

# راهنمای کیت JAK2 RQ

پاییز ۱۴۰۴، ویرایش ۶/۰

جهت تشخیص موتاسیون JAK2 V617F

به روش Real-Time PCR

مخصوص تحقیقات

▽ $\Sigma$  24 (Cat# JAK2RQ24)

▽ $\Sigma$  48 (Cat# JAK2RQ48)

▽ $\Sigma$  96 (Cat# JAK2RQ96)

 NG-WI-ASL-10-600

RUO

شرکت نوین ژن پارس ویرا

تهران، خیابان ایرانشهر، پلاک ۵. کد پستی: ۱۵۸۱۶۳۳۳۳۶



## فهرست مندرجات:

|                                                   |    |
|---------------------------------------------------|----|
| ۱. مقدمه .....                                    | ۳  |
| ۲. حیطه کاربرد .....                              | ۳  |
| ۳. اطلاعات زمینه ای .....                         | ۳  |
| ۴. اساس آزمایش .....                              | ۴  |
| ۵. محتویات کیت .....                              | ۴  |
| ۶. مدل های بسته بندی .....                        | ۵  |
| ۷. شرایط نگهداری و حمل و نقل کیت .....            | ۵  |
| ۸. محدودیت کاربرد .....                           | ۵  |
| ۹. سایر موارد مورد نیاز .....                     | ۶  |
| ۱۰. احتیاط و نکات لازم .....                      | ۶  |
| ۱۱. نمونه مناسب و شرایط نگهداری و انتقال آن ..... | ۷  |
| ۱۲. عوامل مزاحم .....                             | ۷  |
| ۱۳. کنترل داخلی .....                             | ۸  |
| ۱۴. استخراج DNA .....                             | ۸  |
| ۱۵. دستور کار PCR و مراحل آزمایش .....            | ۸  |
| ۱۶. دستگاه ها و نرم افزارها .....                 | ۹  |
| ۱۷. تنظیم دستگاه Rotor-Gene .....                 | ۹  |
| ۱۸. تنظیم دستگاه StepOne .....                    | ۱۰ |
| ۱۹. تنظیم سایر دستگاه ها .....                    | ۱۱ |
| ۲۰. آنالیز نتایج Rotor-Gene .....                 | ۱۱ |

|                                |    |
|--------------------------------|----|
| ۲۱. آنالیز نتایج StepOne ..... | ۱۵ |
| ۲۲. میزان حساسیت .....         | ۱۸ |
| ۲۳. روش امحاء .....            | ۱۸ |
| ۲۴. پشتیبانی فنی .....         | ۱۹ |
| ۲۵. اطلاعات تماس .....         | ۱۹ |
| ۲۶. منابع .....                | ۱۹ |
| ۲۷. توضیحات برچسب .....        | ۲۰ |

## ۱. مقدمه

کیت JAK2 RQ جهت تشخیص موتاسیون JAK2 V617F در DNA انسانی به روش Real-Time PCR طراحی شده است. در این روش، ژن مورد نظر به کمک پرایمرها و پروب اختصاصی شناسایی می‌شود. همچنین میکس این کیت حاوی سری ثانویه ای از پرایمرها و پروب جهت شناسایی یک ژن انسانی به عنوان کنترل داخلی می‌باشد. کنترل داخلی از گزارش منفی کاذب ناشی از استخراج نامناسب و یا مهار PCR جلوگیری می‌کند. این کیت جهت مصارف تحقیقاتی کاربرد دارد.

## ۲. حیطه کاربرد

کیت JAK2 RQ امکان بررسی نمونه بیمار را جهت تشخیص موتاسیون JAK2 V617F در DNA انسانی با روش Real-Time PCR فراهم می‌کند. این کیت برای استفاده با دستگاه‌های Rotor-Gene، StepOne و MIC طراحی شده است.

## ۳. اطلاعات زمینه ای

JAK2 مخفف Janus Kinase 2 است و معرف یک تیروزین کیناز است که در سیتوپلاسم واقع شده است. این آنزیم نقش مهمی در انتقال پیام‌های سیتوکین‌ها و هورمون‌های رشد دارد. موتاسیون اکتسابی G1849T در ژن این آنزیم باعث جایگزینی آمینواسید فنیل آلانین به جای والین می‌شود (V617F). در نتیجه این موتاسیون، JAK2 به صورت دائمی فعال شده و موجب رشد مهار نشده‌ی سلول در غیاب هورمون‌های رشد می‌شود. این موتاسیون در اکثر بیماران دچار اختلالات myeloproliferative که BCR-ABL منفی می‌باشند مشاهده می‌شود. همچنین این موتاسیون یکی از ابزارهای تشخیصی پایه در polycythemia vera (PV)، essential thrombocythemia (ET) و primary myelofibrosis (PMF) می‌باشد.

#### ۴. اساس آزمایش

در این کیت، شناسایی جهش نقطه ای با استفاده از روش واکنش زنجیره ای پلیمرز (PCR (Polymerase Chain Reaction انجام می شود. طی این واکنش، توالی مورد نظر با استفاده از پرایمرهای اختصاصی شناسایی و تکثیر می شود. در روش Real-Time PCR توالی تکثیر شده با استفاده از پروب های فلورسنت قابل تشخیص می گردد. بنابراین، با بررسی میزان فلورسنت در طی واکنش می توان وجود جهش یا فقدان آن را در نمونه تشخیص داد، بدون آنکه پس از پایان واکنش نیاز به انجام مراحل بعدی باشد. با توجه به اینکه در این روش نیازی به بررسی محصول واکنش با روش هایی مشابه الکتروفورز وجود ندارد، امکان ایجاد آلودگی نیز به لحاظ تئوری وجود نخواهد داشت.

#### ۵. محتویات کیت

این کیت شامل یک دفترچه راهنما، یک فلش کارت 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 |

\* ۱، ۲ یا ۴ عدد، به ترتیب برای کیت های ۲۴، ۴۸ و ۹۶ واکنشی

#### ۶. مدل های بسته بندی

کیت در قالب های بیست و چهار، چهار و هشت، و نود و شش واکنش بیست و پنج میکرولیتری در دسترس می باشد.

## ۷. شرایط نگهداری و حمل و نقل کیت

تمامی مواد کیت باید در دمای ۲۰- درجه زیر صفر حمل و نگهداری شوند. در این صورت این مواد تا پایان زمان انقضا کیت که روی کیت و نیز روی هر لوله درج شده است پایدار و قابل استفاده می باشند. از ذوب و انجماد مکرر محتویات کیت بیش از سه بار خودداری کنید زیرا باعث کاهش حساسیت و عدم کارایی آن ها می شود. همچنین برای حمل و نقل کیت از یخ خشک استفاده نمایید.

## ۸. محدودیت کاربرد

- این کیت تنها برای استفاده توسط کاربران حرفه ای و آموزش دیده طراحی شده است.
- تمامی مراحل کار بایستی مطابق دفترچه راهنمای کامل کیت انجام شود و هرگونه تغییری در آن منجر به بروز خطا در نتایج میگردد.
- از محتویات کیت نباید پس از گذشت تاریخ انقضای درج شده روی کیت استفاده شود.
- در صورت تغییر رنگ لیبل حرارتی (به صورتی یا قرمز) حتی به صورت جزئی کیت نباید مورد استفاده قرار گیرد.
- این کیت تنها برای مصارف تحقیقاتی طراحی شده و برای تشخیص طبی (IVD) مورد تایید نمی باشد.

