راهنمای استفاده از کیت تشخیصی
EGFR Qualitative Detection Kit (24 Test)
شرکت رادمان تشخیص پارس
REF: RTP060

❖ مقدمه

رسپتور فاکتور رشد اپیدرمال (EGFR)[1] از اعضای خانواده ی رسپتور های تیروزین کینازی بوده که در سطح سلول های اپیدرمال بیان می شود. EGFR نقش کلیدی در انتقال پیام سلولی در راستای افزایش رشد و تکثیر سلولی را دارد. افزایش بیان این فاکتور در بسیاری از انواع سرطان ها مانند سرطان ریه و گلیوبلاستوما[2] مولتی فرم مشاهده می شود. همچنین گزارش ها حاکی از ارتباط بین بیان خارج از کنترل این ژن با سطوح خطرناک تر سرطان و روند بدخیمی آن می باشد. کیت RTP EGFR موتاسیون های شایع ژن EGFR از جمله T907M و C797S که مرتبط با ایجاد مقاومت با مراحل اول، دوم و سوم درمان با مهارکننده های تیروزین کینازی هستند را شناسایی می کند. شناسایی موتاسیون های سوماتیکی در ژن EGFR یک راهکار موثر برای پیش بینی پاسخ های سلولی به مهارکننده های تیروزین کینازی در راستای افزایش بقا بیماران مبتلا به سرطان ریه تحت درمان هدفمند می باشد.

❖ حیطه کاربرد

کیت RTP EGFR یک کیت تشخیصی جهت شناسایی کیفی 32 جهش سوماتیکی در اگزون های 18و19و20 و 21 ژن EGFR در DNA بافت توموری (بافت تازه، یخ زده و پارافینه) و همچنین نمونه های مایع می باشد. نتایج حاصل از این کیت کمک شایانی به پزشک در شناسایی بیماران مبتلا به سرطان ریه و پاسخ مثبت آنان به درمان با مهارکننده های تیروزین کینازی می نماید.
این کیت بر پایه تکثیر اختصاصی توالی جهش یافته معین در نمونه های شامل ترکیبی از گونه وحشی و موتانت مورد نظر، از طریق ARMS[3] PCR طراحی شده است. دقت 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 24 تستی بوده و شامل 5 ویال میکس جداگانه برای شناسایی جهش های سوماتیکی در اگزون های 18،19،20و21 ژن EGFR و همچنین یک ویال برای شناسایی ژن رفرانس (ژن کنترل داخلی (IC) که ناحیه ای از اگزون 2 ژن EGFR را تکثیر نموده و جفت پرایمر-پروب آن قابلیت شناسایی هیچگونه پلی مورفیسم EGFR را ندارد) می باشد.

[1] Epidermal Growth Factor Receptor
[2] Glioblastoma
[3] Amplification-refractory mutation system

پیشنهاد می گردد قبل از آغاز واکنش سنجش موتاسیون، 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
EGFR Master Mix	مخلوط مستر میکس مورد نیاز برای PCR	720 µL x 2
EGFR REF Primer & Probe Mix (R)	پرایمر و پروب مخصوص ژن رفرانس جهت ارزیابی کیفیت و کمیت DNA نمونه	120 µL
EGFR Primer & Probe Mix 1	پرایمر پروب مخصوص شناسایی 19Del و ژن رفرانس	120 µL
EGFR Primer & Probe Mix 2	پرایمر پروب مخصوص شناسایی جهش T790M و ژن رفرانس	120 µL
EGFR Primer & Probe Mix 3	پرایمر پروب مخصوص شناسایی موتاسیون های S768I , G719X و ژن رفرانس	120 µL
EGFR Primer & Probe Mix 4	پرایمر پروب مخصوص شناسایی موتاسیون های C797S , L858R و ژن رفرانس	120 µL
EGFR Primer & Probe Mix 5	پرایمر پروب مخصوص شناسایی موتاسیون های e20ins , L861Q و ژن رفرانس	120 µL
EGFR Negative Control (NTC)	Nuclease free Water	1500 µL
EGFR Positive Control (PC)	کنترل مثبت حاوی تمامی موتاسیون های ژن EGFR	240 µL

جدول 1

❖ **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 دستگاه های سازگار با کیت RTP EGFR**

کیت RTP EGFR 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 اسید نوکلئیک می توان از انواع کیت های موجود در بازار که توسط تولید کنندگان مختلف در دسترس هستند استفاده نمود. لیکن پیشنهاد ما استفاده از کیت زیر می باشد.

