راهنمای کیت JAK2 RQ

تابستان ۱۴۰۳، ویراش ۵/۰

جهت تشخیص موتاسیون JAK2 V617F به روش Real-Time PCR

جهت کار با دستگاه Rotor-Gene یا StepOne

مخصوص تحقیقات

Σ 24 (Cat# JAK2RQ24)

Σ 48 (Cat# JAK2RQ48)

Σ 96 (Cat# JAK2RQ96)

NG-WI-ASL-10-500

RUO

شرکت نوین ژن پارس ویرا

تهران، خیابان ایرانشهر، پلاک ۵. کد پستی: ۱۵۸۱۶۳۳۳۳۶

Novin Gene

فهرست مندرجات:

۱. مقدمه ۳
۲. حیطه کاربرد ۳
۳. اطلاعات زمینه ای ۳
۴. اساس آزمایش ۴
۵. محتویات کیت ۴
۶. مدل های بسته بندی ۵
۷. شرایط نگهداری و حمل و نقل کیت ۵
۸. محدودیت کاربرد ۵
۹. سایر موارد مورد نیاز ۶
۱۰. احتیاط و نکات لازم ۶
۱۱. نمونه مناسب و شرایط نگهداری و انتقال آن ۷
۱۲. عوامل مزاحم ۷
۱۳. کنترل داخلی ۸
۱۴. استخراج DNA ۸
۱۵. دستورکار PCR و مراحل آزمایش ۸
۱۶. دستگاه ها و نرم افزارها ۹
۱۷. تنظیم دستگاه Rotor-Gene ۹
۱۸. تنظیم دستگاه StepOne ۱۰
۱۹. تنظیم سایر دستگاه ها ۱۰
۲۰. آنالیز نتایج Rotor-Gene ۱۱

۲۱. آنالیز نتایج StepOne ۱۴
۲۲. میزان حساسیت ۱۷
۲۳. روش امحاء ۱۷
۲۴. پشتیبانی فنی ۱۸
۲۵. اطلاعات تماس ۱۸
۲۶. منابع ۱۸
۲۷. توضیحات برچسب ۱۹

۱. مقدمه

کیت JAK2 RQ جهت تشخیص موتاسیون JAK2 V617F در DNA انسانی به روش Real-Time PCR طراحی شده است. در این روش، ژن مورد نظر به کمک پرایمرها و پروب اختصاصی شناسایی می‌شود. همچنین میکس این کیت حاوی سری ثانویه ای از پرایمرها و پروب جهت شناسایی یک ژن انسانی به عنوان کنترل داخلی می‌باشد. کنترل داخلی از گزارش منفی کاذب ناشی از استخراج نامناسب و یا مهار PCR جلوگیری می‌کند. این کیت جهت مصارف تحقیقاتی کاربرد دارد.

۲. حیطه کاربرد

کیت JAK2 RQ امکان بررسی نمونه بیمار را جهت تشخیص موتاسیون JAK2 V617F در DNA انسانی با روش Real-Time PCR فراهم می‌کند. این کیت برای استفاده با دستگاه‌های Rotor-Gene و StepOne طراحی شده است.

۳. اطلاعات زمینه ای

JAK2 مخفف Janus Kinase 2 است و معرف یک تیروزین کیناز است که در سیتوپلاسم واقع شده است. این آنزیم نقش مهمی در انتقال پیام‌های سیتوکین‌ها و هورمون‌های رشد دارد. موتاسیون اکتسابی G1849T در ژن این آنزیم باعث جایگزینی آمینواسید فنیل آلانین به جای والین می‌شود (V617F). در نتیجه این موتاسیون، JAK2 به صورت دائمی فعال شده و موجب رشد مهار نشده‌ی سلول در غیاب هورمون‌های 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.

۴. اساس آزمایش

در این کیت، شناسایی جهش نقطه ایی با استفاده از روش واکنش زنجیره ای پلیمراز PCR (Polymerase Chain Reaction) انجام می‌شود. طی این واکنش، توالی مورد نظر با استفاده از پرایمرهای اختصاصی شناسایی و تکثیر می‌شود. در روش Real-Time PCR توالی تکثیر شده با استفاده از پروب‌های فلورسنت قابل تشخیص می‌گردد. بنابراین، با بررسی میزان فلورسنت در طی واکنش می‌توان وجود جهش یا فقدان آن را در نمونه تشخیص داد، بدون آنکه پس از پایان واکنش نیاز به انجام مراحل بعدی باشد. با توجه به اینکه در این روش نیازی به بررسی محصول واکنش با روش‌هایی مشابه الکتروفورز وجود ندارد، امکان ایجاد آلودگی نیز به لحاظ تئوری وجود نخواهد داشت.

۵. محتویات کیت

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

برچسب	محتوا	حجم
JAK2 Mix	میکس آماده برای PCR*	۴۸۰ میکرولیتر
Pos Ctrl 5%	شاهد مثبت ۵٪	۱۰۰ میکرولیتر
Pos Ctrl 0.1%	شاهد مثبت ۰/۱٪	۱۰۰ میکرولیتر
Negative Ctrl	شاهد منفی	۱۰۰ میکرولیتر
Water	آب مخصوص PCR	۲۰۰ میکرولیتر

*۱، ۲ یا ۴ عدد، به ترتیب برای کیتهای ۲۴، ۴۸ و ۹۶ واکنشی

۶. مدل های بسته بندی

کیت در قالب های بیست وچهار، چهل و هشت، و نود و شش واکنش بیست و پنج میکرولیتری در دسترس می‌باشد.

۷. شرایط نگهداری و حمل و نقل کیت

تمامی مواد کیت 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 محتویات کیت بیش از سه بار خودداری کنید زیرا باعث کاهش حساسیت و عدم کارایی آن ها می‌شود.