## ۹. سایر موارد مورد نیاز

- برای استفاده از این کیت به تجهیزات و اقلام زیر نیاز دارید:
- دستگاه Real-Time PCR به همراه تجهیزات جانبی آن
- سانتریفوژ مخصوص میکروتیوب

- ورتکس (Vortex Mixer)
- بلوک حرارتی رومیزی (Dry Block Heater)
- سمپلر متغیر و سر سمپلر فیلتردار (Nuclease free)
- کیت استخراج DNA
- تیوب ۱/۵ میلی لیتری و میکروتیوب مخصوص Real-Time PCR
- دستکش لاتکس یا نیتریل بدون پودر
- بلوک آلومینیومی (بلوک سرد)

## ۱۰. احتیاط و نکات لازم

برای پیشگیری از تولید نتایج کاذب به نکات زیر توجه کنید:

- **هنگام کار با نمونه بیمار، همیشه فرض را بر آلوده بودن نمونه بگذارید و خطرات بالقوه آن را در نظر داشته باشید.**
- در فضای pre-PCR یا Clean Room سه ناحیه را مشخص و از هم تفکیک کنید. این سه فضا شامل فضای نگهداری نمونه و استخراج، فضای آماده سازی مواد (برای افزودن میکس به لوله های PCR) و فضای آماده سازی واکنش (برای افزودن نمونه DNA به لوله PCR) می باشند. هر یک از سه فضای فوق باید وسایل مخصوص به خود، به ویژه سمپلر، را داشته باشند. از جابجایی وسایل بین این سه فضا پرهیز کنید.
- سطوح کار را همیشه قبل از شروع و پس از خاتمه کار با الکل ۷۰ درجه تمیز کنید.
- هنگام استفاده، مواد کیت را روی یخ خرد شده نگه دارید تا کاملاً ذوب شده و با چند تکان ملایم از مخلوط و یکنواخت شدن محتویات هر لوله اطمینان حاصل کنید. سپس برای چند ثانیه آن ها را در دور پایین سانتریفوژ کنید.

- در حین کار، محتویات کیت را همیشه روی یخ خرد شده نگهداری کنید. از استفاده از یخ‌های قالبی و سایر موارد به غیر از یخ خرد شده پرهیز کنید.
- در حین کار، میکروتیوب‌های PCR را روی بلوک سرد گذاشته، و از گذاشتن آنها بر یخ خرد شده خودداری کنید.

## ۱۱. نمونه مناسب و شرایط نگهداری و انتقال آن

نمونه مناسب برای آزمایش JAK2 با این کیت، خون محیطی (peripheral blood) می باشد که در لوله استریل حاوی ماده ضد انعقاد جمع آوری شده است. ماده ضد انعقاد می‌تواند EDTA یا سیترات باشد. خون کامل را می‌توان تا ۷۲ ساعت در ۴ درجه نگهداری و به آزمایشگاه منتقل نمود. DNA را می‌توان مستقیماً از خون کامل استخراج کرد. همچنین برای افزایش حساسیت تست می‌توان از بافی (buffy coat) استفاده کرد. برای نگهداری نمونه در زمان‌های بیشتر از چند روز بهتر است آن را به حجم‌های کوچک تقسیم کرده و سپس در دمای بیست درجه زیر صفر نگهداری نمود. در چنین شرایطی نمونه تا چند ماه پایدار می ماند.

## ۱۲. عوامل مزاحم

هپارین با غلظت بیش از ۱۰ واحد در میلی لیتر باعث مهار PCR می‌شود. به همین دلیل لوله حاوی هپارین به عنوان ضد انعقاد مناسب نیست و نباید استفاده شود. همچنین نمونه بیماران تحت درمان با هپارین نیز برای PCR مناسب نمی‌باشد.

مقادیر بالای بیلی روبین (تا حداکثر ۴/۵ میلی گرم در دسی لیتر) و چربی (تا حداکثر ۱۰۰۰ میلی گرم در دسی لیتر) و نیز همولیز خون برای این آزمایش مزاحمتی ایجاد نمی‌کند.

### ۱۳. 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 می‌باشد. 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. برای توضیحات بیشتر به بخش آنالیز رجوع کنید.

### ۱۴. استخراج DNA

برای استخراج DNA از نمونه پلاسما از روش‌ها و کیت‌های مختلفی می‌توان استفاده نمود. ما استفاده از کیت‌های زیر را توصیه می‌کنیم:

- High Pure PCR Template Preparation Kit (Cat# 11796828001, Roche Applied Science, Mannheim, Germany)
- QIAamp DNA Blood Mini Kit (Cat. no. 51104, Qiagen GmbH, Hilden, Germany)

برای رسیدن به حساسیت لازم، نمونه DNA استخراج شده باید دارای غلظت حدود ۵۰-۱۰ ng/μl باشد.

### ۱۵. دستور کار PCR و مراحل آزمایش

ابتدا تمامی لوله‌ها را روی یخ خرد شده قرار دهید تا به طور کامل محتویات آنها ذوب شوند. با چند تکان ملایم از مخلوط شدن مواد داخل آن‌ها اطمینان حاصل کرده و برای چند ثانیه آن‌ها را در دور پایین سانتریفوژ کنید. تعداد مورد نیاز لوله PCR روی بلوک سرد بگذارید. علاوه بر تعداد نمونه‌های 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 و یا **شاهد** یا آب به هر لوله اضافه نمایید و درپوش لوله

ها را ببندید. سپس آن ها را مطابق شماره ها داخل دستگاه قرار دهید.  
توجه: در صورت استفاده از دستگاه **StepOne** لوله ها را ابتدا به مدت کوتاهی سانتریفوژ نموده و سپس داخل دستگاه قرار دهید.  
توجه: هنگام استفاده از دستگاه روتورژن، رینگ محافظ را نیز در پایان اضافه کنید.

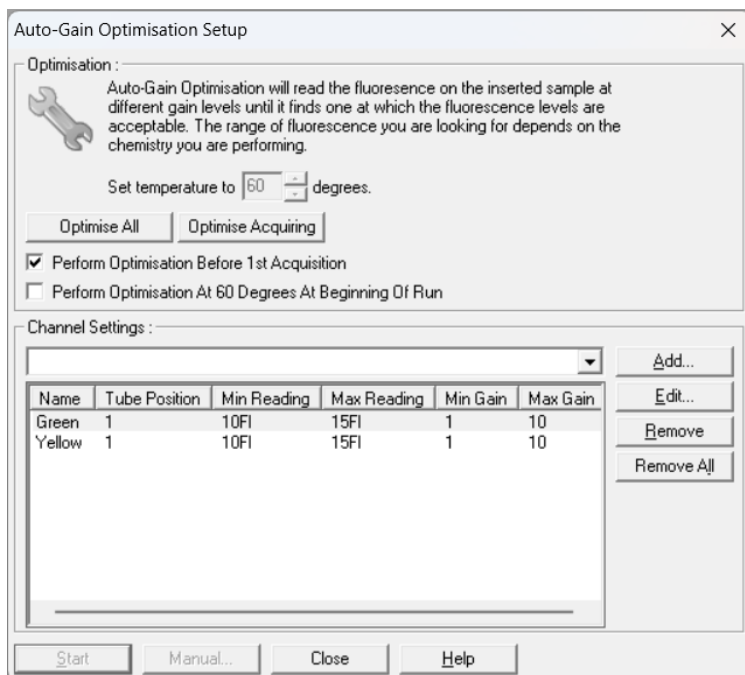
## ۱۶. دستگاه ها و نرم افزارها

کیت JAK2 RQ جهت کار با دستگاه های Rotor-Gene، StepOne و MIC طراحی شده است.

