



جدول ۱: آماده‌سازی اجزای واکنش به ازای یک واکنش

حجم	اجزاء مورد نیاز
۶µl	Q-ROMAX, 4X
۱۴µl	Pro1 HPV or Pro2 HPV or Pro3 HPV or Pro4 HPV Mix
۵µl	Isolated DNA

برنامه دمایی

جدول ۲: برنامه دمایی Viga Genotyping HPV Molecular Diagnostic Kit

مرحله	زمان	دما	تعداد سیکل
فعال شدن آنزیم پلیمرز	۳ دقیقه	۹۵ درجه سانتی‌گراد	۱
واسرشته شدن	۱۰ ثانیه	۹۵ درجه سانتی‌گراد	۴۵
اتصال و تکثیر اسید نوکلئیک (اندازمگیری میزان فلورسانس در کانال‌های سبز، زرد و نارنجی)	۳۰ ثانیه	۵۷ درجه سانتی‌گراد	

محتویات کیت

۱۰۰ واکنش	۲۵ واکنش	اجزای کیت
۲۴۰۰µl	۶۰۰µl	Q-ROMAX, 4X
۱۴۰۰µl	۳۵۰µl	Pro1 HPV Mix
۱۴۰۰µl	۳۵۰µl	Pro2 HPV Mix
۱۴۰۰µl	۳۵۰µl	Pro3 HPV Mix
۱۴۰۰µl	۳۵۰µl	Pro4 HPV Mix
۶۰۰µl	۱۵۰µl	Positive Control
۶۰۰µl	۱۵۰µl	Water (PCR Grade)

اقدامات پیشنهادی کار با مواد قبل از شروع واکنش

قبل از شروع هرگونه تست، هرکدام از ترکیبات کیت باید ذوب و ورتکس شوند. از ذوب و فریز مکرر نمونه‌ها بپرهیزید.

قبل از شروع کار

ترکیبات کیت را خارج کنید و بر روی میز کار قرار دهید. اجازه دهید بافرها به دمای محیط برسند و سپس به صورت مختصر هر تیوب را برای استفاده بعدی ورتکس کنید.

آماده‌سازی بافرها

تمامی اجزاء را از جعبه کیت بیرون آورده تا به دمای اتاق برسد. سپس هر کدام از اجزاء را قبل از مصرف، ورتکس مختصری نمایید. حجم نمونه تخلیص شده مورد استفاده در این تست باید ۵ میکرولیتر می باشد. مطابق جدول ۱ اجزای واکنش را آماده کرده و طبق جدول ۲ برنامه Real Time-PCR را اجراء کنید.

Viga Genotyping HPV Molecular Diagnostic Kit

Store at -20 to -25°C

In darkness

25 rxn

Cat NO: MD003060

100 rxn

Cat NO: MD003061

By ROJE

Edition, 02/2022

2022 ROJETechnologies, all rights reserve

پروتکل

Step 1:
Equilibrate Q-RoMax,
and Pro1 HPV Mix or Pro2 HPV Mix
or Pro3 HPV Mix or Pro4 HPV Mix
to room temperature



Step 2:
pulse Vortex each of reagents



Step 3:
Add 6µl Q-RoMax, 4X into clean microtube



Step 4:
Add 14µl Pro1 HPV Mix or Pro2 HPV Mix
or Pro3 HPV Mix or Pro4 HPV Mix
to the previous tube



Step 5:
Add 5µl isolated DNA



Step 6:
Run the PCR program



Step 7:
Result interpretation

HPV1	HPV2	HPV3/HPV4	Internal Control	HPV
Positive (+) Positive (+) Positive (+)	+	+	+	Pro HPV 1 or Pro HPV 2 or Pro HPV 3
Positive (+) Positive (+) Positive (+)	+	+	+	Pro HPV 4
Positive (+) Positive (+) Positive (+)	+	+	-	No HPV
Positive (+) Positive (+) Positive (+)	+	-	+	No HPV
Positive (+) Positive (+) Positive (+)	-	+	+	No HPV
Positive (+) Positive (+) Positive (+)	-	-	+	No HPV
Control Result	-	-	-	No HPV 1 or Pro HPV 2 or Pro HPV 3 or Pro HPV 4

