راهنمای کیت تشخیص

JAK2 Quantitative Detection Kit (RUO -24 Test)

شرکت رادمان تشخیص پارس

REF: RTP059

❖ 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 V617F JAK2در 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 ی‌تواند بر پیش‌آگهی تأثیر بگذارد و طبقه‌بندی خطر را برای بیماران مبتلا به MPNs اطلاع 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

❖ حیطه ی کاربرد

کیت RTP JAK2 Quantitative Detection برای تشخیص کمی 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 جهش V617F در ژن JAK2 (Janus Kinase 2) در پس زمینه DNA ژنومی نوع وحشی است. کیت RTP JAK2 Quantitative Detection از کاوشگر فلورسنت هدفمند JAK2 V617F/G1849T مخصوص جهش برای شناسایی و تعیین کمیت DNA جهش یافته JAK2V617F با کپی پایین (1٪) در نمونه استفاده می کند.

❖ محتویات کیت

کیت RTP JAK2 Quantitative Detection حاوی معرف های تکثیر کننده برای 24 تست می باشد..

محتویات	توضیح محتویات	حجم
JAK2 QT Master Mix	مخلوط مستر میکس مورد نیاز برای PCR	480 µL
JAK2 QT Mutant Primer & Probe Mix	پرایمر پروب مخصوص شناسایی موتاسیونV617F	120 µL
JAK2 QT Wild Primer & Probe Mix	پرایمر پروب مخصوص شناسایی Wildtype JAK2	120 µL
JAK2 QL NTC	Nuclease free Water	1000 µL
JAK2 QT Wild Type Standards	• STD JAK2 WT 1 ($2x10^5$ copies/5 µl) • STD JAK2 WT 2 ($2x10^4$ copies/5 µl) • STD JAK2 WT 3 ($2x10^3$ copies/5 µl) • STD JAK2 WT 4 ($2x10^2$ copies/5 µl)	25 µL x 4
JAK2 QT Mutant Standards	• STD JAK2 Mutant 1 ($1x10^5$ copies/5 µl) • STD JAK2 Mutant 2 ($1x10^4$ copies/5 µl) • STD JAK2 Mutant 3 ($1x10^3$ copies/5 µl) • STD JAK2 Mutant 4 ($1x10^2$ copies/5 µl)	25 µL x 4

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 Quantitative Detection

کیت RTP JAK2 Quantitative 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 Biosystems™ StepOne series
- Applied Biosystems™ QuantStudio® series
- Rotor-Gene Q
- Bio-Rad CFX96, CFX384
- AriaMx Real-Time PCR
- Line gene K 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 کامل، خون محیطی تصفیه شده، لنفوسیت ها، سلول های چند هسته ای یا گرانولوسیت ها

- 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 شماره ۲ عمل نمایید:

نام معرف	نوع وحشی مقدار برای یک واکنش	جهش یافته مقدار برای یک واکنش
JAK2 QT Master Mix	۱۰ میکرولیتر	۱۰ میکرولیتر
JAK2 QT Mutant Primer & Probe Mix	۵ میکرولیتر	
JAK2 QT Wild Primer & Probe Mix	-	۵ میکرولیتر

جدول ۲

- ۱۵ 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 (250ng) 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.
- برای استفاده از استانداردها، ۵ میکرولیتر استانداردهای نوع وحشی و جهش یافته را به لوله های مربوطه اضافه کنید.
- 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.
- توجه داشته باشید که برای هر نمونه دو ویال واکنش آماده کنید.

- **استاندارد های کمی**

- استاندارد های کیت RTP JAK2 Quantitative، استانداردهای مبتنی بر پلاسمید هستند. کیت ۴استاندارد از 10^2 کپی تا 10^5 کپی هایی از آلل JAK2 WT و JAK2 Mutant به همراه دارد. به منظور اطمینان از منحنی های استاندارد دقیق، هر ۴ رقت استاندارد در هر ران کاری گذاشته شود.