## ۱۷. تنظیم دستگاه Rotor-Gene

ابتدا اطمینان حاصل کنید که رینگ محافظ را روی روتور قرار داده اید!  
دستگاه Rotor-Gene را توسط کابل مخصوص آن به کامپیوتر وصل کرده و آن را به برق بزنید تا چراغ آبی جلوی آن روشن شود.  
فایل تمپلیت JAK2 را از فلش کارت همراه کیت باز نمایید (همچنین قابل دسترس از طریق اسکن QR Code روی جعبه کیت). توجه فرمایید فایل JAK 0.2 یا JAK2 0.1 را با توجه به نوع لوله استفاده شده انتخاب کنید.

نکته: مطابق تصویر برای تنظیم ضریب تابش در منوی نرم افزار، گزینه View، سپس Gain Optimisation را انتخاب کنید. در پنجره باز شده در Auto-Gain Optimisation Setup ابتدا گزینه Optimise Acquiring را بزنید. تنظیمات را دقیقاً مطابق تصویر صفحه بعد برای هر دو کانال انجام دهید. Tube Position روی شماره ۱ تنظیم کنید (در نظر داشته باشید تیوب شماره یک باید حاوی میکس JAK2 باشد). گزینه Perform Optimisation Before 1<sup>st</sup> Acquisition را فعال کنید و پنجره را ببندید.



در منوی بالای صفحه دکمه استارت (دکمه سبز رنگ) را کلیک کنید. روی پنجره باز شده نیز دکمه استارت را کلیک کنید و فایل آزمایش را در محل مورد نظر ذخیره کنید (save) تا دستگاه روشن شود. در پنجره نمونه ها (samples) نام هر نمونه را وارد کنید. در ستون نوع نمونه با عنوان type، برای نمونه بیمار unknown و برای نمونه کنترل مثبت Positive Control و برای نمونه کنترل منفی نیز می‌توانید NTC یا Negative Control را انتخاب کنید.

## ۱۸. تنظیم دستگاه StepOne

نرم افزار دستگاه را باز کنید (StepOne software 2.\*). از منوی Set Up روی دکمه Template کلیک کنید و فایل داخل فلش کارت همراه کیت را انتخاب کنید. (همچنین قابل دسترس از طریق اسکن QR Code روی جعبه کیت).

از منوی سمت چپ **Plate Setup** و سپس دکمه **View Well Table** را انتخاب کنید. دو کنترل مثبت، یک کنترل منفی، یک **NTC** و چند نمونه از پیش تعریف شده اند. کنترل ها و تعداد نمونه مورد نظر خود را در ردیف دلخواه کپی کنید. برای این کار از گزینه های کلیک راست (**copy, paste, clear**) می توانید استفاده کنید. همچنین با استفاده از منوی **define Targets and Samples** می توانید تعداد نمونه های مورد بررسی را نیز اضافه کنید. در پایان تنظیمات دکمه **Start Run** را کلیک کنید و فایل آزمایش را در پوشه مورد نظر ذخیره کنید تا دستگاه شروع به کار کند.

## ۱۹. تنظیم سایر دستگاه ها

چنانچه این کیت را برای استفاده با سایر دستگاه های **Real-Time PCR** استفاده می کنید، دستگاه را مطابق برنامه زیر تنظیم نمایید:

| Step | Temperature and time | Cycles |
|------|----------------------|--------|
| 1    | <b>95°C x 3 min</b>  | 1      |
| 2    | <b>95°C x 15 sec</b> | 50     |
|      | <b>60°C x 60 sec</b> |        |

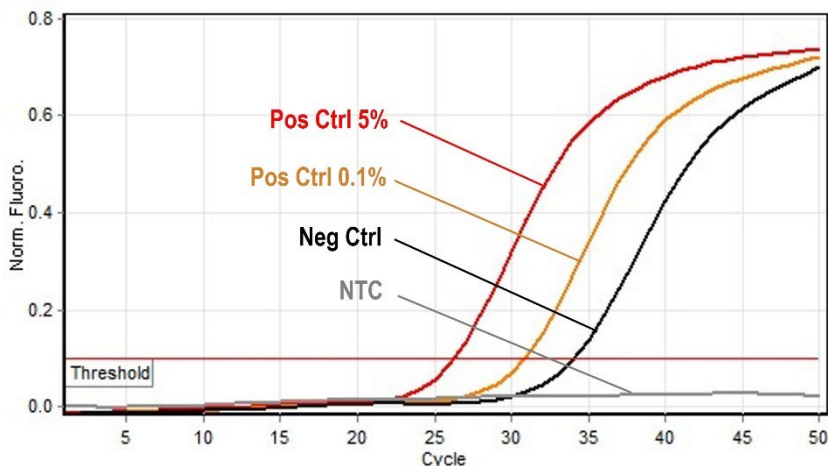
اندازه گیری تابش فلورسانس باید در دمای ۶۰ درجه و برای رنگ های **FAM** و **VIC** تنظیم شود. **JAK2 Mix** حاوی **ROX** است. غلظت نهایی **ROX** در واکنش 300nM می باشد.

## ۲۰. آنالیز نتایج Rotor-Gene

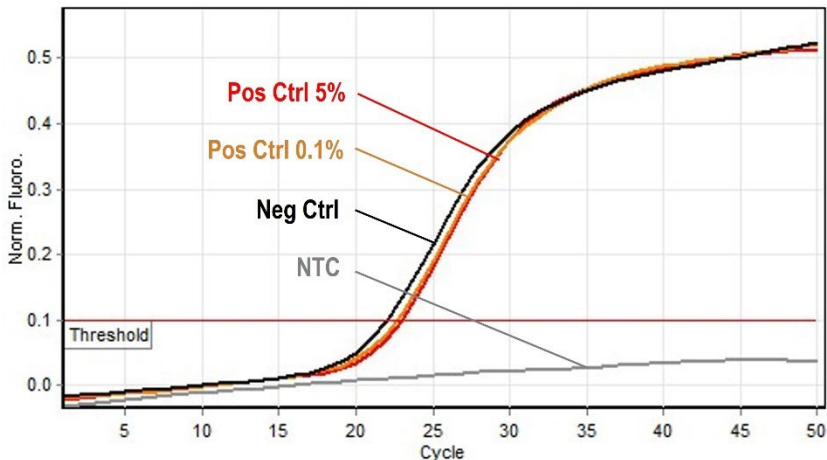
برای آنالیز نتایج به راهنمای **Rotor-Gene** مراجعه کنید. به طور خلاصه از منوی **Quantitation Analysis** را انتخاب کرده و روی **Green** دوبار کلیک کنید. در پنجره **autofind threshold** دکمه **cancel** را بزنید و آستانه را روی ۰/۱ و بالاتر از فلورسانس زمینه (نمونه منفی) قرار دهید. سپس در منوی **Analysis** مجدداً

Quantitation و سپس Yellow را کلیک کنید. در پنجره autofind threshold دکمه cancel را بزنید و آستانه را روی ۰/۱ قرار دهید. برای مشاهده نمودار مورد انتظار شاهدتها و کنترل داخلی تصاویر یک و دو را ملاحظه فرمایید. توجه داشته باشید که افزایش تابش سبز (Green) مربوط به JAK2 و افزایش تابش زرد (Yellow) حاصل از کنترل داخلی می باشد.

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



شکل ۱. نمودار شاهدتهای JAK2 در کانال سبز دستگاه روتورژن



شکل ۲. نمودار شاهد‌های JAK2 در کانال زرد دستگاه روتورژن

جهت تشخیص کیفی JAK2 از نظر جهش V617F، علاوه بر نمونه بیمار، باید شاهد مثبت ۰/۱٪ و شاهد منفی که حاوی DNA می‌باشد، بررسی شود و نتایج مطابق شرایط زیر تفسیر شود.

