راهنمای کیت JAK2 MQ

پاییز ۱۴۰۴، ویرایش ۱/۱

جهت تشخیص و محاسبه درصد جهش V617F

به روش Real-Time PCR

مخصوص تحقیقات

24 (Cat# JAK2MQ24)

48 (Cat# JAK2MQ48)

96 (Cat# JAK2MQ96)

NG-WI-ASL-48-101

RUO

شرکت نوین ژن پارس ویرا

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

Novin Gene

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 ۶
۹. سایر موارد مورد نیاز ۶
۱۰. احتیاط و نکات لازم ۷
۱۱. نمونه مناسب و شرایط نگهداری و انتقال آن ۷
۱۲. عوامل مزاحم ۸
۱۳. استخراج DNA ۸
۱۴. دستورکار PCR و مراحل آزمایش ۹
۱۵. دستگاه ها و نرم افزارها ۱۰
۱۶. تنظیم دستگاه Rotor-Gene ۱۰
۱۷. تنظیم دستگاه StepOne ۱۲
۱۸. تنظیم سایر دستگاه ها ۱۲
۱۹. آنالیز نتایج StepOne و Rotor-Gene ۱۳
۲۰. میزان حساسیت ۱۸

۲۱. روش امحاء ۱۸
۲۲. پشتیبانی فنی ۱۹
۲۳. اطلاعات تماس ۱۹
۲۴. منابع. ۱۹
۲۵. توضیحات برچسب ۲۰

۱. مقدمه

کیت JAK2 Quantitative جهت تشخیص و محاسبه درصد جهش JAK2 V617F در اگزون ۱۴ DNA انسانی به روش Real-Time PCR طراحی شده است. در این روش، DNA به کمک پرایمرها و پروب اختصاصی شناسایی می‌شود. همچنین میکس این کیت حاوی سری ثانویه ای از پرایمرها و پروب جهت شناسایی ژن طبیعی 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 MQ امکان بررسی نمونه را جهت تشخیص و محاسبه درصد موتاسیون JAK2 V617F در اگزون ۱۴ DNA انسانی با روش Real-Time PCR فراهم می‌کند. این کیت جهت استفاده با دستگاه 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 پیام های سیتوکین‌ها و هورمون‌های رشد دارد. جهش اکتسابی G1849T در ژن این آنزیم باعث جایگزینی آمینو اسید فنیل آلانین به جای والین می‌شود (V617F). در نتیجه این جهش، JAK2 به صورت دائمی فعال شده و موجب رشد مهار نشده‌ی سلول در غیاب هورمون های 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 توالی ژنتیکی با استفاده از روش واکنش زنجیره ای پلیمراز PCR/Polymerase Chain Reaction انجام می‌شود. طی این واکنش، توالی مورد نظر با استفاده از پرایمرهای اختصاصی شناسایی و تکثیر می‌شود. در روش Real-Time PCR توالی تکثیر شده با استفاده از پروب‌های فلورسنت قابل تشخیص می‌گردد. بنابراین، با بررسی میزان فلورسنت در طی واکنش می‌توان وجود توالی 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 روش‌هایی 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
MJ Mix	میکس آماده برای JAK2 V617F *	۴۸۰ میکرولیتر
WJ Mix	میکس آماده برای JAK2 Wild type *	۴۸۰ میکرولیتر
MJ1	استاندارد ۱ V617F: صد هزار کپی در میکرولیتر	۱۵۰ میکرولیتر
MJ2	استاندارد ۲ V617F: ده هزار کپی در میکرولیتر	۱۵۰ میکرولیتر
MJ3	استاندارد ۳ V617F: هزار کپی در میکرولیتر	۱۵۰ میکرولیتر
MJ4	استاندارد ۴ V617F: صد کپی در میکرولیتر	۱۵۰ میکرولیتر

MJ5	استاندارد ۵ V617F: ده کپی در میکرولیتر	۱۵۰ میکرولیتر
WJ1	استاندارد ۱ Wild type: صد هزار کپی در میکرولیتر	۱۵۰ میکرولیتر
WJ2	استاندارد ۲ Wild type: ده هزار کپی در میکرولیتر	۱۵۰ میکرولیتر
WJ3	استاندارد ۳ Wild type: هزار کپی در میکرولیتر	۱۵۰میکرولیتر
WJ4	استاندارد ۴ Wild type: صد کپی در میکرولیتر	۱۵۰ میکرولیتر
WJ5	استاندارد ۵ Wild type: ده کپی در میکرولیتر	۱۵۰ میکرولیتر
Pos Ctrl	شاهد مثبت ۲/۵٪	۵۰ میکرولیتر
Neg Ctrl	شاهد منفی	۵۰ میکرولیتر
Water	آب مخصوص PCR	۲۰۰ میکرولیتر

* یک، دو یا چهار عدد، به ترتیب برای کیت های ۲۴، ۴۸ و ۹۶ واکنشی

۶. مدل های بسته بندی

کیت در قالب های بیست و چهار، چهل 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 نمود.
- 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 نمی‌باشد.

