راهنمای کیت BRAF RQ

کیت BRAF RQ جهت بررسی جهش در کدون ۶۰۰ انکوژن BRAF در DNA انسانی با استفاده از دستگاه Real-Time PCR طراحی شده است. این کیت مخصوص مصارف تحقیقاتی است.

توجه: لطفا پیش از استفاده از این راهنما، دفترچه ی کیت به دقت مطالعه شود.

این راهنمای خلاصه، جایگزینی برای دفترچه کیت نخواهد بود.

برچسب	محتوا	تعداد	حجم
BRAF Ctrl Mix	میکس PCR برای کنترل کیفی DNA	۲	۴۸۰ میکرولیتر
V600E Mix	میکس PCR برای بررسی جهش V600E	۱	۴۸۰ میکرولیتر
V600Ec Mix	میکس PCR برای بررسی جهش V600Ec	۱	۴۸۰ میکرولیتر
V600D Mix	میکس PCR برای بررسی جهش V600D	۱	۴۸۰ میکرولیتر
V600K Mix	میکس PCR برای بررسی جهش V600K	۱	۴۸۰ میکرولیتر
V600R Mix	میکس PCR برای بررسی جهش V600R	۱	۴۸۰ میکرولیتر
BRAF Pos	شاهد مثبت	۱	۲۵۰ میکرولیتر
BRAF Neg	شاهد منفی	۱	۲۵۰ میکرولیتر
Water	آب مخصوص PCR	۱	۲۰۰ میکرولیتر

محتویات کیت: این کیت شامل یک دفترچه راهنما و موارد زیر می‌باشد:

تمامی مواد کیت باید در دمای ۲۰ درجه زیر صفر حمل و نگهداری شوند.

روش کار: پیش از بررسی نمونه برای وجود جهش های BRAF، ابتدا باید از کیفیت DNA استخراج شده از نمونه بیمار اطمینان یافت و در صورتی که نتایج در محدوده مطلوب باشد آنگاه، آزمایش دوم که بررسی جهش های ژن BRAF می‌باشد انجام خواهد شد.

بررسی کیفیت DNA نمونه: تعداد مورد نیاز میکروتیوب را بر روی بلوک سرد بگذارید. در این سری، علاوه بر یک میکروتیوب برای نمونه هر بیمار، دو میکروتیوب دیگر برای شاهد منفی و نمونه آب در نظر بگیرید.

به هر میکروتیوب، ابتدا ۲۰ میکرولیتر از Ctrl Mix و سپس ۵ میکرولیتر از DNA نمونه، شاهد منفی و آب اضافه کنید و درپوش میکروتیوب ها را ببندید. سپس آن ها را مطابق شماره ها داخل دستگاه قرار دهید.

تنظیم دستگاه: برای تنظیم دستگاه Real-Time PCR می‌توانید دستگاه را مطابق برنامه زیر تنظیم نمایید. در صورتی که از دستگاه Rotor-Gene و یا StepOne استفاده می‌کنید، می‌توانید از فایل تمپلیت در لوح فشرده همراه کیت استفاده نمایید.

Step	Temperature and time	Cycles
1	**95°C x 3 min**	1
2	**95°C x 15 sec**	45
	60°C x 60 sec	

اندازه گیری تابش فلورسانس باید در دمای ۶۰ درجه و در کانال های سبز (FAM) و زرد (VIC) تنظیم شود. میکس های کیت حاوی ROX می‌باشند. غلظت نهایی ROX در واکنش 300 nM می‌باشد.

آنالیز نتایج بررسی کیفیت DNA نمونه: تحلیل نتایج آزمایش کنترل کیفیت DNA بیمار در دو مرحله انجام می‌شود. در مرحله نخست باید اطمینان یافت که آزمایش از نظر کیفی به نحو مطلوب انجام شده است و سپس می‌توان نتایج نمونه بیمار را آنالیز نمود.

