نمود و تیتر محاسبه شده توسط دستگاه را گزارش نمود.
- در صورتی که یک نمونه در کانال سبز منفی باشد ولی در کانال زرد مثبت و دارای منحنی سیگموید و CT بین ۲۶ تا ۳۰ باشد، نمونه **منفی** در نظر گرفته می شود.
- در صورتی که یک نمونه در هر دو کانال سبز و زرد منفی باشد، نتیجه **نامعتبر** بوده و آزمایش باید **تکرار** شود.

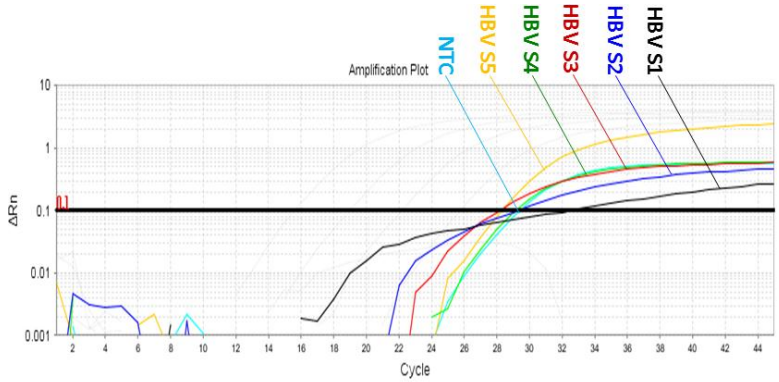
۱۵.آنالیز نتایج StepOne

برای آنالیز نتایج به راهنمای StepOne مراجعه کنید. به طور خلاصه دکمه Analysis را کلیک کنید. برای HBV/FAM آستانه (threshold) را روی ۰/۱ و برای IC/VIC آستانه را روی ۰/۰۵ قرار دهید.

برای مشاهده گراف مورد انتظار استانداردها، کنترل منفی و کنترل داخلی تصاویر سه و چهار را ملاحظه فرمایید.



تصویر سه: منحنی استانداردهای HBV در کانال FAM دستگاه StepOne



تصویر چهار: منحنی کنترل داخلی در کانال VIC دستگاه StepOne

توجه داشته باشید که افزایش **تابش HBV/FAM** مربوط به **HBV** و افزایش **تابش IC/VIC** حاصل از **کنترل داخلی** می باشد.

توجه داشته باشید نمونه تنها زمانی مثبت در نظر گرفته می شود که دارای منحنی سیگموییدی و فاز لگاریتمی باشد و تنها در این حالت CT معتبر بوده و قابل استناد و تفسیر می باشد. در غیاب منحنی سیگموییدی، نمونه منفی محسوب می شود و (CT آن)در صورت وجود فاقد ارزش می باشد.

نتایج را با توجه به نکات زیر تفسیر کنید:

- در صورتی که نمونه در کانال HBV/FAM مثبت و CT کمتر از ۴۰ باشد، بدون در نظر گرفتن نتیجه آن در کانال IC/VIC می توان آن را **مثبت** تلقی نمود و تیتر محاسبه شده توسط دستگاه را گزارش نمود.
- در صورتی که یک نمونه در کانال HBV/FAM منفی باشد ولی در کانال IC/VIC مثبت و CT بین ۲۸ تا ۳۴ باشد، نمونه **منفی** در نظر گرفته می شود.
- در صورتی که یک نمونه در هر دو کانال HBV/FAM و IC/VIC منفی باشد، نتیجه **نامعتبر** بوده و آزمایش باید **تکرار** شود.

