راهنمای کیت تشخیص

BRAF Qualitative Detection Kit (RUO-24 Test)

شرکت رادمان تشخیص پارس

REF: RTP061

❖ مقدمه

ژن BRAF کد کننده ی پروتئین سرین/ تیروزین کینازی می باشد که نقش کلیدی در تنظیم مسیر های سلولی MEP/ERK کینازی، از مسیرهای موثر در روی رشد و تکثیر سلول ها، دارد. جهش های سوماتیکی در ژن BRAF، در بسیاری از سرطان ها از جمله non-Hodgkin lymphoma، سرطان روده بزرگ، ملانومای بدخیم، تیروئید کارسینوما و سرطان ریه مشاهده می شود. از شایع ترین جهش های ژن BRAF، جهش از نوع جایگزینی در کدون 600 می باشد که سبب فعال شدن بخش دومین کینازی و فعال شدن دائمی پروتئین می شود. موتاسیون ژن BRAF به طور عمومی در تومور هایی که فاقد جهش در ژنهای EGFR، KRAS وNRAS هستند اتفاق می افتد.

لیست موتاسیون های قابل شناسایی توسط کیت RTP BRAF در جدول 1 ، آورده شده است:

شماره ویال	جهش	تغییرات نوکلئوتید
1	V600E	c.1799T>A
2	V600E Complex	c.1799_1800TG>AA
3	V600D	1799_1800TG>AT
4	V600G	c.1799T>G
5	V600K	c.1798_1799GT>AA
6	V600M	BRAF c.1798G>A
7	V600R	c.1798_1799GT>AG

جدول 1

❖ حیطه کاربرد

کیت RTP BRAF یک کیت تشخیصی، جهت شناسایی کیفی جهش های سوماتیکی در کدون 600 ژن BRAF در DNA ژنومی استخراج شده از انواع بافت توموری (بافت تازه، یخ زده و پارافینه) می باشد. این کیت بر پایه تکثیر اختصاصی توالی جهش یافته معین در نمونه های شامل ترکیبی از آلل وحشی و موتانت مورد نظر، از طریق ARMS PCR[1] طراحی شده است. دقت

[1] Amplification Refractory Mutation System PCR

طراحی پرایمرها سبب می گردد تا مقادیر بسیار اندک موتانت در نمونه هایی که اکثریت توالی غیر جهش یافته هستند قابل شناسایی باشد.

❖ محتویات کیت

کیت RTP BRAF، 24 تستی بوده و شامل 7 ویال میکس جداگانه برای شناسایی جهش های سوماتیکی ناحیه کدون 600 ژن BRAF، یک ویال برای شناسایی ژن رفرانس (ژن مرجع که جفت پرایمر پروب آن قابلیت شناسایی هیچگونه پلی مورفیسم BRAF را ندارد) و یک ویال کنترل داخلی (IC) می باشد.

پیشنهاد می گردد قبل از آغاز آزمایش، جهت ارزیابی کیفیت و میزان DNA نمونه، ابتدا مراحل واکنش با شناسایی میزان ژن رفرانس در نمونه های کنترل مثبت، کنترل منفی و نمونه بیمار، ست شود.

محتویات	توضیح محتویات	حجم
BRAF QL Master Mix	مخلوط مستر میکس مورد نیاز برای PCR	960 µL x 2
BRAF QL Primer & Probe Mix 1 (V600E)	پرایمر و پروب مخصوص ژن رفرانس جهت ارزیابی کیفیت و کمیت DNA نمونه	60 µL
BRAF QL Primer & Probe Mix 2 (V600E Complex)	پرایمر پروب مخصوص شناسایی موتاسیون V600E	60 µL
BRAF QL Primer & Probe Mix 3 (V600D)	پرایمر پروب مخصوص شناسایی موتاسیون V600E Complex	60 µL
BRAF QL Primer & Probe Mix 4 (V600G)	پرایمر پروب مخصوص شناسایی موتاسیون V600D	60 µL
BRAF QL Primer & Probe Mix 5 (V600K)	پرایمر پروب مخصوص شناسایی موتاسیون V600G	60 µL
BRAF QL Primer & Probe Mix 6 (V600M)	پرایمر پروب مخصوص شناسایی موتاسیون V600K	60 µL
BRAF QL Primer & Probe Mix 7 (V600R)	پرایمر پروب مخصوص شناسایی موتاسیون V600M	60 µL
BRAF QL Primer & Probe Mix 8 (REF)	پرایمر پروب مخصوص شناسایی موتاسیون V600R	60 µL