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 یخچال دار 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 cDNA 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 کاملا 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 یخ های قالبی و سایر موارد به غیر از یخ خرد شده پرهیز کنید.
- در حین کار، میکروتیوب های 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، خون محیطی (peripheral blood) و خون کامل یا نمونه مغز استخوان می‌باشد که در لوله استریل حاوی ماده ضد انعقاد

جمع آوری شده است. ماده ضد انعقاد می تواند EDTA یا سیترات باشد. خون کامل را می‌توان تا ۴۸ ساعت در ۴ درجه نگهداری و به آزمایشگاه منتقل نمود.
DNA را می‌توان مستقیماً از خون استخراج کرد. همچنین برای افزایش حساسیت تست می‌توان از بافی (buffy coat) استفاده کرد.
برای نگهداری خون کامل یا بافی در زمان های طولانی تر از سه روز بهتر است آن را به حجم های کوچک تقسیم نموده و سپس در دمای ۲۰ درجه زیر صفر نگهداری نمود. در چنین شرایطی نمونه تا چند ماه پایدار می‌ماند.
نمونه مناسب باید حاوی ۲۵ ng/µl DNA باشد. مقدار DNA کمتر از ۱۰ ng/µl یا بیشتر از ۵۰ ng/µl سبب کاهش حساسیت تست می‌شود.

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

۱۳. استخراج DNA

برای استخراج DNA از نمونه از روش‌ها و کیت‌های مختلفی می‌توان استفاده نمود. ما استفاده از موارد 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 10-50 ng/µl باشد.

۱۴. دستورکار PCR و مراحل آزمایش

ابتدا تمامی لوله ها را روی یخ خرد شده قرار دهید تا بطور کامل محتویات آنها ذوب شوند. با چند تکان ملایم از مخلوط شدن مواد داخل آنها اطمینان حاصل کرده و برای چند ثانیه آن ها را در دور پایین سانتریفوژ کنید.

هر نمونه برای دو آلل جهش یافته و سالم باید بررسی شود. به این منظور دو آزمایش PCR در دو سری لوله های جداگانه باید انجام شود. در سری اول برای بررسی آلل جهش یافته (V617F) علاوه بر یک لوله برای نمونه هر بیمار، پنج لوله برای استانداردهای (MJ1-MJ5) و سه لوله برای شاهد مثبت، شاهد منفی و آب (NTC) در نظر بگیرید. در سری دوم و برای بررسی آلل سالم علاوه بر یک لوله برای نمونه هر بیمار، پنج لوله نیز برای استانداردها (WJ1-WJ5) و یک لوله برای شاهد مثبت، شاهد منفی و آب در نظر بگیرید. تعداد مورد نیاز لوله در دو سری جداگانه روی بلوک سرد بگذارید.

به هر لوله سری اول، ۲۰ میکرولیتر از MJ Mix و به هر لوله سری دوم، ۲۰ میکرولیتر از WJ Mix اضافه نمایید. سپس ۵ میکرولیتر از DNA نمونه و استاندارد و کنترل به هر لوله اضافه کنید 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.

هنگام استفاده از دستگاه روتورژن، رینگ محافظ را نیز در پایان اضافه کنید.

۱۵. دستگاه ها و نرم افزارها

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

۱۶. تنظیم دستگاه RotorGene

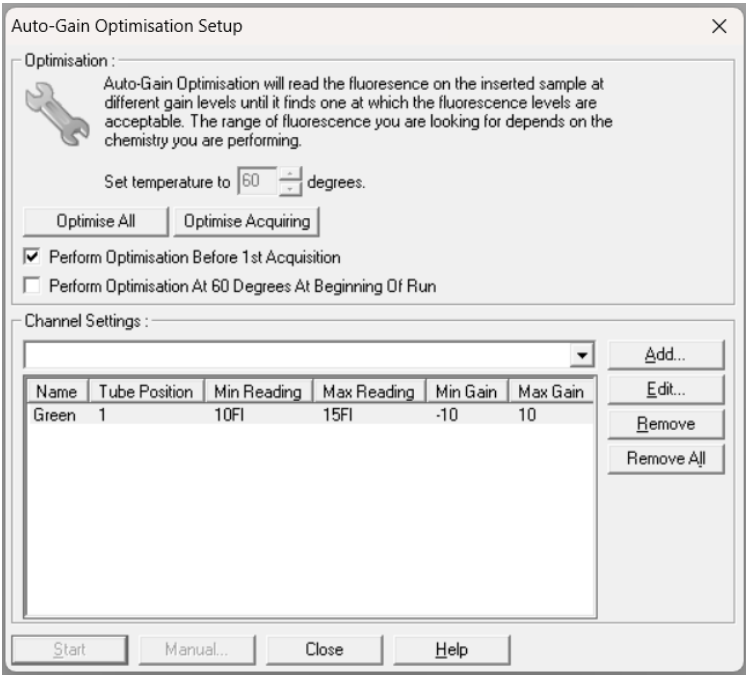
ابتدا اطمینان حاصل کنید که رینگ محافظ را روی روتور قرار داده اید!

