



**SIMBIOLAB**

## SimReal™ HPV MLA Screening Kit

Cat. No: SBL11-373/50

### محتویات کیت:

مقادیر در کیت	عنوان برجسب	اجزا
1ml	Reaction Mix	مسترمیکس
100 µl	HPV Oligomix	الیگومیکس HPV
100 µl	Control Oligomix	الیگومیکس Control
50 µl	Positive Control	کنترل مثبت HPV
50 µl	Negative Control	کنترل منفی HPV

### دستور کار:

تشخیص نوع HPV بر اساس تکثیر ناحیه خاص ژنوم پاتوزن با استفاده از پرایمرهای اختصاصی HPV و تایید محصول تکثیر شده با استفاده از آنالیز منحنی ذوب می باشد. وجود منحنی تکثیر و پیک های ذوب بین ۷۸ تا ۸۶ درجه سانتی گراد نشان دهنده وجود ژنوم ویروس و عدم وجود منحنی تکثیر و پیک های ذوب کمتر از ۷۰ درجه سانتی گراد نشان دهنده عدم وجود ژنوم ویروس پاپیلوما است.

### پروتکل:

#### الف) آماده سازی میکس PCR

برای هر واکنش PCR، دومیکس جداگانه (میکس HPV و میکس Control) با حجم مناسب برای نمونه منفی، نمونه مثبت و نمونه های آزمایش (n+1) آماده کنید. معرف ها باید مطابق نسبت های داده شده در جدول مخلوط شوند:

توجه: برای هر واکنش PCR، یک کنترل مثبت، یک کنترل منفی و یک نمونه شاهد (با آب مقطر) تهیه کنید.

حجم / واکنش	اجزای واکنش HPV
10 µl	مسترمیکس
2 µl	الیگو میکس HPV

حجم / واکنش	اجزای واکنش Control
10 µl	مسترمیکس
2 µl	الیگومیکس Control

۱۲ میکرولیتر از میکس آماده شده را به میکروتیوب اضافه کرده و به مقدار 5 میکرولیتر DNA استخراج شده یا DNA کنترل را به آنها اضافه کنید، سپس، آب مقطر استریل تا حجم نهایی ۲۰ میکرولیتر به هر واکنش اضافه کنید. آنها را در دستگاه Real-time PCR قرار دهید.

### معرفی کیت :

ویروس پاپیلوماى انسانی (HPV) یکی از شایع ترین گروه های ویروسی در جهان است که پوست و نواحی مخاطی بدن انسان را تحت تأثیر قرار می دهد. بیش از ۱۵۰ نوع HPV شناسایی شده است که بیش از ۴۰ نوع از آنها می توانند نواحی تناسلی را از طریق تماس جنسی آلوده کنند. انواع HPV بر اساس ارتباط آنها با سرطان طبقه بندی می شوند.

انواع انکوژنیک یا پرخطر HPV (HCR) می توانند باعث نئوپلازی داخل اپیتلیال ناحیه آئوزیتال از جمله سرطان دهانه رحم، واژن، آلت تناسلی و مقعد و همچنین برخی از سرطان های اوروفارنکس شوند.

از سوی دیگر، انواع کم خطر HPV عموماً باعث ایجاد زگیل تناسلی می شوند، اما باعث سرطان دهانه رحم نمی شوند.

### اساس کار:

کیت غربالگری HPV با استفاده از منحنی تکثیر توالی اختصاصی HPV و "تحلیل منحنی ذوب" (MLA) برای غربالگری سریع و ارزان نمونه های بالینی از نظر وجود ژنوم ویروس پاپیلوما طراحی شده است.

با استفاده از پرایمرهای اختصاصی و رنگ SYBR Green می توان بیش از ۴۰ نوع ویروس پاپیلوما از جمله انواع پرخطر و کم خطر، را شناسایی کرد. پرایمرهای یونیورسال مورد استفاده در این کیت با پرایمرهای مورد استفاده در کیت های ژنوتایپینگ HPV (اعم از کیت های مبتنی بر RealTime PCR و Reverse Dot Blot) یکسان بوده و در نتیجه تمام گونه های قابل شناسایی با کیت های ژنوتایپینگ با کیت HPV Screening MLA قابل شناسایی است.