همچنین برای حمل و نقل کیت از یخ خشک استفاده نمایید.

۸. محدودیت کاربرد

- این کیت تنها برای استفاده توسط کاربران حرفه‌ای و آموزش دیده طراحی شده است.
- تمامی مراحل کار بایستی مطابق دفترچه راهنمای کامل کیت انجام شود و هرگونه تغییری در آن منجر به بروز خطا در نتایج میگردد.
- از محتویات کیت نباید پس از گذشت تاریخ انقضای درج شده روی کیت استفاده شود.
- در صورت تغییر رنگ لیبل حرارتی (به صورتی یا قرمز) حتی به صورت جزئی کیت نباید مورد استفاده قرار گیرد.
- این کیت تنها برای مصارف تحقیقاتی طراحی شده و برای تشخیص طبی مورد تایید نمی‌باشد.

۹. 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 مخصوص میکروتیوب

- ورتکس (Vortex Mixer)
- بلوک حرارتی رومیزی (Dry Block Heater)
- سمپلر متغیر و سر سمپلر فیلتردار (Nuclease free)
- کیت استخراج DNA
- تیوب ۱/۵ میلی لیتری و میکروتیوب مخصوص Real-Time PCR
- دستکش لاتکس یا نیتریل بدون پودر
- بلوک آلومینیومی (بلوک سرد)

۱۰. احتیاط و نکات لازم

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 DNA 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 کاملاً 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 یخ‌های 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.

۱۱. نمونه مناسب و شرایط نگهداری و انتقال آن

- نمونه مناسب برای آزمایش JAK2 با این کیت، خون محیطی (peripheral blood) می باشد که در لوله استریل حاوی ماده ضد انعقاد جمع آوری شده است. ماده ضد انعقاد می‌تواند 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 کامل استخراج کرد. همچنین برای افزایش حساسیت تست می‌توان از بافی (buffy coat) استفاده کرد.
- برای نگهداری نمونه در زمان های بیشتر از چند روز بهتر است آن را به حجم های کوچک تقسیم کرده و سپس در دمای بیست درجه زیر صفر نگهداری نمود. در چنین شرایطی نمونه تا چند ماه پایدار می ماند.

۱۲. 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 نمی‌باشد.

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.

۱۳. کنترل داخلی

برای ارزیابی کیفیت استخراج DNA و احتمال مهار PCR و جلوگیری از نتایج منفی کاذب، میکس واکنش علاوه بر JAK2، حاوی پرایمرها و پروب مخصوص یک ژن انسانی نیز می‌باشد. کنترل داخلی باید به تولید فلورسانس با تابش زرد (VIC) و CT بین ۲۲ تا ۲۵ برای Rotor-Gene و ۲۴ تا ۲۸ برای دستگاه StepOne منجر شود. برای توضیحات بیشتر به بخش آنالیز رجوع کنید.

۱۴. استخراج DNA

برای استخراج DNA از نمونه پلاسما از روش ها و کیت های مختلفی می‌توان استفاده نمود. ما استفاده از کیت های زیر را توصیه می کنیم:

- 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 ۱۰-۵۰ ng/µl باشد.

۱۵. دستورکار PCR و مراحل آزمایش

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

تعداد مورد نیاز لوله PCR روی بلوک سرد بگذارید. علاوه بر تعداد نمونه های مورد آزمایش، سه لوله برای شاهدهای مثبت، منفی و آب نیز در نظر بگیرید.

به هر لوله ۲۰ میکرولیتر از JAK2 Mix اضافه کنید. سپس ۵ میکرولیتر از DNA استخراج شده و یا شاهد یا آب به هر لوله اضافه نمایید 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.

۱۶. دستگاه ها و نرم افزارها

کیت JAK2 RQ جهت کار با دستگاه های Rotor-Gene و StepOne طراحی شده است.

۱۷. تنظیم دستگاه Rotor-Gene

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

دستگاه Rotor-Gene را توسط کابل مخصوص آن به کامپیوتر وصل کرده و آن را به برق بزنید تا چراغ آبی جلوی آن روشن شود.

در لوح فشرده همراه کیت روی فایل JAK2 0.2 و یا JAK2 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.

۱۸. 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 ضمیمه را انتخاب کنید.

از منوی سمت چپ Plate Setup و سپس دکمه View Well Table را انتخاب کنید. یک کنترل مثبت، یک کنترل منفی، یک NTC و پنج نمونه از پیش تعریف شده اند. 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 می توانید تعداد نمونه های مورد بررسی را نیز اضافه کنید. در پایان تنظیمات دکمه Start Run را کلیک کنید و فایل آزمایش را در پوشه مورد نظر ذخیره کنید تا دستگاه شروع به کار کند.

۱۹. 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 10 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 های FAM و VIC تنظیم شود.

JAK2 Mix حاوی ROX است. غلظت نهایی ROX در واکنش 300nM می‌باشد.