ابتدا  $\Delta CT$  را برای شاهد مثبت ۰/۱٪ و شاهد منفی و همچنین نمونه بیمار محاسبه نمایید. برای این منظور،  $CT$  بدست آمده برای هر نمونه را در کانال زرد از  $CT$  بدست آمده در کانال سبز 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 بماند،  $CT$  در کانال سبز را معادل ۴۵ در نظر بگیرید. نتایج را با توجه به نکات زیر تفسیر کنید:

- در صورتی که  $\Delta CT$  نمونه از  $\Delta CT$  شاهد مثبت ۰/۱٪، کمتر باشد نمونه از نظر جهش V617F مثبت است.

- در صورتی که  $\Delta CT$  نمونه از  $\Delta CT$  شاهد منفی بیشتر باشد نمونه از نظر جهش V617F منفی است.
- در صورتی که  $\Delta CT$  نمونه عددی بین  $\Delta CT$  شاهد مثبت ۰/۱٪ و شاهد منفی باشد، نمونه در محدوده‌ی نامشخص قرار دارد و **غیرقابل نتیجه‌گیری** می‌باشد. نکات فوق در جدول زیر به صورت خلاصه ذکر شده است.

| $\Delta CT$                                                                                | نتیجه                      |
|--------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------|
| $\Delta CT \text{ Sample} < \Delta CT \text{ 0.1\% Pos Ctrl}$                              | <b>مثبت</b> برای جهش V617F |
| $\Delta CT \text{ Sample} > \Delta CT \text{ Neg Ctrl}$                                    | <b>منفی</b> برای جهش V617F |
| $\Delta CT \text{ 0.1\% Pos Ctrl} < \Delta CT \text{ Sample} < \Delta CT \text{ Neg Ctrl}$ | <b>غیرقابل نتیجه‌گیری</b>  |

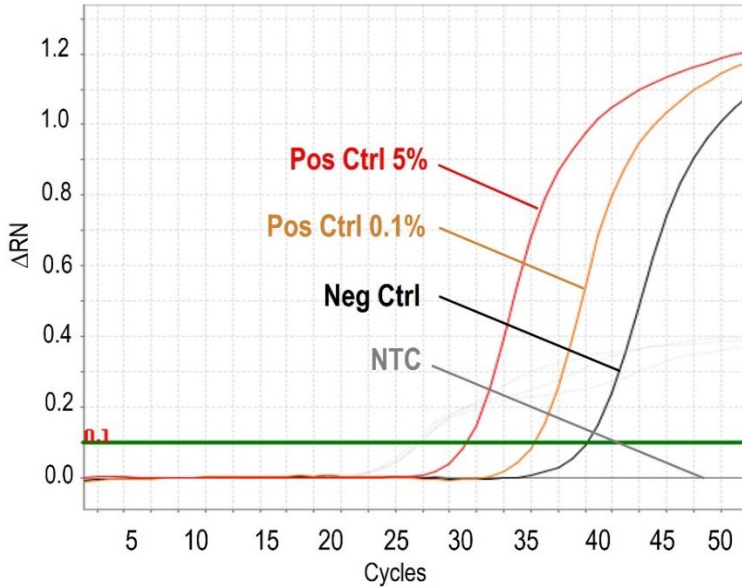
برای مثال، در صورتی که شاهد منفی دارای CT معادل ۳۴ در کانال سبز و CT معادل ۲۳ در کانال زرد باشد،  $\Delta CT$  برای شاهد منفی معادل ۱۱ خواهد بود. همچنین برای شاهد مثبت ۰/۱٪ با CT معادل ۳۱ در کانال سبز و CT معادل ۲۳ در کانال زرد،  $\Delta CT$  برابر با ۸ می‌باشد. و نهایتاً برای نمونه بیمار دارای CT معادل ۲۹ در کانال سبز و CT معادل ۲۳ در کانال زرد،  $\Delta CT$  برابر با ۶ می‌باشد که از  $\Delta CT$  شاهد مثبت ۰/۱٪ کمتر بوده، پس از نظر جهش V617F مثبت می‌باشد. مثال فوق بطور خلاصه در جدول زیر درج شده است.

| نمونه       | CT کانال سبز | CT کانال زرد | $\Delta CT$ |
|-------------|--------------|--------------|-------------|
| شاهد منفی   | ۳۴           | ۲۳           | $34-23=11$  |
| شاهد مثبت   | ۳۱           | ۲۳           | $31-23=8$   |
| نمونه بیمار | ۲۹           | ۲۳           | $29-23=6$   |

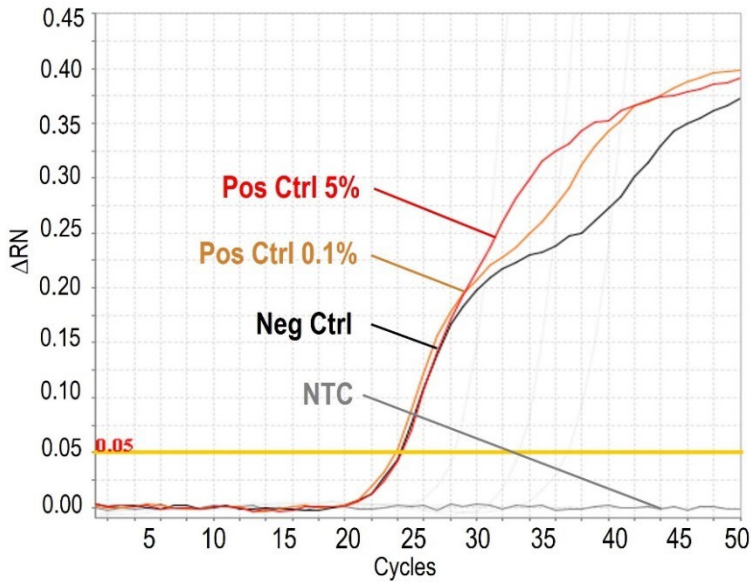
## ۲۱. آنالیز نتایج StepOne

برای آنالیز نتایج به راهنمای StepOne مراجعه کنید. به طور خلاصه دکمه Analysis را کلیک کنید. برای JAK2/FAM آستانه (threshold) رابالاتر از فلورسانس نمونه منفی و روی ۰/۱ و برای IC/VIC آستانه را روی ۰/۰۵ قرار دهید. برای مشاهده نمودار مورد انتظار شاهدها و کنترل داخلی، تصاویر سه و چهار را ملاحظه فرمائید. توجه داشته باشید که افزایش تابش FAM مربوط به JAK2 و افزایش تابش VIC حاصل از کنترل داخلی می باشد.

