راهنمای کیت EGFR RQ

کیت EGFR RQ جهت بررسی ۳۴ نوع جهش سوماتیک در انکوژن EGFR 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.

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

برچسب	محتوا	تعداد	حجم
EGFR Ctrl Mix	میکس PCR برای کنترل کیفی DNA	۲	۴۸۰ میکرولیتر
G719X Mix	میکس PCR برای بررسی جهش G719A، G719C و G719S	۱	۴۸۰ میکرولیتر
19Del Mix	میکس PCR برای بررسی Exon 19 Deletions	۱	۴۸۰ میکرولیتر
20Ins Mix	میکس PCR برای بررسی Exon 20 Insertions	۱	۴۸۰ میکرولیتر
S768I Mix	میکس PCR برای بررسی جهش S768I	۱	۴۸۰ میکرولیتر
T790M Mix	میکس PCR برای بررسی جهش T790M	۱	۴۸۰ میکرولیتر
L858R Mix	میکس PCR برای بررسی جهش L858R	۱	۴۸۰ میکرولیتر
L861Q Mix	میکس PCR برای بررسی جهش L861Q	۱	۴۸۰ میکرولیتر
EGFR Pos	شاهد مثبت	۱	۲۵۰ میکرولیتر
EGFR Neg	شاهد منفی	۱	۲۵۰ میکرولیتر
Water	آب مخصوص PCR	۱	۲۰۰ میکرولیتر

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

روش کار: پیش از بررسی نمونه برای وجود جهش های EGFR، 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 EGFR می‌باشد انجام خواهد شد.
در نظر داشته باشید نمونه استخراج شده باید حاوی ۱۰ الی ۵۰ نانوگرم DNA در هر میکرولیتر باشد.

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 مثبت، شاهد منفی و آب اضافه کنید.

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 می کنید، می توانید 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.

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.

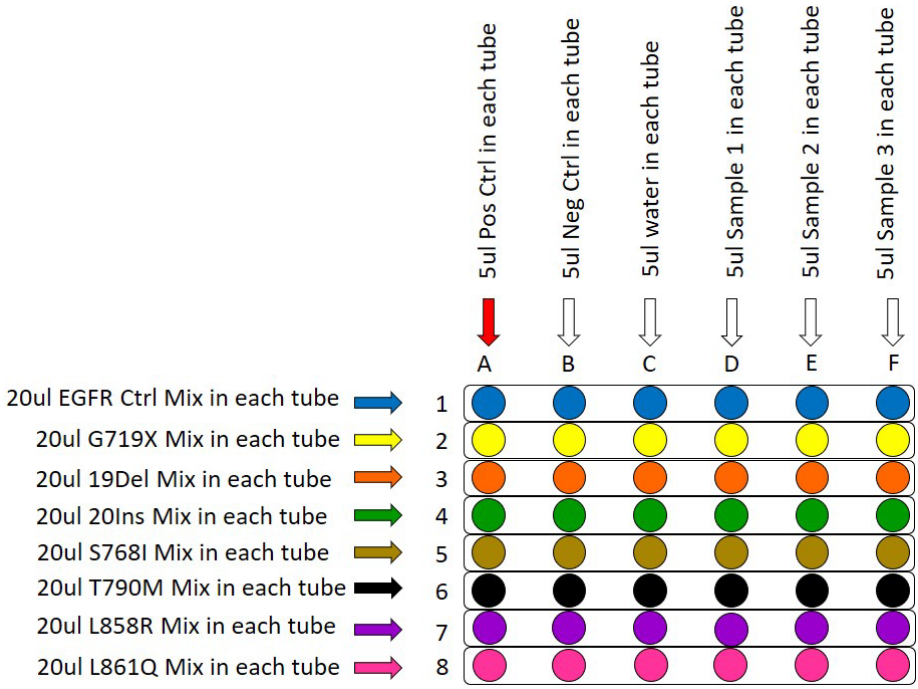
VIC/Yellow	FAM/Green	نمونه
Pos (CT 27-33)	Neg	آب/NTC
Pos (CT 27-33)	Pos (CT 23-28)	شاهد منفی

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: 27-33	Invalid
4	+ CT: 22-30	+ 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 EGFR انجام می شود.

بررسی جهش های EGFR: برای بررسی جهش های EGFR، هر نمونه باید با هشت میکس آزمایش شود. در این آزمایش ۳۴ جهش ژن EGFR با هفت میکس موجود در کیت، هر کدام در یک میکروتیوب جداگانه بررسی می شوند. علاوه بر هفت میکروتیوب مذکور، یک میکروتیوب نیز به بررسی نمونه با میکس کنترل اختصاص می یابد. تصویر زیر نحوه چیدمان برای بررسی سه نمونه بیمار را نشان می دهد.



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

به هر یک از میکروتیوبهای ردیف دوم ۲۰ میکرولیتر از G719X Mix اضافه کنید.

