راهنمای کیت
JAK2 MQ

جهت تشخیص و محاسبه درصد جهش V617F
به روش Real-Time PCR

جهت کار با دستگاه Rotor-Gene یا StepOne
مخصوص تحقیقات

NG-WI-ASL-48-100
ویرایش ۱/۰
زمستان ۱۴۰۰

Novin Gene

فهرست مندرجات

۱. مقدمه..... ۲

۲. محتویات کیت..... ۳

۳. شرایط نگهداری و پایداری کیت..... ۳

۴. سایر موارد مورد نیاز..... ۴

۵. نکات قابل توجه..... ۴

۶. نمونه مناسب و شرایط نگهداری و انتقال آن..... ۵

۷.عوامل مزاحم ۶

۸. استخراج DNA..... ۶

۹. دستور کار PCR..... ۷

۱۰. تنظیم دستگاه RotorGene..... ۷

۱۱. تنظیم دستگاه StepOne..... ۸

۱۲. تنظیم سایر دستگاه ها..... ۹

۱۳. آنالیز نتایج RotorGeneو StepOne ۹

۱۴. حساسیت..... ۱۵

کیت **JAK2 Quantitative** جهت تشخیص و کمیت سنجی موتاسیون JAK2 V617F در DNA انسانی برای استفاده با دستگاه RotorGene و StepOne طراحی شده است. این کیت مخصوص استفاده تحقیقاتی است.

۱. مقدمه

JAK2 مخفف Janus Kinase 2 است و معرف یک تیروزین کیناز است که در سیتوپلاسم واقع شده است. این آنزیم نقش مهمی در انتقال پیام های سیتوکین‌ها و هورمون‌های رشد دارد. جهش اکتسابی G1849T در ژن این آنزیم باعث جایگزینی آمینو اسید فنیل آلانین به جای والین می‌شود (V617F). در نتیجه این جهش، JAK2 به صورت دائمی فعال شده و موجب رشد مهار نشده‌ی سلول در غیاب هورمون های رشد می‌شود. این موتاسیون در اکثر بیماران دچار اختلالات myeloproliferative که BCR-ABL منفی می‌باشند مشاهده می‌شود. همچنین این موتاسیون یکی از ابزارهای تشخیصی پایه در polycythemia vera (PV)، essential thrombocythemia (ET) و primary myelofibrosis (PMF) می‌باشد.

کیت حاضر امکان بررسی نمونه جهت تشخیص و محاسبه درصد این جهش و همچنین تشخیص کیفی را به روش Real-Time PCR فراهم می‌کند. در این روش با استفاده از پروب های فلورسنت می‌توان محصول PCR را بررسی نمود بدون این که پس از پایان واکنش نیاز به انجام مراحل بعدی باشد. بنابراین امکان ایجاد آلودگی نیز به لحاظ تئوری وجود نخواهد داشت.

این کیت برای استفاده با دستگاه Rotor-Gene یا دستگاه StepOne طراحی شده است.

۲. محتویات کیت

این کیت شامل یک دفترچه راهنما، یک لوح فشرده و مواد زیر می باشد:

برچسب	محتوا	حجم
MJ Mix	میکس آماده برای JAK2 V617F *	۴۸۰ میکرولیتر
WJ Mix	میکس آماده برای JAK2 Wild type *	۴۸۰ میکرولیتر
MJ1	استاندارد ۱ V617F: صد هزار کپی در میکرولیتر	۱۵۰ میکرولیتر
MJ2	استاندارد ۲ V617F: ده هزار کپی در میکرولیتر	۱۵۰ میکرولیتر
MJ3	استاندارد ۳ V617F: هزار کپی در میکرولیتر	۱۵۰ میکرولیتر
MJ4	استاندارد ۴ V617F: صد کپی در میکرولیتر	۱۵۰ میکرولیتر
MJ5	استاندارد ۵ V617F: ده کپی در میکرولیتر	۱۵۰ میکرولیتر
WJ1	استاندارد ۱ Wild type: صد هزار کپی در میکرولیتر	۱۵۰ میکرولیتر
WJ2	استاندارد ۲ Wild type: ده هزار کپی در میکرولیتر	۱۵۰ میکرولیتر
WJ3	استاندارد ۳ Wild type: هزار کپی در میکرولیتر	۱۵۰میکرولیتر
WJ4	استاندارد ۴ Wild type: صد کپی در میکرولیتر	۱۵۰ میکرولیتر
WJ5	استاندارد ۵ Wild type: ده کپی در میکرولیتر	۱۵۰ میکرولیتر
Pos Ctrl	شاهد مثبت ٪۲/۵	۵۰ میکرولیتر
Neg Ctrl	شاهد منفی	۵۰ میکرولیتر
Water	آب مخصوص PCR	۲۰۰ میکرولیتر

* یک، دو یا چهار عدد، به ترتیب برای کیت های ۲۴، ۴۸ و ۹۶ واکنشی

۳. شرایط نگهداری و پایداری کیت

تمامی مواد کیت که در جدول بالا ذکر شده است باید در دمای ۲۰ درجه زیر صفر حمل و نگهداری شوند. در این صورت این مواد تا پایان زمان انقضا کیت که روی کیت و نیز روی هر لوله درج شده است پایدار و قابل استفاده می باشند.