BRAF QL IC Primer & Probe Mix 9	پرایمر پروب مخصوص شناسایی موتاسیون ژن کنترل داخلیIC	480 µL x 2
BRAF QL Positive Control (PC)	Positive Control	200 µL
BRAF QL NTC	Nuclease free Water	1000 µL

❖ **شرایط نگهداری کیت**

- تمامی اجزای کیت می بایست در دمای 20- درجه سانتیگراد نگهداری شوند. در صورت نگهداری در این شرایط تا زمان تاریخ انقضای مندرج بر روی ویال ها، کیت قابل استفاده می باشد.
- از ذوب و انجماد کردن مکرر اجزای کیت جدا خودداری نمایید. در صورت نیاز به استفاده مکرر، پیشنهاد می شود محلول ها را بسته به میزان مورد نیاز در هر بار استفاده در ویال های جداگانه در دمای 20- درجه سانتیگراد نگهداری کنید. اینکار در حفظ کیفیت و حساسیت کیت نقش موثری دارد.
- نتایج کنترل کیفی نشان می دهد اجزای کیت قابلیت سه مرتبه متوالی ذوب و انجماد را دارند. از ذوب و انجماد محلول ها بیش از سه مرتبه جدا خودداری کنید.
- کلیه اجزای کیت تا تاریخ انقضا درج شده بر روی محصول پایدار می باشند و در نتیجه پس از گذشت تاریخ انقضا از این محصول استفاده نشود.

نتایج مطلوب و صحیح از طریق استفاده دقیق طبق دستورالعمل استفاده از کیت بدست می آید، هر گونه تخلف از این دستورالعمل می تواند منجر به بدست آمدن جواب های نامعتبر شود.

❖ **موارد مورد نیاز جهت انجام واکنش که در داخل کیت تعبیه نشده اند**

- پیپت در اندازه های مختلف
- سمپلر و سر سمپلر فیلتر دار در سایز های مختلف
- ویال های میکروسانترفیوژ استریل در اندازه های 1/5 و 2 میلی لیتر
- هود لامینار
- دستگاه Real-Time PCR
- دستگاه ورتکس-اسپین
- کیت استخراج DNA
- ویال های مخصوص دستگاه PCR
- هات پلیت

❖ دستگاه های سازگار با کیت RTP BRAF

کیت RTP BRAF قابل استفاده با انواع مختلف دستگاه Real-Time PCR روتوری و پیلیتی می باشند، در پایین به تعدادی از این دستگاه ها اشاره شده است :

- Applied Biosystems™ 7500 series
- Applied Biosystems™ QuantStudio® series
- Rotor-Gene Q
- Bio-Rad CFX96, CFX384
- Roche -LightCycler® 480/480 II and COBAS z 480

❖ استخراج DNA

جهت استخراج DNA می توان از انواع کیت های موجود در بازار استفاده نمود. لیکن پیشنهاد ما استفاده از کیت تولیدی شرکت رادمان تشخیص پارس است:

کمپانی سازنده	کیت پیشنهادی	نوع نمونه
رادمان تشخیص پارس	RTP DNA Tissue extraction kit	بافت تازه

- با توجه به اهمیت نقش کیفیت و خلوص DNA استخراج شده در عملکرد کیت پیشنهاد می گردد، حتما پیش از آغاز ارزیابی موتاسیون، کیفیت و خلوص DNA با دستگاه اسپکتروفوتومتر سنجیده شود.
- میزان A260/A280 می بایست بین 1/7 تا 2/0 باشد، مقادیر کمتر این مقدار نشان دهنده وجود آلودگی پروتئینی است.
- واکنش PCR برای حداقل 20ng و 40ng نمونه DNA استخراج شده، به ترتیب سنجیده با دستگاه های فلوئورومتر و اسپکترومتر بهینه سازی شده است.

❖ مراحل انجام واکنش Real-Time PCR

آماده سازی مخلوط واکنش

- از ورتکس نمودن مستر میکس اجتناب کنید. می توانید کمی به آرامی آن را پیپتاژ نمایید.
- سپس جهت اطمینان حاصل نمودن از اینکه تمامی محلول ویال ها در انتهای ویال جمع شده اند، ویال مستر میکس و پنج ویال میکس پرایمر- پروب موتاسیون ها را کمی سانتریفیوژ نمایید.