۱۶. محاسبه تیتر ویروس

هرکیت حاوی ۵ استاندارد کمی با غلظت مشخص می باشد که با استفاده از آنها منحنی استاندارد رسم شده و میزان ویروس در نمونه بیمار معین می شود.
تیتر استانداردها با واحد در میکرولیتر (IU/ul) مشخص شده اند. برای تبدیل نتایج به صورت واحد در میلی لیتر، از معادله زیر استفاده کنید:

$$\text{Result(IU/ml)} = \frac{\text{Result(IU/µl)} \times \text{elution volume(µl)}}{\text{sample volume(ml)}}$$

به طور مثال چنانچه ۲۰۰ میکرولیتر پلاسما استخراج و DNA حاصل در ۵۰ میکرولیتر بافر حل شود، نتایج باید در عدد ۲۵۰ ضرب شوند تا به واحد در میلی لیتر (IU/ml) تبدیل شوند.

۱۷.محدوده خطی

محدوده خطی این کیت با استفاده از نمونه کلون شده حاوی بخشی از ژنوم ویروس هپاتیت ب بررسی شده است و شامل بازه ده میلیون واحد در میکرولیتر تا نیم واحد در میکرولیتر می باشد.

۱۸. میزان حساسیت

حساسیت تشخیصی این کیت با استفاده از نمونه کلون شده حاوی بخشی از ژنوم ویروس هپاتیت ب بررسی شده و معادل ۰/۱۵ واحد در میکرولیتر می باشد. یعنی در ۹۵٪ مواردی که تیتر ویروس در نمونه بیش از این میزان باشد، توسط این کیت تشخیص داده خواهد شد. در صورت کاهش تیتر نمونه به کمتر از این میزان همچنان کیت قادر به تشخیص خواهد بود اما با ضریب اطمینان به مراتب کمتر.

Table of Contents:

1. Introduction 2
2. Kit Contents 2
3. Storage and Stability 3
4. Additionally Required Materials 3
5. General Precautions 4
6. Specimen, storage and transport 4
7. Interfering substances 4
8. DNA isolation 5
9. Internal control (IC) 5
10. PCR Protocol 5
11. Programming of the Rotor-Gene 6
12. Programming of StepOne(/Plus) 6
13. Programming other machines 7
14. Quantitation 7
15. Data Analysis: Rotor-Gene 8
16. Data Analysis: StepOne 10
17. Linear Range 11
18. Sensitivity 12

HBV RQ kit is intended for use with Rotor-Gene or StepOne machines and for the quantitative detection of HBV-DNA extracted from plasma. This kit is for research use only.

1. Introduction

Hepatitis B, a viral infection with Hepatitis B virus (HBV) is a major global health issue. About 2 billion people are infected world wide of which 350 million are chronic carriers. In recent years, accessing the level of circulating virus in blood has been regarded as the most reliable tool for disease monitoring and patient management including clinical staging and pretreatment evaluation, monitoring and evaluation of antiviral therapy success and detection of emerging new resistant viruses.

HBV RQ kit provides a ready-to-use Real-Time PCR system for detection and quantitation of HBV DNA with Rotor-Gene or StepOne machines. Currently the Real-Time PCR provides the highest sensitivity and widest dynamic range among other methods. In this method application of fluorescent probes allows detection of amplified product. Analysis of fluorescent kinetics also leads to quantification of the target sequence in the reaction without requiring post-amplification analysis therefore, reducing the possibility of contamination with the PCR product. This kit also incorporates an *Internal Control* (IC) to identify possible PCR inhibition.

2. Kit Contents

The kit contains a manual, a CD with Rotor-Gene and StepOne templates and following reagents:

Label	Content	Quantity
HBV Mix	PCR Master mix*	360 µl
HBV S1	Standard 1: 100,000 IU/µl	150 µl
HBV S2	Standard 2: 10,000 IU/ µl	150 µl
HBV S3	Standard 3: 1,000 IU/ µl	150 µl
HBV S4	Standard 4: 100 IU/ µl	150 µl
HBV S5	Standard 5: 10 IU/ µl	150 µl
Water	PCR Grade Water	200 µl

* 1, 2 and 4 tubes for 24, 48 and 96 reaction kits.

3. Storage and Stability

The kit components should be shipped and stored at -20°C and are stable until the expiry date mentioned. Avoid repeated freeze-thaws more than few times to prevent reduced sensitivity.