دستگاه RotorGene را توسط کابل مخصوص آن با کامپیوتر متصل کرده و آن را به برق وصل کنید 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 دقیقا مطابق تصویر صفحه بعد برای هر دو کانال انجام دهید. Tube Position را روی شماره ۱ تنظیم کنید (در نظر داشته باشید تیوب شماره یک باید حاوی میکس JAK2 باشد).

گزینه Perform Optimisation Before 1st 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.

دقت کنید که دو صفحه جداگانه با نام های MJ و WJ تعریف شده اند و لوله های حاوی MJ Mix فقط در صفحه MJ و لوله های حاوی WJ Mix فقط در صفحه WJ باید نامگذاری شوند. در ستون "Type" نوع هر نمونه را نیز مشخص کنید، یعنی نمونه بیمار را با unknown، استانداردها را با standard و شاهد منفی را با Negative Control و نمونه اب یا NTC را با عنوان NTC تعریف کنید. غلظت استانداردها را نیز در ستون مربوطه وارد کنید.

۱۷. 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 Assign Targets and Sample را انتخاب کنید. در کانال FAM دو تارگت با نام های MJ و WJ تعریف شده است. پنج استاندارد برای MJ، پنج استاندارد برای WJ و دو کنترل مثبت و کنترل منفی، همچنین NTC و چند نمونه از پیش تعریف شده اند. استانداردها، 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) می‌توانید استفاده کنید. همچنین با استفاده از منوی Define Targets and Samples می‌توانید تعداد نمونه های مورد بررسی را نیز اضافه کنید و نام نمونه ها را نیز مطابق نام بیماران تغییر دهید. در پایان تنظیمات دکمه Start Run را کلیک کنید و فایل آزمایش را در محل مورد نظر ذخیره کنید تا دستگاه شروع به کار کند.

۱۸. تنظیم سایر دستگاه ها

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

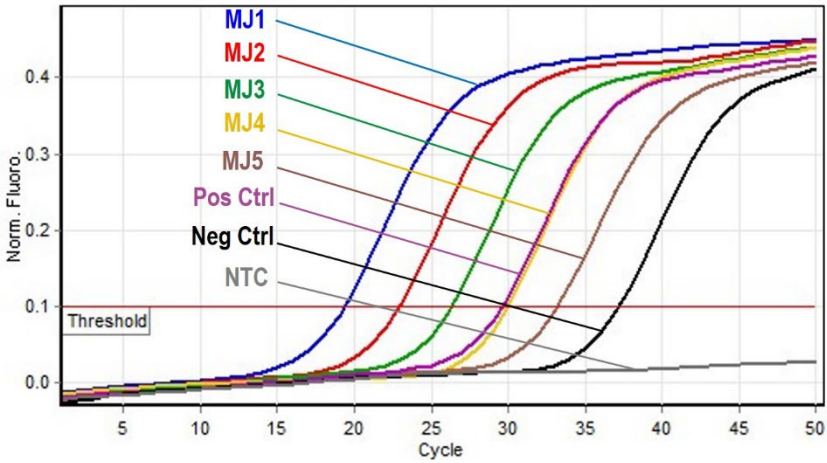
Step	Temperature and time	Cycles
1	**95°C x 3 min**	1
2	**95°C x 15 sec**	50
	60°C x 60 sec	

اندازه گیری تابش فلورسانس باید در دمای ۶۰ درجه و برای رنگ FAM تنظیم شود. MJ Mix و WJ Mix حاوی ROX می‌باشند. غلظت نهایی ROX در واکنش 300nM می‌باشد.