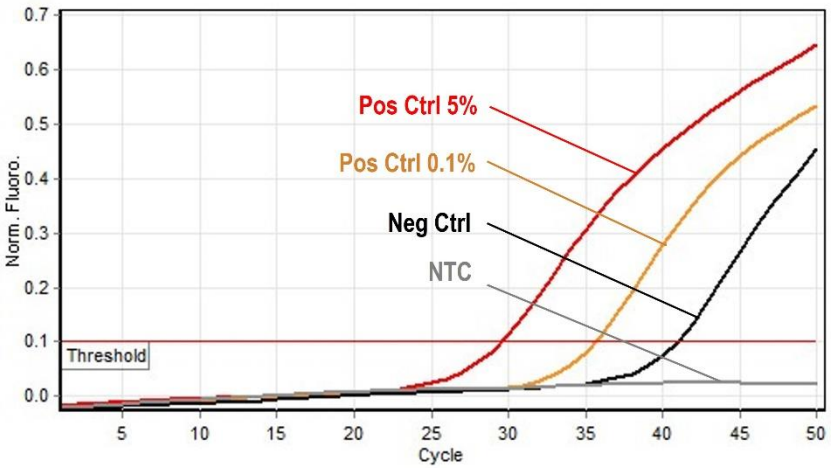
۲۰. آنالیز نتایج Rotor-Gene

برای آنالیز نتایج به راهنمای Rotor-Gene مراجعه کنید. به طور خلاصه از منوی Analysis، Quantitation را انتخاب کرده و روی Green دوبار کلیک کنید. در پنجره autofind threshold دکمه cancel را بزنید و آستانه را روی ۰/۱ و بالاتر

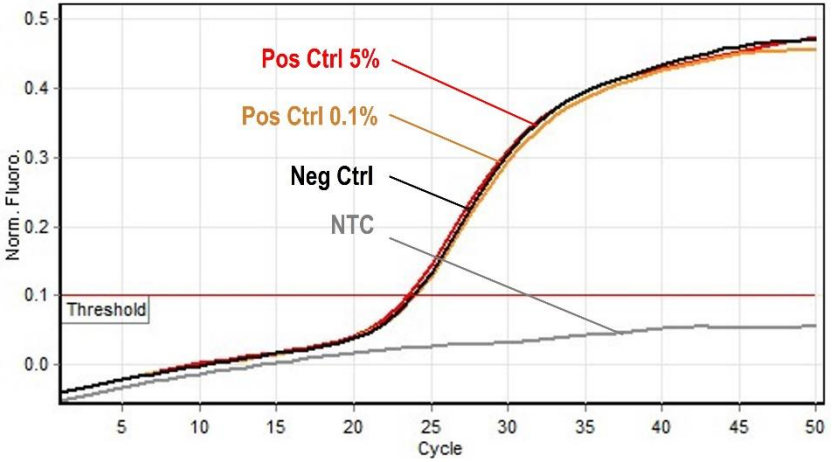
از فلورسانس زمینه (نمونه منفی) قرار دهید. سپس در منوی Analysis مجددا Quantitation و سپس Yellow را کلیک کنید. در پنجره autofind threshold دکمه cancel را بزنید و آستانه را روی ۰/۱ قرار دهید. برای مشاهده نمودار مورد انتظار شاهدها و کنترل داخلی تصاویر یک و دو را ملاحظه فرمایید.

توجه داشته باشید که افزایش تابش سبز **(Green)** مربوط به **JAK2** و افزایش تابش زرد **(Yellow)** حاصل از **کنترل داخلی** می باشد.

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.



شکل ۱. نمودار شاهدهای JAK2 در کانال سبز دستگاه روتورژن



شکل ۲. نمودار شاهدهای JAK2 در کانال زرد دستگاه روتورژن

جهت تشخیص کیفی JAK2 از نظر جهش V617F ، علاوه بر نمونه بیمار، باید شاهد مثبت ۰/۱٪ و شاهد منفی که حاوی DNA می‌باشد، بررسی شود و نتایج مطابق شرایط زیر تفسیر شود.

ابتدا ΔCT را برای شاهد مثبت ۰/۱٪ و شاهد منفی 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.

$$\Delta CT = CT_{\text{Green Ch}} - CT_{\text{Yellow Ch}}$$

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.

نتایج را با توجه به نکات زیر تفسیر کنید:

- در صورتی که ΔCT نمونه از ΔCT شاهد مثبت ۰/۱٪ ، کمتر باشد نمونه از نظر جهش V617F مثبت است.
- در صورتی که ΔCT نمونه از ΔCT شاهد منفی بیشتر باشد نمونه از نظر جهش V617F **منفی** است.
- در صورتی که ΔCT نمونه عددی بین ΔCT شاهد مثبت ۰/۱٪ و شاهد منفی باشد، نمونه در محدوده‌ی نامشخص قرار دارد و **غیرقابل نتیجه‌گیری** می‌باشد. نکات فوق در جدول زیر به صورت خلاصه ذکر شده است.

نتیجه	ΔCT
مثبت برای جهش V617F	ΔCT Sample < ΔCT 0.1% Pos Ctrl
منفی برای جهش V617F	ΔCT Sample > ΔCT Neg Ctrl
غیرقابل نتیجه‌گیری	ΔCT 0.1% Pos Ctrl < ΔCT Sample < ΔCT Neg Ctrl

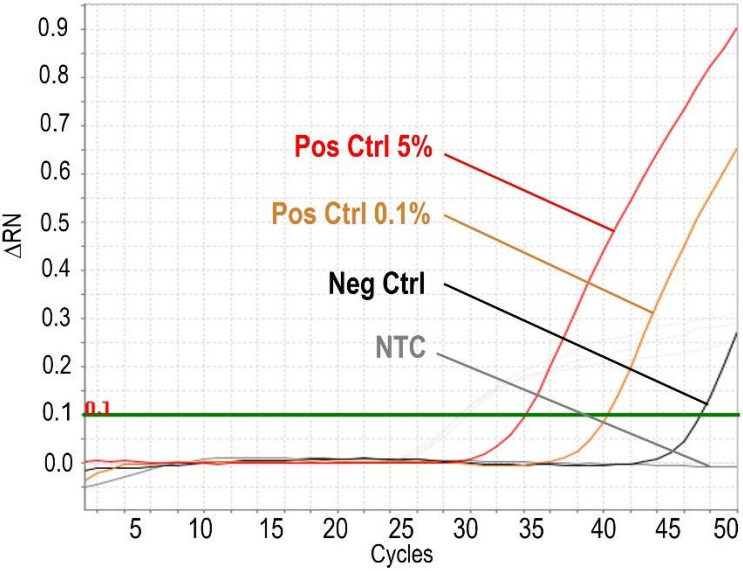
برای مثال، در صورتی که شاهد منفی دارای CT معادل ۴۷ در کانال سبز و CT معادل ۲۴ در کانال زرد باشد، ΔCT برای شاهد منفی معادل ۲۳ خواهد بود. همچنین برای شاهد مثبت ۰/۱٪ با CT معادل ۳۷ در کانال سبز و CT معادل ۲۴ در کانال زرد، ΔCT برابر با ۱۳ می‌باشد. و نهایتا برای نمونه بیمار دارای CT معادل ۳۶ در کانال سبز و CT معادل ۲۴ در کانال زرد، ΔCT برابر با ۱۲ می‌باشد که از ΔCT شاهد مثبت ۰/۱٪ کمتر بوده، پس از نظر جهش V617F مثبت می‌باشد. مثال فوق بطور خلاصه در جدول زیر درج شده است.