از ذوب و انجماد مکرر و بیش از سه بار این مواد به ویژه میکس PCR خودداری کنید، زیرا باعث کاهش حساسیت و عدم کارایی آن ها می شود.

٤. سایر موارد مورد نیاز

برای استفاده از این کیت به تجهیزات و اقلام زیر نیاز دارید:

- دستگاه Real-Time PCR به همراه تجهیزات جانبی آن
- سانتریفوژ یخچال دار مخصوص میکروتیوب
- ورتکس (Vortex Mixer)
- بلوک حرارتی رومیزی (Dry Block Heater)
- سمپلر متغیر و سر سمپلر فیلتردار (Nuclease free)
- کیت استخراج DNA
- تیوب ۱/۷ میلی لیتری و میکروتیوب مخصوص Real-Time PCR
- دستکش لاتکس یا نیتریل بدون پودر
- بلوک آلومینیومی (بلوک سرد)

٥. نکات قابل توجه

برای پیشگیری از تولید نتایج کاذب به نکات زیر توجه کنید:

- هنگام کار با نمونه بیمار، همیشه فرض را بر آلوده بودن نمونه بگذارید و خطرات بالقوه آن را در نظر داشته باشید.
- در فضای pre-PCR یا Clean Room سه ناحیه را مشخص و از هم تفکیک کنید. این سه فضا شامل فضای نگهداری نمونه و استخراج، فضای آماده سازی مواد (برای افزودن میکس به لوله های PCR) و فضای آماده سازی واکنش (برای افزودن نمونه cDNA به لوله PCR) می باشند. هر یک

از سه فضای فوق باید وسایل مخصوص به خود، به ویژه سمپلر، را داشته باشند. از جابجایی وسایل بین این سه فضا پرهیز کنید.

- سطوح کار را همیشه قبل از شروع و پس از خاتمه کار با الکل ۷۰ درجه تمیز کنید.
- هنگام استفاده، مواد کیت را روی یخ خرد شده نگه دارید تا کاملا ذوب شده و با چند تکان ملایم از مخلوط و یکنواخت شدن محتویات هر لوله اطمینان حاصل کنید. سپس برای چند ثانیه آن ها را در دور پایین سانتریفوژ کنید.
- در حین کار، محتویات کیت را همیشه روی یخ خرد شده نگهداری کنید. از استفاده از یخ های قالبی و سایر موارد به غیر از یخ خرد شده پرهیز کنید.
- در حین کار، میکروتیوب های PCR را روی بلوک سرد گذاشته، و از گذاشتن آنها بر یخ خرد شده خودداری کنید.

٦. نمونه مناسب و شرایط نگهداری و انتقال آن

- نمونه مناسب برای آزمایش JAK2 با این کیت، خون کامل (peripheral blood) و یا نمونه مغز استخوان می‌باشد که در لوله استریل حاوی ماده ضد انعقاد جمع آوری شده است. ماده ضد انعقاد می تواند EDTA یا سیترات باشد. خون کامل را می‌توان تا ۷۲ ساعت در ۴ درجه نگهداری و به آزمایشگاه منتقل نمود.
- DNA را می‌توان مستقیماً از خون استخراج کرد. همچنین برای افزایش حساسیت تست می‌توان از بافی (buffy coat) استفاده کرد.
- برای نگهداری خون کامل یا بافی در زمان های طولانی تر از سه روز بهتر است آن را به حجم های کوچک تقسیم نموده و سپس در دمای ۲۰ درجه

زیر صفر نگهداری نمود. در چنین شرایطی نمونه تا چند ماه پایدار می‌ماند.

- نمونه مناسب باید حاوی DNA ،۲۵ ng/µl باشد. مقدار DNA کمتر از ۱۰ ng/µl یا بیشتر از ۵۰ ng/µl سبب کاهش حساسیت تست می‌شود.

۷. عوامل مزاحم

هپارین با غلظت بیش از ۱۰ واحد در میلی لیتر باعث مهار PCR می‌شود. به همین دلیل لوله حاوی هپارین به عنوان ضد انعقاد مناسب نیست و نباید استفاده شود. همچنین نمونه بیماران تحت درمان با هپارین نیز برای PCR مناسب نمی باشد. مقادیر بالای بیلیروبین (تا حداکثر ۴/۵ میلی گرم در دسی لیتر) و چربی (تا حداکثر ۱۰۰۰میلی گرم در دسی لیتر) و نیز همولیز خون برای این آزمایش مزاحمتی ایجاد نمی‌کند.

۸. استخراج DNA

برای استخراج DNA از نمونه از روش‌ها و کیت‌های مختلفی می‌توان استفاده نمود. ما استفاده از موارد زیر را توصیه می‌کنیم:

- High Pure PCR Template Preparation Kit (Cat# 11796828001, Roche Applied Science, Mannheim, Germany)
- QIAamp DNA Blood Mini Kit (Cat. no. 51104, Qiagen GmbH, Hilden, Germany)

برای رسیدن به حساسیت لازم، نمونه DNA استخراج شده باید دارای غلظت حدود 10-50 ng/µl باشد.

