

راهنمای کیت KRAS RQ

کیت KRAS RQ جهت بررسی جهش در کدون های ۱۲ و ۱۳ ژن KRAS در DNA انسانی با استفاده از دستگاه Rotor-Gene 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 می باشد:

برچسب	محتوا	تعداد	حجم
Ctrl Mix	میکس PCR برای کنترل کیفی تست	۲	۴۸۰ میکرولیتر
G12A Mix	میکس PCR برای بررسی جهش G12A	۱	۴۸۰ میکرولیتر
G12C Mix	میکس PCR برای بررسی جهش G12C	۱	۴۸۰ میکرولیتر
G12D Mix	میکس PCR برای بررسی جهش G12D	۱	۴۸۰ میکرولیتر
G12R Mix	میکس PCR برای بررسی جهش G12R	۱	۴۸۰ میکرولیتر
G12S Mix	میکس PCR برای بررسی جهش G12S	۱	۴۸۰ میکرولیتر
G12V Mix	میکس PCR برای بررسی جهش G12V	۱	۴۸۰ میکرولیتر
G13D Mix	میکس PCR برای بررسی جهش G13D	۱	۴۸۰ میکرولیتر
KRAS Pos	شاهد مثبت	۱	۲۵۰ میکرولیتر
KRAS 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 KRAS ، ابتدا باید از کیفیت DNA استخراج شده از نمونه بیمار اطمینان یافت و در صورتی که نتایج در محدوده مطلوب NG-WI-ASL-33-302-S

باشد آنگاه، آزمایش دوم که بررسی جهش های ژن KRAS می باشد 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 مثبت 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. درپوش میکروتیوب ها را ببندید. سپس آن ها را مطابق شماره ها داخل دستگاه قرار دهید.

تنظیم دستگاه: برای تنظیم دستگاه Rotor-Gene 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 10 min	1
2	95°C x 20 sec	45
	60°C x 60 sec	

اندازه گیری تابش فلورسانس باید در دمای ۶۰ درجه و در کانال های سبز (Green) و زرد (Yellow) تنظیم شود. میکس های کیت حاوی ROX می باشند. غلظت نهایی ROX در واکنش ۳۰۰ nM می باشد.

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

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

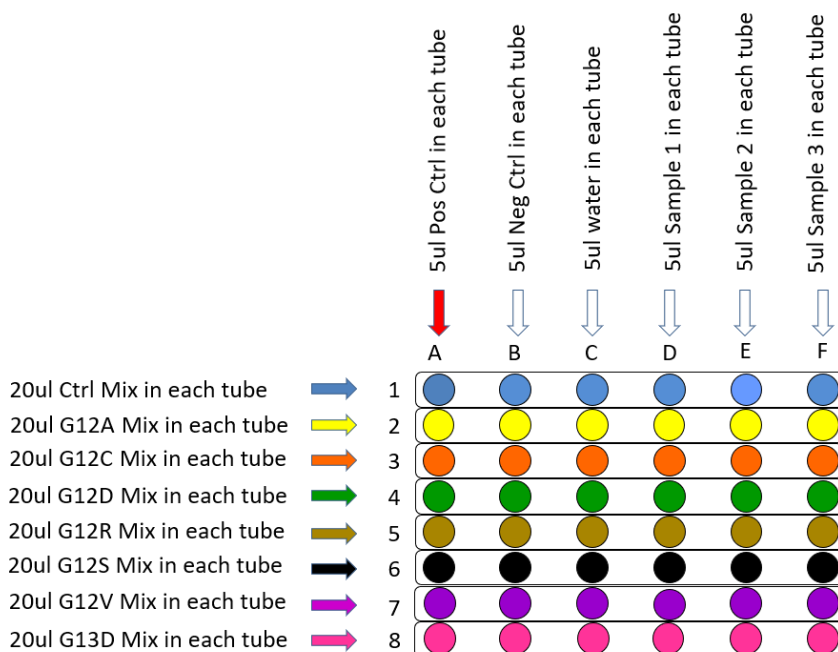
نمونه	کانال سبز	کانال زرد
نمونه فاقد DNA (آب)	Neg	Pos (CT 28-31)
شاهد منفی	Pos (CT 26-29)	Pos (CT 28-31)

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: 28-31	Valid
2	+ CT<22	+ CT: 28-31	Sample dilution
3	+ CT>30	+ CT: 28-31	Invalid
4	+ CT: 22-30	+ CT>31	Invalid

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

بررسی جهش های KRAS: برای بررسی جهش های KRAS، هر نمونه باید با هشت میکس آزمایش شود. در این آزمایش هفت جهش ژن KRAS هر کدام در یک میکروتیوب جداگانه با یکی از میکس های اختصاصی KRAS 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 چهار نمونه بیمار را نشان می دهد.



