دفترچه راهنما

کیت شناسایی و سنجش کیفی

جهش JAK2

با روش Real-Time PCR

JAK2 PCR kit

Doc. #: IFU-JAK2 01 Doc. Version: 01 Revision Date: 01-16-2023

فهرست مطالب

شماره رفرانس..... ۳

شرح کیت..... ۳

اصول..... ۳

اطلاعات جهش..... ۳

محتویات کیت..... ۴

نگهداری و انتقال کیت..... ۴

نکات احتیاط عمومی..... ۵

هشدارها و محدودیت‌ها..... ۷

عوامل تداخلی..... ۸

خالص‌سازی نوکلئیک اسید..... ۸

آماده سازی..... ۸

اضافه کردن الگو..... ۹

جدول شماره ۲. آماده سازی مواد..... ۹

برنامه دمایی..... ۹

جدول شماره ۳. برنامه دمایی دستگاه..... ۱۰

آنالیزنتایجRotor-Gene..... ۱۲

جدول تفسیر نتایج..... ۱۲

نشانه ها..... ۱۳

اطلاعات تماس..... ۱۳

شماره رفرانس

- BONJAK - 24

شرح کیت

این کیت بر اساس واکنش زنجیره‌ای پلیمراز (PCR) به صورت Real-Time ساخته شده است. این محصول برای تشخیص جهش JAK2 در شرایط آزمایشگاهی تهیه شده است. نتایج تشخیصی به‌دست‌آمده توسط این محصول باید همراه با سایر داده‌های بالینی یا آزمایشگاهی تفسیر شوند.

اصول

تشخیص پلی مورفیسم توسط واکنش زنجیره‌ای پلیمراز (PCR) بر اساس تکثیر ناحیه JAK-2 انجام میگیرد. در واکنش Real-Time PCR محصول تکثیر شده از طریق فلوروسنت شناسایی می‌شوند. مشاهده شدت فلوروسنت در حین واکنش PCR (به صورت Real-Time) تشخیص محصولات در حال تکثیر را بدون نیاز به بازکردن مجدد لوله‌های واکنش پس از اجرای PCR ممکن می‌سازد.

اطلاعات جهش

ژن JAK2 کد کننده ی یک پروتئین تیروزین کیناز می باشد که در تحریک رشد سلولی و تقسیم نقش دارد. این نقش به طور ویژه ای در کنترل تولید سلول های خونی در مغز استخوان مشاهده می شود. جهش در ژن JAK2 می تواند منجر به انواعی از نئوپلازی های میلوپرولیفراتیو (MPN) شود که شامل ترومبوسیتوز اولیه (ET)، پلی سیتمی ورا (PV) و میلوفیبروزیس اولیه (PMF)می باشند. بنابراین، تشخیص مولکولی این جهش، برای تشخیص انواعی از بیماری های MPN می تواند استفاده شود. به همچنین اثربخشی مداوای دارویی و مهار JAK2 نیز با انجام این تست می تواند بررسی گردد.

محتویات کیت

Title	24 Tests
JAK2 Master mix	360 µl/tube × 1
Positive Control (0.1%)	100 µl/tube × 1

نگهداری و انتقال کیت

- ✓ کلیه محتویات این کیت باید در دمای۲۰- درجه سانتی‌گراد و در تاریکی نگهداری‌گردد، همچنین به منظور انتقال و جابه‌جایی کیت از یونولیت با درب و یخ‌خشک استفاده نمایید.
- ✓ از نگهداری کیت دردمای ۴ درجه سانتی‌گراد بیشتر از یک ساعت جدا خودداری نمایید.
- ✓ این کیت نیاز به حمل برروی بسته‌های یخزده (Frozen Ice Pack) را دارد.
- ✓ همه مواد موجود در کیت تا تاریخ انقضا، همان‌طور که روی برچسب بسته‌بندی محصول مشخص شده است، در شرایط مشخص شده پایدار هستند.
- ✓ از چرخه‌های متعدد ذوب و انجماد (Freeze-Thaw) خودداری کنید زیرا سبب کاهش حساسیت و درنتیجه عدم کارایی کیت می‌شود.
- ✓ از قراردادن مستقیم اجزای کیت در معرض نور، گرما یا رطوبت خودداری کنید.
- ✓ معرف‌ها را قبل از استفاده در دمای اتاق (۱۵ تا ۲۵ درجه سانتی‌گراد) ذوب کنید. پس از ذوب شدن مواد موجود در کیت، لوله‌ها را به طور مختصر اسپین نمایید تا مطمئن شوید که مواد موجود در کیت به طور یکنواخت مخلوط شده‌اند.