۹. دستور کار PCR

ابتدا تمامی لوله ها را روی یخ خرد شده قرار دهید تا بطور کامل محتویات آنها ذوب شوند. با چند تکان ملایم از مخلوط شدن مواد داخل آنها اطمینان حاصل کرده و برای چند ثانیه آن ها را در دور پایین سانتریفوژ کنید.

هر نمونه برای دو آلل جهش یافته و سالم باید بررسی شود. به این منظور دو آزمایش PCR در دو سری لوله های جداگانه باید انجام شود. در سری اول برای بررسی آلل جهش یافته (V617F) علاوه بر یک لوله برای نمونه هر بیمار، پنج لوله برای استانداردهای (MJ1-MJ5) و سه لوله برای شاهد مثبت، شاهد منفی و آب (NTC) در نظر بگیرید. در سری دوم و برای بررسی آلل سالم علاوه بر یک لوله برای نمونه هر بیمار، پنج لوله نیز برای استانداردها (WJ1-WJ5) و یک لوله برای شاهد مثبت، شاهد منفی و آب در نظر بگیرید. تعداد مورد نیاز لوله در دو سری جداگانه روی بلوک سرد بگذارید.

به هر لوله سری اول، ۲۰ میکرولیتر از MJ Mix و به هر لوله سری دوم، ۲۰ میکرولیتر از WJ Mix اضافه نمایید. سپس ۵ میکرولیتر از DNA نمونه و استاندارد و کنترل به هر لوله اضافه کنید و درپوش لوله ها را ببندید. سپس آن ها را مطابق شماره ها داخل دستگاه قرار دهید.

توجه: در صورت استفاده از دستگاه StepOne لوله ها را ابتدا به مدت کوتاهی سانتریفوژ نموده و سپس داخل دستگاه قرار دهید.

توجه: هنگام استفاده از دستگاه روتورژن، رینگ محافظ را نیز در پایان اضافه کنید.

۱۰. تنظیم دستگاه RotorGene

ابتدا اطمینان حاصل کنید که رینگ محافظ را روی روتور قرار داده اید!

دستگاه RotorGene را توسط کابل مخصوص آن با کامپیوتر متصل کرده و آن را به برق وصل کنید تا چراغ آبی جلوی آن روشن شود.

در لوح فشرده همراه کیت روی فایل "JAK2 MQ 0.2" و یا "JAK2 MQ 0.1" (با توجه به نوع میکروتیوب استفاده شده) دو بار کلیک کنید تا برنامه باز شود.

در منوی بالای صفحه دکمه استارت (دکمه سبز رنگ) را کلیک کنید. روی پنجره باز شده نیز دکمه استارت را کلیک کنید و فایل آزمایش را در محل مورد نظر ذخیره کنید تا دستگاه روشن شود.

در پنجره نمونه ها (samples) نام هر نمونه را وارد کنید. دقت کنید که دو صفحه جداگانه با نام های MJ و WJ تعریف شده اند و لوله های حاوی MJ Mix فقط در صفحه MJ و لوله های حاوی WJ Mix فقط در صفحه WJ باید نامگذاری شوند. در ستون "Type" نوع هر نمونه را نیز مشخص کنید، یعنی نمونه بیمار را با unknown، استانداردها را با standard و شاهد منفی را با Negative Control و نمونه اب یا NTC را با عنوان NTC تعریف کنید. غلظت استانداردها را نیز در ستون مربوطه وارد کنید.

۱۱. تنظیم دستگاه StepOne

نرم افزار دستگاه را باز کنید (StepOne software 2.*). از منوی Set Up روی دکمه Template کلیک کنید و فایل داخل لوح فشرده همراه کیت را انتخاب کنید. از منوی سمت چپ Plate Setup و سپس دکمه Assign Targets and Samples را انتخاب کنید. در کانال FAM دو تارگت با نام های MJ و WJ تعریف شده است. پنج استاندارد برای MJ، پنج استاندارد برای WJ و دو کنترل مثبت و کنترل منفی، همچنین NTC و چند نمونه از پیش تعریف شده اند. استانداردها، کنترل ها و تعداد نمونه مورد نظر خود را در ردیف دلخواه کپی کنید. برای این کار از گزینه های کلیک راست (copy, paste, clear) می‌توانید

استفاده کنید. همچنین با استفاده از منوی Define Targets and Samples می‌توانید تعداد نمونه های مورد بررسی را نیز اضافه کنید و نام نمونه ها را نیز مطابق نام بیماران تغییر دهید. در پایان تنظیمات دکمه Start Run را کلیک کنید و فایل آزمایش را در محل مورد نظر ذخیره کنید تا دستگاه شروع به کار کند.

