

# Developing a Quantitative Real-Time PCR Kit

Shahin Negari

2012-04-23

# Why?

- Eu/US kits: *Reliable but Expensive*
- Russian/Indian/Chinese kits: *Cheap, Not Reliable*
- Other problems: *No Technical Support*
- We Offer:
  - Reliable Kit
  - Reasonable Price
  - Technical Support: in Lab/Tel/email

# Development Stages:

- Data Collection/Analysis/Design
- Standards
- Internal Control
- Prototype Kit
- Quality Control
- Final Touches

# Data Collection, Analysis/Design:

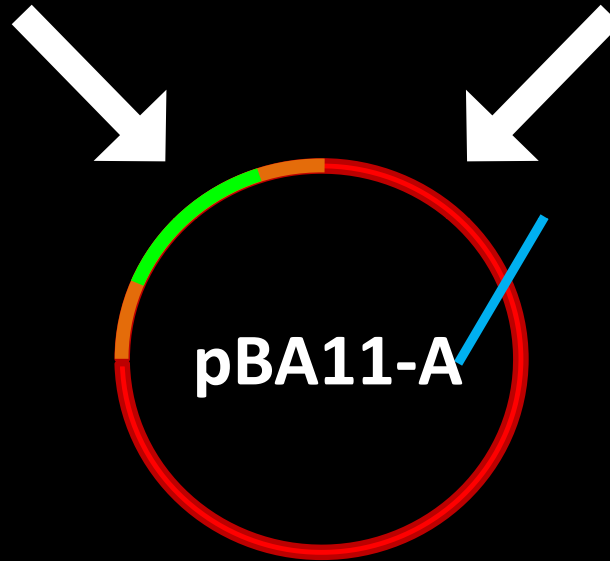
- Target selection: *Highly Conserved Region: S gene*
- Alignment: *1500 complete HBV genome, Clustal X*
- Designing primers-probe: *TaqMan Probe, 150bp*

# Standards:

- Outer primers: 250bp of S gene amplified
- *Cloned into plasmid*/Ecoli
- Plasmid *extracted/linearized*



+



Cloned, extracted, linearized



HBV Standard



# Standards:

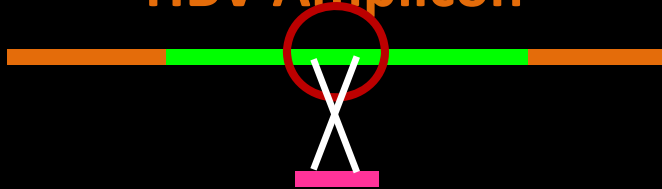
- Outer primers: 250bp of S gene amplified
- *Cloned into plasmid*/Ecoli
- Plasmid *extracted/linearized*
  
- Titration:
  - *HBV Positive Pool*: Titration by Aruts/Qiagen
  - Titration of *Synthetic Standard* by HBV Pool

# Internal Control (IC):

- Same sequence as Standards
- *Probe Region Replaced (25bp)*
- *Cloned/extracted/linearized*
- Why:
  - No extra pair of primers:
  - No cross reaction
  - Same efficiency

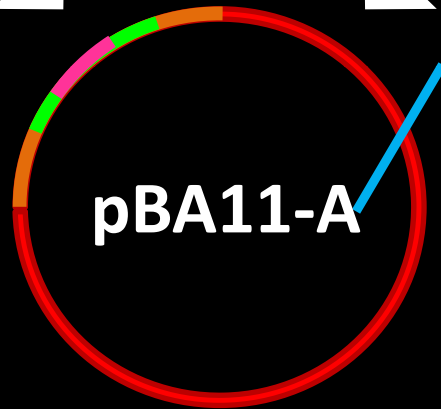
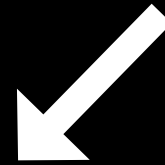
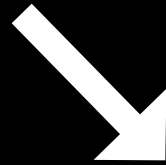


**HBV Amplicon**



**Secondary probe**

+



**Cloned, extracted, linearized**



**HBV Internal Control**



# Analytical Sensitivity:

- Using Serial Dilution of Cloned Target:
- 95% confidence: 0.5 copy/ul or 5 copy/rxn
  - 125 copy/ml or 18 IU/ml
  - 35% for 1 copy/rxn or 3.5 IU/ml

# Specificity:

- Archives of HBV Negative samples:
  - No Cross Reaction/Positive



# Comparison with other kits:

- Artus/Qiagen kit: 50 positive samples
- R of 0.95 ( $P < 0.001$ )

جمهوری اسلامی ایران  
انستیتو پاستور ایران  
INSTITUT PASTEUR D'IRAN

شماره: ۹۰، ۰۲۲۳، ۲۷۲۳  
تاریخ: ۹۰، ۹، ۲۰  
پیوست: ۵۰

انستیتو پاستور ایران

بسمه تعالی

مدیرعامل محترم شرکت کاوش فن آور  
با سلام

		Artus	Novingen
Artus <sup>۱</sup>	Pearson Correlation	1	.951**
	Sig. (2-tailed)		.000
	N	50	50
Novingen <sup>۲</sup>	Pearson Correlation	.951**	1
	Sig. (2-tailed)	.000	
	N	50	50

با تشکر  
دکتر سعید بوذری  
معاون پژوهشی

احتراماً، پیرو نامه مورخ ۹۰/۱/۲۲ آن شرکت (تصویر به پیوست) در خصوص ارزیابی کیفی کیت تشخیص کمی ویروس هپاتیت B (HBV Real-time PCR) با عنوان Novingen با شماره batch No # HBX0511A به این وسیله نتایج بررسی توسط گروه هپاتیت و ایدز این انستیتو به شرح ذیل ایفاد می گردد.

INSTITUT PASTEUR D'IRAN

# Comparison: Cobas TaqMan

KEYVAN VIROLOGY LABORATORY

Dr. Hossein Ketvani

Ph.D.in Virology from Canada

Associate Professor

آزمایشگاه تخصصی ویروس شناسی کیوان

دکتر حسین کیوانی

متخصص ویروس شناسی بالینی از کانادا

دانشیار دانشگاه

شماره نظام پزشکی: آ- ۱۳۷۲



بنام خدا

جناب آقای مهندس نگاری

بیرو مذاکره تلفنی با جنابعالی نتایج مقایسه کیت HBV RG, HBV Taqman به شرح زیر است :

HBV RG IU/ml	HBV Taqman IU/ml	
0.9	1/699/060	C+
38	44	
347	515	
2/990	4/063	
198/297/363	>110/000/000	
8/791	10/470	
2/486	1/609	
39	14	
0.4	Not Detected	
28/345	15/933	
42/190	6/322	
13/827	12/265	

آزمایشگاه تخصصی ویروس شناسی  
کیوان  
تهران، خیابان دکتر بهشتی، نرسیده به خیا  
تلفن: ۰۲۱-۸۷۱۵۳۵۰ - ۸۷۱۲۸۳۵ - ۸۷۱۶۵۵۶ - ۸۷۱۸۹۳۰  
lab.com

# HBV NovinGene

- Validated on Both **RotorGene** and **StepOne**

## **HBV RG Kit**



*for Detection and Quantitation  
of Hepatitis B Virus (HBV)  
with RotorGene 6000*

**96 reactions**

*for Research Use Only!*

Expiry: 2012-12      Store at -20C

Manufactured by: NovinGene Parsvira Ltd.

Re# HBV0312A-v2.3