## کیت استخراج HPV-DNA ۵۰ تستی

**(CN: KPG-HPVDNA)**

**محتویات کیت:**

- **بافر لیز A (CN: KPG-KLS)؛ ۱ ویال ۲۰ میلی لیتری**
- **بافر لیز B (CN: KPG-KLSB)؛ ۱ ویال ۲۵ میلی لیتری**
- **بافر لیز C (CN: KPG-KLSC)؛ ۱ ویال ۵ میلی لیتری**
- **بافر رسوب دهنده (CN: KPG-PS)؛ ۱ ویال ۲۵ میلی لیتری**
- **بافر شستشو (KPG-WBp)؛ ۲ ویال ۲۵ میلی لیتری**
- **آب مقطر DNase free (CN: KPG-DW)؛ ۱ ویال ۵ میلی لیتری**
- **حامل (Carrier) (KPG-Car) ۱ ویال ۱ میلی لیتر**
- **ستون استخراج همراه با کالکشن تیوب؛ ۵۰ عدد**
- **کالکشن تیوب؛ ۱۰۰ عدد**

**دیگر موارد مورد نیاز:**

سمپلر ۱۰۰۰ و ۱۰۰ میکرولیتری متغیر، میکروتیوب ۱/۵ میلی لیتری

**نمونه:** این کیت برای استخراج DNA از نمونه HPV مثبت طراحی شده است. با استفاده از کیت استخراج DNA شرکت کارمانیا پارس ژن شما می توانید از تمامی نمونه ها حتی بافت، از ویروس HPV مقادیر زیادی DNA استخراج نمایید. با این تفاوت که در صورت استفاده از بافت، ابتدا بایستی نمونه بافت در بافر هموژن کننده شرکت کارمانیا پارس ژن (CN: KPG-HBt) کامل هموژن شود (بافر مورد نظر به صورت مجزا قابل تهیه می باشد). **در موراد استخراج از محیط انتقالی نیاز به این بافر نیست.** لازم به ذکر است که کیت حاظر قادر به جداسازی DNA ژنومیک از خون، کشت سلول و دیگر ویروس ها نیز می باشد. برای استفاده از نمونه های دیگر به جز محیط انتقالی HPV از مقادیر زیر استفاده نمایید:

۱. خون، سرم و پلاسما: ۲۰۰ میکرولیتر
۲. کشت سلول: حداکثر تا $۱ \times ۱۰^{۷}$ سلول
۳. بافت هموژنیزه شده: ۳۰ تا ۵۰ میلی گرم بافت هموژنیزه شده در حجم ۵۰۰ میکرولیتر بافر هموژنیزه کننده و در نهایت برداشت ۲۰۰ میکرولیتر

**مراحل استخراج DNA**

برای استخراج HPV-DNA بایستی ابتدا محیط انتقالی کامل مخلوط شود و از آن به میزان ۱/۵ میلی لیتر به میکروتیوب درب دار ۱/۵ میلی لیتری DNase/RNase free اضافه کرده و در ادامه در دور ۱۳/۰۰۰ به مدت ۳ دقیقه سانتریفیوژ شود. مایع رویی را کامل تخلیه کرده و بر روی رسوب باقیمانده موارد زیر اعمال شود:

