

راهنمای کیت HPV HR RQ4

کیت HPV HR RQ4 مخصوص تشخیص ۱۴ تایپ پرخطر (۱۶، ۱۸، ۳۱، ۳۳، ۳۵، ۳۹، ۴۵، ۵۱، ۵۲، ۵۶، ۵۸، ۵۹، ۶۶ و ۶۸) و ۲ تایپ کم خطر (۶ و ۱۱) و ویروس پاپیلومای انسانی به روش Real-Time PCR با دستگاه Rotor-Gene می باشد و دستگاه Real-Time PCR باید امکان تشخیص هم زمان تابش رنگ های FAM, VIC, ROX, Cy5 را داشته باشد. این کیت برای مصارف تحقیقاتی طراحی شده است.

محتویات کیت: این کیت شامل یک راهنما و مواد زیر می باشد:

برچسب	محتوا	حجم
HPV HR1 Mix	میکس آماده برای PCR	۴۸۰
HPV HR2 Mix	میکس آماده برای PCR	۴۸۰
HPV HR3 Mix	میکس آماده برای PCR	۴۸۰
HPV HR4 Mix	میکس آماده برای PCR	۴۸۰
Pos Ctrl	شاهد مثبت	۱۰۰
Neg Ctrl	شاهد منفی	۱۰۰
Water	آب مخصوص PCR	۲۰۰

تمامی مواد کیت باید در دمای ۱۰ تا ۳۰ درجه زیر صفر نگهداری شوند.

کنترل داخلی: برای ارزیابی احتمال استخراج نامناسب یا مهار واکنش و جلوگیری از نتایج منفی کاذب، این کیت حاوی کنترل داخلی می باشد. به این منظور پرایمرها و پروب مخصوص یک ژن انسانی به HR1 Mix افزوده شده است که در صورت عملکرد مناسب باید به تولید فلورسانس با تابش نارنجی (ROX) و CT بین ۲۰ تا ۳۰ منجر شود.

روش استفاده: کیت محتوی ۴ نوع میکس متفاوت می باشد که هر میکس ۴ تایپ ویروس پاپیلوما را تشخیص می دهد. بنابراین هر نمونه باید با تمامی ۴ میکس کیت آزمایش شود تا امکان تشخیص ۱۶ تایپ مورد نظر ویروس پاپیلوما فراهم شود. مطابق شکل زیر چهار سری لوله مخصوص PCR، هر سری برای یکی از میکس های PCR روی بلوک سرد بگذارید. در هر سری علاوه بر یک لوله برای هر یک از نمونه ها، ۳ لوله نیز برای شاهد های مثبت و منفی، و نمونه آب یا NTC در نظر بگیرید. به عنوان مثال برای آزمایش ۵ نمونه، به ۲۰ لوله برای نمونه ها و ۱۲ لوله برای شاهد ها نیاز داریم که مجموعاً ۳۲ لوله خواهد بود که به صورت ۴ سری ۸ تایی مرتب شده اند. درپوش لوله ها را ببندید. سپس آن ها را مطابق شماره ها داخل دستگاه قرار دهید.

به هر یک از لوله های سری اول ۲۰ میکرولیتر از **HPV HR1 Mix** اضافه کنید.

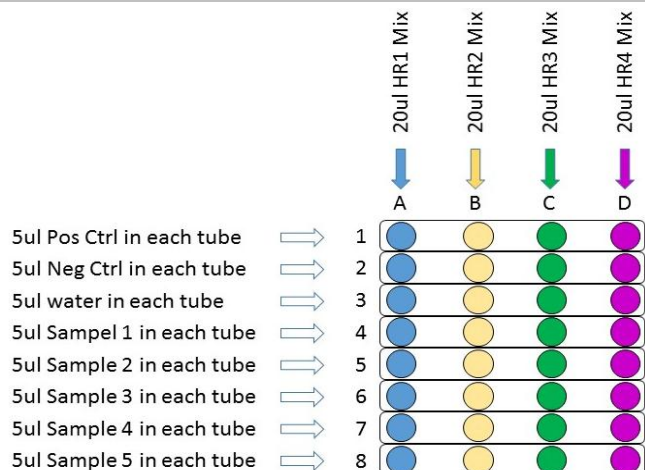
به هر یک از لوله های سری دوم ۲۰ میکرولیتر از **HPV HR2 Mix** اضافه کنید.