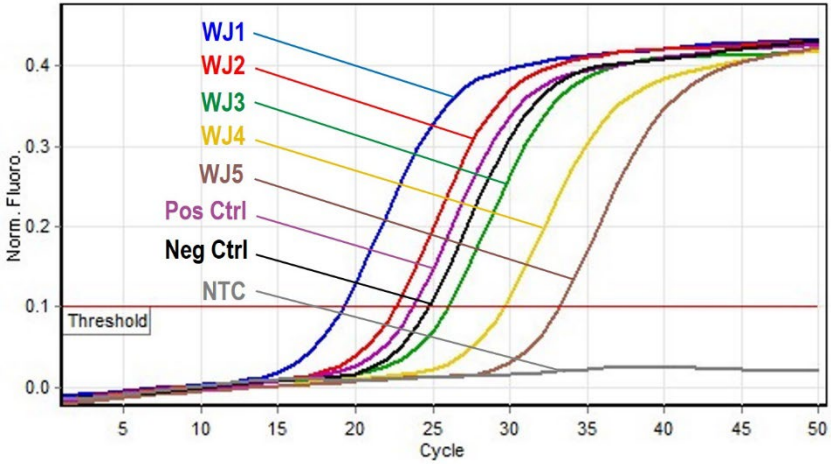
۱۹. آنالیز نتایج RotorGene و StepOne

برای آنالیز نتایج به راهنمای دستگاه RotorGene و StepOne مراجعه کنید. آنالیز کمی را انجام داده و threshold یا آستانه را در کانال Green/FAM و برای MJ و WJ روی ۰/۱ قرار دهید. برای مشاهده نمودار مورد انتظار از استانداردهای MJ و WJ در دستگاه روتورژن تصاویر یک و دو را ملاحظه فرمایید. در نظر داشته باشید که افزایش **تابش سبز (FAM/Green)** مربوط به **MJ** و **WJ** هر دو می‌باشد که در دو صفحه جداگانه بررسی می‌شود.

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



تصویر ۱. منحنی استانداردهای MJ در کانال سبز دستگاه روتورژن



تصویر ۲. منحنی استانداردهای WJ در کانال سبز دستگاه روتورژن

آنالیز نمونه با کیت JAK2 به دو روش کمی از طریق محاسبه درصد V617F و همچنین روش کیفی قابل انجام می‌باشد.

الف) آنالیز کمی نمونه (محاسبه درصد V617F)

توجه! نتایج تست تنها در صورتی معتبر میباشد که مجموع نسخه های آلل سالم و جهش یافته در نمونه بین پنج هزار الی سی هزار کپی در میکرولیتر باشد.

درصد جهش JAK2 (V617F) را از طریق فرمول زیر می توان محاسبه کرد. به این منظور تیتر آلل جهش یافته را بر مجموع تیتر آلل‌های سالم و جهش یافته تقسیم و در عدد صد ضرب نمایید.

$$\textbf{JAK2 V617F}\ (\%) = \frac{\textbf{mutant allele titre}}{(\textbf{mutant allele titre} + \textbf{wild allele titre})} \times \textbf{100}$$

- نمونه با تیتر برابر یا بالاتر از ۰/۱٪ **مثبت** می‌باشد و درصد محاسبه شده را می‌توان گزارش کرد.
- نمونه با تیتر برابر یا کمتر از ۰/۰۱٪ **منفی** می‌باشد و تیتر محاسبه شده غیرقابل گزارش می‌باشد.
- نمونه با تیتر بین ۰/۰۲٪ تا ۰/۰۹٪ **غیرقابل نتیجه گیری** است و نمونه می‌تواند مثبت یا منفی باشد و تیتر محاسبه شده غیرقابل گزارش می‌باشد.

شرایط فوق به صورت خلاصه در جدول زیر ذکر شده است.

نتیجه	JAK2 V617F%
مثبت برای جهش V617F	≥ ٪۰/۱
منفی برای جهش V617F	≤ ٪۰/۰۱
غیرقابل نتیجه گیری	٪۰/۰۹ ≤ نمونه ≤ ٪۰/۰۲

محاسبه درصد JAK2 (V617F) برای نمونه های شاهد مثبت و شاهد منفی نیز انجام شود. نتایج مورد انتظار برای شاهدها مطابق جدول می‌باشد:

شاهدها	JAK2 V617F%
شاهد مثبت ٪۲.۵	٪۱/۵ – ٪۴
شاهد منفی	≤ ٪ ۰/۰۲

ب) آنالیز کیفی نمونه:

در صورتیکه از این کیت برای تشخیص کیفی استفاده می‌کنید، علاوه بر نمونه بیمار، باید شاهد مثبت و شاهد منفی که حاوی DNA است با هر دو میکس MJ و WJ بررسی شود و نتایج مطابق شرایط زیر تفسیر شود.

- ابتدا ΔCT را برای شاهد منفی محاسبه نمایید. برای این منظور، CT بدست آمده برای شاهد منفی را با میکس WJ از CT بدست آمده با میکس MJ کم نمایید، این اختلاف CT معادل Cut-off می‌باشد.

$$\text{Cut-off or } \Delta CT_{\text{Negative Control}} = CT_{\text{MJ Mix}} - CT_{\text{WJ Mix}}$$

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.