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 نشاندهنده وجود آلودگی پروتئینی است.
-

❖ **انجام واکنش Real-Time PCR**

دستورالعمل انجام qPCR جهت ارزیابی کیفیتDNA نمونه

یکی از مزایای کیت RTP EGFR ایجاد امکان ارزیابی کیفیت نمونه و اطمینان حاصل نمودن از آن پیش از ارزیابی موتاسیون هاست.

آماده سازی مسترمیکس

- در این مرحله مستر میکس (Multiples Master Mix) و EGFR REF PPM (R) را به دمای اتاق رسانده می شود.
- سپس محلول EGFR REF PPM (R) را ورتکس نمایید.
- 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 هر دو ویال را کمی سانتریفیوژ نمایید.

جهت آماده سازی مخلوط واکنش مطابق جدول 2 عمل نمایید:

معرف	حجم (1 RXN)
Multiples Master Mix	10 µL
EGFR REF PPM (R)	5 µL
حجم نهایی	15 µL

جدول 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 را ورتکس نکنید.
- سپس مخلوط واکنش مستر میکس را به ویال های 0.2 میلی لیتری مخصوص واکنش PCR منتقل کرده و مطابق جدول 3 عمل نمایید.

معرف	PCR Tube1 (کنترل منفی)	PCR Tube2 (کنترل مثبت)	PCR Tube3 (نمونه)
Prepared Reaction Mix	15µL	15 µL	15 µL

Nuclease Free Water (NTC)	5 µL	-	-
EGFR Positive Control	-	5 µL	-
Extracted sample DNA	-	-	5 µL
Total	20 µL	20 µL	20 µL

جدول 3

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

❖ برنامه زمانی و دمایی دستگاه

مطابق جدول 4 پروفایل دمایی و زمانی را تنظیم کنید:

مرحله	دما به درجه سانتیگراد	زمان	خوانش فلورسنت	چرخه ها
1	94	10 دقیقه	-	1
2	94 68	15 ثانیه 30 ثانیه	-	10
3	94 60	60 ثانیه 60 ثانیه	- دارد	40

Passive Reference Dye-None

جدول 4

کانال های دستگاه را مطابق جدول 5 انتخاب نمایید.

Target	Reporter	Quencher
Reference	HEX/VIC/YELLOW	None

جدول 5

❖ تنظیمات نرم افزار دستگاه

تعیین Absolute threshold Value در هر ران واکنش، بسته به نوع دستگاه و مدل و کالیبراسیون متفاوت است. خواهشمند است جهت تنظیم مناسب برای نخستین بار، با تیم پشتیبانی مولکولی شرکت رادمان تشخیص پارس تماس حاصل فرمایید.

❖ **تفسیر داده ها**

❖ **آنالیز واکنش های مربوط به کنترل مثبت و منفی**

❖

کنترل ها	Ct در کانال VIC	تفسیر داده
کنترل منفی	هر گونه Ct	- آلودگی: آزمایش دوباره تکرار شود. امکان آنالیز نتایج نمونه وجود ندارد
کنترل مثبت	15≤Ct≤23	- تست درست انجام شده و امکان ارزیابی نتایج نمونه وجود دارد.
	Ct<15 یا Ct>23	- اشتباهی در نحوه ی ست آپ واکنش و یا ست آپ PCR رخ داده و امکان آنالیز نتایج نمونه وجود ندارد.

جدول 6

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

نمونه	Ct در کانال VIC	تفسیر داده
DNA نمونه	15≤Ct≤23	- نمونه حاوی مقدار مناسبی DNA بوده و برای ارزیابی موتاسیون ها مناسب است.
	Ct<15	- مقدار DNA در نمونه زیاد است باید رقیق شود تا Ct در بازه مناسب قرار بگیرد.
	Ct>23	- مقدار DNA در نمونه کم است. می بایست مجدد استخراج انجام بگیرد.