توجه داشته باشید نمونه تنها زمانی مثبت در نظر گرفته می شود که دارای منحنی سیگموییدی و فاز لگاریتمی باشد و تنها در این حالت CT معتبر بوده و قابل استناد و تفسیر می باشد. در غیاب منحنی سیگموییدی، 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 ۰/۱٪ و شاهد منفی که حاوی DNA می‌باشد، بررسی شود و نتایج مطابق شرایط زیر تفسیر شود. ابتدا  $\Delta CT$  را برای شاهد مثبت ۰/۱٪ و شاهد منفی و همچنین نمونه بیمار محاسبه نمایید. برای این منظور، برای هر نمونه CT بدست آمده را در کانال VIC از CT بدست آمده در کانال FAM، کسر نمایید.

$$\Delta CT = CT_{FAM\ Ch} - CT_{VIC\ Ch}$$

توجه: در صورتی که شاهد منفی دارای CT بالاتر از ۴۵ باشد یا تا پایان تست منفی بماند، CT در کانال سبز را معادل ۴۵ در نظر بگیرید. نتایج را با توجه به نکات زیر تفسیر کنید:

- در صورتی که  $\Delta CT$  نمونه از  $\Delta CT$  شاهد مثبت ۰/۱٪، کمتر باشد نمونه از نظر جهش V617F **مثبت** است.
- در صورتی که  $\Delta CT$  نمونه از  $\Delta CT$  شاهد منفی بیشتر باشد نمونه از نظر جهش V617F **منفی** است.
- در صورتی که  $\Delta CT$  نمونه عددی بین  $\Delta CT$  شاهد مثبت ۰/۱٪ و شاهد منفی باشد، نمونه در محدوده‌ی نامشخص قرار دارد و **غیر قابل نتیجه گیری** می‌باشد. نکات فوق در جدول زیر به صورت خلاصه ذکر شده است.

| $\Delta CT$                                                              | نتیجه                      |
|--------------------------------------------------------------------------|----------------------------|
| $\Delta CT\ Sample < \Delta CT\ 0.1\%\ Pos\ Ctrl$                        | <b>مثبت</b> برای جهش V617F |
| $\Delta CT\ Sample > \Delta CT\ Neg\ Ctrl$                               | <b>منفی</b> برای جهش V617F |
| $\Delta CT\ 0.1\%\ Pos\ Ctrl < \Delta CT\ Sample < \Delta CT\ Neg\ Ctrl$ | <b>غیر قابل نتیجه گیری</b> |

برای مثال، در صورتی که شاهد منفی دارای CT معادل ۳۸ در کانال FAM و CT معادل ۲۵ در کانال VIC باشد،  $\Delta CT$  برای شاهد منفی معادل ۱۳ خواهد بود. همچنین برای شاهد مثبت ۰/۱٪ با CT معادل ۳۴ در کانال FAM و CT معادل ۲۵ در کانال VIC مقدار  $\Delta CT$  برابر با ۹ می‌باشد و برای نمونه بیمار دارای CT معادل ۳۲ در کانال FAM و CT معادل ۲۵ در کانال VIC،  $\Delta CT$  برابر با ۷ می‌باشد که از  $\Delta CT$  شاهد مثبت ۰/۱٪ کمتر بوده، پس از نظر جهش V617F مثبت می‌باشد. مثال فوق بطور خلاصه در جدول صفحه بعد درج شده است.

| نمونه       | CT کانال سبز | CT کانال زرد | $\Delta CT$ |
|-------------|--------------|--------------|-------------|
| شاهد منفی   | ۳۸           | ۲۵           | $38-25=13$  |
| شاهد مثبت   | ۳۴           | ۲۵           | $34-25=9$   |
| نمونه بیمار | ۳۲           | ۲۵           | $32-25=7$   |

## ۲۲. میزان حساسیت

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

## ۲۳. روش امحاء

محتویات کیت فاقد خطرات بیولوژیکی یا شیمیایی بوده و می‌توان آنها را مستقیماً به سطل زباله انتقال داد. اما نمونه های عفونی آزمایشگاه را در محلول هیپوکلریت سدیم ۵٪ به مدت حداقل یک شبانه روز قرار دهید و سپس آنها را به سطل زباله منتقل کنید.

## ۲۴. پشتیبانی فنی

برای ارتباط با بخش پشتیبانی فنی می‌توانید با شماره تلفن یا آدرس ایمیل زیر تماس حاصل فرمایید:

۰۹۹۳۶۲۳۳۴۱

Info@novingene.com

## ۲۵. اطلاعات تماس

### شرکت نوین ژن پارس ویرا

آدرس: تهران، خیابان ایرانشهر، پلاک ۵. کد پستی: ۱۵۸۱۶۳۳۳۳۶  
تلفن تماس:

۰۲۱-۸۸۸۳۷۳۹۳

۰۹۹۰۱۸۱۳۱۲۴

ایمیل: info@novingene.com

وبسایت: www.novingene.ir

## ۲۶. منابع

- Jones, D., 2010. Neoplastic Hematopathology. Springer Science & Business Media.
- Levine, R.L., Pardanan, A., Tefferi, A. and Gilliland, D.G., 2007. Role of JAK2 in the pathogenesis and therapy of myeloproliferative disorders. Nature reviews cancer, 7(9), pp.673-683.
- Mackay IM. Real-time PCR in the microbiology laboratory. Clin. Microbiol. Infect. 2004; 10 (3): 190 – 212.
- Yoo, J.H., Park, T.S., Maeng, H.Y., Sun, Y.K., Kim, Y.A., Kie, J.H., Cho, E.H., Song, J., Lee, K.A., Suh, B. and Choi, J.R.,

2009. JAK2 V617F/C618R mutation in a patient with polycythemia vera: a case study and review of the literature. Cancer genetics and cytogenetics, 189(1), pp.43-47.

## ۲۷. توضیحات برچسب

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

برای دریافت اطلاعات و منابع بیشتر، به وبسایت ما به نشانی [www.novingene.ir](http://www.novingene.ir) مراجعه فرمایید یا با پشتیبانی تماس بگیرید.

# JAK2 RQ Kit Manual

Autumn 2025, Version 6.0

For Real-Time PCR Detection of JAK2 V617F Mutation  
For Research Use Only

 24 (Cat# JAK2RQ24)

 48 (Cat# JAK2RQ48)

 96 (Cat# JAK2RQ96)

 NG-WI-ASL-10-600

RUO



**NovinGene ParsVira**

No. 5, Iranshahr St, Tehran, Iran 1581633336.



## Table of Contents

|                                           |   |
|-------------------------------------------|---|
| 1. Introduction .....                     | 3 |
| 2. Intended Use .....                     | 3 |
| 3. Background Information .....           | 3 |
| 4. Test Principle .....                   | 3 |
| 5. Kit Contents .....                     | 4 |
| 6. Packaging models .....                 | 4 |
| 7. Storage and Stability .....            | 4 |
| 8. Product Use Limitations .....          | 4 |
| 9. Additionally Required Materials .....  | 5 |
| 10. General Precautions .....             | 5 |
| 11. Specimen, Storage and Transport ..... | 6 |
| 12. Interfering Substances .....          | 6 |
| 13. DNA Isolation .....                   | 6 |
| 14. Internal Control (IC) .....           | 7 |
| 15. PCR Protocol .....                    | 7 |
| 16. Devices and software .....            | 7 |
| 17. Programming Rotor-Gene .....          | 7 |
| 18. Programming StepOne .....             | 8 |
| 19. Programming Other Machines .....      | 9 |

|                                    |    |
|------------------------------------|----|
| 20. Data Analysis: Rotor-Gene..... | 9  |
| 21. Data Analysis: StepOne .....   | 12 |
| 22. Sensitivity .....              | 14 |
| 23. Disposal Method .....          | 15 |
| 24. Technical Support .....        | 15 |
| 25. Contact Information .....      | 15 |
| 26. References.....                | 15 |
| 27. Symbols .....                  | 16 |

## 1. Introduction

JAK2 RQ kit provides a ready-to-use Real-Time polymerase chain reaction (PCR) test designed for detecting JAK2 V617F mutation. All required reagents are included in the PCR Mix provided in the kit. This Mix also contains a different series of primers and probes for detecting a housekeeping gene sequence as an Internal Control (IC). IC prevents false negative results due to extraction or presence of PCR inhibitors.

This kit is intended for Research Use Only!

## 2. Intended Use

JAK2 RQ kit is intended for detecting JAK2 V617F mutation in DNA samples extracted from human. Detection is achieved using Real-Time PCR and is compatible with Rotor-Gene, StepOne and MIC machines.