مواد و تجهیزات مورد نیاز که باید توسط کاربر تدارک دیده شود:

۱. کیت استخراج DNA از نمونه
۲. سمپلر قابل تنظیم در اندازه‌های مختلف و نوك سمپلر فیلتردار
۳. سانتریفوژ رومیزي
۴. بلوك خنك كننده
۵. وایتکس ۱۰ درصد
٦. گان و دستکش
۷. دستگاه با قابلیت خوانش در کانال‌های فلوروسنت مخصوص Cycling Green, Cycling Yellow
۸. نرم‌افزار دستگاه مورد استفاده
۹. استریپ و کپ مناسب دستگاه مورد استفاده

نکات احتیاط عمومی

۱. لطفاً دستورالعمل را با دقت بخوانید و قبل از استفاده محصول با تمام اجزای کیت آشنا شوید و درحین‌کار دستورالعمل را دقیقاً دنبال کنید.
✓ لطفاً قبل از استفاده، ابزارهای Real-Time PCR سازگار را بررسی کنید و فرآیند را با آن‌ها جلو ببرید.
✓ از کیت یا اجزای کیت پس از تاریخ انقضاء استفاده نکنید.
✓ در کیت آزمایش از ماده دیگری استفاده نکنید.
۲. از سرسمپلرهای فیلتردار و RNase & DNase free استفاده کنید.
۳. نگهداری و تخلیص نمونه‌های گرفته شده، باید در محلی کاملا جدا از محل نگهداری و آماده سازی مسترمیکس صورت پذیرد.
٤. همه مواد مورد نیاز کیت قبل از شروع کار باید به طورکامل در دمای اتاق ذوب شود.
٥. بعد از ذوب شدن، کلیه مواد را به خوبی پیپتاژ نمایید و به‌طور مختصر اسپین کنید. این امر برای جلوگیری از کاهش عملکرد کیت در طی زمان به‌طورکامل توصیه می‌شود.

٦. تمام مراحل مربوط به تهیه مسترمیکس باید بر روی یخ یا جعبه‌های سرد (Cooling Box)انجام شود. استوک اصلی مربوط به مسترمیکس بعد از برداشتن مقدار مورد نیاز از آن باید به سرعت به فریزر منتقل شود.

٧. هنگام کار با مواد شیمیائي، روپوش مناسب آزمایشگاهي، دستکش یکبار مصرف، وعینك‌هاي محافظ داشته باشید.

٨. کیت حاوی کنترل مثبت است. برای جلوگیری از آلودگی که ممکن است باعث ایجاد مثبت کاذب شود، کنترل مثبت را از سایر مواد موجود در کیت کاملا جدا کنید.

٩. PCR بسیار حساس به آلودگی متقابل است، پس فرآیند کار را با دقت انجام دهید.

١٠. هنگام کار با نمونه‌ها و مواد موجود در کیت، برای جلوگیری از آلودگی، دستکش‌ها باید مرتباً تعویض شوند.

١١. از تیپ‌های جداگانه و اختصاصی استفاده کنید. هنگام کار با نمونه‌ها و مواد موجود در کیت از میکروتیپ‌های فیلتردار برای جلوگیری از ورود آلودگی RNA و DNA استفاده کنید.

١٢. لطفاً لوله‌های PCR را با دو دستکش یکبارمصرف بسته‌بندی کرده و به درستی دور بیندازید. لوله‌های PCR را پس از تکثیر باز نکنید.

١٣. از استفاده ی مجدد مواد یکبار مصرف بپرهیزید.

١٤. مواد موجود درکیت که بلا استفاده شده اند، کیت استفاده شده و زباله‌ها باید به درستی دور انداخته شوند.