جدول7

❖ **دستورالعمل انجام qPCR جهت شناسایی موتاسیون های ژن EGFR در نمونه**

زمانی که نمونه ی استخراج شده از لحاظ میزان و کیفیت DNA مورد تایید قرار گرفت می توانید نمونه را از جهت انجام واکنش qPCR برای شناسایی موتاسیون های ژن EGFR مورد استفاده قرار دهید.

- **آماده سازی مخلوط واکنش**

- در این مرحله مستر میکس (Multiples Master Mix) را به همراه تمامی میکس های پرایمر- پروب موتاسیون ها به دمای اتاق برسانید.
- سپس هر 5 ویال میکس پرایمر پروب موتاسیون ها را ورتکس نمایید.
- 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 8 عمل نمایید.

معرف	Tube1	Tube2	Tube3	Tube4	Tube5
Multiples Master Mix	10 µL	10 µL	10 µL	10 µL	10µL
EGFR PPM1	5 µL	-	-	-	-
EGFR PPM2	-	5 µL	-	-	-
EGFR PPM3	-	-	5 µL	-	-
EGFR PPM4	-	-	-	5 µL	-
EGFR PPM5	-	-	-	-	5 µL
حجم نهایی	15 µL	15 µL	15 µL	15 µL	15 µL

جدول 8

- 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 0.2 میلی لیتری مخصوص واکنش PCR منتقل و مطابق جدول 9 عمل نمایید.

معرف	Tube1	Tube2	Tube3	Tube4	Tube5	NTC	PC
Prepared Reaction Mix	15 µL	15 µL	15 µL	15 µL	15 µL	15 µL	15 µL
Nuclease Free Water (NTC)	-	-	-	-	-	5 ul	-
EGFR Positive Control	-	-	-	-	-	-	5 ul
Extracted sample DNA	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

جدول 9

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

❖ برنامه زمانی و دمایی دستگاه

مطابق جدول 10 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 68	15 ثانیه 30 ثانیه	-	10
3	94 60	60 ثانیه 60 ثانیه	- دارد	40

Passive Reference Dye-None

جدول 10

کانال های دستگاه را مطابق جدول زیر انتخاب نمایید.

Tune No.	Target	Reporter	Quencher
1	19-Del Reference	FAM/Green VIC/HEX/Yellow	None
2	T790M Reference	FAM/Green VIC/HEX/Yellow	None
3	S768I Reference G719x	FAM/Green VIC/HEX/Yellow ROX/Texas Red/Orange	None
4	Reference L858R	FAM/Green VIC/HEX/Yellow	None
5	Ex20ins Reference L861Q	FAM/Green VIC/HEX/Yellow ROX/Texas Red/Orange	None

جدول 11

❖ **تنظیمات نرم افزار دستگاه**

هر نشانگر می بایست در Threshold متفاوتی آنالیز شود. تعیین Absolute threshold Value بسته به نوع دستگاه و مدل و کالیبراسیون آن متفاوت است. خواهشمند است جهت تنظیم مناسب برای نخستین بار، با تیم پشتیبانی مولکولی شرکت رادمان تشخیص پارس تماس حاصل فرمایید.

❖ **تفسیر داده ها**

- **آنالیز واکنش های مربوط به کنترل مثبت و منفی**

کنترل ها	Ct در کانال VIC	تفسیر داده
کنترل منفی	هر گونه Ct	- آلودگی: آزمایش دوباره تکرار شود. امکان آنالیز نتایج نمونه وجود ندارد
کنترل مثبت	15≤Ct≤23	- تست درست انجام شده و امکان ارزیابی نتایج نمونه وجود دارد
	Ct<15 یا Ct>23	- اشتباهی در نحوه ی ست آپ واکنش و یا ست آپ PCR رخ داده و امکان آنالیز نتایج نمونه وجود ندارد

جدول 12

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

نمونه	Ct در کانال VIC	تفسیر داده
DNA نمونه	15≤Ct≤23	- نمونه حاوی مقدار مناسبی DNA بوده و برای ارزیابی موتاسیون ها مناسب است.
	Ct<15	- مقدار DNA در نمونه زیاد است باید رقیق شود تا Ct در بازه مناسب قرار بگیرد.
	Ct>23	- مقدار DNA در نمونه کم است. می بایست مجدد استخراج انجام بگیرد.

