

راهنمای کیت JAK2 RQ

کیت JAK2 RQ جهت کار با دستگاه های Rotor-Gene و StepOne به منظور تشخیص موتاسیون JAK2 V617F در DNA انسانی به روش Real-Time PCR می باشد. این کیت جهت مصارف تحقیقاتی طراحی شده است.

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

تمامی مواد کیت باید در دمای ۱۰ تا ۳۰ درجه زیر صفر نگهداری شوند.

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 می باشد. 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.

روش استفاده: 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، **شاهدها** و آب به هر لوله اضافه نمایید و درپوش لوله ها را ببندید.

سپس آن ها را مطابق شماره ها داخل دستگاه قرار دهید.

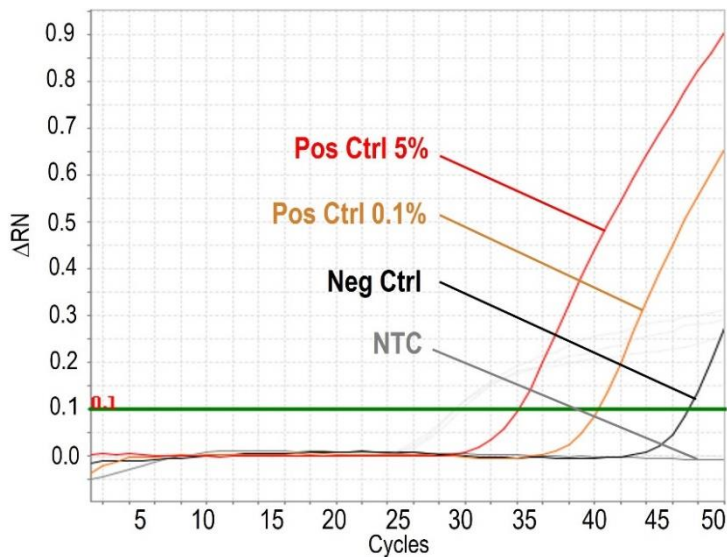
تنظیم دستگاه: برای تنظیم دستگاه Rotor-Gene یا StepOne از فایل تمپلیت مخصوص این کیت استفاده کنید. همچنین می‌توانید دستگاه را مطابق برنامه زیر تنظیم نمایید.

Step	Temperature and time	Cycles
1	95°C x 10 min	1
2	95°C x 15 sec	50
	60°C x 60 sec	

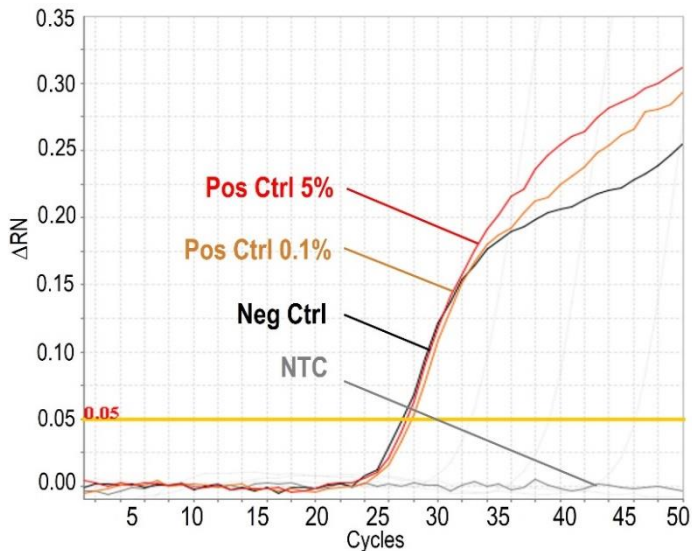
اندازه گیری تابش فلورسانس باید در دمای ۶۰ درجه و برای رنگ های FAM و VIC تنظیم شود. JAK2 Mix موجود در کیت حاوی ROX با غلظت نهایی 300nM می‌باشد.

آنالیز نتایج: توجه داشته باشید که افزایش تابش FAM/Green مربوط به JAK2 و افزایش تابش VIC/Yellow حاصل از کنترل داخلی می‌باشد.
برای مشاهده نمودار مورد انتظار شاهدها و کنترل داخلی، در دستگاه استپ وان، شکل ۱ و ۲ را ملاحظه فرمائید.

همچنین نمونه تنها زمانی مثبت در نظر گرفته می شود که دارای منحنی سیگموئیدی و فاز لگاریتمی باشد و تنها در این حالت CT معتبر بوده و قابل استناد و تفسیر می باشد. در غیاب منحنی سیگموئیدی، نمونه منفی محسوب می شود و (CT آن) در صورت وجود فاقد ارزش می باشد.



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 ۱/۰٪ و شاهد منفی که حاوی DNA می‌باشد، بررسی شود و نتایج مطابق شرایط زیر تفسیر شود. ابتدا ΔCT را برای شاهد مثبت ۱/۰٪ و شاهد منفی و همچنین نمونه بیمار محاسبه نمایید. برای این منظور، برای هر نمونه CT بدست آمده را در کانال VIC/Yellow از CT بدست آمده در کانال FAM/Green، 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 ماند، CT در کانال FAM/Green را معادل ۴۵ در نظر بگیرید.

سپس بر اساس جدول زیر نتایج را تفسیر نمایید:

نتیجه	ΔCT
مثبت برای جهش V617F	$\Delta CT_{\text{Sample}} < \Delta CT_{0.1\% \text{ Pos Ctrl}}$
منفی برای جهش V617F	$\Delta CT_{\text{Sample}} > \Delta CT_{\text{Neg Ctrl}}$
غیر قابل نتیجه گیری	$\Delta CT_{0.1\% \text{ Pos Ctrl}} < \Delta CT_{\text{Sample}} < \Delta CT_{\text{Neg Ctrl}}$

میزان حساسیت: حساسیت تشخیصی این کیت معادل یک در هزار یا ۱/۰٪ 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.

توضیحات برچسب:

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

برای توضیحات بیشتر و کسب اطلاع در مورد کیت های جدید نوین ژن، دریافت
فایل کامل دفترچه راهنمای کیت و فایل تمپلیت برای تنظیم دستگاه به وبسایت
ما به نشانی www.novingene.com مراجعه فرمایید یا با پشتیبانی تماس بگیرید.
همچنین از طریق این وب سایت می توانید با نمایندگی های فروش ما آشنا شوید.