4. Additionally Required Materials

To use this kit, you need the following items:

- Real-Time PCR machine and accessory computer
- Table top microtube centrifuge
- Vortex Mixer
- Dry Block Heater
- Adjustable pipetters and nuclease free filtered tips
- DNA extraction kit
- Nuclease free 1.7ml microtubes and PCR microtubes

- Disposable powder-free gloves

5. General Precautions

In order to prevent false results, always pay attention to the following points:

- Treat all samples as potentially infectious.
- Within the pre-PCR work area assign three separate spaces for: a) Sample storage and extraction, b) Reagent preparation where the master-mix is aliquoted into tubes and c) Reaction preparation area for addition of extracted DNA to the tubes.
- Always wipe the working surfaces with 70% Ethanol before and after work.
- Thaw kit components on ice completely, mix by flickering followed by a quick spin and store on crushed ice after.
- Do not place 0.2ml PCR tubes on crushed ice. Use cold blocks instead.

6. Specimen, Storage and Transport

Peripheral blood should be collected in sterile condition in proper and sterile tubes. We recommend EDTA or citrate plasma for HBV detection. Whole blood or plasma should be shipped at +4°C. Upon receipt plasma should be separated from whole blood and can be stored at +4°C for few days or aliquoted and stored at -20°C for up to few weeks.

7. Interfering Substances

Heparin (more than 10 IU/ml) affects the PCR. Blood collected in heparin containing tubes should not be used. Samples of heparinized patients must not be used as well. Elevated levels of bilirubin (≤4.5 mg/dl) and lipids (≤1000 mg/dl) and hemolytic samples do not influence the extraction and PCR.

8. DNA Isolation

DNA isolation can be performed using different kits from various manufacturers. We recommend the following:

- High Pure Viral Nucleic Acid Kit (Cat. no. 11858874001, Roche Applied Science, Mannheim, Germany)
- QIAamp DNA Blood Mini Kit (Cat. no. 51104, Qiagen GmbH, Hilden, Germany)
- QIAampUltraSens ® Virus Kit (Cat. no. 53704, Qiagen GmbH, Hilden, Germany)
- QIAampMiniElute Virus Spin Kit (Cat. no. 57704, Qiagen GmbH, Hilden, Germany).

9. Internal Control (IC)

To examine the possible PCR inhibition and to prevent false negative results, the kit contains an *Internal Control* included in PCR Master Mix. Internal control should generate a CT of 26-30 in Yellow Channel on Rotor-Gene and a CT of 28-34 in VIC channel on StepOne.

10. PCR Protocol

Thaw the reagents on ice completely followed by a brief mixing and a quick spin. Place required number of tubes on cold block. Consider one tube for each sample plus one for each standard and one for the negative control.

Pipette 15ul of HBV Mix directly to each tube followed by adding 10ul of standard or isolated DNA.

Cap the tubes and visually inspect to make sure all are caped securely. Place tubes in the machine.

Note: Working with StepOne instrument, spin tubes briefly before loading on the block.

Note: If using Rotor-Gene attach the locking ring too.

11. Programming Rotor-Gene

Before you start the machine make sure you have attached the locking ring on the rotor!

Open the CD provided in the kit and double click on HBV 0.2 or HBV-strip template depending on used tubes. Program starts. Click on Start button (Green button on the top menu). On the pop up window click start again and save program on desired location.

12. Programming StepOne

Open the StepOne software (V 2.*). On the Set Up menu click on Template and select the file on CD provided with the kit. Click on Plate Setup. One negative control, 5 standards and 10 samples are defined. You may change plate set up using right click options (copy, paste, clear). You may also

add /remove samples or change sample name on “Define Targets and Samples” menu. When finished, click on “Start Run” and save the experiment on desired location. Instrument will start shortly.