١٥. پس از آزمایش، محل کار را پاک کنید، پیپت‌ها و تجهیزات را با اسپری اتانول ٧٥٪ و وایتکس ١٠٪ تمیز کنید.

هشدارها و محدودیت‌ها

۱. تمامی مراحل آزمایش باید بر اساس اصول GLP[۱] توسط پرسنل آموزش دیده دارای پوشش حرفه ای و محافظ (PPE)[۲] انجام شود. آزمایش‌های بالینی بر نمونه‌های عفونی باید در هود کلاس دو (Class II Biological Safety Cabinet) در محیط BSL-2 (مطابق دستورالعمل: Interim Laboratory Biosafety Guideline For Handling and Processing Specimen Associated) انجام شود.

۲. پیشنهاد می‌شود هود و یا استیشن مورد استفاده قبل و بعد از کار با وایتکس ۱۰ درصد تمیز شود و همینطور بعد از کار لامپ UV زده شود.

۳. پیشنهاد می‌شود آماده‌سازی مخلوط واکنش از فضای اضافه کردن نمونه و کنترل مثبت جدا باشند زیرا ممکن است نتایج کاذب به وجود آید.

۴. پس از آماده‌سازی مخلوط واکنش، آن را در تاریکی نگهداری نمایید.

کنترل‌ها

۱. نمونه بیمار: از محتویات اسید نوکلئیک حاصل از استخراج DNA استفاده شود.

۲. کنترل منفی (NTC): همواره یک نمونه کنترل منفی حاوی آب بجای نمونه استفاده شود.

۳. کنترل مثبت 0.1% (PTC): از کنترل مثبت کیت به‌جای نمونه در یک واکنش استفاده شود.

نگهداری نمونه‌های گرفته شده

نمونه می‌تواند کمتر از ۸ ساعت در یخچال با محدوده دما از ۲ تا ۸ درجه سانتی‌گراد و برای نگهداری طولانی‌مدت آن، باید در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد منجمد شده و نگهداری شود.

تاریخ انقضای کیت

تاریخ انقضای کیت بر روی جعبه محصول درج شده است.

---

[۱] Good Laboratoty Practice

[۲] Personal Protective Equipment

عوامل تداخلی

EDTA (0.5M)، HCl (1N)، دانه‌های سیلیس (1μl)، خون (1μl)، اوره (۴۰ گرم در ۱۰۰ میلی‌لیتر) و بافر لیز عملکرد آزمایش را مهار می‌کنند. وجود مهارکننده در واکنش با ژن کنترل داخلی قابل ردیابی است.

خالص‌سازی نوکلئیک اسید

جداسازی اسید نوکلئیک باید توسط کیت‌های استخراج DNA موجود در بازار مطابق پروتکل‌های جداسازی مواد بالینی خاص انجام شود.

مواد نمونه باید از سلول‌های جدا شده از نمونه‌های بافت یا سواب استخراج شده باشد.

کیت استخراج DNA در این کیت گنجانده نشده است.

کنترل داخلی

برای ارزیابی کیفیت استخراج DNA و احتمال مهار PCR و جلوگیری از نتایج منفی کاذب، میکس حاوی پرایمرها و پروب یک ژن انسانی نیز می باشد. کنترل داخلی باید در کانال زرد در CT بین ۲۲ تا ۲۵ برای Gene-Rotor دیتکت شود.

آماده سازی

۱. ابتدا لوله‌ها را روی رک یخ بگذارید تا محتویات آن‌ها ذوب شوند و لوله‌ی MasterMix را به آرامی ورتکس کنید و به طور مختصر سانتریفیوژ کنید.

۲. میزان ۱۵ میکرولیتر از میکس MasterMix را به لوله ی PCR اضافه کنید.

نکته در هر بار انجام تست یک لوله به‌عنوان No Template Control (NTC) باید گذاشته شود. در NTC به‌جای نمونه استخراج شده از آب استفاده می‌شود که برای کنترل آلودگی واکنش کاربرد دارد.