به هر یک از لوله های سری سوم ۲۰ میکرولیتر از **HPV HR3 Mix** اضافه کنید.

به هر یک از لوله های سری چهارم ۲۰ میکرولیتر از **HPV HR4 Mix** اضافه کنید.

سپس ۵ میکرولیتر از DNA استخراج شده، **شاهد** یا آب به هر لوله اضافه کنید.

به این منظور یک لوله در هر سری برای هر یک از شاهد ها در نظر بگیرید.



تنظیم دستگاه: برای تنظیم دستگاه Rotor-Gene از فایل تمپلیت مخصوص این کیت استفاده کنید. همچنین می‌توانید دستگاه را مطابق برنامه زیر تنظیم نمایید:

Step	Temperature/time	Cycles
1	95°C x 3 min	1
2	95°C x 15 sec	45
	60°C x 60 sec	

اندازه‌گیری تابش فلورسانس باید در دمای ۶۰ درجه و برای رنگ‌های FAM و VIC و ROX و Cy5 تنظیم شود.

آنالیز نتایج: هر یک از میکس‌های موجود در کیت ۴ تایپ پاپیلوما ویروس را تشخیص می‌دهد. با توجه به اینکه نمونه با کدام میکس و در چه کانالی مثبت شده است، می‌توان نتیجه را تفسیر نمود.

توجه داشته باشید نمونه تنها زمانی مثبت در نظر گرفته می‌شود که دارای منحنی سیگموئیدی و فاز لگاریتمی و CT کمتر از ۴۰ باشد. در غیاب منحنی سیگموئیدی، نمونه منفی محسوب می‌شود. همچنین CT بالاتر از ۴۰ نیز مثبت محسوب نمی‌شود.

همچنین، کنترل داخلی نمونه همیشه باید مثبت باشد یعنی نمونه باید با میکس ۱ در کانال نارنجی همواره مثبت و دارای CT بین ۲۰ تا ۳۰ باشد. در غیر اینصورت چنانچه نمونه با میکس ۱ در کانال نارنجی منفی باشد یا CT آن بالاتر از ۳۰ باشد، جواب نامعتبر است و آزمایش باید تکرار شود.

نتیجه منفی: در صورتیکه نمونه فقط در **کانال نارنجی** و با میکس ۱ مثبت باشد و با بقیه میکس‌ها در تمامی کانال‌ها منفی باشد، نمونه **منفی** می‌باشد.

نتیجه مثبت: در صورتیکه نمونه در کانال نارنجی با میکس ۱ با CT حدود ۲۰ تا ۳۰ مثبت باشد، آنگاه مطابق جدول صفحه بعد، نتایج را تفسیر کنید:

	Green	Yellow	Orange	Red	Result
HR1 Mix	+	-	IC	-	Pos: HPV16
HR1 Mix	-	+	IC	-	Pos: HPV6 or 11
HR1 Mix	-	-	IC	+	Pos: HPV33
HR2 Mix	+	-	-	-	Pos: HPV18
HR2 Mix	-	+	-	-	Pos: HPV39
HR2 Mix	-	-	+	-	Pos: HPV59
HR2 Mix	-	-	-	+	Pos: HPV56
HR3 Mix	+	-	-	-	Pos: HPV31
HR3 Mix	-	+	-	-	Pos: HPV52
HR3 Mix	-	-	+	-	Pos: HPV66
HR3 Mix	-	-	-	+	Pos: HPV58
HR4 Mix	+	-	-	-	Pos: HPV35
HR4 Mix	-	+	-	-	Pos: HPV51
HR4 Mix	-	-	+	-	Pos: HPV68
HR4 Mix	-	-	-	+	Pos: HPV45

میزان حساسیت: حساسیت تشخیصی این کیت با استفاده از نمونه کلون شده حاوی بخشی از ژنوم پاپیلوما ویروس انسانی تایپ ۱۶ بررسی شده و معادل ۵۰ کپی در میکرولیتر می باشد.

جهت توضیحات بیشتر در مورد کیت های نوین ژن، دریافت فایل کامل دفترچه راهنمای کیت و فایل تمپلیت برای تنظیم دستگاه و آشنایی با نمایندگان فروش، به وبسایت ما به نشانی www.novingene.com مراجعه فرمایید یا QR Code موجود بر روی جعبه کیت را اسکن نمایید. جهت کسب اطلاعات بیشتر با پشتیبانی فنی تماس بگیرید.