

# راهنمای کیت JAK2 MQ

کیت JAK2 MQ جهت تشخیص و محاسبه درصد جهش JAK2 (V617F) در خون محیطی می‌باشد. این کیت به روش Real-Time PCR برای استفاده با دستگاه های RotorGene، StepOne و MIC طراحی شده است. این کیت مخصوص مصارف تحقیقاتی است.

**محتویات کیت:** این کیت شامل یک راهنما و مواد زیر می‌باشد:

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	۱۵۰ میکرولیتر
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

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

**روش استفاده:** 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.

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 می توانید 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 موجود در کیت حاوی ROX می باشند. غلظت نهایی ROX در واکنش 300nM می باشد.

**آنالیز نتایج:** توجه داشته باشید که افزایش تابش سبز (Green) مربوط به MJ و WJ

هر دو می باشد.

همچنین 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.

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

**الف) آنالیز کمی نمونه (محاسبه درصد V617F)**

توجه! نتایج تست تنها در صورتی معتبر می باشد 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 تیتراژ آلل جهش یافته را بر مجموع تیتراژ آلل های سالم و جهش یافته تقسیم و در عدد صد ضرب نمایید.

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

نتایج را مطابق جدول زیر تفسیر و گزارش کنید.

نتیجه	JAK2 V617F%
مثبت برای جهش V617F و محاسبه درصد گزارش شود.	$\geq 1\%$
منفی برای جهش V617F	$\leq 0.1\%$
غیر قابل نتیجه گیری	$0.2\% \leq \text{نمونه} \leq 0.9\%$

محاسبه درصد JAK2 (V617F) برای نمونه های شاهد مثبت و شاهد منفی نیز انجام شود. نتایج مورد انتظار برای شاهد ها مطابق جدول زیر می باشد:

شاهد ها	JAK2 V617F%
شاهد مثبت ۲.۵٪	۴٪ - ۱.۵٪
شاهد منفی	۰.۲٪ ≤

### ب) آنالیز کیفی نمونه:

در صورتیکه از این کیت برای تشخیص کیفی استفاده می کنید، 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  $\Delta CT$  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 می باشد.

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

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 میکس های MJ و WJ با توجه به معادله زیر محاسبه کنید:

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

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


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

نتایج را با توجه به نکات زیر تفسیر کنید:

- در صورتی که  $\Delta\text{CT}$  نمونه از محدوده‌ی نامشخص کمتر باشد نمونه از نظر JAK2 **مثبت** است.
- در صورتی که  $\Delta\text{CT}$  نمونه از Cut-off بیشتر باشد نمونه از نظر JAK2 **منفی** است.
- در صورتی که  $\Delta\text{CT}$  نمونه عددی بین محدوده‌ی نامشخص و Cut-off باشد، نمونه **غیرقابل نتیجه گیری** می‌باشد.

**میزان حساسیت:** حساسیت این کیت معادل ۱/۰٪ 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.

### توضیحات برچسب:

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

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](http://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.