13. Programming Other Machines

If you apply this kit to other Real-Time PCR machines, program it according to the following table:

Step	Temperature and time	
1	**95°C x 10 min**	1 cycle
2	**95°C x 15 sec**	45 cycles
	60°C x 60 sec	

Fluorescence should be collected at 60°C for FAM and VIC/HEX dyes.
HBV Mix contains Rox with the final concentration of 300nM in the reaction.

14. Quantitation

The kit provides 5 quantitation standards with defined titers to generate a standard curve for quantification of samples viral load. Working with Rotor-Gene machine, the standard curve from a previous run can also be imported for quantification of samples to the recent run. To do so, at least one standard must be used in the current run. Apparently using all five standards in each run will lead to more accurate results.

Quantitation standards are defined as IU/ul. To convert the result to IU/ml following equation should be used:

$$\text{Result(IU/ml)} = \frac{\text{Result(IU/µl)} \times \text{elution volume(µl)}}{\text{sample volume(ml)}}$$

“Sample volume” is the plasma volume used for DNA isolation and “Elution volume” is the volume of buffer or water used to elute or dissolve isolated DNA.

15. Data Analysis: Rotor-Gene

Before analyzing results, make sure in the sample menu all the standards have been defined as “standard” and the relative concentrations have been entered. Patient samples should be defined as "unknown" and Negative control or no template control as "Negative Control" or "NTC" respectively.
Analyze data according to manufacturer recommendations. Perform quantitative analysis for HBV (Green channel) and qualitative analysis for Internal Control (Yellow channel). Briefly, click on analysis menu and then under Quantitation tab double click on cycling A. Green.
In the pop up for Automatic Threshold increase the minimum or lower bound until it surpasses the negative control or the NTC fluorescence, and then click on OK.
Repeat the above for Cycling A. Yellow but cancel the Automatic Threshold and manually put threshold on 0.1.
Figures 1 and 2 represent typical graphs for Rotor-Gene machine.

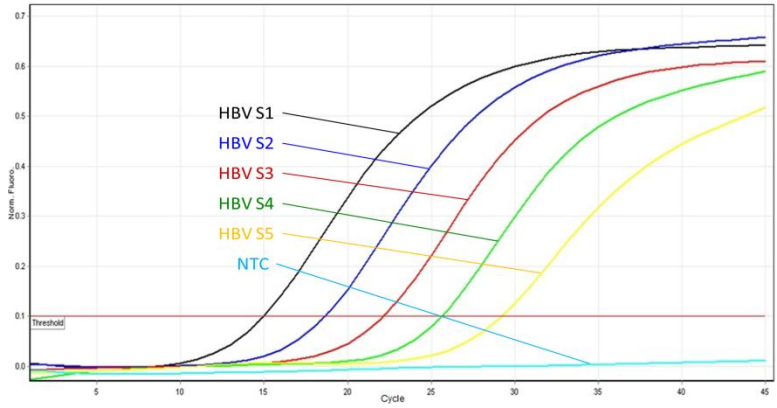


Figure 1. Typical HBV Graph in Green Channel for Rotor-Gene

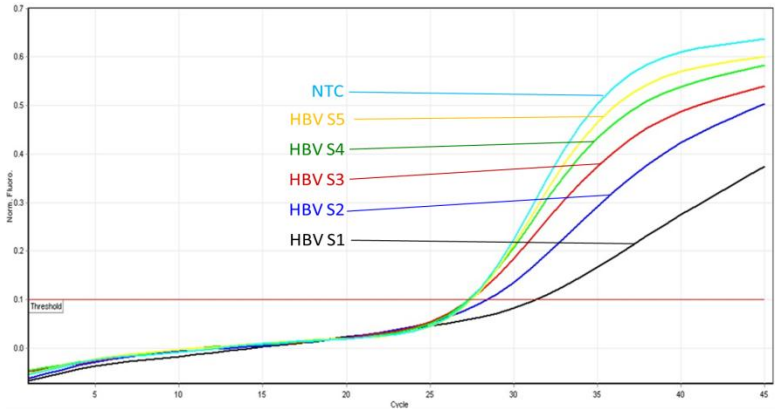


Figure 2. Typical IC Graph in Yellow Channel for Rotor-Gene

Note that a sample is considered Positive only if it has a log phase, and only then CT is reliable and can be used. In the absence of log phase, sample is considered Negative and CT if present is not reliable.