- اختلاف CT نمونه بیمار را با میکس‌های MJ و WJ با توجه به معادله زیر

محاسبه کنید:

$$\Delta CT\ Sample = CT_{MJ\ Mix} - CT_{WJ\ Mix}$$

- برای مشخص کردن محدوده نامشخص و غیرقابل نتیجه گیری از معادله زیر استفاده کنید:

$$Cut\text{-}off - 3.3 < Inconclusive\ CT\ range < Cut\text{-}off$$

نتایج را با توجه به نکات زیر تفسیر کنید:

- در صورتی که ΔCT نمونه از محدوده‌ی نامشخص کمتر باشد نمونه از نظر JAK2 **مثبت** است.
- در صورتی که ΔCT نمونه از Cut-off بیشتر باشد نمونه از نظر JAK2 **منفی** است.
- در صورتی که ΔCT نمونه عددی بین محدوده‌ی نامشخص و Cut-off باشد، نمونه **غیرقابل نتیجه گیری** می‌باشد.

همچنین برای سهولت می‌توانید نتایج را در جدول زیر وارد نمایید:

نمونه	CT MJ	CT WJ	ΔCT	محدوده نامشخص	نتیجه
شاهد منفی					
شاهد مثبت					
نمونه بیمار					
نمونه بیمار					
نمونه بیمار					

برای مثال: در صورتی که در کانال سبز CT شاهد منفی با میکس WJ معادل ۲۴/۸ و با میکس MJ معادل ۳۷/۲ باشد. Cut off برای شاهد منفی عدد ۱۲/۴ و **محدوده‌ی نامشخص** معادل بازه (۹/۱=۳/۳-۱۲/۴) ۹/۱ تا ۱۲/۴ می‌باشد.

نتایج نمونه ها در جدول زیر آمده است.

نمونه	CT MJ	CT WJ	ΔCT	محدوده نامشخص	نتیجه
شاهد منفی	۳۷/۲	۲۴/۸	۱۲/۴	۹/۱-۱۲/۴	منفی
شاهد مثبت	۲۹/۲	۲۳/۴	۵/۸	۵/۸< ۹/۱	مثبت
نمونه بیمار	۴۱/۵	۲۸/۵	۱۳	۱۳> ۹/۱	منفی
نمونه بیمار	۳۰/۷	۲۹/۰	۱/۷	۱/۷< ۹/۱	**مثبت**
نمونه بیمار	۳۹/۵	۲۸/۷	۱۰/۸	۹/۱<۱۰/۸ <۱۲/۴	غیرقابل نتیجه گیری

۲۰. حساسیت

حساسیت این کیت معادل ۰/۱٪ برای JAK2 محاسبه گردید. برای دستیابی به این میزان حساسیت، در نمونه مورد نظر باید میزان مجموع آلل جهش یافته و سالم معادل پنج هزار الی سی هزار کپی در میکرولیتر باشد.

۲۱.روش امحاء

محتویات کیت فاقد خطرات بیولوژیکی یا شیمیایی بوده و می‌توان آنها را مستقیما 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.

۲۲. پشتیبانی فنی

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

۰۹۹۳۶۲۲۳۲۴۱

Info@novingene.com

۲۳. 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

۲۴. منابع

- Lay, M., Mariappan, R., Gotlib, J., Dietz, L., Sebastian, S., Schrijver, I. and Zehnder, J.L., 2006. Detection of the JAK2 V617F mutation by LightCycler PCR and probe dissociation analysis. The Journal of Molecular Diagnostics, 8(3), pp.330-334.
- 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.

۲۵. توضیحات برچسب

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

برای دریافت اطلاعات و منابع بیشتر، به وبسایت ما به نشانی www.novingene.com مراجعه فرمایید یا با پشتیبانی تماس بگیرید.

JAK2 MQ Kit Manual

Autumn 2025, Version 1.1

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

24 (Cat# JAK2MQ24)
48 (Cat# JAK2MQ48)
96 (Cat# JAK2MQ96)
NG-WI-ASL-48-101

RUO

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

Novin Gene

Table of Contents

1. Introduction 3
2. Intended Use 3
3. Mutation Information 3
4. Test Principle 3
5. Kit Contents 4
6. Packaging models 4
7. Storage and Stability 5
8. Product Use Limitations 5
9. Additionally Required Materials 5
10. General Precautions 6
11. Specimen, Storage and Transport 6
12. Interfering Substances 6
13. DNA Isolation 7
14. PCR Protocol 7
15. Programming RotorGene 8
16. Programming of StepOne 9
17. Programming Other Machines 9
18. Data Analysis: RotorGene and StepOne 10
19. Analytical Sensitivity 14

20. Disposal Method 15
21. Technical Support 15
22. Contact Information 15
23. References 15
24. Symbols 16

1. Introduction

JAK2 MQ kit provides a ready-to-use Real-Time polymerase chain reaction (PCR) test designed for detecting and quantifying of JAK2 V617F mutation in exon 14 human genomic DNA. All required reagents are included in the PCR Mix provided in the kit. The other Mix also contains a different series of primers and probes for the detection of a Wild type gene serving as internal control to prevent false negative results.
This kit is intended for Research Use Only!