- ۲۵۰ میکرولیتر از **بافر لیز A** به میکروتیوب حاوی رسوب اضافه کرده و به شدت به مدت ۵ ثانیه بر روی وورتکس مخلوط کنید و در دمای اتاق به مدت ۵ دقیقه انکوبه کنید.
- ۲۵۰ میکرولیتر از **بافر لیز B** به همراه ۱۰ میکرولیتر از حامل (Carrier) به میکروتیوب اضافه کرده و به شدت به مدت ۵ ثانیه بر روی وورتکس مخلوط کنید و در دمای اتاق به مدت ۵ دقیقه انکوبه کنید.
- ۱۰۰ میکرولیتر از **بافر لیز C** به میکروتیوب اضافه کرده و به شدت به مدت ۵ ثانیه بر روی وورتکس مخلوط کنید و در دمای اتاق به مدت ۵ دقیقه انکوبه کنید.
- ۳۰۰ میکرولیتر از **بافر رسوب دهنده سرد** به میکروتیوب اضافه کرده و به آرامی با حرکت دست مخلوط کنید و در دمای ۲۰- درجه سانتیگراد (فریزر) به مدت ۵ دقیقه انکوبه کنید.
- محتویات میکروتیوب را به ستون های استخراج DNA اضافه کرده و به مدت دو دقیقه در دمای اتاق انکوبه کنید و در ادامه در دور ۱۲/۰۰۰ RPM و به مدت ۳۰ ثانیه سانتریفیوژ کنید.
- ستون را به کالکشن تیوب جدید منتقل کرده و به میزان ۵۰۰ میکرولیتر **بافر شستشو** اضافه کنید و در ادامه در دور ۱۲/۰۰۰ RPM و به مدت ۳۰ ثانیه سانتریفیوژ کنید.
- ستون را به کالکشن تیوب جدید منتقل کرده و به میزان ۴۰ میکرولیتر **آب مقطر DNase/RNase free** اضافه نمایید و به مدت ۲ دقیقه در دمای اتاق انکوبه کنید. دقت کنید بهتر است دمای آب مقطر در **حدود ۶۰ درجه سانتیگراد** باشد تا جداسازی HPV-DNA بهتر انجام شود.

در ادامه ستون ها را در دور ۱۲/۰۰۰ RPM و به مدت ۱ دقیقه سانتریفیوژ کنید. محلول به دست آمده حاوی HPV-DNA است و پیشنهاد می شود برای انجام PCR به میزان ۵ میکرولیتر در حجم نهایی ۲۰ میکرولیتر PCR از این HPV-DNA خالص شده استفاده کنید.

**عیب یابی (Troublshooting):**

کیت حاضر به میزان زیادی کنترل کیفی شده و احتمال برخورد با مشکل بسیار پایین می باشد. با این وجود در مواردی ممکن است در استفاده از این کیت با مشکلاتی مواجه شوید. برای حل این موارد به جدول زیر مراجعه کنید:

| مشکل | علل احتمالی ایجاد مشکل | نحوه برطرف کردن مشکل |
|---|---|---|
| میزان استخراج کم DNA | عدم تعداد مناسب سلول | استفاده از مقادیر بیشتر نمونه |
| | کیت تاریخ مصرف گذشته | در زمان ذکر شده کیت مصرف شود |
| | میکروتیوب های حاوی DNase | از میکروتیب های DNase/RNase free |
| | استفاده از مقادیر کم محلول های لیز | دقیقا طبق پروتوکول کیت استخراج انجام شود. |
| عدم انجام تست PCR | وجود مهار کننده ها | مرحله شستشو به خوبی انجام شود |

**احتیاط لازم برای کار با کیت و محتویات آن**

- محلول لیز موجود در کیت دارای Ph بازی و اسیدی شدید می باشند. از طرفی مواد به کار رفته در این محلول ها در برخی موارد ممکن است برای سیست اعصاب محرک باشند. بنابراین در زمان کار با این محلول ها حتما از دستکش استفاده شود و در صورت تماس با پوست با مقادیر زیادآب شستشو گردد. در زمان تماس با چشم، با مقادیر زیادآب شستشو گردد و درصورت عدم بهبودی به مراکز درمانی مراجعه گردد.

باقی مواد موجود در کیت ایمن و فاقد خاصیت آسیب زایی به بافت انسان می باشند.