## 3. Background Information

JAK2 (Janus Kinase 2) is a Tyrosine Kinase located in cytoplasm with essential role in signaling pathways for cytokines and growth factors. The acquired mutation G1849T replaces valine with phenylalanine (V617F). This substitution results in constitutively active JAK2 which leads to uncontrolled cell proliferation in the absence of growth factors. This mutation is found in the majority of BCR-ABL-negative myeloproliferative disorders (MPDs) and has become a main diagnostic test for polycythemia vera (PV), essential thrombocythemia (ET) and primary myelofibrosis (PMF).

## 4. Test Principle

The target sequence is detected using PCR, where primers specific to the target genome amplify its unique sequence. Real-Time PCR facilitates the detection of the amplified product through

fluorescent-labeled probes. Therefore, monitoring fluorescence provides a means for detecting the target without requiring post-amplification analysis. This eliminates the possibility of PCR product contamination.

## 5. Kit Contents

The kit contains a manual, a flash card with Rotor-Gene and StepOne templates and the following reagents:

| Label         | Content               | Quantity |
|---------------|-----------------------|----------|
| JAK2 Mix      | PCR mix*              | 480 µl   |
| Pos Ctrl 5%   | Positive Control 5%   | 100 µl   |
| Pos Ctrl 0.1% | Positive Control 0.1% | 100 µl   |
| Negative Ctrl | Negative Control      | 100 µl   |
| Water         | PCR Grade Water       | 200 µl   |

\* 1, 2 and 4 tubes for 24, 48 and 96 reaction kits, respectively.

## 6. Packaging models

The kit is available in 24, 48, and 96 reactions of 25 microliters.

## 7. Storage and Stability

The kit components should be shipped and stored at -20°C and are stable until the expiration date mentioned. Avoid repeated freeze-thaw more than three times to prevent reduced sensitivity.

## 8. Product Use Limitations

- This kit is intended to be used only by specially instructed and trained personnel.
- The User manual should be strictly followed, and any modification will invalidate the results.

- The kit and its contents should not be used past the expiration date on the package.
- The kit and its contents should not be used if there is any sign of pink or red color on the Warm Mark label.
- This kit is for Research use only and is not validated for IVD (in vitro diagnostics) applications.

### 9. Additionally Required Materials

To use this kit, you need the following items:

- Real-Time PCR machine and the accessory computer
- Tabletop microtube centrifuge
- Vortex Mixer
- Dry Block Heater
- Adjustable pipettors and nuclease free filtered tips
- DNA extraction kit
- Nuclease free 1.5ml microtubes and PCR microtubes
- Disposable powder-free gloves
- Cold block

### 10. General Precautions

To prevent false results, always pay attention to the following points:

- **Treat all samples as potentially infectious.**
- Within the pre-PCR work area, assign three separate spaces for: a) Sample storage and extraction, b) Reagent preparation where the Master Mix is aliquoted into tubes, and c) Reaction preparation area for addition of extracted DNA to the tubes.
- Always wipe the working surfaces with 70% Ethanol before and after work.

- Thaw kit components on **crushed ice** completely, mix by flickering followed by a quick spin and **store on crushed ice while working**.
- Do not place PCR tubes on crushed ice. Use cooling blocks instead.

## 11. Specimen, Storage and Transport

Peripheral blood is the suitable sample for JAK2 test. We recommend EDTA or citrate as anticoagulant.

DNA can directly be extracted from whole blood. Alternately to increase sensitivity buffy coat can be used.

Whole blood or buffy coat can be shipped and stored at +4°C for a few days or can be aliquoted and stored at -20°C which is stable for a few months.

## 12. Interfering Substances

Heparin (more than 10 IU/ml) affects the PCR. Blood collected in heparin containing tubes and samples of heparinized patients must not be used.

Elevated levels of bilirubin ( $\leq 4.5$  mg/dl) and lipids ( $\leq 1000$  mg/dl) and hemolytic samples do not influence the extraction and PCR.

## 13. DNA Isolation

DNA isolation can be performed using different kits from various manufacturers. We recommend the following:

- High Pure PCR Template Preparation Kit (Cat# 11796828001, Roche Applied Science, Mannheim, Germany)
- QIAamp DNA Blood Mini Kit (Cat. no. 51104, Qiagen GmbH, Hilden, Germany).

To reach the sensitivity of 0.1%, extracted DNA should have a concentration of 10-50 ng/ul.

## 14. Internal Control (IC)

To examine DNA extraction quality as well as the presence of PCR inhibitors and to prevent false negative results, primers and probe for an *Internal Control* (a housekeeping gene) is included in the PCR Master Mix. Internal control should generate a CT of 22-25 in Rotor-Gene and a CT of 24-28 in StepOne. See analysis section for more details.

## 15. PCR Protocol

Thaw the reagents on ice completely, followed by a brief mixing and a quick spin. Place the required number of tubes on a cold block. Consider one tube for each sample, plus three for Positive control, Negative control and NTC.

**Pipette 20ul of JAK2 Mix directly, to each tube followed by adding 5ul of control, or isolated DNA.**

Cap the tubes and visually inspect to make ensure all are capped securely. Place the tubes in the machine.

*Note: Working with StepOne instrument, spin tubes briefly before loading on the block.*

*Note: If using Rotor-Gene attach the locking ring.*

## 16. Devices and software

JAK2 RQ kit is designed to work with Rotor-Gene, StepOne and MIC.

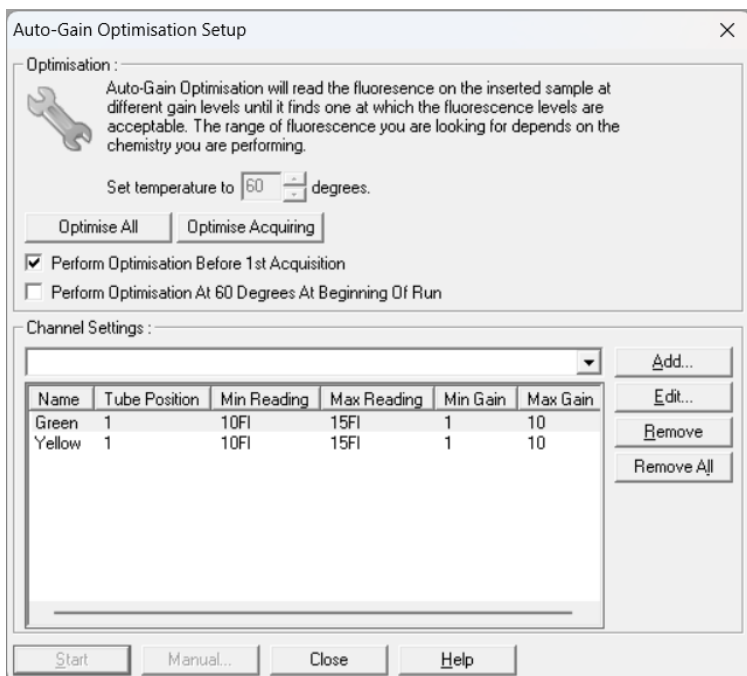
## 17. Programming Rotor-Gene

*Before you start the machine, make sure you have attached the locking ring on the rotor!*

Open the JAK2 RQ template file for Rotor-Gene (provided in the flash card, or accessible by kit QR code); JAK2 0.1 is for strip tubes and JAK2 0.2 is for 0.2ml tubes. Program starts.

## JAK2 RQ (v6.0)

Note: For Gain Optimisation, in the View menu select the Gain Optimisation. Adjust the setting according to the below image. Make sure to set the Tube Position to number 1 for all channels (note that Tube number 1 should contain Jak2 Mix).



Click on the Start button (Green button on the top menu). On the pop-up window click Start again and save the file to start the machine.