نمونه	CT کانال سبز	CT کانال زرد	ΔCT
شاهد منفی	۴۷	۲۴	۴۷-۲۴=۲۳
شاهد مثبت	۳۷	۲۴	۳۷-۲۴=۱۳
نمونه بیمار	۳۶	۲۴	۳۶-۲۴=۱۲

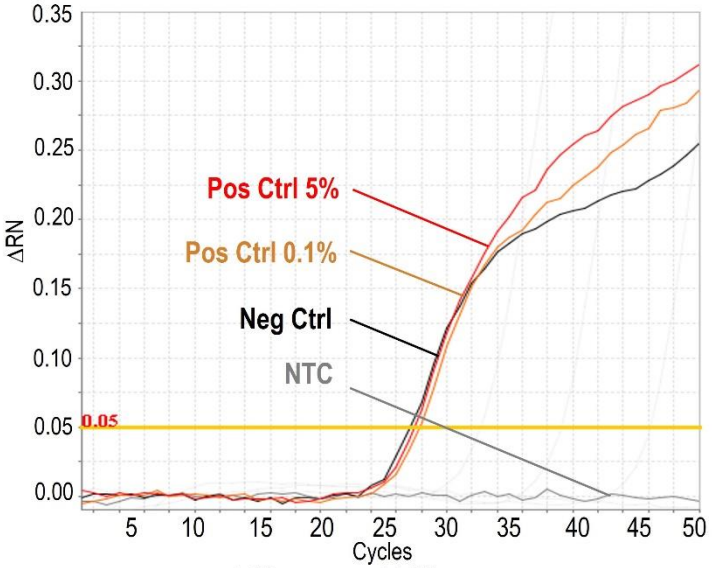
۲۱. آنالیز نتایج StepOne

برای آنالیز نتایج به راهنمای StepOne مراجعه کنید. به طور خلاصه دکمه Analysis را کلیک کنید. برای JAK2/FAM آستانه (threshold) رابالاتر از فلورسانس نمونه منفی و روی ۰/۱ و برای IC/VIC آستانه را روی ۰/۰۵ قرار دهید. برای مشاهده نمودار مورد انتظار شاهدها وکنترل داخلی، تصاویر سه و چهار را ملاحظه فرمائید. توجه داشته باشید که افزایش تابش **FAM** مربوط به **JAK2** و افزایش تابش **VIC** حاصل از **کنترل داخلی** می باشد.

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.



شکل ۳. نمودار شاهدهای JAK2 در کانال FAM دستگاه استپ وان



شکل ۴. نمودار شاهدهای JAK2 در کانال VIC دستگاه استپ وان

جهت تشخیص کیفی JAK2، علاوه بر نمونه بیمار، باید شاهد مثبت ۰/۱٪ و شاهد منفی که حاوی DNA می‌باشد، بررسی شود و نتایج مطابق شرایط زیر تفسیر شود. ابتدا ΔCT را برای شاهد مثبت ۰/۱٪ و شاهد منفی و همچنین نمونه بیمار محاسبه نمایید. برای این منظور، برای هر نمونه CT بدست آمده را در کانال VIC از CT بدست آمده در کانال FAM، کسر نمایید.

$$\Delta CT = CT_{\text{FAM Ch}} - CT_{\text{VIC Ch}}$$

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.

نتایج را با توجه به نکات زیر تفسیر کنید:

- در صورتی که ΔCT نمونه از ΔCT شاهد مثبتِ ۰/۱٪ ، کمتر باشد نمونه از نظر جهش V617F **مثبت** است.
- در صورتی که ΔCT نمونه از ΔCT شاهد منفی بیشتر باشد نمونه از نظر جهش V617F **منفی** است.
- در صورتی که ΔCT نمونه عددی بین ΔCT شاهد مثبت ۰/۱٪ و شاهد منفی باشد، نمونه در محدوده‌ی نامشخص قرار دارد و **غیرقابل نتیجه گیری** می‌باشد. نکات فوق در جدول زیر به صورت خلاصه ذکر شده است.