۱۲. تنظیم سایر دستگاه ها

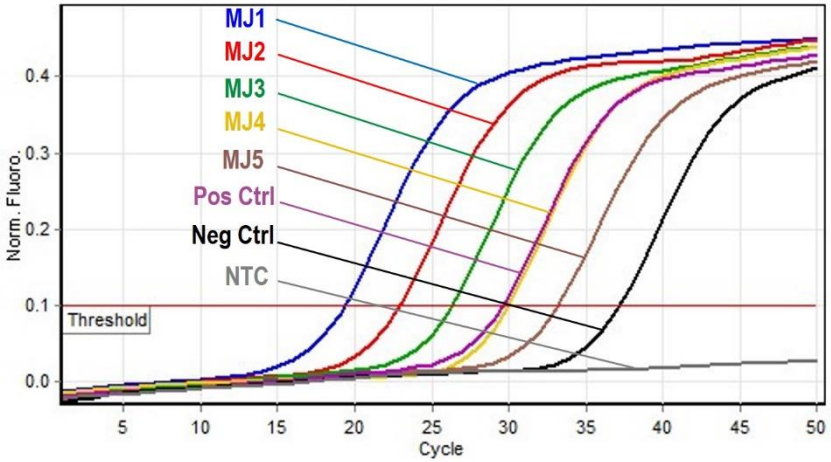
چنانچه این کیت را برای استفاده با سایر دستگاه های Real-Time PCR استفاده می‌کنید، دستگاه را مطابق برنامه زیر تنظیم نمایید:

Step	Temperature and time	Cycles
1	**95°C x 3 min**	1
2	**95°C x 15 sec**	50
	60°C x 60 sec	

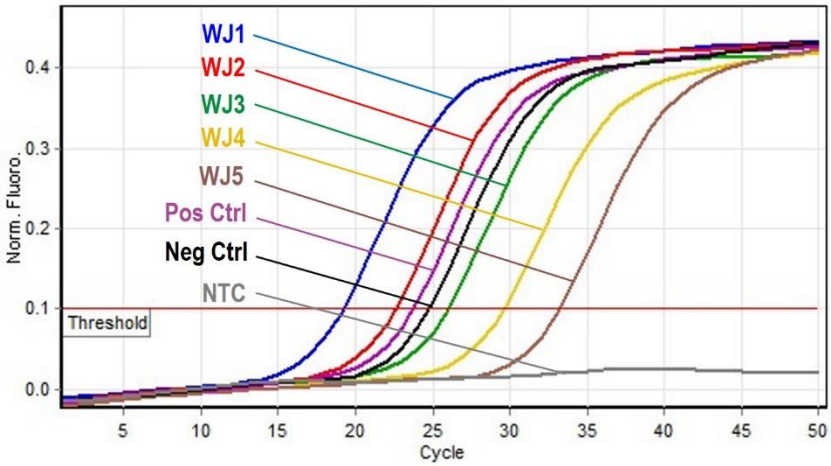
اندازه گیری تابش فلورسانس باید در دمای ۶۰ درجه و برای رنگ FAM تنظیم شود. MJ Mix و WJ Mix حاوی ROX می‌باشند. غلظت نهایی ROX در واکنش 300nM می‌باشد.

۱۳. آنالیز نتایج RotorGene و StepOne

برای آنالیز نتایج به راهنمای RotorGene و StepOne مراجعه کنید. آنالیز کمی را انجام داده و threshold یا آستانه را در کانال Green/FAM و برای MJ و WJ روی ۰/۱ قرار دهید. برای مشاهده نمودار مورد انتظار از استانداردهای MJ و WJ در دستگاه روتورژن تصاویر یک و دو را ملاحظه فرمایید. در نظر داشته باشید که افزایش **تابش سبز (FAM/Green)** مربوط به **JM** و **WJ** هر دو می‌باشد که در دو صفحه جداگانه بررسی می‌شود.



تصویر ۱. منحنی استانداردهای MJ در کانال سبز دستگاه روتورژن



تصویر ۲. منحنی استانداردهای WJ در کانال سبز دستگاه روتورژن

توجه داشته باشید نمونه تنها زمانی مثبت در نظر گرفته می‌شود که دارای منحنی سیگموییدی و فاز لگاریتمی باشد و تنها در این حالت CT معتبر بوده و قابل استناد و تفسیر می‌باشد. در غیاب منحنی سیگموییدی، نمونه منفی محسوب می‌شود و (CT آن) در صورت وجود فاقد ارزش می‌باشد.

آنالیز نمونه با کیت JAK2 به دو روش کمی از طریق محاسبه درصد V617F و همچنین روش کیفی قابل انجام می‌باشد.

الف) آنالیز کمی نمونه (محاسبه درصد V617F)

توجه! نتایج تست تنها در صورتی معتبر میباشد که مجموع نسخه های آلل سالم و جهش یافته در نمونه بین پنج هزار الی سی هزار کپی در میکرولیتر باشد.