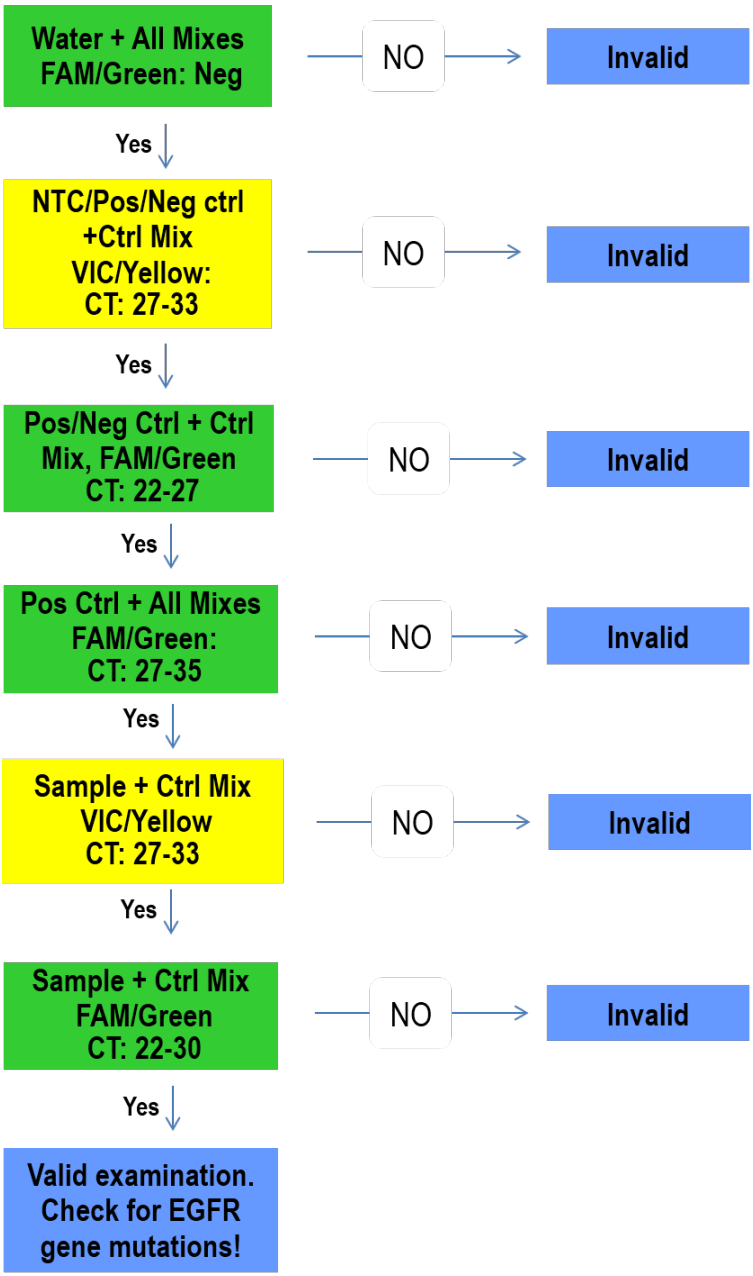
به هر یک از میکروتیوبهای ردیف سوم ۲۰ میکرولیتر از 19Del Mix اضافه کنید.

به هر یک از میکروتیوبهای ردیف چهارم ۲۰ میکرولیتر از 20Ins Mix اضافه کنید.
به هر یک از میکروتیوبهای ردیف پنجم ۲۰ میکرولیتر از S768I Mix اضافه کنید.
به هر یک از میکروتیوبهای ردیف ششم ۲۰ میکرولیتر از T790M Mix اضافه کنید.
به هر یک از میکروتیوبهای ردیف هفتم ۲۰ میکرولیتر از L858R Mix اضافه کنید.
به هر یک از میکروتیوبهای ردیف هشتم ۲۰ میکرولیتر از L861Q Mix اضافه کنید.
سپس ۵ میکرولیتر از شاهد، آب و DNA استخراج شده، 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 EGFR: تحلیل نتایج آزمایش جهش های EGFR 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: 27-35
NO
Invalid
Yes
Sample + Ctrl Mix
VIC/Yellow
CT: 27-33
NO
Invalid
Yes
Sample + Ctrl Mix
FAM/Green
CT: 22-30
NO
Invalid
Yes
Valid examination.
Check for EGFR
gene mutations!

ب- تحلیل نتایج بررسی جهش های EGFR: 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.

میکس EGFR	CT نمونه	ΔCT نمونه	نتیجه گیری
G719X Mix	>۴۰	-	برای جهش های G719A/ G719S/ G719C منفی
	۴۰-۲۰	>۷/۴	برای جهش های G719A/ G719S/ G719C منفی
	۴۰-۲۰	≤۷/۴	برای جهش های G719A/ G719S/ G719C مثبت
19Del Mix	>۴۰	-	برای Exon 19 Deletions منفی
	۴۰-۲۰	>۷/۵	برای Exon 19 Deletions منفی
	۴۰-۲۰	≤۷/۵	برای Exon 19 Deletions مثبت
20Ins Mix	>۴۰	-	برای Exon 20 Insertions منفی
	۴۰-۲۰	>۶/۹	برای Exon 20 Insertions منفی
	۴۰-۲۰	≤۶/۹	برای Exon 20 Insertions مثبت
S768I Mix	>۴۰	-	برای جهش S768I منفی
	۴۰-۲۰	>۱۰/۳	برای جهش S768I منفی
	۴۰-۲۰	≤۱۰/۳	برای جهش S768I مثبت
T790M Mix	>۴۰	-	برای جهش T790M منفی
	۴۰-۲۰	>۸/۲	برای جهش T790M منفی
	۴۰-۲۰	≤۸/۲	برای جهش T790M مثبت
L858R Mix	>۴۰	-	برای جهش L858R منفی

	۴۰-۲۰	>۱۰/۲	برای جهش L858R منفی
	۴۰-۲۰	≤۱۰/۲	برای جهش L858R مثبت
L861Q Mix	>۴۰	-	برای جهش L861Q منفی
	۴۰-۲۰	>۱۰	برای جهش L861Q منفی
	۴۰-۲۰	≤۱۰	برای جهش L861Q مثبت

میزان حساسیت: حساسیت تشخیصی این کیت در صورتی که CT نمونه در کانال سبز با میکس کنترل بین ۲۲ تا ۲۷ باشد، با توجه به نوع جهش بین ۱٪ تا ۸٪ می‌باشد.

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.