نتیجه	ΔCT
مثبت برای جهش V617F	ΔCT Sample < ΔCT 0.1% Pos Ctrl
منفی برای جهش V617F	ΔCT Sample > ΔCT Neg Ctrl
غیرقابل نتیجه گیری	ΔCT 0.1% Pos Ctrl < ΔCT Sample < ΔCT Neg Ctrl

برای مثال، در صورتی که شاهد منفی دارای CT معادل ۴۷ در کانال FAM و CT معادل ۲۸ در کانال VIC باشد، ΔCT برای شاهد منفی معادل ۱۹ خواهد بود. همچنین برای شاهد مثبت ۰/۱٪ با CT معادل ۳۹ در کانال FAM و CT معادل ۲۸ در کانال VIC مقدار ΔCT برابر با ۱۱ می‌باشد و برای نمونه بیمار دارای CT معادل ۳۵ در کانال FAM و CT معادل ۲۷ در کانال VIC، ΔCT برابر با ۸ می‌باشد که از ΔCT شاهد مثبت ۰/۱٪ کمتر بوده، پس از نظر جهش V617F مثبت می‌باشد. مثال فوق بطور خلاصه در جدول صفحه بعد درج شده است.

نمونه	CT کانال سبز	CT کانال زرد	ΔCT
شاهد منفی	۴۷	۲۸	۴۷-۲۸=۱۹
شاهد مثبت	۳۹	۲۸	۳۹-۲۸=۱۱
نمونه بیمار	۳۵	۲۷	۳۵-۲۷= ۸

۲۲. میزان حساسیت

حساسیت تشخیصی این کیت معادل یک در هزار یا ۰/۱٪ می‌باشد. به بیان دیگر در صورتی که از هزار گلبول سفید تنها یکی دارای این جهش باشد، در ۹۵٪ موارد توسط این کیت تشخیص داده خواهد شد. برای رسیدن به این میزان حساسیت، نمونه استخراج شده باید حاوی ۱۰ تا ۵۰ نانوگرم DNA در هر میکرولیتر باشد.

۲۳. روش امحاء

محتویات کیت فاقد خطرات بیولوژیکی یا شیمیایی بوده و می‌توان آنها را مستقیما به سطل زباله انتقال داد. اما نمونه های عفونی آزمایشگاه را در محلول هیپوکلریت سدیم ۵٪ به مدت حداقل یک شبانه روز قرار دهید و سپس آنها را به سطل زباله منتقل کنید.

۲۴. پشتیبانی فنی

برای پشتیبانی فنی می‌توانید با شماره تلفن یا آدرس ایمیل زیر تماس حاصل فرمایید:

+۹۸ ۹۹۳۶۲۲۳۲۴۱

Info@novingene.com

۲۵. اطلاعات تماس

شرکت نوین ژن پارس ویرا

آدرس: تهران، خیابان ایرانشهر، پلاک ۵. کد پستی: ۱۵۸۱۶۳۳۳۳۶

تلفن تماس:

+۹۸ ۲۱-۸۸۸۳۷۳۹۳

+۹۸ ۹۹۰۱۸۱۳۱۲۴

ایمیل: info@novingene.com

وبسایت: www.novingene.ir

۲۶. منابع

- Jones, D. (2010). Neoplastic Hematopathology. Springer Science & Business Media.
- Yoo, J.H., Park, T.S., Maeng, H.Y., Sun, Y.K., Kim, Y.A., Kie, J.H., Cho, E.H., Song, J., Lee, K.A., Suh, B. and Choi, J.R., 2009. JAK2 V617F/C618R mutation in a patient with polycythemia vera: a case study and review of the literature. Cancer genetics and cytogenetics, 189(1), pp.43-47.
- Levine, R.L., Pardanani, A., Tefferi, A. and Gilliland, D.G., 2007. Role of JAK2 in the pathogenesis and therapy of

myeloproliferative disorders. Nature reviews cancer, 7(9), pp.673-683.

- Mackay IM. Real-time PCR in the microbiology laboratory. Clin. Microbiol. Infect. 2004; 10 (3): 190 – 212.

۲۷. توضیحات برچسب

RUO جهت مصارف پژوهشی	تولید کننده	دستورالعمل برای استفاده را بررسی نمایید
LOT کدبهر (شماره بچ)	تعداد <n> آزمون کافی	تاریخ انقضاء
REF شماره کاتالوگ	SN شماره سریال	-10°C / -30°C محدوده دمایی

برای دریافت اطلاعات و منابع بیشتر، به وبسایت ما به نشانی www.novingene.ir مراجعه فرمایید یا با پشتیبانی تماس بگیرید.

JAK2 RQ Kit Manual

Spring 2024, Version 5.0

For Real-Time PCR Detection of JAK2 V617F Mutation
For use with Rotor-Gene or StepOne
For Research use only

24 (Cat# JAK2RQ24)
48 (Cat# JAK2RQ48)
96 (Cat# JAK2RQ96)
NG-WI-ASL-10-500

RUO

NovinGene ParsVira
No. 5, Iranshahr St, Tehran, Iran 1581633336.

Novin Gene

Table of Contents

1. Introduction 3
2. Intended Use 3
3. Background Information 3
4. Test Principle 3
5. Kit Contents 4
6. Packaging models 4
7. Storage and Stability 4
8. Product Use Limitations 4
9. Additionally Required Materials 5
10. General Precautions 5
11. Specimen, Storage and Transport 6
12. Interfering Substances 6
13. DNA Isolation 6
14. Internal Control (IC) 7
15. PCR Protocol 7
16. Devices and software 7
17. Programming Rotor-Gene 7
18. Programming StepOne 8
19. Programming Other Machines 8

20. Data Analysis: Rotor-Gene 8
21. Data Analysis: StepOne 11
22. Sensitivity 14
23. Disposal Method 14
24. Technical Support 14
25. Contact Information 14
26. References 15
27. Symbols 15

1. Introduction

JAK2 RQ kit provides a ready-to-use Real-Time Time polymerase chain reaction (PCR) test designed for detecting JAK2 V617F mutation. All required reagents are included in the PCR Mix provided in the kit. This Mix also contains a different series of primers and probes for detecting a housekeeping gene sequence as an Internal Control (IC). IC prevents false negative results due to extraction or presence of PCR inhibitors.
This kit is intended for Research Use Only!