اضافه کردن الگو

پس از آماده سازی محلول‌ها و انتقال آن به تیوب‌های واکنش، ابتدا نمونه کنترل منفی (NTC) را آماده کنید. برای این کار، ۵ میکرولیتر از آب بدون نوکلئاز را به تیوب کنترل منفی اضافه نمایید. پس از انتقال به منطقه کار با اسید نوکلئیک، ۵ میکرولیتر از نمونه‌های تحت تست و ۵ میکرولیتر از کنترل مثبت 0.1% را به تیوب‌های مربوطه اضافه نمایید (جدول ۲). سپس تیوب‌ها را در دستگاه ترمال سایکلر قرار داده و نمونه‌ها را نام‌گذاری کنید.

Reaction Setup	Volume
Master Mix	15 μl
Sample or Control	5 μl
Final Volume	20 μl

جدول شماره ۲. آماده سازی مواد

برنامه دمایی

دستورالعمل برای دستگاه‌های Real-Time PCR دارای دو کانال Green و Yellow شده است. پس از تنظیم‌کردن دستگاه مطابق برنامه زیر، واکنش را راه اندازی کنید. درصورت استفاده از دستگاه ABI StepOne گزینه‌رنگ‌رفرنس‌داخلی(Passive Refrence) را حذف کنید. برای آگاهی از نحوه تعریف کانال در دستگاه Rotor Gene به کاتالوگ دستگاه مراجعه کنید. مقادیر دمایی هر قسمت در جدول ۳ آورده شده است.

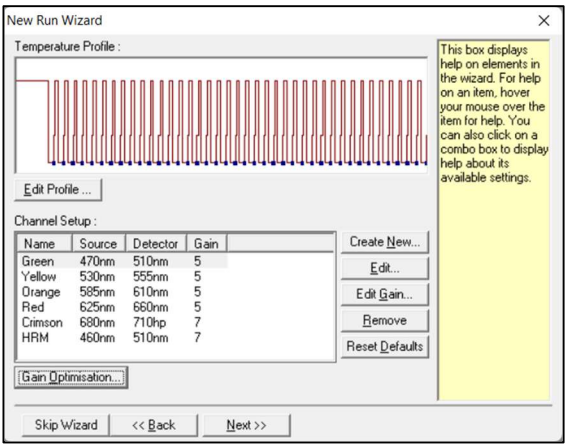
	Temperature	Hold	Cycle
Pre-Denaturation	95 ℃	4 min	1
Denaturation	95 ℃	15 sec	45
Annealing and Acquisition on Channel Green and yellow	60 ℃	45 sec	
Extention	72 ℃	20	

جدول شماره ۳. برنامه دمایی دستگاه

تعریف طیف سنجش فلورسنت در دستگاه ها

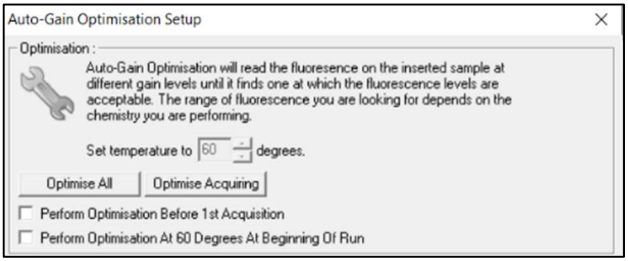
دستگاه **Rotor-Gene**

بدین منظور در دستگاه Rotor-gene گزینه‌ی Gain Optimization را انتخاب کنید (شکل ۱).