## 18. Programming StepOne

Open the StepOne software (V 2.\*). On the Set-Up menu, click Template (provided in the flash card, or accessible by kit QR code). Click on Plate Setup. One negative control, two positive control, and a few samples are defined. You may change plate setup using

right-click options (copy, paste, clear). You may also add/remove samples or change the sample name on the “Define Targets and Samples” menu. When finished, click on “Start Run” and save the experiment to the desired location. The instrument will start shortly.

## 19. Programming Other Machines

If you apply this kit to other Real-Time PCR machines, program it according to the following table:

| Step | Temperature and time | Cycles |
|------|----------------------|--------|
| 1    | <b>95°C x 3 min</b>  | 1      |
| 2    | <b>95°C x 15 sec</b> | 50     |
|      | <b>60°C x 60 sec</b> |        |

Fluorescence should be collected at 60°C for FAM and VIC/HEX dyes. JAK2 Mix contains 300nM ROX in final reaction.

## 20. Data Analysis: Rotor-Gene

Analyze data according to RotorGene manual. Perform qualitative analysis for **JAK2 (Green channel)** and **Internal Control (Yellow channel)**. Briefly, click on "Analysis" menu and then under "Quantitation" tab, double click on "Cycling A. Green". Close the pop up for Automatic Threshold and set the threshold on 0.1 and above background or Negative control.

Repeat the above for "Cycling A. Yellow" and manually set threshold on 0.1. Refer to figures 1 and 2 for typical graphs.

**Note that a sample is considered Positive only if it has a sigmoid graph and log phase, and only then CT is reliable and can be used. In the absence of a sigmoid graph and log phase, the sample is considered Negative, and CT, if present, is not reliable.**

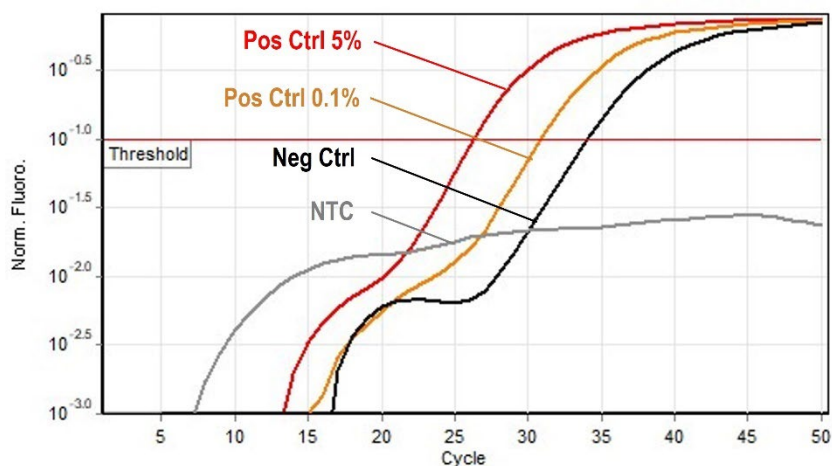


Fig 1. Typical JAK2 graph in Green channel for Rotor-Gene

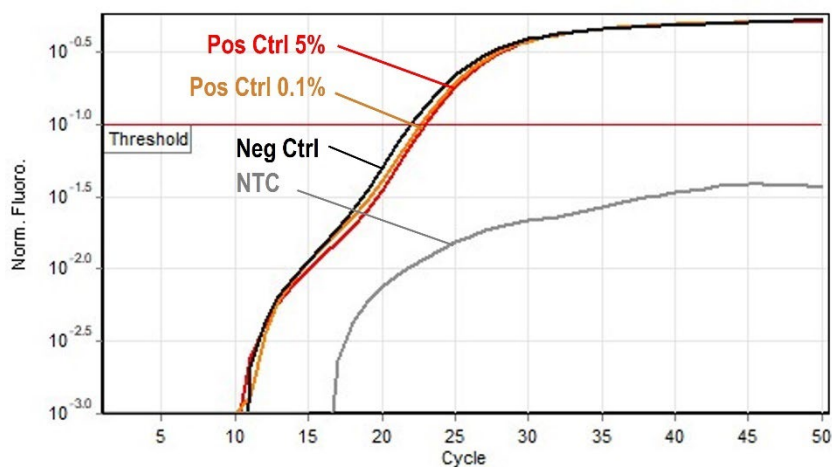


Fig 2. Typical JAK2 graph in Yellow channel for Rotor-Gene

## JAK2 RQ (V6.0)

For detection of JAK2 V617F, in addition to sample, 0.1% Positive Control and Negative Control must be assessed too.

Calculate  $\Delta CT$  for each sample including 0.1% Pos Ctrl and Neg Ctrl and patient sample according to the below formula□

$$\Delta CT = CT_{\text{Green Ch}} - CT_{\text{Yellow Ch}}$$

Note! If CT of Negative Control is higher than 45 or it remains negative in the Green Channel, use CT of 45 for calculation.

Consider the following points for analyzing:

- A sample is **Positive** for V617F, when sample  $\Delta CT$  is less than 0.1% Pos Ctrl  $\Delta CT$ .
- A sample is **Negative** for V617F, when sample  $\Delta CT$  is higher than Neg Ctrl  $\Delta CT$ .
- A sample is **Inconclusive**, when sample  $\Delta CT$  is higher than 0.1% Pos Ctrl  $\Delta CT$  and less than Neg Ctrl  $\Delta CT$ .

Above points are summarized in the following Table.

| $\Delta CT$                                                                                | Result                    |
|--------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------|
| $\Delta CT \text{ Sample} < \Delta CT \text{ 0.1\% Pos Ctrl}$                              | <b>Positive</b> for V617F |
| $\Delta CT \text{ Sample} > \Delta CT \text{ Neg Ctrl}$                                    | <b>Negative</b> for V617F |
| $\Delta CT \text{ 0.1\% Pos Ctrl} < \Delta CT \text{ Sample} < \Delta CT \text{ Neg Ctrl}$ | <b>Inconclusive</b>       |

As an example, If CT of Neg Ctrl is 34 in Green channel and 23 in the Yellow channel, the  $\Delta CT$  is 11. And, If CT of 0.1% Pos Ctrl is 31 in the Green channel and 23 in the Yellow channel, the  $\Delta CT$  is 8. For patient sample with the CT of 29 in the Green channel and 23 in the Yellow channel,  $\Delta CT$  is 6 and less than 0.1% Pos Ctrl  $\Delta CT$  (8) so, patient sample is considered Positive for V617F.

The example is summarized in below Table.

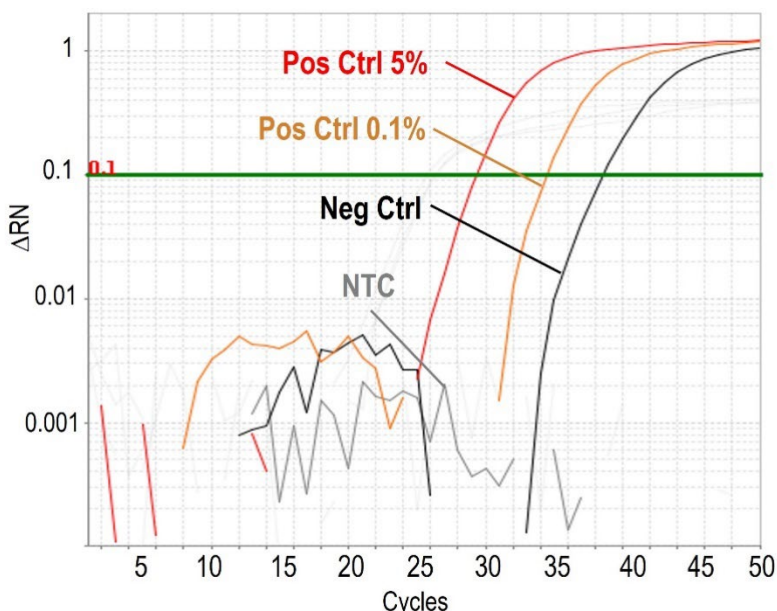
| Sample         | Green CT | Yellow CT | $\Delta$ CT |
|----------------|----------|-----------|-------------|
| Neg Ctrl       | 34       | 23        | 34-23=11    |
| 0.1% Pos Ctrl  | 31       | 23        | 31-23= 8    |
| Patient sample | 29       | 23        | 29-23= 6    |