2. Intended Use

JAK2 RQ kit is intended for detecting JAK2 V617F mutation in DNA samples extracted from human. Detection is achieved using Real-Time PCR and is compatible with Rotor-Gene or StepOne machines.

3. Background Information

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).

4. Test Principle

The target sequence is detected using PCR, where primers specific to the target genome amplify its unique sequence. Real-Time PCR facilitates the detection of the amplified product through

fluorescent-labeled probes. Therefore, monitoring fluorescence provides a means for detecting the target without requiring post-amplification analysis. This eliminates the possibility of PCR product contamination.

5. Kit Contents

The kit contains a manual, a CD with Rotor-Gene and StepOne templates and the following reagents:

Label	Content	Quantity
JAK2 Mix	PCR Master mix*	480 µl
Pos Ctrl 5%	Positive Control 5%	100 µl
Pos Ctrl 0.1%	Positive Control 0.1%	100 µl
Negative Ctrl	Negative Control	100 µl
Water	PCR Grade Water	200 µl

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

6. Packaging models

The kit is available in 24, 48, and 96 reactions of 25 microliters.

7. Storage and Stability

The kit components should be shipped and stored at -20°C and are stable until the expiration date mentioned. Avoid repeated freeze-thaw more than three times to prevent reduced sensitivity.

8. Product Use Limitations

- This kit is intended to be used only by specially instructed and trained personnel.
- The User manual should be strictly followed, and any modification will invalidate the results.

- The kit and its contents should not be used past the expiration date on the package.
- The kit and its contents should not be used if there is any sign of pink or red color on the Warm Mark label.
- This kit is for Research use only and is not validated for in vitro diagnostics.

9. Additionally Required Materials

To use this kit, you need the following items:

- Real-Time PCR machine and computer accessory
- Tabletop microtube centrifuge
- Vortex Mixer
- Dry Block Heater
- Adjustable pipetters and nuclease free filtered tips
- DNA extraction kit
- Nuclease free 1.5ml microtubes and PCR microtubes
- Disposable powder-free gloves
- Cold block

10. General Precautions

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 extracted DNA 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 PCR tubes on crushed ice. Use cooling blocks instead.

11. Specimen, Storage and Transport

Peripheral blood is the suitable sample for JAK2 test. We recommend EDTA or citrate as anticoagulant.
DNA can directly be extracted from whole blood. Alternately to increase sensitivity buffy coat can be used.
Whole blood or buffy coat can be shipped and stored at +4°C for a few days or can be aliquoted and stored at -20°C which is stable for a few months.

12. Interfering Substances

Heparin (more than 10 IU/ml) affects the PCR. Blood collected in heparin containing tubes and samples of heparinized patients must not be used.
Elevated levels of bilirubin (≤4.5 mg/dl) and lipids (≤1000 mg/dl) and hemolytic samples do not influence the extraction and PCR.

13. DNA Isolation

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

- 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/ul.

14. Internal Control (IC)

To examine DNA extraction quality as well as the presence of PCR inhibitors and to prevent false negative results, primers and probe for an *Internal Control* (a housekeeping gene) is included in the PCR Master Mix. Internal control should generate a CT of 22-25 in Rotor-Gene and a CT of 24-28 in StepOne. See analysis section for more details.

15. PCR Protocol

Thaw the reagents on ice completely, followed by a brief mixing and a quick spin. Place the required number of tubes on a cold block. Consider one tube for each sample, plus three for Positive control, Negative control and NTC.

Pipette 20ul of JAK2 Mix directly, to each tube followed by adding 5ul of control, or isolated DNA.

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

Note: Working with StepOne instrument, spin tubes briefly before loading on the block.

Note: If using Rotor-Gene attach the locking ring.

16. Devices and software

JAK2 RQ kit is designed to work with Rotor-Gene and StepOne.

17. Programming Rotor-Gene

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 0.2" or on "JAK2 strip" depending on the tubes used. Program starts. Click on the Start button (Green button on the top menu). On the pop-up window click Start again and save the program on the desired location.

18. Programming StepOne

Open the StepOne software (V 2.*). On the Set Up menu, click Template and select the file on the CD provided with the kit. Click on Plate Setup. One negative control, four standards, and a few samples are defined. You may change plate setup using right-click options (copy, paste, clear). You may also add /remove samples or change the sample name on the “Define Targets and Samples” menu. When finished, click on “Start Run” and save the experiment to the desired location. The instrument will start shortly.

19. 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 10 min**	1
2	**95°C x 15 sec**	50
	60°C x 60 sec	

Fluorescence should be collected at 60°C for FAM and VIC/HEX dyes. JAK2 Mix contains 300nM ROX in final reaction.

20. Data Analysis: Rotor-Gene

Analyze data according to manufacturer recommendations. Perform qualitative analysis for **JAK2 (Green channel)** and **Internal Control (Yellow channel)**. Briefly, click on "Analysis" menu and then under "Quantitation" tab, double click on "Cycling A. Green". Close the pop up for Automatic Threshold and set the threshold on 0.1 and above background or Negative control.
Repeat the above for "Cycling A. Yellow" and manually set threshold on 0.1. Refer to figures 1 and 2 for typical graphs.