شکل ۱. تنظیمات دستگاه

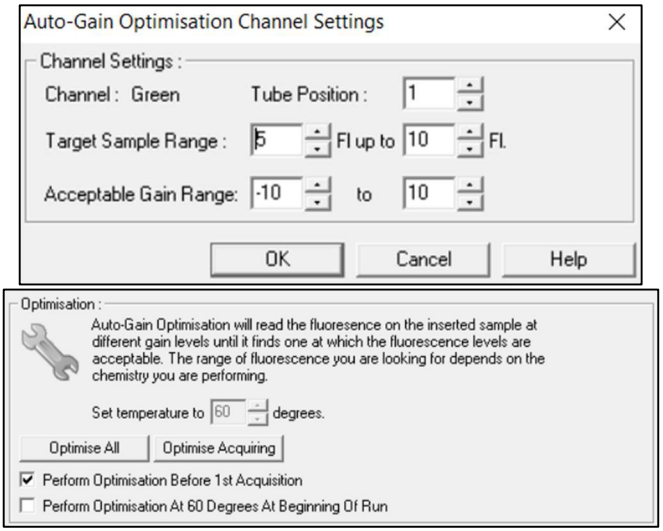
در این صفحه با انتخاب گزینه‌ی Optimise Acquiring برای کانال سبز و زرد بازه‌ی Target sample range از ۵ تا ۱۰ (حالت پیش‌فرض دستگاه) انتخاب شود (شکل ۲).



شکل ۲. تنظیمات دستگاه

همچنین Gain دستگاه باید برمبنای تیوب اول انجام شود.

پس از انتخاب بازه‌ی مناسب برای هر کانال، گزینه‌ی Perform Optimization Before 1st Acquisation را انتخاب کرده، و پنجره را ببندید (شکل ۳).



شکل ۳. تنظیمات دستگاه

آنالیزنتایج Rotor-Gene

آنالیز نتایج توسط نرم افزار مربوطه و بر اساس دستورالعمل دستگاه انجام شود. در کانال رنگی سبز و زرد، آستانه را روی گزینه‌ی 0.02 قرار دهید.

چنانچه نمونه در کانال سبز و زرد دارای منحنی سیگموئیدی و فاز لگاریتمی باشد، آنالیز نتایج بر اساس محاسبه‌ی اختلاف Ct بین دو نتایج کانال سبز و زرد انجام می‌شود.

۱. ابتدا ΔCt را برای کنترل مثبت 0.1% و همچنین نمونه بیمار محاسبه نمایید. برای این منظور، Ct بدست آمده برای هر نمونه را در کانال زرد از Ct بدست آمده در کانال سبز کسر نمایید.

$$\Delta Ct = Ct\ Green\ Ch - Ct\ Yellow\ Ch$$

در صورتی که شاهد منفی تا پایان تست منفی بماند ، Ctدر کانال سبز را معادل ٤٥ در نظر بگیرید.

با توجه به توضیحات فوق، آنالیز را به صورت زیر انجام دهید:

- ✓ در صورتی که ΔCT نمونه از ΔCt کنترل مثبت 0.1%، کمتر باشد نمونه از نظر جهش V617F مثبت است.
- ✓ در صورتی که ΔCt نمونه از ΔCt کنترل مثبت 0.1%، بیشتر باشد نمونه از نظر جهش V617F منفی است.

2. چنانچه نمونه فقط در کانال زرد دارای منحنی سیگموئیدی و فاز لگاریتمی باشد، نمونه دارای جهش JAK2 نمی باشد.

جدول تفسیر نتایج

ΔCt $(Ct_1 - Ct_2)$	Result
ΔCt Sample < ΔCt 0.1% Pos Ctrl	JAK-2 Positive
ΔCt Sample > ΔCt 0.1% Pos Ctrl	JAK-2 Negative

نشانه ها

	Research Use Only	برای مصارف پژوهشی
	Catalog Number	کد کالا
	Batch Number	شماره بچ تولید شده
	Temprature Limitation	محدودیت دمایی
	Concult Instructon For Use	مطالعه دستورالعمل
	Content sufficent for <n> tets	تعداد تست
	Use by	تاریخ انقضا
	Manufacturer	آدرس

اطلاعات تماس

شرکت فناوری بن یاخته -گروه سین مورو

دفتر مرکزی : تهران، سعادت آباد، میدان فرهنگ، بلوار ۲۴ متری سعادت آباد، خیابان حیدرنیا (دوم شرقی)، پلاک ۹، شرکت فناوری بن یاخته

کد پستی : ۱۹۹۷۷۷۵۵۵۵ پشتیبان فنی : ۰۹۳۰۱۸۲۱۶۰۱

تلفن های تماس : ۰۲۱۲۲۰۸۲۱۲۰

Web Site: www.Senmurv.co Email: info@senmurv.ir