جدول 13

- **آنالیز موتاسیون ها**

چنانچه Ct ژن رفرانس در هر ویال میکس موتاسیون ها در محدوده مجاز اعلام شده قرار گرفته باشد می توانیم نمونه ها را از جهت شناسایی موتاسیون ها مورد آنالیز قرار دهیم.

برای شناسایی میزان موتاسیون برای هر ژن موتانت میبایست مقدار ΔCt آن موتاسیون را نعیین نمود که مطابق با فرمول زیر محاسبه می گردد.

ΔCt = Ct Mutation – Ct Reference

توجه داشته باشید چنانچه برای ژن موتانت تکثیری در ویال رخ نداده باشد، میزان Ct آن ژن را مطابق با آخرین سیکل تکثیر یعنی 40 در نظر می بریم.

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

نمونه ها زمانی که ΔCt آنها کمتر و یا مساوی با میزان Cutoff ΔCt value تعیین شده در جداول زیر باشد، مثبت در نظر گرفته می شوند.

اگر ΔCt نمونه بیشتر از این مقدار باشد، ممکن است یا نمونه حاوی مقادیر کمتری از درصد قابل شناسایی موتاسیون در کیت RTP EGFR باشد و یا گونه وحشی[4] (فاقد موتاسیون) باشد.

[4] Wild Type

- **نحوه آنالیز در دستگاه های**

APPLIED BIOSYSTEMS™ QUANTSTUDIO/BIORAD CFX96

Tube No.	Target (FAM)	Cutoff ΔCt value	Target (Rox)	Cutoff ΔCt value
1	19-Del	12	-	-
2	T790M	9.3	-	-
3	S768I	10	G719x	9
4	C797S	11.8	L858R	12
5	Ex20ins	13	L861Q	11

جدول 14

- **نحوه آنالیز در دستگاه ROTOR-GENE Q**

Tube No.	Target (FAM)	Cutoff ΔCt value	Target (Rox)	Cutoff ΔCt value
1	19-Del	12	-	-
2	T790M	8.5	-	-
3	S768I	8	G719x	7.5
4	C797S	11.5	L858R	11.5
5	Ex20ins	12	L861Q	11

جدول 15

❖ **توصیه های لازم جهت آنالیز صحیح موتاسیون در نمونه ها**

- موتاسیون مثبت: در شرایطی که ΔCt کمتر و یا مساوی با Cutoff ΔCt value تعیین شده باشد.
- موتاسیون منفی: اگر ΔCt نمونه بیشتر از Cutoff ΔCt value باشد که در این حالت ممکن است یا نمونه حاوی مقادیر کمتری از درصد قابل شناسایی موتاسیون در کیت RTP EGFR باشد (منجر به نتیجه منفی کاذب) و یا نمونه فاقد موتاسیون باشد.

❖ **ارزیابی عملکرد کیت**

- کمترین حد شناسایی موتاسیون (LOD) : 1% معادل 5 میکروگرم
- حساسیت بالینی: 97.14 درصد
- اختصاصیت بالینی: 99.14 درصد
- میزان پیش بینی مثبت[5]: 98.55 درصد
- میزان پیش بینی منفی[6]: 98.29 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
- ذوب کردن و یا ورتکس ناکافی ویال کنترل مثبت - بررسی تمامی مراحل انجام کار بخصوص بررسی احتمال خطای سرسمپلر - 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	- عدم استفاده صحیح از کنترل مثبت - عدم اضافه نمودن و یا اضافه کردن ناکافی 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)

[5] Positive Predictive Value
[6] Negative Predictive Value

❖ 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[۷] 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.
- 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 آزمایش، باید تعویض شوند تا از ایجاد آلودگی جلوگیری شود.
- روند انجام آزمایش باید مطابق با پروتکل فوق انجام شود.
- از کیت RTP EGFR صرفا برای ارزیابی موتاسیون ژن EGFR در نمونه های انسانی استفاده کنید.

RTP
RADMAN TASHKHIS PARS
رادمان تشخیص پارس

[7] Cool rak