درصد جهش JAK2 (V617F) را از طریق فرمول زیر می توان محاسبه کرد. به این منظور تیتر آلل جهش یافته را بر مجموع تیتر آلل‌های سالم و جهش یافته تقسیم و در عدد صد ضرب نمایید.

$$\textbf{JAK2 V617F}\ (\%) = \frac{\textbf{mutant allele titre}}{(\textbf{mutant allele titre} + \textbf{wild allele titre})} \times \mathbf{100}$$

- نمونه با تیتر برابر یا بالاتر از ۰/۱٪ **مثبت** می‌باشد و درصد محاسبه شده را می‌توان گزارش کرد.
- نمونه با تیتر برابر یا کمتر از ۰/۰۱٪ **منفی** می‌باشد و تیتر محاسبه شده غیرقابل گزارش می‌باشد.

- نمونه با تیتر بین ۰/۰۲٪ تا ۰/۰۹٪ **غیرقابل نتیجه گیری** است و نمونه می‌تواند مثبت یا منفی باشد و تیتر محاسبه شده غیرقابل گزارش می‌باشد.

شرایط فوق به صورت خلاصه در جدول زیر ذکر شده است.

نتیجه	JAK2 V617F%
مثبت برای جهش V617F	≥ ۰/۱٪
منفی برای جهش V617F	≤ ۰/۰۱٪
غیرقابل نتیجه گیری	۰/۰۹٪ ≥ نمونه ≤ ۰/۰۲٪

محاسبه درصد JAK2 (V617F) برای نمونه های شاهد مثبت و شاهد منفی نیز انجام شود. نتایج مورد انتظار برای شاهدها مطابق جدول زیر می‌باشد:

شاهدها	JAK2 V617F%
شاهد مثبت ۲.۵٪	۴٪ – ۱/۵٪
شاهد منفی	≤ ۰/۰۲ ٪

ب) آنالیز کیفی نمونه:

در صورتیکه از این کیت برای تشخیص کیفی استفاده می‌کنید، علاوه بر نمونه بیمار، باید شاهد مثبت و شاهد منفی که حاوی DNA است با هر دو میکس MJ و WJ بررسی شود و نتایج مطابق شرایط زیر تفسیر شود.

- ابتدا ΔCT را برای شاهد منفی محاسبه نمایید. برای این منظور، CT بدست آمده برای شاهد منفی را با میکس WJ از CT بدست آمده با میکس MJ کم نمایید، این اختلاف CT معادل Cut-off می‌باشد.

$$\text{Cut-off or } \Delta CT_{\text{Negative Control}} = CT_{\text{MJ Mix}} - CT_{\text{WJ Mix}}$$

توجه: در صورتی که شاهد منفی دارای CT بالاتر از ۴۵ باشد یا تا پایان تست منفی بماند، CT در کانال سبز را معادل ۴۵ در نظر بگیرید.

- اختلاف CT نمونه بیمار را با میکس‌های MJ و WJ با توجه به معادله زیر محاسبه کنید:

$$\Delta CT\ \text{Sample} = CT_{\text{MJ Mix}} - CT_{\text{WJ Mix}}$$

- برای مشخص کردن محدوده نامشخص و غیرقابل نتیجه گیری از معادله زیر استفاده کنید:

$$\text{Cut-off} - 3.3 < \text{Inconclusive CT range} < \text{Cut-off}$$

نتایج را با توجه به نکات زیر تفسیر کنید:

- در صورتی که ΔCT نمونه از محدوده‌ی نامشخص کمتر باشد نمونه از نظر JAK2 **مثبت** است.
- در صورتی که ΔCT نمونه از Cut-off بیشتر باشد نمونه از نظر JAK2 **منفی** است.
- در صورتی که ΔCT نمونه عددی بین محدوده‌ی نامشخص و Cut-off باشد، نمونه **غیرقابل نتیجه گیری** می‌باشد.

همچنین برای سهولت می‌توانید نتایج را در جدول زیر وارد نمایید:

نمونه	CT MJ	CT WJ	ΔCT	محدوده نامشخص	نتیجه
شاهد منفی					
شاهد مثبت					
نمونه بیمار					
نمونه بیمار					
نمونه بیمار					

برای مثال: در صورتی که در کانال سبز CT شاهد منفی با میکس WJ معادل ۲۴/۸ و با میکس MJ معادل ۳۷/۲ باشد. Cut off برای شاهد منفی عدد ۱۲/۴ و محدوده‌ی نامشخص معادل بازه (۹/۱=۳/۳-۱۲/۴) ۹/۱ تا ۱۲/۴ می‌باشد.

نتایج نمونه ها در جدول زیر آمده است.

نمونه	CT MJ	CT WJ	ΔCT	محدوده نامشخص	نتیجه
شاهد منفی	۳۷/۲	۲۴/۸	۱۲/۴	۹/۱-۱۲/۴	منفی
شاهد مثبت	۲۹/۲	۲۳/۴	۵/۸	۵/۸< ۹/۱	مثبت
نمونه بیمار	۴۱/۵	۲۸/۵	۱۳	۱۳> ۹/۱	منفی
نمونه بیمار	۳۰/۷	۲۹/۰	۱/۷	۱/۷< ۹/۱	مثبت
نمونه بیمار	۳۹/۵	۲۸/۷	۱۰/۸	۹/۱<۱۰/۸ <۱۲/۴	غیرقابل نتیجه گیری

۱۴. حساسیت

حساسیت این کیت معادل ۰/۱٪ برای JAK2 محاسبه گردید. برای دستیابی به این میزان حساسیت، در نمونه مورد نظر باید میزان مجموع آلل جهش یافته و سالم معادل پنج هزار الی سی هزار کپی در میکرولیتر باشد.