2. Intended Use

JAK2 MQ kit is intended for detecting and quantifying of JAK2 V617F mutation in exon 14 human genomic DNA. 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 an 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 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, quick guide and a flash card and the following reagents:

Label	Content	Quantity
MJ Mix*	Mix for JAK2 (V617F)	480 µl
WJ Mix*	Mix for Wild Type	480 µl
MJ1	Standard 1 V617F: 100,000 copies/µl	150 µl
MJ2	Standard 2 V617F: 10,000 copies/µl	150 µl
MJ3	Standard 3 V617F: 1,000 copies/µl	150 µl
MJ4	Standard 4 V617F: 100 copies/µl	150 µl
MJ5	Standard 5 V617F: 10 copies/µl	150 µl
WJ1	Standard 1 Wild Type: 100,000 copies/µl	150 µl
WJ2	Standard 2 Wild Type: 10,000 copies/µl	150 µl
WJ3	Standard 3 Wild Type: 1,000 copies/µl	150 µl
WJ4	Standard 4 Wild Type: 100 copies/µl	150 µl
WJ5	Standard 5 Wild Type: 10 copies/µl	150 µl
Pos Ctrl 2.5%	Positive Control 2.5%	50 µl
Neg Ctrl	Negative Control	50 µl
Water	PCR Grade Water	200 µl

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

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
- Refrigerated microtube centrifuge
- Vortex Mixer
- Dry Block Heater
- Adjustable pipetters 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 templates 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 0.2 ml PCR tubes on crushed ice. Use cold blocks instead.

11. Specimen, Storage and Transport

Peripheral blood should be collected in sterile condition in proper and sterile tubes. We recommend EDTA or Citrate as anticoagulant. Whole blood should be shipped and stored at +4°C (stable for 48 hours).

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

Whole blood or buffy coat can be stored at +4°C for three days. Otherwise, should be aliquoted and stored at -70°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 (≤4.5 mg/dl) and lipids (≤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 using:

- 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/µl. Samples with lower DNA content, result in reduced sensitivity.

14. PCR Protocol

Thaw the reagents on ice completely, followed by a brief mixing and a quick spin.

Each sample should be examined with both MJ Mix (for V617F) and with WJ Mix (for Wild type allele) in two separate set of reactions. In each set, consider 1 tube for each sample as well as 5 tubes for the 5 standards (MJ or WJ) and 3 tubes for Positive Control, Negative Control and NTC. Use MJ standards for reactions with MJ mix and WJ standards for reactions with WJ mix. Place required number of tubes on a cold block.

Pipette 20µl of MJ Mix to the first series of tubes and 20µl of WJ Mix to each tube of the second group. Continue by adding 5µl of sample DNA, standards, Positive or Negative Control to each tube.

Cap the tubes and visually inspect to 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 RotorGene attach the locking ring.

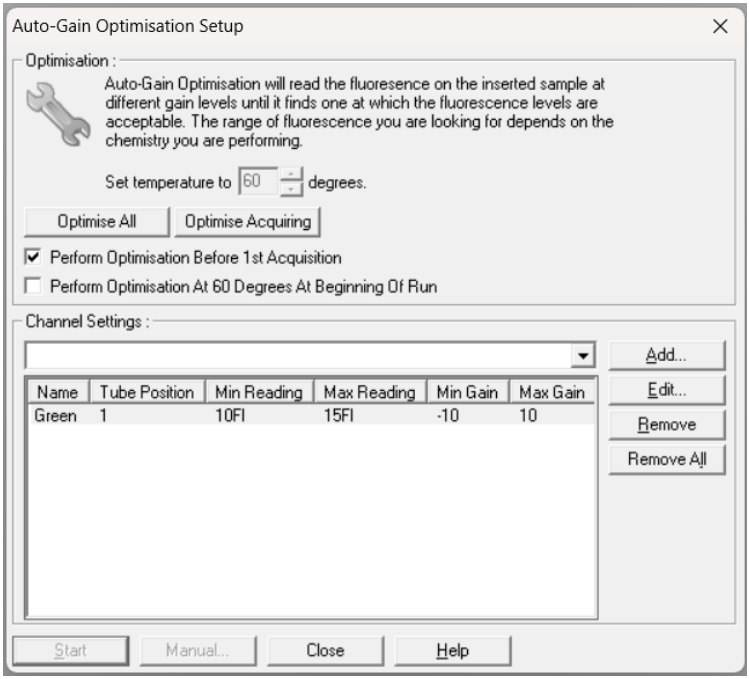
15. Programming RotorGene

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 MQ 0.1 is for strip tubes and JAK2 MQ 0.2 is for 0.2ml tubes. Program starts.