جهت آماده سازی مخلوط واکنش مطابق جدول شماره (2) عمل نمایید:

معرف	Tube1	Tube2	Tube3	Tube4	Tube5	Tube6	Tube7	Tube8
Multiples Master Mix	10 µL	10 µL	10 µL	10 µL	10 µL	10 µL	10 µL	10 µL
Primer & Probe Mix 1 (V600E)	2.5 µL	-	-	-	-	-	-	-
Primer & Probe Mix 2 (V600E Complex)	-	2.5 µL	-	-	-	-	-	-
Primer & Probe Mix 3 (V600D)	-	-	2.5 µL	-	-	-	-	-
Primer & Probe Mix 4 (V600G)	-	-	-	2.5 µL	-	-	-	-
Primer & Probe Mix 5 (V600K)	-	-	-	-	2.5 µL	-	-	-
Primer & Probe Mix 6 (V600M)	-	-	-	-	-	2.5 µL	-	-
Primer & Probe Mix 7 (V600R)	-	-	-	-	-	-	2.5 µL	-
Primer & Probe Mix 8 (REF)	-	-	-	-	-	-	-	2.5 µL
IC Primer & Probe Mix 9	2.5 µL	2.5 µL	2.5 µL	2.5 µL	2.5 µL	2.5 µL	2.5 µL	2.5 µL
حجم نهایی	15 µL	15 µL	15 µL	15 µL	15 µL	15 µL	15 µL	15 µL

جدول شماره 2

- پس از مخلوط نمودن مقادیر بالا، ویال را به خوبی پیپتاژ و برای 10 مرتبه سر و ته نمایید.
- دقت کنید در این مرحله به هیچ عنوان ویال ها را ورتکس نکنید.
- سپس مخلوط واکنش مستر میکس را به ویال های 0.2ml مخصوص واکنش PCR اضافه و مطابق جدول شماره 3 عمل نمایید.

Reagent	Tube1	Tube2	Tube3	Tube4	Tube5	Tube6	Tube7	Tube8	NTC	PC
Prepared Reaction Mix	15 µL	15 µL	15 µL	15 µL	15 µL	15 µL	15 µL	15 µL	15 µL	15 µL
Nuclease Free Water (NTC)	-	-	-	-	-	-	-	-	5 µL	-
BRAF Positive Control	-	-	-	-	-	-	-	-	-	5 µL
Extracted sample DNA	5 µL	5 µL	5 µL	5 µL	5 µL	5 µL	5 µL	5 µL	-	-
Total	20 µL	20 µL	20 µL	20 µL	20 µL	20 µL	20 µL	20 µL	20 µL	20 µL

جدول شماره 3

- سپس جهت اطمینان از مخلوط شدن اجزای واکنش ویال ها را چند بار سر و ته نموده و سانتریفیوژ نمایید. در ادامه، جهت انجام واکنش PCR ویال های را در دستگاه Real-Time PCR قرار می دهیم.

❖ **برنامه زمانی و دمایی دستگاه**

مطابق جدول 4 ، پروفایل دمایی و زمانی دستگاه را تنظیم کنید:

مرحله	دما به درجه سانتیگراد	زمان	خوانش فلورسنت	چرخه ها
1	94	10 دقیقه	-	1
2	94	15 ثانیه	-	10
3	60	60 ثانیه	دارد	40

جدول شماره 4

کانال های دستگاه را مطابق جدول زیر انتخاب نمایید.

Detection	Detector Name	Reporter	Quencher	Tube No.	Gain Setup (RGQ)
BRAF	BRAF	FAM/GREEN	None	1-8	Manual
Internal Control	IC	VIC /YELLOW	None	1-8	Manual

Passive Reference Dye-ROX

جدول 5

❖ **تنظیمات نرم افزار دستگاه (تعیین Threshold)**

S. No.	Applied Biosystem	Threshold value range
1	FAM	0.1-0.5
2	VIC	0.05-0.3

جدول 6

تنظیمات جدول بالا برای دستگاه های Applied Biosystems™ 7500 series و Applied Biosystems™ QuantStudio® series مناسب می باشند.

چنانچه دستگاه شما متفاوت است جهت تنظیمات با بخش پشتیبانی شرکت تماس حاصل فرمایید.