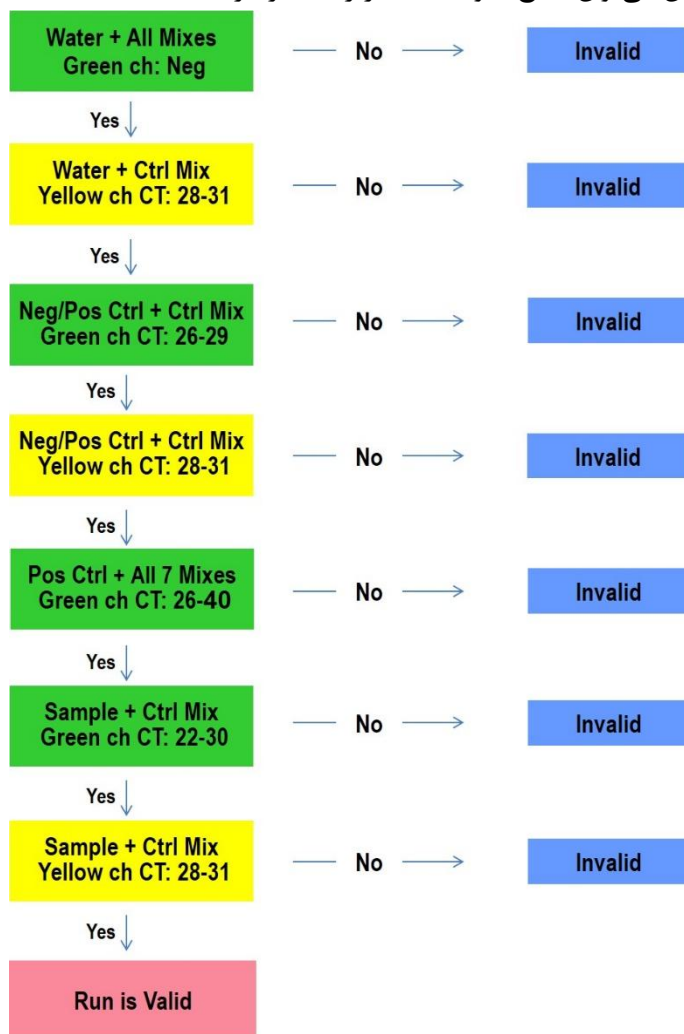
به هر یک از میکروتیوب های ردیف یک تا هشت، ۲۰ میکرولیتر از میکس های زیر به ترتیب ذکر شده اضافه شود.

ردیف اول **Ctrl Mix**، ردیف دوم **G12A Mix**، ردیف سوم **G12C Mix**، ردیف چهارم **G12D Mix**، ردیف پنجم **G12R Mix**، ردیف ششم **G12S Mix**، ردیف هفتم **G12V Mix** و به ردیف هشتم از **G13D Mix** اضافه کنید.

سپس ۵ میکرولیتر از DNA استخراج شده، **شاهد مثبت**، **شاهد منفی** و آب به هر میکروتیوب اضافه کنید. به این منظور سری اول را برای شاهد مثبت، سری دوم شاهد منفی، سری سوم را برای آب و سری 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 نمایید.

آنالیز نتایج برای جهش های **KRAS**: تحلیل نتایج آزمایش جهش های KRAS در دو مرحله انجام می شود.

الف - کنترل کیفی آزمایش: ابتدا آزمایش به لحاظ کیفی مطابق نمودار زیر ارزیابی می شود. سپس می توان نتایج نمونه ی بیمار را تفسیر کرد.



ب- تحلیل نتایج بررسی جهش های **KRAS**: 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 KRAS دارای ΔCT قابل قبول باشد، نمونه در واکنشی که کوچک ترین ΔCT را دارد مثبت است و برای سایر جهش ها منفی خواهد بود.

نتیجه گیری	ΔCT نمونه	CT نمونه	میکس KRAS
برای جهش G12A منفی	-	>۴۰	G12A Mix
برای جهش G12A منفی	>۱۲	۴۰-۲۰	
برای جهش G12A مثبت	≤۱۲	۴۰-۲۰	
برای جهش G12C منفی	-	>۴۰	G12C Mix
برای جهش G12C منفی	>۱۳	۴۰-۲۰	
برای جهش G12C مثبت	≤۱۳	۴۰-۲۰	
برای جهش G12D منفی	-	>۴۰	G12D Mix
برای جهش G12D منفی	>۸	۴۰-۲۰	
برای جهش G12D مثبت	≤۸	۴۰-۲۰	
برای جهش G12R منفی	-	>۴۰	G12R Mix
برای جهش G12R منفی	>۷	۴۰-۲۰	
برای جهش G12R مثبت	≤۷	۴۰-۲۰	
برای جهش G12S منفی	-	>۴۰	G12S Mix
برای جهش G12S منفی	>۸	۴۰-۲۰	
برای جهش G12S مثبت	≤۸	۴۰-۲۰	
برای جهش G12V منفی	-	>۴۰	G12V Mix
برای جهش G12V منفی	>۳	۴۰-۲۰	
برای جهش G12V مثبت	≤۳	۴۰-۲۰	

برای جهش G13D منفی	-	>40	G13D Mix
برای جهش G13D منفی	>6	40-20	
برای جهش G13D مثبت	≤6	40-20	

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 ۴ درصد می باشد.

توضیحات برچسب:

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

جهت توضیحات بیشتر در مورد کیت های 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.