## 21. Data Analysis: StepOne

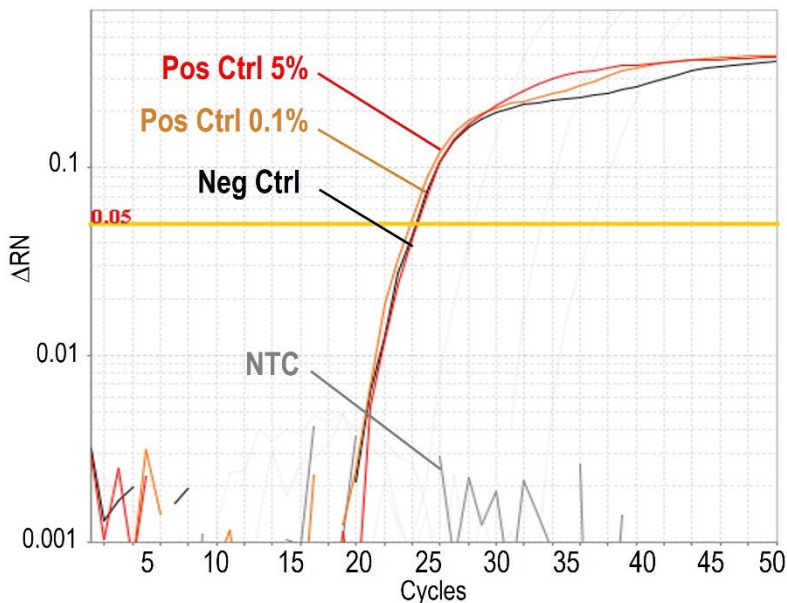
Analyze the data according to the StepOne manual. Briefly, click on the "Analyze" and set the threshold at 0.1 for **JAK2 (the FAM channel)** and 0.05 for **Internal Control (the VIC channel)**.

Refer to figures 3 and 4 for typical graphs.

**Note that a sample is considered Positive only if it has a sigmoid graph and log phase, and only then CT is reliable and can be used. In the absence of a sigmoid graph and log phase, the sample is considered Negative, and CT, if present, is not reliable.**



**Fig 3.** Typical JAK2 graph in FAM channel for StepOne



**Fig 4.** Typical JAK2 graph in VIC channel for StepOne

For detection of JAK2 V617F, in addition to sample, 0.1% Positive Control and Negative Control must be assessed too.

Calculate  $\Delta CT$  for each sample including 0.1% Pos Ctrl and Neg Ctrl and patient sample according to the below formula□

$$\Delta CT = CT_{FAM\ Ch} - CT_{VIC\ Ch}$$

Note! If CT of Negative Control is higher than 45 or it remains negative in Green Channel, use CT of 45 for calculation.

Consider following points for analyzing:

- A sample is **Positive** for V617F, when sample  $\Delta CT$  is less than 0.1% Pos Ctrl  $\Delta CT$ .
- A sample is **Negative** for V617F, when sample  $\Delta CT$  is higher than Neg Ctrl  $\Delta CT$ .
- A sample is **Inconclusive**, when sample  $\Delta CT$  is higher than 0.1% Pos Ctrl  $\Delta CT$  and less than Neg Ctrl  $\Delta CT$ .

Above points are summarized in the following table.

| $\Delta CT$                                                                                | Result                    |
|--------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------|
| $\Delta CT \text{ Sample} < \Delta CT \text{ 0.1\% Pos Ctrl}$                              | <b>Positive</b> for V617F |
| $\Delta CT \text{ Sample} > \Delta CT \text{ Neg Ctrl}$                                    | <b>Negative</b> for V617F |
| $\Delta CT \text{ 0.1\% Pos Ctrl} < \Delta CT \text{ Sample} < \Delta CT \text{ Neg Ctrl}$ | <b>Inconclusive</b>       |

As an example, If CT of Neg Ctrl is 38 in FAM channel and 25 in VIC channel, the  $\Delta CT$  is 13. And, If CT of 0.1% Pos Ctrl is 34 in FAM channel and 25 in VIC channel, the  $\Delta CT$  is 9. For patient sample with the CT of 32 in FAM channel and 25 in VIC channel,  $\Delta CT$  is 7 and less than 0.1% Pos Ctrl  $\Delta CT$  (9) so, patient sample is considered Positive for V617F. The example is summarized in below Table.

| Sample         | FAM CT | VIC CT | $\Delta CT$ |
|----------------|--------|--------|-------------|
| Neg Ctrl       | 38     | 25     | 38-25=13    |
| 0.1% Pos Ctrl  | 34     | 25     | 34-25=9     |
| Patient sample | 32     | 25     | 32-25=7     |

## 22. Sensitivity

The analytical detection limit of the kit was assessed with dilution series of the positive target in negative DNA and showed a limit of detection equal to 0.1% or 1 in 1,000. In other words, if in 1,000 cells only one is positive, it will be detected in 95% cases. To meet this level of sensitivity, extracted sample should contain 10-50 ng/ $\mu$ l DNA.

## 23. Disposal Method

The contents of the kit do not require any special treatment before disposal and can be directly discarded. Infectious specimens should be maintained in 5% Sodium Hypochlorite overnight and then discarded.

## 24. Technical Support

For technical support, contact us via phone at +98 993-6223241 and email: [info@novingene.com](mailto:info@novingene.com)

## 25. Contact Information

### NovinGene ParsVira

Address: No. 5, Iranshahr St, Tehran, Iran 1581633336.

Tel: +98 21-88837393

+98 990-1813124

Email: [info@novingene.com](mailto:info@novingene.com)

Website: [www.novingene.com](http://www.novingene.com)

## 26. References

- Jones, D., 2010. Neoplastic Hematopathology. Springer Science & Business Media.
- Levine, R.L., Pardanani, A., Tefferi, A. and Gilliland, D.G., 2007. Role of JAK2 in the pathogenesis and therapy of myeloproliferative disorders. *Nature reviews cancer*, 7(9), pp.673-683.
- Mackay IM. Real-time PCR in the microbiology laboratory. *Clin. Microbiol. Infect.* 2004; 10 (3): 190 – 212.
- Yoo, J.H., Park, T.S., Maeng, H.Y., Sun, Y.K., Kim, Y.A., Kie, J.H., Cho, E.H., Song, J., Lee, K.A., Suh, B. and Choi, J.R., 2009. JAK2 V617F/C618R mutation in a patient with

polycythemia vera: a case study and review of the literature. Cancer genetics and cytogenetics, 189(1), pp.43-47.

## 27. Symbols

|            |                   |                                                                                   |                                  |                                                                                   |                              |
|------------|-------------------|-----------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------|------------------------------|
| <b>RUO</b> | Research use only |  | Manufacturer                     |  | Consult instructions for use |
| <b>LOT</b> | Lot number        |  | Content sufficient for <n> tests |  | Use-by date                  |
| <b>REF</b> | Catalogue number  | <b>SN</b>                                                                         | Serial number                    |  | Temperature limit            |

**For more information and resources please visit our website; [www.novingene.com](http://www.novingene.com)**