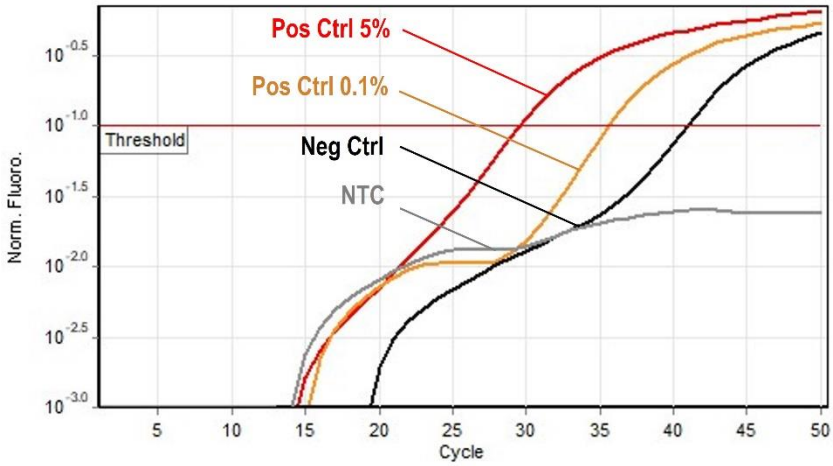


Fig 1. Typical JAK2 graph in Green channel for Rotor-Gene

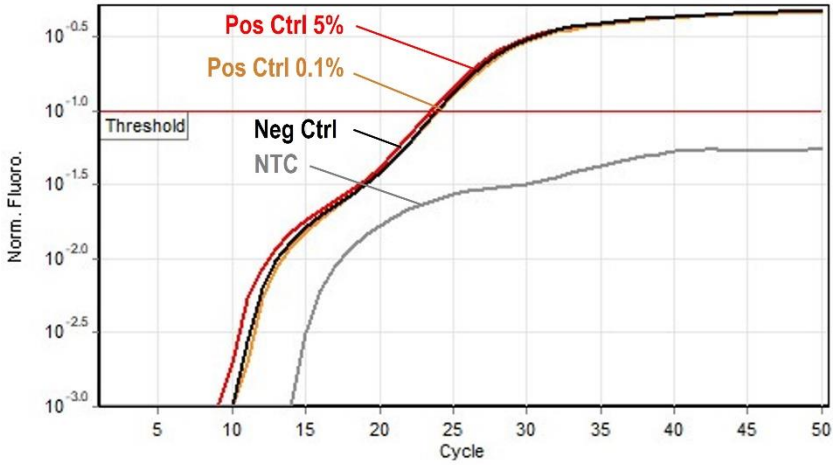


Fig 2. Typical JAK2 graph in Yellow channel for Rotor-Gene

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 a sigmoid graph and log phase, the sample is considered Negative, and CT, if present, is not reliable.

For detection of JAK2 V617F, in addition to sample, 0.1% Positive Control and Negative Control must be assessed too.
Calculate ΔCT for each sample including 0.1% Pos Ctrl and Neg Ctrl and patient sample according to the below formula.

$$\Delta CT = CT_{\text{Green Ch}} - CT_{\text{Yellow Ch}}$$

Note! If CT of Negative Control is higher than 45 or it remains negative in the Green Channel, use CT of 45 for calculation.
Consider the following points for analyzing:

- A sample is **Positive** for V617F**,** when sample ΔCT is less than 0.1% Pos Ctrl ΔCT.
- A sample is **Negative** for V617F**,** when sample ΔCT is higher than Neg Ctrl ΔCT.
- A sample is **Inconclusive,** when sample ΔCT is higher than 0.1% Pos Ctrl ΔCT and less than Neg Ctrl ΔCT.

Above points are summarized in the following Table.

ΔCT	Result
ΔCT Sample < ΔCT 0.1% Pos Ctrl	Positive for V617F
ΔCT Sample > ΔCT Neg Ctrl	Negative for V617F
ΔCT 0.1% Pos Ctrl < ΔCT Sample < ΔCT Neg Ctrl	Inconclusive

As an example, If CT of Neg Ctrl is 47 in Green channel and 24 in the Yellow channel, the ΔCT is 23. And, If CT of 0.1% Pos Ctrl is 37 in the Green channel and 24 in the Yellow channel, the ΔCT is 13. For patient sample with the CT of 36 in the Green channel and 24 in the Yellow channel, ΔCT is 12 and less than 0.1% Pos Ctrl ΔCT (13) so, patient sample is considered Positive for V617F.
The example is summarized in below Table.

Sample	Green CT	Yellow CT	ΔCT
Neg Ctrl	47	24	47-24=23
0.1% Pos Ctrl	37	24	37-24=13
Patient sample	36	24	36-24=12

21. Data Analysis: StepOne

Analyze the data according to the manufacturer's recommendations. Briefly, click on the "Analyze" and set the threshold at 0.1 for **JAK2 (the FAM channel)** and 0.05 for **Internal Control (the VIC channel)**.
Refer to figures 3 and 4 for typical graphs.
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 a sigmoid graph and log phase, the sample is considered Negative, and CT, if present, is not reliable.