شکل ۱: مراحل آماده‌سازی بافرها و اجرای برنامه PCR و تفسیر نتایج حاصل

آنالیز نتایج

- تجزیه و تحلیل داده‌ها باید به صورت جداگانه برای هر میکس Pro HPV با استفاده از تنظیم دستی آستانه (Manual Threshold) انجام شود. خط آستانه برای هر نمونه باید در فاز نمایی منحنی‌های فلورسانس و بالاتر از هر سیگنال پس زمینه قرار گیرد.
- برای تفسیر نتایج به جدول زیر توجه کنید. این جدول نشان می‌دهد که هر یک از میکس‌های Pro HPV1 تا Pro HPV4، در هر یک از کانال‌های فلورسانس کدام تایپ را تشخیص می‌دهند.

Promix	Green	Yellow	Orange
Pro HPV1	31	16	18/45
Pro HPV2	51	Internal Control	56/66
Pro HPV3	39	33/52/58	6/11
Pro HPV4	35	68	59

- کنترل منفی (NTC) به عنوان کنترل آلودگی استفاده می‌شود. مقدار افزایش فلورسانس منحنی در کنترل منفی از مرز آستانه عبور نمی‌کند. اگر Ct کمتر از ۳۵ باشد به عنوان آلودگی احتمالی در نظر گرفته می‌شود. سیگنال‌های قوی، Ct بالای ۳۵ در کنترل منفی می‌تواند PCR artifacts

باشد که در این موارد می‌توان شکل منحنی را در نظر گرفت (منحنی S شکل تیبیکال نتیجه مثبت می‌باشد).

- کنترل داخلی باید در Ct ۳۵ یا قبل از آن برای همه نمونه‌های بالینی، مثبت باشد که نشان‌دهنده وجود اسیدنوکلئیک کافی انسانی بوده و نمونه از کیفیت قابل قبولی برخوردار است.
- منحنی کنترل داخلی با Ct > 37 یا بدون Ct نشان‌دهنده غلظت پایین نمونه یا مواد ممانعت‌کننده در واکنش است. در این شرایط توصیه می‌شود نمونه تخلیص شده حداقل ۱/۲ رقیق شود. اگر پس از تکرار آزمایش، نتیجه تست موردپذیرش نبود، باید یک نمونه تازه دیگر از بیمار گرفته و تست تکرار شود.
- نمونه بالینی مثبت باید Ct ≤ 40 داشته باشد.
- در صورت عدم دستیابی به واکنش مثبت مورد انتظار (منحنی S شکل تیبیکال)، آزمایش انجام شده موردپذیرش نمی‌باشد و با رعایت دقیق دستورالعمل‌هایی کیت، تست را دوباره تکرار کنید.
- علت عدم موفقیت در واکنش کنترل مثبت را تعیین کنید، اقدامات اصلاحی را انجام دهید و نتایج اقدامات اصلاحی را مستند کنید.
- برای اطلاع از نمونه‌های مثبت و منفی برای هر ران به جدول ۳ مراجعه کنید.



جدول ۳: شرایط قابل قبول برای نمونه‌های مثبت و منفی

نتایج	ROX/Texas Red	Yakima yellow	FAM	PROMIX
Positive:31 Positive: 16 Positive:18/ 45	+	+	+	Pro HPV 1
Positive:51 Positive:56/ 65	+	در نظر گرفته نمی- شود	+	Pro HPV2
Positive:39 Positive:33/ 52/58 Positive:6/1 1	+	+	+	Pro HPV3
Positive:35 Positive:68 Positive:59	+	+	+	Pro HPV4
نمونه منفی	-	+	-	Pro HPV2
نامعتبر و مورد پذیرش نمی‌باشد	-	-	-	Pro HPV 1 or Pro HPV 2 or Pro HPV 3 or Pro HPV 4