در نظر داشته باشید نمونه استخراج شده باید حاوی ۱۰ الی۵۰ نانوگرم DNA در هر میکرولیتر باشد.

الف- بررسی شاهد منفی: توجه داشته باشید نمونه بیمار تنها زمانی قابل بررسی خواهد بود که نمونه ها دارای شرایط مندرج در جدول ابتدای صفحه ۳ باشند. در غیر این صورت، آزمایش غیر معتبر بوده و کلیه نتایج فاقد ارزش می باشد.

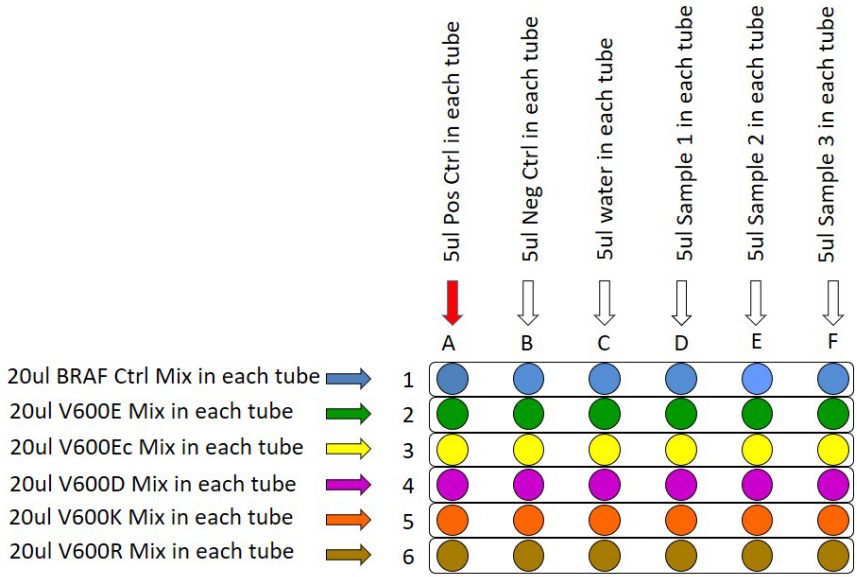
نمونه	FAM/Green	VIC/Yellow
آب	Neg	Pos (CT 27-33)
شاهد منفی	Pos (CT 23-28)	Pos (CT 27-33)

ب- بررسی نمونه بیمار: در صورتی که کیفیت نمونه مورد تایید باشد، آنگاه مطابق جدول زیر، نتایج را تفسیر کنید:

	FAM/Green	VIC/Yellow	Result
1	+ CT: 22-30	+ CT: 27-33	Valid
2	+ CT<22	+ CT: 27-33	Sample dilution
3	- CT>30	+ CT>33	Invalid

پس از بررسی کیفیت DNA نمونه و تحلیل داده ها و در موارد لازم، اِعمال تغییر در غلظت نمونه ها، بررسی جهش های BRAF انجام می شود.

بررسی جهش های BRAF: برای بررسی جهش های BRAF، هر نمونه باید با شش میکس آزمایش شود. در این آزمایش پنج جهش ژن BRAF شامل V600E/Ec/D/K/R هر کدام در یک میکروتیوب جداگانه با یکی از میکس های BRAF بررسی می شوند. علاوه بر پنج میکروتیوب مذکور، یک میکروتیوب نیز به بررسی نمونه با میکس کنترل اختصاص می یابد. تصویر زیر نحوه چیدمان برای بررسی چهار نمونه بیمار را نشان می دهد.



به هر یک از میکروتیوب های ردیف اول ۲۰ میکرولیتر از **BRAF Ctrl Mix** اضافه کنید.

به هر یک از میکروتیوب‌های ردیف دوم ۲۰ میکرولیتر از **V600E Mix** اضافه کنید.

