

CedQual JAK2 V617F Mutation RT-PCR Detection kit

REF: JAK-01-24T

Reaction: 24 T

موارد استفاده:

کیت تشخیص جهش JAK2 V617F Mutation یک کیت تشخیصی آزمایشگاهی بر پایه Real-Time PCR است که برای شناسایی جهش آلل V617F در ژن JAK-2 (جانوس کیناز ۲) در DNA ژنومی استخراج شده از نمونه خون کامل حاوی ماده ضد انعقادی EDTA طراحی شده است. این تشخیص در برابر DNA ژنومی نوع وحشی (Wild Type) انجام میشود. جهش مشاهده شده یک جایگزینی باز گوانین به تیمیدین در موقعیت 1849 ژن JAK-2 است که منجر به جایگزینی والین به فنیل آلانین در موقعیت 617 پروتئین میشود.

اطلاعات پایه ای:

ژن JAK-2 دستورالعمل هایی برای تولید پروتئینی ارائه میدهد که این پروتئین مسئول ترویج رشد و تقسیم سلولها میباشد. این پروتئین بخشی از یک مسیر سیگنال دهی بنام مسیر JAK/ATAT است که سیگنالهای شیمیایی را از خارج سلول به هسته سلول منتقل میکند. جهشهای سوماتیک در ژن JAK با بیماری ترومبوسیتوز اولیه مرتبط هستند. ترومبوسیتوز اولیه اختلالی است که با افزایش تعداد پلاکتها (سلولهای خونی دخیل در فرآیند طبیعی لخته سازی خون) مشخص میشود.

شایعترین جهش (V617F) باعث جایگزینی توالی (اسید آمینه) سازنده پروتئین والین با اسید آمینه فنیل آلانین در موقعیت ۶۱۷ پروتئین میشود. این جهش خاص در حدود نیمی از افراد مبتلا به ترومبوسیتوز اولیه مشاهده میشود. جهش JAK2 نوع V617F منجر به تولید پروتئینی از JAK2 میشود که بطور مداوم فعال است. این وضعیت در ترومبوسیتوز اولیه منجر به تولید بیش از حد سلولهای خونی غیر طبیعی بنام مگاکاریوسیت ها میشود. از آنجا که پلاکتها از مگاکاریوسیتها تشکیل میشوند، تولید بیش از حد مگاکاریوسیت ها منجر به افزایش تعداد پلاکتها میگردد. پلاکتهای اضافی میتوانند باعث لخته سازی غیر طبیعی خون شوند که منجر به بروز علائم و نشانه های مختلف بیماری ترومبوسیتوز اولیه میگردد.

توصیف محصول:

کیت تشخیص جهش JAK2 V617F یک کیت تشخیصی In Vitro مبتنی بر روش Real-Time PCR است که برای شناسایی آلل JAK2 (Janus Kinase 2) V617F در DNA ژنومی استخراج شده از خون کامل حاوی EDTA

طراحی شده است. این تشخیص در زمینه DNA ژنومی نوع وحشی (Wild Type) انجام میشود. ژن بتا اکتین (Beta Actin) بعنوان کنترل داخلی استفاده میشود. این کیت جهت مصارف حرفه ای طراحی شده است.

مشخصات تحلیلی:

این کیت دارای اختصاصیت ۱۰۰٪ و حساسیت ۱۰۰٪ میباشد. حد تشخیص (LOD) کیت برای ژن هدف JAK2 برابر با ۱۰ کپی از جهش در هر ماکرولیتر میباشد.

محتویات داخل کیت:

SI/No	Components	Volume
1	2X Master Mix (MM)	300 µL
2	20X Primer & Probe Mix (PPMX)	30 µL
3	Nuclease free Water (NFW)	500 µL
4	Positive Test Control (PTC)	25 µL

مشخصات فلورسنت پروب:		
Target	Reporter	Quencher
JAK-2 Gene	FAM	BHQ1
Beta-Actin	TEXAS RED/ROX	BHQ2

*توجه: در برخی از دستگاه های ریل تایم گزینه ی BHQ در دسترس نمی باشد، لطفاً در این دستگاه ها در مقابل Quencher گزینه "NONE" را انتخاب کنید.

شرایط نگهداری و حمل و نقل:

- تمام معرف ها و بافرهای کیت تشخیص کمی JAK-2 Real-Time PCR را در دمای ۲۰- درجه سانتی گراد نگهداری کنید.
- معرفهای کیت را پشت سر هم بیشتر از ۵ بار ذوب و منجمد (Freeze Thaw) نکنید زیرا منجر به کاهش حساسیت سنجش کیت میشود. ذوب معرف ها را فقط روی یخ و یا در دمای ۴ درجه سانتی گراد انجام دهید.
- پایداری اجزای کیت در صورتی که در دمای ۲۰- درجه سانتی گراد نگهداری شود، تا پایان تاریخ انقضاء کیت میباشد که روی جعبه درج شده است. ماندگاری این کیت ۱۲ ماه از تاریخ تولید میباشد.