JAK2 MQ
Kit Manual

For Real-Time PCR Detection and Quantitation of JAK2 V617F Mutation

For use with Rotor-Gene or StepOne
Research use only

NG-WI-ASL-48-100
Version 1.0
Winter 2022

Novin Gene

Table of Contents:

1. Introduction 2
2. Kit Contents..... 2
3. Storage and Stability 3
4. General Precautions..... 3
5. Additionally Required Materials 4
6. Specimen, storage and transport..... 4
7. DNA isolation..... 5
8. PCR Protocol..... 5
9. Programming of RotorGene 6
10. Programming of StepOne..... 6
11. Programming of other machines 7
12. Data Analysis: RotorGene and StepOne 7
13. Analytical Sensitivity..…….....….....……...12

JAK2 MQ kit is intended for detection and quantitation of JAK2 V617F mutation in human genomic DNA with Rotor-Gene 6000/Q or StepOne instrument. This kit is for research use only.

1. Introduction

JAK2 (Janus Kinase 2) is a Tyrosine Kinase located in cytoplasm with essential role in signaling pathways for cytokines and growth factors. The acquired mutation G1849T replaces valine with phenylalanine (V617F). This substitution results in constitutively active JAK2 which leads to uncontrolled cell proliferation in the absence of growth factors. This mutation is found in the majority of BCR-ABL-negative myeloproliferative disorders (MPDs) and has become a main diagnostic test for polycythemia vera (PV), essential thrombocythemia (ET) and primary myelofibrosis (PMF). JAK2 MQ kit provides a ready-to-use Real-Time PCR system for detection and quantitation of JAK2 V617F mutation with Rotor-Gene or StepOne machines. In this method application of fluorescent dye labeled probes allows detection of amplified product without requiring post-amplification analysis, reducing the possibility of contamination with the PCR product.

2. Kit Contents

The kit contains a manual, quick guide and a CD and following reagents:

Label	Content	Quantity
MJ Mix*	Master mix for JAK2 (V617F)	480 µl
WJ Mix*	Master mix for Wild Type	480 µl
MJ1	Standard 1 V617F: 100,000 copy/µl	150 µl

MJ2	Standard 2 V617F: 10,000 copy/µl	150 µl
MJ3	Standard 3 V617F: 1,000 copy/µl	150 µl
MJ4	Standard 4 V617F: 100 copy/µl	150 µl
MJ5	Standard 5 V617F: 10 copy/µl	150 µl
WJ1	Standard 1 Wild Type: 100,000 copy/µl	150 µl
WJ2	Standard 2 Wild Type: 10,000 copy/µl	150 µl
WJ3	Standard 3 Wild Type: 1,000 copy/µl	150 µl
WJ4	Standard 4 Wild Type: 100 copy/µl	150 µl
WJ5	Standard 5 Wild Type: 10 copy/µl	150 µl
Pos Ctrl 2.5%	Positive Control 2.5%	50 µl
Neg Ctrl	Negative Control	50 µl
Water	PCR Grade Water	200 µl

* 1, 2 and 4 tubes for 24, 48 and 96 reaction kits.

3. Storage and Stability

The kit components should be shipped and stored at -20°C and are stable until the expiry date mentioned. Avoid repeated freeze-thaws especially for PCR Mix more than few times to prevent reduced sensitivity.

4. General Precautions

In order to prevent false results, always pay attention to the following points:

- Treat all samples as potentially infectious.
- Within the pre-PCR work area, assign three separate spaces for: a) Sample storage and extraction; b) Reagent preparation where the Master Mix is aliquoted into tubes; and c) Reaction preparation area for addition of templates to the tubes.
- Always wipe the working surfaces with 70% Ethanol before and after work.

- Thaw kit components on crushed ice completely, mix by flickering followed by a quick spin and store on crushed ice while working.
- Do not place 0.2 ml PCR tubes on crushed ice. Use cold blocks instead.

5. Additionally Required Materials

To use this kit, you need the following items:

- Real-Time PCR machine and accessory computer
- Refrigerated microtube centrifuge
- Vortex Mixer
- Dry Block Heater
- Adjustable pipetters and nuclease free filtered tips
- DNA extraction kit
- Nuclease free 1.7ml microtubes and PCR microtubes
- Disposable powder-free gloves
- Cold block

6. Specimen, Storage and Transport

Peripheral blood should be collected in sterile condition in proper and sterile tubes. We recommend EDTA or Citrate as anticoagulant. Whole blood should be shipped and stored at +4°C (stable for 72 hrs).

DNA can directly be extracted from whole blood. Alternately to increase sensitivity, buffy coat can be used.

Whole blood or buffy coat can be stored at +4°C for three days. Otherwise, should be aliquoted and stored at -70°C which is stable for few months.