Consider following points when analyzing:

- A sample is **Positive** if it is positive in Green channel with a CT of less than 40. The viral load or quantitation results in the Cycling A. Green are valid.
- A sample is **Negative** if it is negative in Green channel while it is positive in Yellow channel with a sigmoid graph and CT of 26-30.
- Results are **Inconclusive** and the test should be repeated if a sample is negative in both of Green and Yellow channels.

16. Data Analysis: StepOne

Analyze data according to manufacturer recommendations. Briefly, click on Analyze and set the threshold for HBV/FAM at 0.1 and at 0.05 for IC/VIC.

Figures 3 and 4 represent typical graphs for StepOne machine.

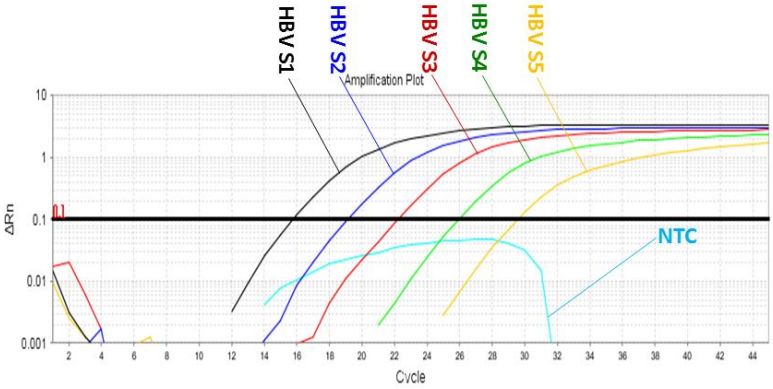


Figure 3. Typical HBV Graph in FAM Channel for StepOne

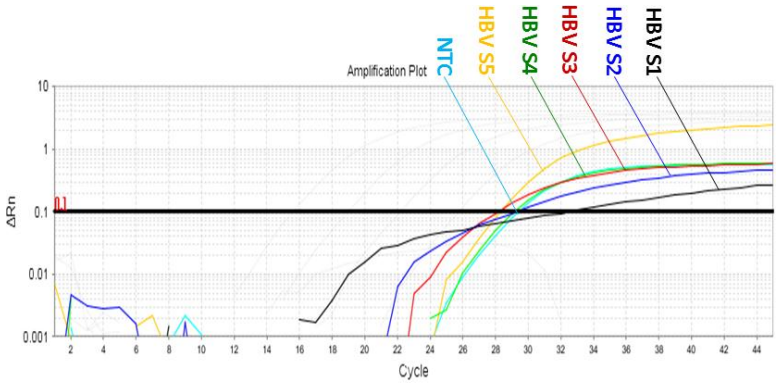


Figure 4. Typical IC Graph in VIC Channel for StepOne

Note that a sample is considered Positive only if it has a sigmoid graph and log phase, and only then CT is reliable and can be used.
In the absence of sigmoid graph and log phase, sample is considered Negative and CT if present is not reliable.

Consider following points when analyzing:

- A sample is **Positive** if it is positive in FAM/HBV channel with a CT of less than 40. The viral load or quantitation results are valid.
- A sample is **Negative** if it is negative in FAM/HBV channel while it is positive in VIC/IC channel with a CT of 28-34.
- Results are **Inconclusive** and the test should be repeated if a sample is negative in both of FAM/HBV and VIC/IC channels.

17. Linear Range

The linear range of the kit was assessed with dilution series of the cloned target and the assay showed to be linear in the range of 10,000,000 IU/µl to 0.5 IU/µl.

18. Sensitivity

The analytical detection limit of the kit was assessed with dilution series of the cloned target and the detection limit was determined as 0.15 IU/µl.