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 Green channel (note that Tube number 1 should contain Jak2 Mix MJ).



Click on Start button (Green button on the top menu). On the pop-up window click Start again and save the run file.
Edit samples on both MJ and WJ pages. Remember that tubes containing MJ Mix should only be named in MJ page and tubes containing WJ Mix should only be named in WJ page.
Make sure in the “Type” column, all the standards have been defined as “standard” and the relative concentrations have been entered. Patient samples should be defined as "unknown" and no template control as "NTC", respectively.

16. 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. Two targets of MJ and WJ are define in FAM channel. For MJ reactions, 5 standards (MJ1-MJ5) along with Positive and Negative Control, NTC and few samples have been defined. Also, for WJ reactions, 5 standards (WJ1-WJ5) along with Positive and Negative Control, NTC and few samples have been defined. You may change plate setup using right-click options (copy, past, clear). You may also add or remove samples on “Define Targets and Samples” menu. When finished click on Start Run and save the experiment. The instrument will start shortly.

17. 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	**95°C x 3 min**	1
2	**95°C x 15 sec**	50
	60°C x 60 sec	

Fluorescence should be collected at 60°C for FAM. Both MJ Mix

and WJ Mix contain ROX with final concentration of 300nM in reaction.

18. Data Analysis: RotorGene and StepOne

Analyze the data according to machine manual. Perform quantitative analysis for both **MJ** and **WJ** in the **Green/FAM channel** with threshold set at 0.1.
Figures 1 and 2 represent typical graphs for the StepOne machine.

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.

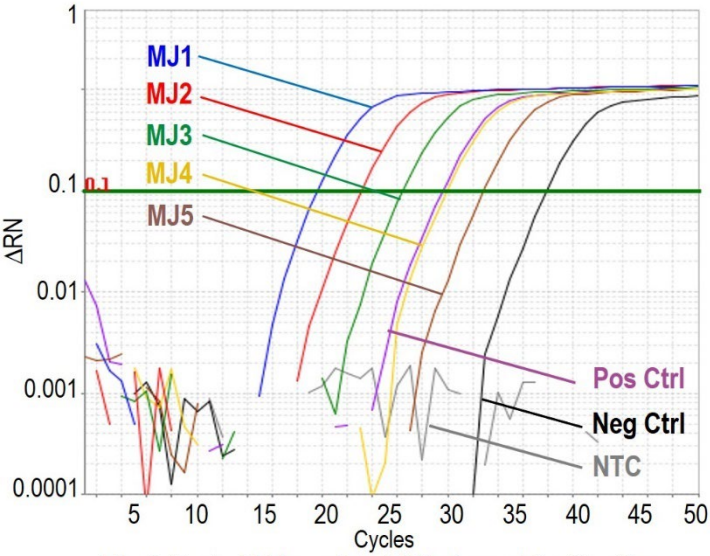


Fig 1. Typical MJ graph in FAM channel for StepOne

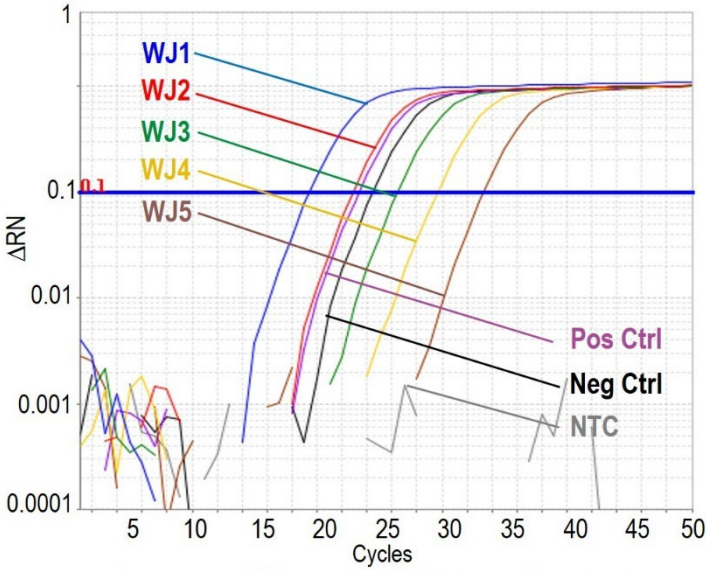


Fig 2. Typical WJ graph in FAM channel for StepOne

Consider the following points when analyzing:
Sample analysis with JAK2 MQ kit can be done in two ways, Quantitative and Qualitative methods.