7. DNA Isolation

DNA isolation can be performed using different kits from various manufacturers. We recommend using:

- High Pure PCR Template Preparation Kit (Cat# 11796828001, Roche Applied Science, Mannheim, Germany)
- QIAamp DNA Blood Mini Kit (Cat. no. 51104, Qiagen GmbH, Hilden, Germany)

To reach the sensitivity of 0.1%, extracted DNA should have a concentration of 10-50 ng/µl. Samples with lower DNA content, result in reduced sensitivity.

8. PCR Protocol

Thaw the reagents on ice completely, followed by brief mixing and a quick spin.

Each sample should be examined with both MJ Mix (for V617F) and with WJ Mix (for Wild type allele) in two separate set of reactions. In each set, consider 1 tube for each sample as well as 5 tubes for the 5 standards (MJ or WJ) and 3 tubes for Positive Control, Negative Control and NTC. Use MJ standards for reactions with MJ mix and WJ standards for reactions with WJ mix.

Place required number of tubes on cold block.

Pipette 20µl of MJ Mix to the first series of tubes and 20µl of WJ Mix to each tube of the second group. Continue by adding 5µl of sample DNA, standards, Positive or Negative Control to each tube.

Cap the tubes and visually inspect to make sure all are caped securely. Place tubes in the machine.

Note: Working with StepOne instrument, spin tubes briefly before loading on the block.
Note: If using RotorGene attach the locking ring.

9. Programming RotorGene

Before you start the machine, make sure you have attached the locking ring on the rotor!

Open the CD provided in the kit and double click on “JAK2 MQ 0.1” or on “JAK2 MQ 0.2” depending to tubes used.

Click on Start button (Green button on the top menu). On the pop up window click start again and save the run file.

Edit samples on both MJ and WJ pages. Remember that tubes containing MJ Mix should only be named in MJ page and tubes containing WJ Mix should only be named in WJ page.

Make sure in the “Type” column, all the standards have been defined as “standard” and the relative concentrations have been entered. Patient samples should be defined as "unknown" and no template control as "NTC", respectively.

10. Programming of StepOne

Open the StepOne software (V 2.*). On the Set Up menu click on Template and select the file on CD provided with the kit. Click on Plate Setup.

Two targets of MJ and WJ are define in FAM channel. For MJ reactions, 5 standards (MJ1-MJ5) along with Positive and Negative Control, NTC and few samples have been defined. Also, for WJ reactions, 5 standards (WJ1-WJ5) along with Positive and Negative Control, NTC and few samples have been defined. You

may change plate set up using right click options (copy, past, clear). You may also add or remove samples on “Define Targets and Samples” menu. When finished click on Start Run and save the experiment. Instrument will start shortly.

11. Programming Other Machines

If you apply this kit to other Real-Time PCR machines, program it according to the following table:

Step	Temperature and time	Cycles
1	**95°C x 3 min**	1
2	**95°C x 15 sec**	50
	60°C x 60 sec	

Fluorescence should be collected at 60°C for FAM.
Both of MJ Mix and WJ Mix contain ROX with final concentration of 300nM in reaction.

12. Data Analysis: RotorGene and StepOne

Analyze the data according to manufacturer recommendations. Perform quantitative analysis for both **MJ** and **WJ** in **Green/FAM channel** with threshold set at 0.1.
Figures 1 and 2 represent typical graphs for StepOne machine.
Consider following points when analyzing:

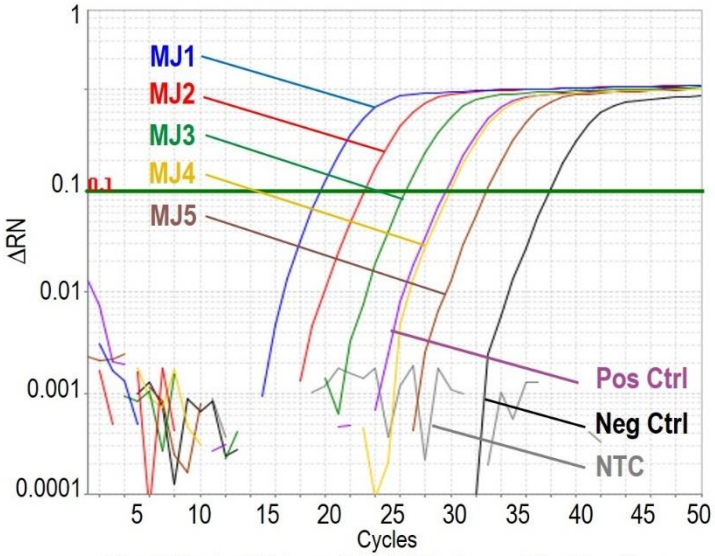


Fig 1. Typical MJ graph in FAM channel for StepOne

Note that a sample is considered Positive only if it has a sigmoid graph and log phase, and only then CT is reliable and can be used. In the absence of sigmoid graph and log phase, sample is considered Negative and CT if present is not reliable.