به هر یک از میکروتیوب‌های ردیف سوم ۲۰ میکرولیتر از **V600Ec Mix** اضافه کنید.

به هر یک از میکروتیوب‌های ردیف چهارم ۲۰ میکرولیتر از **V600D Mix** اضافه کنید.

به هر یک از میکروتیوب‌های ردیف پنجم ۲۰ میکرولیتر از **V600K Mix** اضافه کنید.

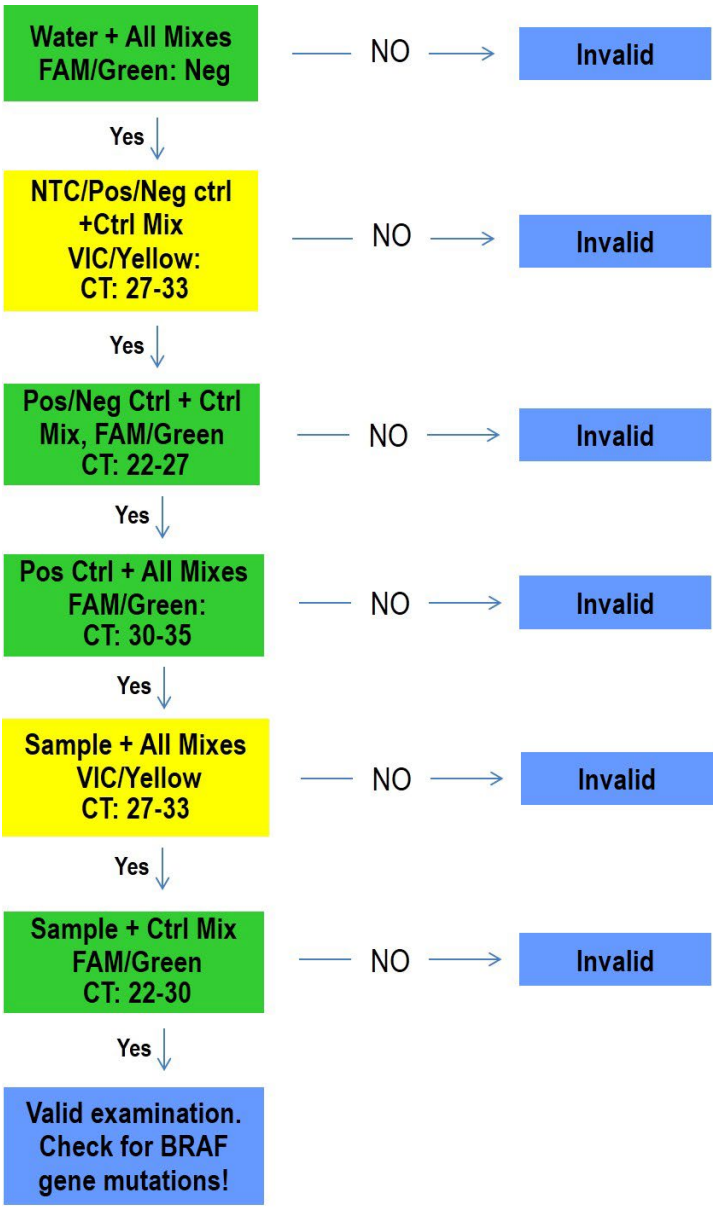
به هر یک از میکروتیوب‌های ردیف ششم ۲۰ میکرولیتر از **V600R Mix** اضافه کنید.

سپس ۵ میکرولیتر از DNA استخراج شده، شاهد یا آب به هر میکروتیوب اضافه کنید. به این منظور ستون اول را برای شاهد مثبت، ستون دوم و سوم را برای شاهد منفی و آب و ستون های بعدی را برای نمونه های بیماران در نظر بگیرید.

درپوش میکروتیوب ها را ببندید، سپس آن ها را مطابق شماره ها داخل دستگاه قرار دهید. دستگاه را مطابق جدول در قسمت "تنظیم دستگاه" تنظیم نمائید.