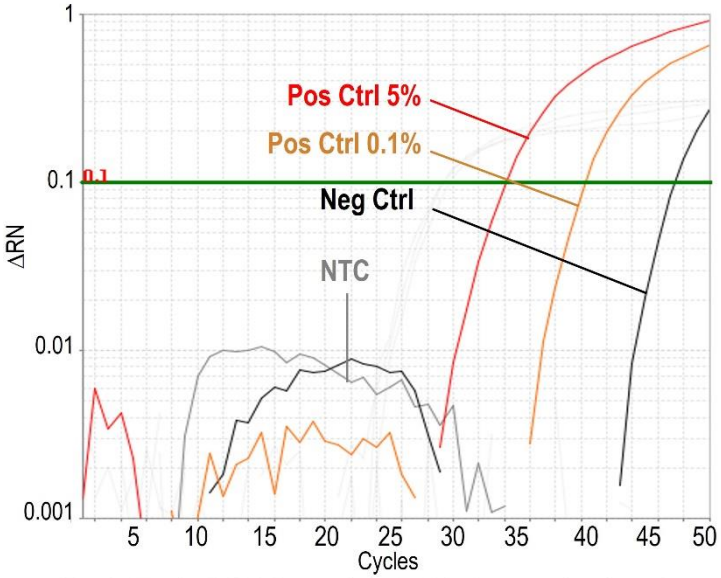


Fig 3. Typical JAK2 graph in FAM channel for StepOne

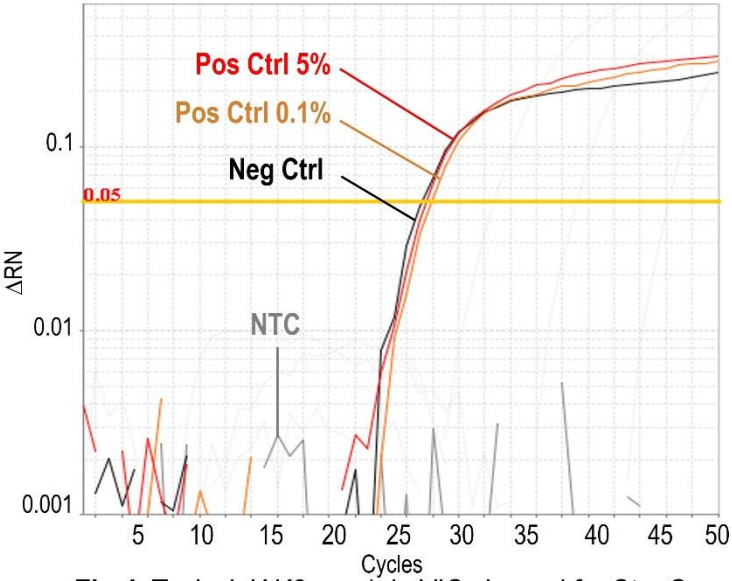


Fig 4. Typical JAK2 graph in VIC channel for StepOne

For detection of JAK2 V617F, in addition to sample, 0.1% Positive Control and Negative Control must be assessed too.
Calculate ΔCT for each sample including 0.1% Pos Ctrl and Neg Ctrl and patient sample according to the below formula.

$$\Delta CT = CT_{FAM\ Ch} - CT_{VIC\ Ch}$$

Note! If CT of Negative Control is higher than 45 or it remains negative in Green Channel, use CT of 45 for calculation.
Consider following points for analyzing:

- A sample is **Positive** for V617F, when sample ΔCT is less than 0.1% Pos Ctrl ΔCT.
- A sample is **Negative** for V617F, when sample ΔCT is higher than Neg Ctrl ΔCT.
- A sample is **Inconclusive,** when sample ΔCT is higher than 0.1% Pos Ctrl ΔCT and less than Neg Ctrl ΔCT.

Above points are summarized in the following table.

ΔCT	Result
ΔCT Sample < ΔCT 0.1% Pos Ctrl	**Positive** for V617F
ΔCT Sample > ΔCT Neg Ctrl	**Negative** for V617F
ΔCT 0.1% Pos Ctrl < ΔCT Sample < ΔCT Neg Ctrl	**Inconclusive**

As an example, If CT of Neg Ctrl is 47 in FAM channel and 28 in VIC channel, the ΔCT is 19. And, If CT of 0.1% Pos Ctrl is 39 in FAM channel and 28 in VIC channel, the ΔCT is 11. For patient sample with the CT of 39 in FAM channel and 28 in VIC channel, ΔCT is 8 and less than 0.1% Pos Ctrl ΔCT (11) so, patient sample is considered Positive for V617F. The example is summarized in below Table.

Sample	FAM CT	VIC CT	ΔCT
Neg Ctrl	47	28	47-28=19
0.1% Pos Ctrl	39	28	39-28=11
Patient sample	35	27	35-27=8

22. Sensitivity

The analytical detection limit of the kit was assessed with dilution series of the positive target in negative DNA and showed a limit of detection equal to 0.1% or 1 in 1,000. In other words, if in 1,000 cells only one is positive, it will be detected in 95% cases. To meet this level of sensitivity, extracted sample should contain 10-50 ng/µl DNA.

23. Disposal Method

The contents of the kit do not require any special method of disposal and can be directly discarded. But infectious laboratory specimens should be maintained in 5% Sodium Hypochlorite overnight and then discarded.

24. Technical Support

For technical support, contact us via phone at +98 993-6223241 and email: info@novingene.com

25. Contact Information

NovinGene ParsVira
Address: No. 5, Iranshahr St, Tehran, Iran 1581633336.
Tel: +98 21-88837393
+98 990 -1813124
Email: info@novingene.com
Website: www.novingene.com

26. References

- Jones, D. (2010). Neoplastic Hematopathology. Springer Science & Business Media.
- Yoo, J.H., Park, T.S., Maeng, H.Y., Sun, Y.K., Kim, Y.A., Kie, J.H., Cho, E.H., Song, J., Lee, K.A., Suh, B. and Choi, J.R., 2009. JAK2 V617F/C618R mutation in a patient with polycythemia vera: a case study and review of the literature. Cancer genetics and cytogenetics, 189(1), pp.43-47.
- Levine, R.L., Pardanani, A., Tefferi, A. and Gilliland, D.G., 2007. Role of JAK2 in the pathogenesis and therapy of myeloproliferative disorders. Nature reviews cancer, 7(9), pp.673-683.
- Mackay IM. Real-time PCR in the microbiology laboratory. Clin. Microbiol. Infect. 2004; 10 (3): 190 – 212.

27. Symbols

RUO Research use only	Manufacturer	Consult instructions for use
LOT Lot number	Content sufficient for <n> tests	Use-by date
REF Catalogue number	SN Serial number	-10°C / -30°C Temperature limit

For more information and resources please visit our website; www.novingene.com