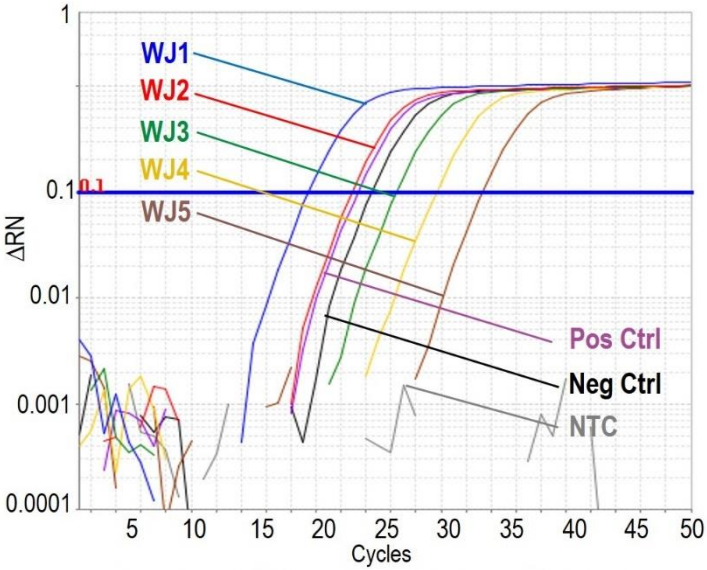


Fig 2. Typical WJ graph in FAM channel for StepOne

Sample analysis with JAK2 MQ kit can be done in two ways, Quantitative and Qualitative methods.

A) Quantitative analysis (V617F% calculation)

Note! To consider a sample valid, total copy number of wild and mutant alleles must be equal to 5,000-30,000 copy/ul.

V617F% value can be calculated for each patient with below formula.

$$\textbf{JAK2 V617F}\ (\%) = \frac{\textbf{mutant allele titre}}{(\textbf{mutant allele titre} + \textbf{wild allele titre})} \times \mathbf{100}$$

- A sample is **Positive** if V617F% is equal or higher than 0.1% and calculated titer could be reported.
- A sample is **Negative** if V617F% is equal or lower than 0.01% and calculated number should be ignored.
- A sample is **Inconclusive** if V617F% is between 0.02% - 0.09%. So it could be Positive or Negative and calculated number should be ignored.

JAK2 V617F%	Results
≥ 0.1%	**Positive for V617F**
≤ 0.01%	**Negative for V617F**
0.02% ≤ Sample ≤ 0.09%	**Inconclusive**

Note: Calculate V617F percentage for JAK2 Neg Ctrl and JAK2 Pos Ctrl. Results must be according to the below table.

Controls	JAK2 V617F%
2.5% Pos Ctrl	1.5% - 4%
Neg Ctrl	≤ 0.02%

B) Qualitative Analysis

For qualitative detection of JAK2 V617F, in addition to sample, Positive and Negative Controls must be assessed with both MJ and WJ Mix.
First, calculate Cut-off as below:

$$\text{Cut-off} = \Delta CT_{\text{Neg Ctrl}} = CT_{\text{MJ Mix}} - CT_{\text{WJ Mix}}$$

Note! If CT of Negative Control is higher than 45 or it remains negative in Green Channel, consider CT of 45 for it.

- Calculate delta CT of MJ and WJ Mix for each patients sample according to the following equation.

$$\Delta CT\ Sample = CT_{MJ\ Mix} - CT_{WJ\ Mix}$$

- Determine Inconclusive CT range by following formula.

$$Cut\text{-}off < Inconclusive\ CT\ range < Cut\text{-}off - 3.3$$

Consider following points when analyzing:

- A sample is **Positive** for V617F, If sample ΔCT is less than Inconclusive CT range.
- A sample is **Negative** for V617F, If sample ΔCT is higher than Cut-off.
- A sample is **Inconclusive**, If sample ΔCT falls within Inconclusive CT range.

Enter the results in the table below.

Sample	CT_{MJ}	CT_{WJ}	ΔCT	Inconclusive CT	Evaluation
Pos Ctrl					
Neg Ctrl					
Sample					
Sample					
Sample					

As an example, If CT of Neg Ctrl with WJ is 24.8 in Green/FAM channel and 37.2 with MJ Mix, the ΔCT or Cut-off is 12.4. and Inconclusive CT range is (12.4-3.3=9.1) 9.1 to 12.4. results are summarized in below table.

Sample	CT $_{MJ}$	CT$_{WJ}$	ΔCT	Inconclusive CT	Evaluation
Neg Ctrl	37.2	24.8	12.4	9.1-12.4	Negative
Pos Ctrl	29.2	23.4	5.8	5.8 < 9.1	Positive
Sample	41.5	28.5	13	13> 9.1	Negative
Sample	30.7	29.0	1.7	1.7< 9.1	Positive
Sample	39.5	28.7	10.8	9.1< 10.8 < 12.4	Inconclusive

13. Analytical Sensitivity

Analytical sensitivity of the kit has been estimated about 0.1% for JAK2 V617F.To achieve this sensitivity, sample must include 5,000-30,000 copy/µl mutant and wild type alleles.