❖ **تفسیر داده ها**

آنالیز واکنش های مربوط به کنترل مثبت و منفی

کنترل ها	Ct در کانال VIC	Ct در کانال FAM	تفسیر داده
کنترل منفی	Ct≤36	هر گونه Ct	- آلودگی: آزمایش دوباره تکرار شود. امکان آنالیز نتایج نمونه وجود ندارد.
کنترل مثبت	18≤Ct≤25	18≤Ct≤25	- تست درست انجام شده و امکان ارزیابی نتایج نمونه وجود دارد
	Ct<18 یا Ct>25	Ct<18 یا Ct>25	- اشتباهی در نحوه ی ست آپ واکنش و یا ست آپ PCR رخ داده و امکان آنالیز نتایج نمونه وجود ندارد.

جدول 7

❖ **آنالیز ژن رفرانس (جهت ارزیابی کیفیت DNA نمونه)**

نمونه	Ct در کانال FAM (REF)	Ct در کانال VIC (IC)	تفسیر داده
DNA	20≤Ct≤28	23≤Ct≤30	- نمونه حاوی مقدار مناسبی DNA بوده و برای ارزیابی موتاسیون ها مناسب است.
DNA	Ct<20	Ct<23	- مقدار DNA در نمونه زیاد است باید رقیق شود تا Ct در بازه مناسب قرار بگیرد.
DNA	Ct>28	Ct>30	- احتمال وجود مهارکننده های PCR و یا مقادیر نامناسب نمونه. در این حالت امکان ارزیابی موتاسیون وجود ندارد. و می بایست یکی از راهکارهای زیر انتخاب شود: 1- مجدد مرحله استخراج را انجام دهید تا DNA نمونه با غلظت و کیفیت بالاتر داشته باشید. 2- اگر احتمال میدهید به دلیل وجود مهارکننده ها است نمونه را رقیق کنید تا مهارکننده ها کاهش یابند. ولی توجه داشته باشید که اینکار روی غلظت نمونه تاثیر منفی دارد.

جدول 8

- **در آنالیز نتایج به نکات زیر دقت کنید:**

- چنانچه Ct کنترل مثبت و منفی در بازه ی مشخص شده نبود آزمایش فاقد اعتبار بوده و نتایج قابل ارزیابی نمی باشند.
- اگر ژن کنترل داخلی (IC) در دامنه تعیین قرار نداشت اما در کانال FAM تکثیر بالا مشاهده کردید آزمایش معتبر بوده و آنالیز داده امکان پذیر است. در این حالت به دلیل واکنش رقابتی ژن کنترل داخلی مجال تکثیر نداشته است.
- اگر چنانچه در هر دو کانال FAM و VIC تکثیری مشاهده نشد، آزمایش فاقد اعتبار است. در این حالت امکان دارد وجود مهارکننده های PCR منجر به ایجاد نتایج منفی کاذب شده باشد.

❖ **آنالیز موتاسیون ها**

برای شناسایی میزان موتاسیون برای هر ژن موتانت می بایست مقدار Δ Ct آن موتاسیون را تعیین نمود که مطابق با فرمول زیر محاسبه می گردد.

$$\Delta Ct = Ct\ Mutation - Ct\ Reference$$

حال میزان Δ Ct به دست آمده برای هر موتانت را با آنچه که در جداول زیر آورده شده است مقایسه کنید.

نمونه ها زمانی که Δ Ct آنها کمتر و یا مساوی با میزان Δ Ct value Cut off تعیین شده در جداول زیر باشد مثبت در نظر گرفته می شوند.

اگر Δ Ct نمونه بیشتر از این مقدار باشد، ممکن است یا نمونه حاوی مقادیر کمتری از درصد قابل شناسایی موتاسیون در کیت RTP BRAF باشد و یا گونه وحشی[2] (فاقد موتاسیون) باشد.

Assay	Internal Control Amplification	Δ Ct	Results
V600E V600E Complex V600D V600G V600K V600M V600R	Ct<30	<9.6 <11.5 <10.9 <12.4 <10.2 <11.5 <7.8	V600E Positive V600E Complex Positive V600D Positive V600G Positive V600K Positive V600M Positive V600R Positive
V600E V600E Complex V600D V600G V600K V600M V600R	Ct<30	>9.6 >11.5 >10.9 >12.4 >10.2 >11.5 >7.8	Wild Type or below LOD
V600E V600E Complex V600D V600G V600K V600M V600R	No signal or Ct>30	- - - - - - -	PCR Reaction Failed: Insufficient DNA/ Error in PCR setup or dispensing/ PCR inhibition