**با ما در تماس باشید**

**www.karmaniaparsgen.ir ۰۹۱۳۲۹۲۶۱۱۳**

**HPV-DNA extraction kit (50 RX)**
**(CN: KPG-DNABt)**

**Component of kit:**

- Lysis Buffer A (CN: KPG-LBat), 1 vial 20 mL
- Lysis Buffer B (CN: KPG-LBbt), 1 vial 25 mL
- Lysis Buffer C (CN: KPG-LBct), 1 vial 5 mL
- Precipitation (CN: KPG-PS), 1 vial 25 mL
- Wash Buffer (CN: KPG-WBp), 2 vial 25 mL
- DNase free water (CN: KPG-DW), 1 vial 5 mL
- Carrier (KPG-Car) 1 vial 1 ml
- High absorbent column (50 Preps)
- Collection tube (100 Preps)

**Other materials needed:** Samplers, Centrifuge, 1.5 mL tubes

**Sample**: This kit is designed to extract DNA from HPV positive samples. Using the DNA extraction kit of Karmania Pars Gene Company, you can extract large amounts of HPV DNA from all samples, even tissue. With the difference that if tissue is used, first the tissue sample must be completely homogenized in the homogenizing buffer of Karmania Pars Gene Company (CN: KPG-HBt) (the desired buffer can be prepared separately). **There is no need for this buffer when extracting from the transfer medium**. It should be noted that the current kit is able to isolate genomic DNA from blood, cell culture and other viruses. To use samples other than HPV medium, use the following values:

1. Blood, serum and plasma: 200 microliters.
2. Cell culture: up to $1 \times 10^7$ cells.
3. Homogenized tissue: 30 to 50 mg of homogenized tissue in a volume of 500 microliters of homogenizing buffer and finally take 200 microliters.

**Protocol:**

To extract HPV-DNA, the complete transfer medium (LBC) should be mixed first and 1.5 ml of it should be added to a 1.5 ml DNase/RNase free microtube and then centrifuged at 13.000 rpm for 3 minutes. Drain the supernatant completely and apply the following to the remaining sediment:

- Add 250 µL of lysis buffer A to the microtube containing the sediment and mix vigorously for 5 seconds on a vortex and incubate at room temperature for 5 minutes.
- Add 250 microliters of lysis buffer B along with 10 microliters of the carrier (Carrier) to the microtube and mix vigorously for 5 seconds on the vortex and incubate at room temperature for 5 minutes.
- Add 100 µL of lysis buffer C to the microtube and vortex vigorously for 5 seconds and incubate at room temperature for 5 minutes.
- Add 300 microliters of cold sedimentation buffer to the microtube and mix gently with hand movement and incubate at -20°C (freezer) for 5 minutes.
- Add the contents of the microtube to the DNA extraction columns and incubate for two minutes at room temperature and then centrifuge at 12.000 RPM for 30 seconds.
- Transfer the column to a new collection tube and add 500 microliters of washing buffer and then centrifuge at 12/000 RPM for 30 seconds.
- Transfer the column to a new collection tube and add 40 microliters of DNase/RNase free distilled water and incubate for 2 minutes at room temperature. Make sure that the temperature of the distilled water is around 60°C so that HPV-DNA purification can be done better.

Next, centrifuge the columns at 12/000 RPM for 1 minute. The obtained solution contains HPV-DNA and it is suggested to use this purified HPV-DNA to perform PCR in the amount of 5 µl in the final volume of 20 µl PCR.

**Troublshooting**:

The present kit is highly quality controlled and the probability of encountering a problem is very low. However, in some cases, you may encounter problems using this kit. Refer to the following table to solve these issues:

| Troubleshot | Reason | Solving |
|---|---|---|
| Low yeild | Low sample | Use more cell size |
| | Expired kit | Use the kit with valid ET |
| | Existence of DNase | Use DNase free microtubes and sampler tips |
| | Using low volume of lysis buffer | Purify according to the kit protocol |
| PCR false negative | Existense of inhibitors | Washing the column one more time |

Necessary precautions for working with the kit and its contents

- The lysing solution in the kit has a very alkaline and acidic pH. On the other hand, the substances used in these solutions may in some cases be stimulating for the nervous system. Therefore, when working with these solutions, be sure to use gloves and in case of contact with the skin, wash with large amounts of water. In case of contact with the eyes, wash with large amounts of water and if there is no improvement, refer to medical centers.

The rest of the materials in the kit are safe and do not cause damage to human tissue.

**Contact us:**
**http://.karmaniaparsgene.com**
**karmaniaparsgene@gmail.com**
09132926113 +983434208024-5