راهنمای کیت تشخیص

JAK2 Qualtitative Detection Kit (RUO -24 Test)

شرکت رادمان تشخیص پارس

REF: RTP058

❖ مقدمه

ژن JANUS KINASE 2 (JAK2) تیروزین کیناز JAK2 را کد می کند، که با بخش سیتوپلاسمی انواع سیتوکین های غشایی و گیرنده های فاکتور رشد برای انتقال سیگنال در سلول های خونساز مرتبط است. سیگنال دهی از طریق فعال سازی JAK2 باعث فسفوریلاسیون مبدل های سیگنال پایین دست و فعال کننده های پروتئین های رونویسی (STAT)[1] (مانند STAT5) می شود. فعال شدن این مسیر پیام رسانی در نهایت منجر به رشد و تمایز سلولی می گردد. نئوپلاسم میلوپرولیفراتیو مزمن (MPN)[2] ، بدخیمی سلول های بنیادی خونساز کلونال می باشد، که با تولید بیش از حد سلول های خونی مشخص می گردد. MPN اغلب دارای یک جهش تک نوکلئوتیدی اکتسابی در JAK2 است که به عنوان C. G1849T مشخص می شود.

جهش JAK2 Val617Phe (V617F)، جهشی با افزایش عملکرد است که منجر به تکثیر توده ی سرطانی می شود. جهش V617Fدر 95 تا 98 درصد پلی سیتمی ورا (PV)[3] ، 50 تا 60 درصد میلوفیبروز اولیه (PMF)[4] و ترومبوسیتمی ضروری (ET)[5] مشاهده می شود. معیارهای تشخیصی برای ET، MF، و PV که توسط سازمان بهداشت جهانی (WHO) پذیرفته شده است، شامل شناسایی یک نشانگر کلونال، برای آزمایش جهش JAK2 V617F در اگزون 14.1 است.

بررسی موتاسیون JAK2 V617F به تمایز این اختلالات میلوپرولیفراتیو از سایر شرایطی که ممکن است با علائم مشابهی مانند پلی سیتمی ثانویه[6]یا ترومبوسیتوز[7] واکنشی ظاهر شوند، کمک می کند. علاوه بر این، وجود یا عدم وجود جهشJAK2 V617F می‌تواند بر پیش‌آگهی تأثیر بگذارد و طبقه‌بندی خطر را برای بیماران مبتلا به MPNs اطلاع دهد.

❖ حیطه ی کاربرد

کیت RTP JAK2 Qualitative Detection برای تشخیص کیفی جهش V617F در ژن JAK2 با استفاده از تکنیک Real-Time PCR بر روی DNA ژنومی بیماران مشکوک به اختلال میلوپرولیفراتیو طراحی گردیده است. اساس کیت مبتنی بر تقویت و تکثیر ناحیه ژن آللی توسط پرایمر-پروب های اختصاصی JAK2 می باشد. در این کیت دو واکنش مستقل به صورت موازی وجود دارد:

درهر ویال واکنش، پرایمر-پروب اول JAK2 را شناسایی می کند و پرایمر-پروب دومی شناسایی ژن رفرانس (ژن مرجع که جفت پرایمر پروب آن قابلیت شناسایی هیچگونه پلی مورفیسم JAK2 را ندارد.) را تشخیص می دهد.

---

[1] Signal transducer and activator of transcription
[2] Myeloproliferative neoplasm
[3] Polycythemia vera
[4] Myelofibrosis
[5] Essential Thrombocytopenia
[6] Secondary polycythemia
[7] Thrombocytosis

Site : www.rtpmed.com
Email: info@rtpmed.com

❖ محتویات کیت

کیت RTP JAK2 Qualitative Detection حاوی معرف های تکثیر کننده برای 24 تست می باشد. پیشنهاد می گردد قبل از آغاز واکنش، جهت ارزیابی کیفیت و میزان DNA نمونه، ابتدا مراحل واکنش با شناسایی میزان ژن مرجع در نمونه های کنترل مثبت، کنترل منفی و نمونه بیمار ست شود.

محتویات	توضیح محتویات	حجم
JAK2 QL Master Mix	مخلوط مستر میکس مورد نیاز برای PCR	240µL
JAK2 QL Primer & Probe Mix	پرایمر پروب مخصوص شناسایی موتاسیونV617F و ژن رفرانس	120µL
JAK2 QL Positive Control (PC)	Positive Control	100 µL
JAK2 QL NTC	Nuclease free Water	500µL

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 ۵ / ۱ و ۲ میلی لیتر و ۰/۲ میلی لیتری
- هود لامینار
- آب مقطر استریل
- اتانول ۹۶-۱۰۰ درصد

- دستگاهReal-Time PCR
- دستگاه ورتکس-اسپین
- کیت استخراجDNA
- ویال های مخصوص دستگاهPCR
- هات پلیت

❖ دستگاه های سازگار با کیت RTP JAK2 Qualitative Detection

کیت RTP JAK2 Qualitative Detection 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 BiosystemsTM QuantStudio® 3 & 5
- Rotor-Gene Q
- Bio-Rad CFX96, CFX384
- Roche - LightCycler® 480/480 II and COBAS z 480
- AriaMx Real-Time PCR

❖ 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 استخراج اسید زیر است:

کمپانی سازنده	کیت پیشنهادی	نوع نمونه
رادمان تشخیص پارس	RTP Blood DNA Extraction Kit	خون

- 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 توسط دستگاه اسپکتروفوتومتر سنجیده شود.
- میزان A260/A280 می بایست بین ۱/۷ تا ۲/۰ باشد، مقادیر کمتر این مقدار نشان دهنده وجود آلودگی پروتئینی است.

توجه: از خون منجمد برای استخراج DNA استفاده نکنید.