اولین پنل مرجع بین‌المللی WHO برای جهش ژنومیک JAK2 V617F با کد NIBSC: 16/120 شامل هفت ویال کدگذاری شده جداگانه است که هر کدام حاوی DNA ژنومی خالص‌شده و منجمد استخراج‌شده از رده ی سلول های انسانی است. هر ویال مقدار تعریف شده متفاوتی برای JAK2 V617F به عنوان درصد از کل JAK2 دارد. این پنل به عنوان

استاندارد اولیه برای کالیبره کردن استانداردهای ثانویه کیت های تشخیصی JAK2 V617F در نظر گرفته شده است.

استانداردهای ثانویه این کیت و بر اساس استانداردهای اولیه WHO کالیبره شده اند.

❖ 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	-	45
3	60	60 ثانیه	دارد	

جدول ۳

کانال های دستگاه را مطابق جدول زیر انتخاب نمایید.

Detection	Detector Name	Reporter	Gain Setup (RGQ)
JAK2 Mutant	JAK2	FAM	Manual
JAK2 WT	Reference	VIC	Manual

جدول ۴

❖ تنظیمات نرم افزار دستگاه (تعیینThreshold)

S.No.	Instrument	Applied Biosystem	Threshold value range
1	Rotor-Gene Q	FAM/VIC	0.03-0.05
2	Applied Biosystems 7500	FAM/VIC	10,000-20,000
3	BioRad CFX 96 Real-Time PCR System	FAM/VIC	100-200

جدول ۵

تنظیمات جدول بالا برای دستگاه های ذکر شده در جدول می باشد. چنانچه دستگاه شما متفاوت است جهت تنظیمات با بخش پشتیبانی شرکت تماس حاصل فرمایید.

❖ **تفسیر داده ها**

تجزیه و تحلیل نتایج کمی

- مقادیر نمونه های مجهول در قسمت در کانال FAM برای ژن جهش یافته (JAK2 Mutant) و در کانال HEX/VIC برای ژن نوع وحشی(JAK2 WT) ظاهر می شوند.
- همه نمونه های بالینی باید منحنی های واکنش، ژن WildTypeر ا نشان دهند که از خط آستانه عبور می کند. بالا آمدن خط آستانه Ct ≤ ۲۷، وجود DNA در لوله واکنش را نشان می دهد و منعکس کننده ی این است که نمونه از کیفیت قابل قبولی برخوردار 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.

❖ **تجزیه و تحلیل کمی جهش V617F**

آنالیز کمی نتایج با استفاده از روش گراف استاندارد (Standard Curve)، بدست آمده از نتایج Ct نمونه های استاندارد محاسبه می شود. با کمک Standard Curve تعداد کپی نامبر های (CN) رونوشت JAK2 Mutant و ژن کنترلی JAK2 WT را میتوان محاسبه نمود. دقت کنید که حداقل 4 رقت سریالی برای ایجاد standard curve مورد نیاز است

با توجه به اینکه استاندارد ها 10 برابر رقیق شده هستند، standard curve باید دارای ویژگی های زیر باشد:

slope -3.2 to -3.6

R2 > 0.98

در نظر داشته باید چنانچه R2 > 0.95 باشد، شیب نمودار در بازه ی 3.2- تا 3.6- نیز قابل قبول است.

❖ **محاسبه ی کپی نامبر نرمال شده (NCN)**

محاسبه ی NCN با استفاده از تعداد کپی رونوشت ژن کنترلی JAK 2 (WT CN) و تعداد کپی رونوشتJAK 2 موتانت V617F CN ، حاصله از نتایج آزمایش، طبق فرمول زیر انجام می گیرد.

$$\text{NCN}\ (100\%) = \frac{\text{V617F CN}}{\text{V617F CN} + \text{WT CN}} \times 100$$

❖ **ارزیابی عملکرد کیت**

- کم ترین حد شناسایی بلانک(LOB): 0 کپی رونوشت آلل V617F JAK2

❖ **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
- 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 درکانال مربوط به ژن رفرانس (VIC/HEX)

جدول 6

❖ **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[8] قرار دهید.
- پیش از آغاز، محل انجام آزمایش را با محلول ضدعفونی کننده مناسب، ضدعفونی نمایید.
- تمامی مراحل انجام آزمایش بایستی زیرهود لامینار و یا ورکاستیشن 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