آنالیز نتایج برای جهش های BRAF: تحلیل نتایج آزمایش جهش های BRAF در دو مرحله انجام می‌شود.

الف – کنترل کیفی آزمایش: ابتدا آزمایش به لحاظ کیفی مطابق نمودار زیر ارزیابی می‌شود. سپس می‌توان نتایج نمونه ی بیمار را تفسیر کرد.


Water + All Mixes
FAM/Green: Neg
NO
Invalid
Yes
NTC/Pos/Neg ctrl
+Ctrl Mix
VIC/Yellow:
CT: 27-33
NO
Invalid
Yes
Pos/Neg Ctrl + Ctrl
Mix, FAM/Green
CT: 22-27
NO
Invalid
Yes
Pos Ctrl + All Mixes
FAM/Green:
CT: 30-35
NO
Invalid
Yes
Sample + All Mixes
VIC/Yellow
CT: 27-33
NO
Invalid
Yes
Sample + Ctrl Mix
FAM/Green
CT: 22-30
NO
Invalid
Yes
Valid examination.
Check for BRAF
gene mutations!

ب- تحلیل نتایج بررسی جهش های BRAF: برای نمونه هایی که CT آنها با میکس اختصاصی در کانال سبز بین ۲۰ تا ۴۰ باشد، با توجه به معادله زیر، میزان ΔCT را محاسبه کرده و نتایج CT و ΔCT را با جدول زیر مقایسه نمایید.

$$\Delta CT = \text{Mutation Mix CT} - \text{Control Mix CT}$$

در صورتی که نمونه در محدوده قابل قبول باشد دارای جهش و مثبت است.

نکته: در صورتی که یک نمونه برای بیش از یک میکس BARF دارای ΔCT قابل قبول باشد، نمونه در واکنشی که کوچک ترین ΔCT را دارد مثبت است و برای سایر جهش ها منفی خواهد بود.

میکس BRAF	CT نمونه	ΔCT نمونه	نتیجه گیری
V600E Mix	>۴۰	-	برای جهش V600E منفی
	۴۰-۲۰	>۷/۳	برای جهش V600E منفی
	۴۰-۲۰	≤۷/۳	برای جهش V600E یا V600K مثبت
V600Ec Mix	>۴۰	-	برای جهش V600Ec منفی
	۴۰-۲۰	>۱۰/۶	برای جهش V600Ec منفی
	۴۰-۲۰	≤۱۰/۶	برای جهش V600Ec مثبت
V600D Mix	>۴۰	-	برای جهش V600D منفی
	۴۰-۲۰	>۹/۶	برای جهش V600D منفی
	۴۰-۲۰	≤۹/۶	برای جهش V600D مثبت
V600K Mix	>۴۰	-	برای جهش V600K منفی
	۴۰-۲۰	>۹	برای جهش V600K منفی
	۴۰-۲۰	≤۹	برای جهش V600K مثبت
V600R Mix	>۴۰	-	برای جهش V600R منفی
	۴۰-۲۰	>۸/۳	برای جهش V600R منفی
	۴۰-۲۰	≤۸/۳	برای جهش V600R مثبت

میزان حساسیت: حساسیت تشخیصی این کیت در صورتی که CT نمونه در کانال سبز با میکس کنترل بین ۲۲ تا ۲۷ باشد بین ۱ تا ۲ درصد می باشد.

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

جهت توضیحات بیشتر در مورد کیت‌های نوین ژن، دریافت فایل کامل دفترچه راهنمای کیت و فایل تمپلیت برای تنظیم دستگاه و آشنایی با نمایندگان فروش، به وبسایت ما به نشانی www.novingene.com مراجعه فرمایید یا QR Code موجود بر روی جعبه کیت را اسکن نمایید. جهت کسب اطلاعات بیشتر با پشتیبانی فنی تماس بگیرید.