❖ مراحل انجام واکنش Real-Time PCR

آماده سازی واکنش برای نمونه ها

جهت آماده سازی مخلوط واکنش مطابق جدول زیر عمل نمایید:

نام معرف	مقدار برای یک واکنش
JAK2 QL Master Mix	10 µL
JAK2 QL Primer & Probe Mix	5 µL
حجم نهایی	15 µL

جدول ۲

- 15 میکرولیتر از PCR Mix Master آماده شده فوق را در ویال های 0.2 میلی لیتری مخصوص واکنش PCR انتقال دهید و درب آن را ببندید
- برای ۱۵ میکرولیتر از مخلوط واکنش بالا، ۵ میکرولیتر DNA نمونه اضافه کنید.
- ۵ میکرولیتر از کنترل مثبت ارائه شده را به لوله کنترل مثبت اضافه کنید و حجم نهایی ویال کنترل مثبت را به ۲۰ میکرولیتر برسانید.
- ۵ میکرولیتر آب استریل را به لوله کنترل منفی اضافه کنید و حجم نهایی ویال کنترل منفی را با آب استریل به ۲۰ میکرولیتر برسانید.

❖ نکات مهم در هنگام انجام فرآیند Real-Time PCR

❖ تمام معرف ها را در دمای محیط (۲۵-۱۵ درجه سانتیگراد) ذوب کنید.

❖ معرف های واکنش نباید ورتکس شوند، در عوض با ضربه ملایم محتوای ویال را مخلوط کرده و هرگز مخلوط واکنش آماده شده را ورتکس نکنید.

❖ تمام ویال های معرف قبل از استفاده اسپین گردد.

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

❖ برنامه زمانی و دمایی دستگاه

مطابق جدول زیر پروفایل دمایی و زمانی را تنظیم کنید.

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

جدول ۳

کانال های دستگاه را مطابق جدول زیر انتخاب نمایید.

Detection	Detector Name	Reporter	Quencher
JAK2 Mutant	JAK2	FAM	None
JAK2 WT	Reference	VIC	None

Passive Reference Dye –Rox

جدول ۴

❖ **تنظیمات نرم افزار دستگاه (تعیینThreshold)**

S.No.	Applied Biosystem	Threshold value range
1	FAM	0.1-0.5
2	VIC	0.01-0.3

جدول ۵

با توجه به اینکه 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 FAM/VIC	تفسیر داده
کنترل منفی	عدم تکثیر	تست درست انجام شده و امکان ارزیابی نتایج نمونه وجود دارد.
	هر گونه Ct	آلودگی: آزمایش دوباره تکرار شود. امکان آنالیز نتایج نمونه وجود ندارد.
کنترل مثبت	17≤Ct≤24	تست درست انجام شده و امکان ارزیابی نتایج نمونه وجود دارد.
	Ct<17 یا Ct>24	اشتباهی در نحوه ی ست آپ واکنش و یا ست آپ PCR رخ داده و امکان آنالیز نتایج نمونه وجود ندارد.

جدول 6

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

رفرانس	Ct در کانال FAM/VIC	تفسیر داده
DNA نمونه ها	15≤Ct≤28	- 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>28	- احتمال وجود مهارکننده های PCR و یا مقادیر نامناسب نمونه. در این حالت امکان ارزیابی موتاسیون وجود ندارد. مجدد مرحله استخراج را انجام دهید تا DNA نمونه با غلظت و کیفیت بالاتر داشته باشید.

جدول ۷

❖ **تجزیه و تحلیل جهش:**

- نمونه ای که آنالیز ارزیابی DNA را پشت سر می گذارد مناسب است و می تواند برای جستجو جهش مورد تجزیه و تحلیل قرار گیرد, چرخه آستانه جهش (FAM) و چرخه آستانه ژن رفرانس (VIC/HEX) (Ct) را یادداشت کنید.
- مقادیر Δ Ct باید با فرمول زیر محاسبه شوند.

Ct REF–*ΔCt = Ct Mut

*اگر در لوله های جهش مشاهده نشد، 40 Ct را به عنوان آخرین سیکل در نظر بگیرید.

به منظور تشخیص صحیح، جدول زیر را ماهده کنید و نمونه ها را با مقادیر گزارش شده در جدول زیر مقایسه کنید:

کنترل ها/نمونه ها	ΔCt	تفسیر
کنترل منفی	بدون تقویت	- عدم آلودگی: تجزیه و تحلیل نمونه ها را ادامه دهید.
کنترل منفی	تقویت	- آلودگی احتمالی: امکان تجزیه و تحلیل نمونه ها وجود ندارد.
کنترل مثبت	ΔCt ≤ 10	- تجزیه و تحلیل نمونه ها را ادامه دهید.
کنترل مثبت	ΔCt > 10	- خطای احتمالی در ست کردن واکنش: امکان تجزیه و تحلیل نمونه ها وجود ندارد.
نمونه های مجهول	ΔCt ≤ 10	- نمونه برای جهش JAK2 V617F مثبت است

جدول ۸

❖ **ارزیابی عملکرد کیت**

- کمترین حد شناسایی موتاسیون (LOD) : 0.5% آلل جهش یافته در پس زمینه ی 99.5% آلل Wildtype
- حساسیت بالینی: 97.78% درصد
- اختصاصیت بالینی: 98.46% 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 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

جدول 9

❖ **هشدار های عمومی و تخصصی لازم در استفاده از کیت:**

- 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[8] 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 نمونه باید تعویض شوند تا از ایجاد آلودگی جلوگیری شود
- جهت تشخیص قطعی، نتایج حاصل از کیت می بایست همراه با سایر بررسی های بالینی مورد ارزیابی قرار گردد. 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

[8] Cool rak