A) Quantitative analysis (V617F% calculation)

Note! To consider a sample valid, total copy number of wild and mutant alleles must be equal to 5,000-30,000 copy/ul.

V617F% value can be calculated for each patient with the below formula.

$$\textbf{JAK2 V617F}\ (\%) = \frac{\textbf{mutant allele titre}}{(\textbf{mutant allele titre} + \textbf{wild allele titre})} \times \mathbf{100}$$

- A sample is **Positive** if V617F% is equal or higher than 0.1% and calculated titer could be reported.
- A sample is **Negative** if V617F% is equal or lower than 0.01% and calculated number should be ignored.
- A sample is **Inconclusive** if V617F% is between 0.02% - 0.09%. So it could be Positive or Negative and calculated number should be ignored.

JAK2 V617F%	Results
≥ 0.1%	**Positive for V617F**
≤ 0.01%	**Negative for V617F**
0.02% ≤ Sample ≤ 0.09%	**Inconclusive**

Note: Calculate V617F percentage for JAK2 Neg Ctrl and JAK2 Pos Ctrl. Results must be according to the below table.

Controls	JAK2 V617F%
2.5% Pos Ctrl	1.5% - 4%
Neg Ctrl	≤ 0.02%

B) Qualitative Analysis

For qualitative detection of JAK2 V617F, in addition to sample, Positive and Negative Controls must be assessed with both MJ and WJ Mix.

First, calculate Cut-off as below:

$$\text{Cut-off} = \Delta CT_{\text{Neg Ctrl}} = CT_{\text{MJ Mix}} - CT_{\text{WJ Mix}}$$

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

- Calculate delta CT of MJ and WJ Mix for each patient's sample according to the following equation.

$$\Delta CT\ \text{Sample} = CT_{\text{MJ Mix}} - CT_{\text{WJ Mix}}$$

- Determine Inconclusive CT range by following formula.

$$\text{Cut-off} < \text{Inconclusive CT range} < \text{Cut-off} - 3.3$$

Consider following points when analyzing:

- A sample is **Positive** for V617F, If sample ΔCT is less than Inconclusive CT range.
- A sample is **Negative** for V617F, If sample ΔCT is higher than Cut-off.
- A sample is **Inconclusive**, If sample ΔCT falls within Inconclusive CT range.

Enter the results in the table below.

Sample	CT $_{MJ}$	CT$_{WJ}$	ΔCT	Inconclusive CT	Evaluation
Pos Ctrl					
Neg Ctrl					
Sample					
Sample					
Sample					

As an example, If CT of Neg Ctrl with WJ is 24.8 in the Green/FAM channel and 37.2 with MJ Mix, the ΔCT or Cut-off is 12.4. and Inconclusive CT range is (12.4-3.3=9.1) 9.1 to 12.4. results are summarized in below table.

Sample	CT $_{MJ}$	CT$_{WJ}$	ΔCT	Inconclusive CT	Evaluation
Neg Ctrl	37.2	24.8	12.4	9.1 - 12.4	Negative
Pos Ctrl	29.2	23.4	5.8	5.8 < 9.1	Positive
Sample	41.5	28.5	13	13 > 9.1	Negative
Sample	30.7	29.0	1.7	1.7 < 9.1	Positive
Sample	39.5	28.7	10.8	9.1< 10.8 < 12.4	Inconclusive

19. Analytical Sensitivity

Analytical sensitivity of the kit has been estimated about 0.1% for JAK2 V617F. To achieve this sensitivity, sample must include 5,000-30,000 copy/µl mutant and wild type alleles.

20. 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.

21. Technical Support

For technical support, contact us via
Phone: +98 993-6223241
Email: info@novingene.com

22. Contact Information

NovinGene ParsVira
Address: No. 5, Iranshahr St, Tehran, Iran 1581633336.
Tel: +98 21-88837393
+98 990-1813124
Email: info@novingene.com
Website: www.novingene.com

23. References

- Lay, M., Mariappan, R., Gotlib, J., Dietz, L., Sebastian, S., Schrijver, I. and Zehnder, J.L., 2006. Detection of the JAK2 V617F mutation by LightCycler PCR and probe dissociation analysis. The Journal of Molecular Diagnostics, 8(3), pp.330-334.
- 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.

24. Symbols

RUO	Research use only		Manufacturer		Consult instructions for use
LOT	Lot number		Content sufficient for <n> tests		Use-by date
REF	Catalogue number	SN	Serial number	-10°C -30°C	Temperature limit

For more information and resources please visit our website; www.novingene.com