اقدامات احتیاطی:

- توصیه میشود این محصول توسط متخصص آموزش دیده با روش Real-Time PCR و در شرایط In Vitro مورد استفاده قرار گیرد.
- تمام نمونه ها را بصورت بالقوه به عنوان نمونه های عفونی در نظر بگیرید.
- هنگام کار با نمونه ها از دستکش یکبار مصرف بدون پودر، محافظ چشم و روپوش آزمایشگاه استفاده کنید.
- نمونه های مثبت/و یا مواد (کنترل) مثبت کیت را از سایر محتویات کیت جدا کرده و بصورت جداگانه نگهداری کنید.
- برای آماده سازی مستر میکس و الگو از فضاهاى جداگانه استفاده کنید و برای آماده سازی، زیر محفظه کابینت های ایمنی زیستی کار کنید.
- از سر سمپلرهای حائل (مانعت کننده از انتشار) آئروسل استفاده کنید و در حین کار مرتب دستکش های خود را عوض کنید.
- برای جلوگیری از آلودگی با امپلیکونها (قطعات DNA تکثیر شده)، از باز کردن درب تیوب/پلیت ها بعد از انجام واکنش ریل تایم اجتناب کنید.
- از خوردن، آشامیدن و سیگار کشیدن در محیطی که بافرهای کیت / نمونه های انسانی مورد استفاده قرار میگیرد اجتناب کنید.
- از مصرف محتویات کیت تاریخ گذشته اجتناب کنید.

دفع زباله:

- تمام زباله / باقی مانده های مواد شیمیایی استفاده شده در تهیه مخلوط واکنش و اجزای کیت منقضی شده را همراه با زباله های زیستی طبق دستورالعمل راهنمای آزمایشگاه / دستورالعمل های عمومی مدیریت زباله های زیستی دفع کنید.
- پلیت / تیوب های PCR حاوی نمونه ی بیماران را پس از واکنش بصورت مهر و موم شده دفع کنید تا از احتمال عفونت برای اپراتورها و آلودگی محیط آزمایشگاه جلوگیری شود.

مخلوط واکنش:

Reagents	1 Rxn	24 Rxn
Master Mix	12.5 μ L	300 μ L
Primer & Probe Mix	1.25 μ L	30 μ L
Nuclease Free Water	5.25 μ L	126 μ L
TOTAL	19 μ L	456 μ L

مقدار ۶ ماکرولیتر از RNA/cDNA مورد آزمایش را به ازای هر واکنش اضافه کنید.

آماده سازی مخلوط واکنش:

۱. تمام محتویات کیت را روی یخ ذوب کنید، با استفاده از ورتکس به آرامی مخلوط کرده و محتویات را به مدت ۵ ثانیه با اسپینر بچرخانید و بلافاصله از آن استفاده کنید.
۲. برای آماده سازی میکس واکنش، تعداد واکنش ها را برای هر آزمایش به اضافه تعداد همه ی کنترل ها و یک حجم اضافه در کوکتل واکنش برای جبران خطاهای پیتینگ محاسبه کنید.
- به عنوان مثال: تعداد واکنش ها بر اساس تعداد نمونه بیمار (n) + تعداد کنترل ها = ۱۰ (به تعداد ۱۰ واکنش حین آماده سازی یک واکنش اضافه میکنیم تا خطای پیتینگ را برطرف کنیم)
۳. میکس واکنش را درون یک میکروتیوب ۲ / ۱.۵ میلی لیتری و در اتاق مخصوص آماده سازی مسترمیکس آماده کنید.
۴. میکروتیوب حاوی مخلوط واکنش را با دور پایین اسپین کنید و حجم ۱۹ ماکرولیتر از مخلوط را درون هر چاهک از استریپ و یا پلیت های ۹۶ خانه الیکوت کنید.

۵. قبل از اینکه پلیت حاوی مخلوط واکنش را به اتاق مخصوص اضافه کردن RNA/DNA نمونه (Template) منتقل کنید، در چاهک مخصوص NTC میزان ۶ ماکرولیتر آب عاری از نوکلئیک اسید (Nuclease Free Water) اضافه کنید و درب آن را ببندید.
۶. در اتاق مخصوص اضافه کردن Template با احتیاط ۶ ماکرولیتر از DNA نمونه ی بیمار را که روی یخ نگهداری کرده اید به درون چاهک های مورد نظر اضافه کنید.
۷. در زیر هود جداگانه، حجم ۲ ماکرولیتر از کنترل مثبت کیت را درون چاهک مورد نظر بریزید و با اضافه کردن ۴ ماکرولیتر آب عاری از نوکلئیک اسید به درون چاهک، به حجم ۶ ماکرولیتر برسانید.
۸. آزمایش باید همراه با کنترل های مثبت و منفی اجرا شود.