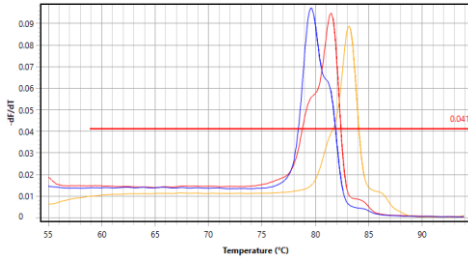
## ب) برنامه دمایی واکنش Real time PCR

دستگاه را طبق پروفایل دمایی زیر تنظیم کنید.

Step	Temp	Time	Data Collection	Cycle
Initial activation	95°C	15 min		1X
Denaturation	95°C	30 s		40-45X
Annealing	53°C	30 s		
Extension	72°C	30 s	*	
Melt curve analysis	55°C_99°C	...		...

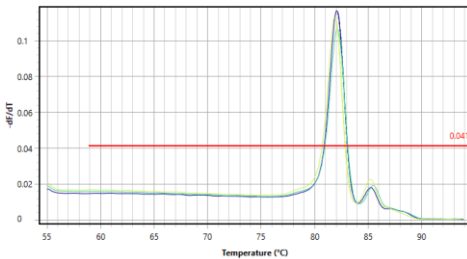
Acquisition باید در کانال FAM انجام شود.

توجه: برنامه دمایی مناسب واکنش را می توانید در [www.sim-biolab.com](http://www.sim-biolab.com) مشاهده و دانلود کنید.



تصویر ۲: منحنی ذوب HPV در محدوده های دمایی مشخص در یک واکنش با نمونه های مثبت

۲. نمونه ای منفی در نظر گرفته می شود که در لوله واکنش HPV پیک تکثیر نداشته و یا دارای پیک ذوب در محدوده دمایی خارج از ۷۹-۸۴ درجه باشند.



تصویر ۳: منحنی ذوب کنترل داخلی در محدوده دمایی مشخص

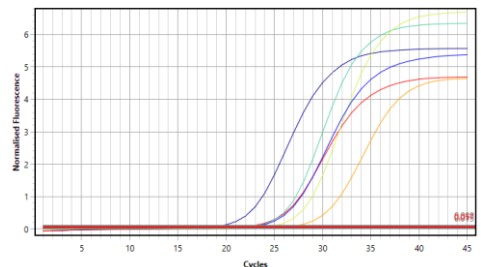
## تحلیل داده ها:

آنالیز نمونه ها بر اساس بررسی منحنی تکثیر و منحنی ذوب نمونه ها انجام می شود.

نتایج را با در نظر گرفتن نکات زیر تفسیر کنید:

۱. تمامی نمونه ها (به غیر از نمونه NTC) باید در لوله های مربوط به پرایمر کنترل منحنی تکثیر مثبت داشته باشند. این پیک مربوط به پرایمر کنترل داخلی می باشد که برای ارزیابی احتمال استخراج نامناسب یا مهار واکنش و جلوگیری از نتایج منفی کاذب است.
۲. نمونه ای مثبت در نظر گرفته می شود که در لوله واکنش HPV پیک تکثیر مثبت داشته و در محدوده دمایی ۷۸-۸۶ دارای پیک ذوب واضح باشند.

نکته نمونه هایی که فاقد منحنی تکثیر در لوله Control - و دارای منحنی تکثیر در لوله HPV باشند، به شرط دارا بودن پیک ذوب مناسب به عنوان نمونه های مثبت در نظر گرفته می شوند.



تصویر ۱: منحنی تکثیر HPV و کنترل داخلی

آدرس: ایران، مشهد، پژوهشکده بوعلی، اتاقهای تمیز مرکز رشد فناوری سلامت

همراه: +۹۸ ۹۱۰ ۳۸۳ ۱۴ ۰۷

تلفن: +۹۸ ۳۷۲ ۰۰ ۴۹۰

Web address: [www.simbiolab.co](http://www.simbiolab.co)

E-mail: [info@simbiolab.co](mailto:info@simbiolab.co)