جدول 9

[2] Wild Type

❖ **ارزیابی عملکرد کیت**

- کمترین حد شناسایی موتاسیون (LOD) : 1% معادل 5 میکروگرم
- حساسیت بالینی: 100 درصد
- اختصاصیت بالینی: 100 درصد

❖ **توصیه های لازم جهت رفع خطاهای احتمالی در Real-Time PCR**

راهکارهای احتمالی	دلایل احتمالی	خطای احتمالی
- تکرار واکنش با مواد جدید - پیپتاژ ویال کنترل مثبت در آخرین مرحله - ضدعفونی کردن محل انجام آزمایش و تمامی وسایل	- وقوع آلودگی در حین آماده سازی نمونه ها و یا در حین واکنش PCR	مشاهده تکثیر در نمونه ی کنترل منفی
- دقت در اضافه کردن تمامی مواد مورد نیاز در ویال - بررسی تمامی مراحل انجام کار بخصوص بررسی احتمال خطای سرسمپلر - درج نام نمونه ها روی تمامی ویال های 1/5ml میکروسانتریفیوژ و ویال PCR - بررسی شرایط نگهداری و تاریخ انقضای مندرج بر روی لیبل ویال کنترل مثبت و استفاده از ویال جدید - چک کردن پروفایل دمایی داده شده به دستگاه ا دستورالعمل داخل کیت	- درست کردن اشتباه مخلوط واکنش - عدم اضافه نمودن و یا اضافه کردن ناکافی کنترل مثبت - اضافه کردن اشتباه DNA نمونه در ویال کنترل مثبت - شرایط نگهداری نامناسب کنترل مثبت و یا استفاده از کنترل مثبت تاریخ مصرف گذشته - تنظیم اشتباه پروفایل دمایی و زمانی دستگاه	عدم مشاهده تکثیر در نمونه کنترل مثبت
- بررسی مجدد شرایط نگهداری کیت - استفاده از نمونه ی تازه و استخراج مجدد نمونه با کیت های ذکر شده در دستورالعمل	- ذوب و انجماد مواد بیش از حد نوشته شده در دستورالعمل و یا نگهداری در شرایط نامناسب - استفاده از DNA نمونه با کیفیت و خلوص پایین	عدم مشاهده سیگنال و یا سیگنال ضعیف در کانال مربوط به ژن رفرانس (VIC/HEX)

❖ **هشدار ها :**

- پیش از آغاز آزمایش از کالیبر بودن تمام تجهیزات اطمینان حاصل کنید.
- تمامی مواد را پیش از آغاز واکنش در دمای محیط ذوب و سپس کمی سانتریفوژ کنید.
- DNA نمونه استخراج شده را در دمای 20 - درجه سانتیگراد نگهداری نمایید و در حین انجام آزمایش بر روی کول رک[3] قرار دهید.
- پیش از آغاز، محل انجام آزمایش را با محلول ضدعفونی کننده مناسب، ضدعفونی نمایید.
- تمامی مراحل انجام آزمایش بایستی زیر هود لامینار، ورک استیشن استریل انجام گردد.
- با توجه به اهمیت تاثیر کاربر متخصص در عملکرد کیت و نتایج حاصل از آن، از افراد با سابقه، متخصص و آموزش دیده جهت انجام تست کمک بگیرید.

از کیفیت جمع آوری نمونه و استخراج آن، پیش از آغاز آزمایش اطمینان حاصل نمایید

- از کیت RTP BRAF صرفا برای ارزیابی موتاسیون ژن BRAF در نمونه های انسانی استفاده کنید.
- تمامی نمونه ها باید به صورت بالقوه عفونی در نظر گرفته شوند. پرسنل آزمایشگاه باید ملزومات پوشش حرفه ای و محافظ را رعایت کنند (شامل دستکش های یکبار مصرف، عینک محافظ، گان و یا روپوش آزمایشگاه). شستشوی دست ها قبل و بعد از شروع کار باید انجام شود. دستکش ها بعد از هر نمونه باید تعویض شوند تا از ایجاد آلودگی جلوگیری شود.
- پروسه آزمایش باید مطابق با پروتکل فوق انجام شود.
- این محصول بعد از گذشتن تاریخ مصرف نباید استفاده شود.

RTP
RADMAN TASHKHIS PARS
رادمان تشخیص پارس

[3] Cool rak