شرایط چرخه دمایی				
STEP	TEMP (°C)	TIME	QUANTITATION	CYCLE
Hold	95	2 min	Off	1
PCR & Detection	95	15 sec	Off	40
	58	30 sec	ON	

شرایط چرخه دمایی

تحلیل داده ها / خوانش نتایج تست:

- NTC ها (کنترل های منفی) باید منفی باشند و نباید منحنی تقویت فلورسانس که خط آستانه را قطع میکند، نشان دهند.
- اگر یک نتیجه مثبت کاذب با یک یا چند پرایمر و پروب در واکنشهای NTC مشاهده شود، نشان دهنده آلودگی نمونه است.
- در چنین مواردی، آزمایش را نامعتبر اعلام کرده و با رعایت دقیق تر دستورالعملهای روش انجام، آزمایش را مجدداً تکرار کنید.
- کنترل مثبت، باید نتیجه مثبتی با مقدار Ct مورد انتظار برای هر هدف گنجانده شده در تست ایجاد کند.
- اگر واکنش مثبت مورد انتظار حاصل نشود، آزمایش را نامعتبر اعلام کرده و با رعایت دقیق تر دستورالعمل ها، آزمایش را تکرار کنید.
- پس از اتمام اجرای ران ریل تایم، داده های بدست آمده را مطابق دستورالعمل سازنده دستگاه Real-Time PCR تجزیه و تحلیل کنید.

- تحلیل داده ها باید برای هر هدف (Target) جداگانه با رسم تنظیمات آستانه (Threshold) بصورت دستی انجام شود.
- در صورتی که کنترل داخلی برای یک نمونه کار نکرد، آزمایش را بر روی آن نمونه با ۲ یا چند رقیق سازی تکرار کنید.
- نتایج مثبت برای JAK2 نباید به تنهایی بعنوان مبنای درمان قرار گیرد.

ارزیابی نتایج بدست آمده		
For JAK2	Beta Actin Internal Control	Assay Result
$Ct < 40$	$Ct \leq 40$	مثبت
$Ct = \text{Undetermined or } Ct \geq 40$	$Ct \leq 40$	منفی
$Ct = \text{Undetermined or } Ct \geq 40$	$Ct \geq 40 \text{ Undetermined}$	غیر قابل قبول: استخراج مجدد نوکلئیک اسید از نمونه و تکرار مجدد تست.

تفسیر داده ها:

JAK2 FAM	IC Texas Red/ROX	تفسیر داده ها
+	+	جهش JAK2 V617F تشخیص داده شد.
-	+	جهش JAK2 V617F تشخیص داده نشد.
-	-	نتایج غیر قابل قبول: استخراج DNA مجدد تکرار شود و تست تکرار شود.

آگاهی و هشدارها:

- معرف کنترل مثبت هیچ تکثیری نداشته و Amplify نشده است:
- ✓ نگهداری نامناسب معرف های کیت:

- معرف های کیت را در دمای توصیه شده برای عملکرد بهینه نگهداری کنید.
- از انجماد و ذوب مکرر خودداری کنید.
- تاریخ انقضای معرف ها را بررسی کنید.

- معرف کنترل منفی تکثیر شده و جواب مثبت را نشان میدهند:

✓ آلودگی متقابل اتفاق افتاده است:

- از روشها و پروتکل های صحیح آزمایشگاهی برای جلوگیری از ایجاد آلودگی پیروی کنید.
- از یک گروه جدید از معرف ها استفاده کنید و آزمایش را تکرار کنید.

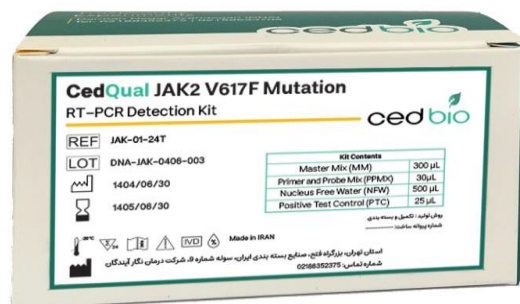
- نمودار غیر طبیعی / یا مقادیر کم ΔRn در منحنی تکثیر:

✓ خط پایه (Baseline) به درستی تنظیم نشده است (برخی از نمونه ها دارای مقادیر CT کمتر از مقدار پایه هستند)

- در تنظیمات دستگاه خط پایه را از حالت دستی به حالت اتوماتیک تغییر دهید و یا سطح خط پایه را به صورت دستی به CT پایین تر منتقل کنید (۲ سیکل قبل از منحنی تکثیر برای نمونه ایی که از خط آستانه عبور کرده است)

- یک سیگنال تکثیری در سیکل های اولیه مشاهده میشود:

✓ نمونه را رقیق کنید تا مقدار CT افزایش یابد.



Cedbio:

**8th kilometer of Fath Highway, Iran Packaging Industries Company - Hall No. 9,
Tehran, Iran**



24 Reaction