

# راهنمای کیت WT1 RQ

کیت WT1 RQ جهت ارزیابی کمی بیان ژن WT1 در خون محیطی می‌باشد. این کیت مخصوص استفاده تحقیقاتی است و برای استفاده با دستگاه‌های RotorGene، StepOne و MIC طراحی شده است.

توجه داشته باشید، این کیت فاقد مواد لازم برای استخراج RNA یا تهیه cDNA می‌باشد! **محتویات کیت:** این کیت شامل یک راهنما و مواد زیر می‌باشد:

برچسب	محتوا	حجم
WT1 Mix	میکس آماده برای WT1	۴۸۰ میکرولیتر
ABL Mix	میکس آماده برای ABL	۴۸۰ میکرولیتر
WT1 S1	استاندارد ۱ WT1: صد هزار کپی در میکرولیتر	۱۵۰ میکرولیتر
WT1 S2	استاندارد ۲ WT1: ده هزار کپی در میکرولیتر	۱۵۰ میکرولیتر
WT1 S3	استاندارد ۳ WT1: هزار کپی در میکرولیتر	۱۵۰ میکرولیتر
WT1 S4	استاندارد ۴ WT1: صد کپی در میکرولیتر	۱۵۰ میکرولیتر
WT1 S5	استاندارد ۵ WT1: ده کپی در میکرولیتر	۱۵۰ میکرولیتر
A1	استاندارد ۱ ABL: صد هزار کپی در میکرولیتر	۱۵۰ میکرولیتر
A2	استاندارد ۲ ABL: ده هزار کپی در میکرولیتر	۱۵۰ میکرولیتر
A3	استاندارد ۳ ABL: هزار کپی در میکرولیتر	۱۵۰ میکرولیتر
A4	استاندارد ۴ ABL: صد کپی در میکرولیتر	۱۵۰ میکرولیتر
Water	آب مخصوص PCR	۲۰۰ میکرولیتر

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

**تهیه cDNA:** در حدود یک میکروگرم total RNA برای این تست مورد نیاز می‌باشد که باید با استفاده از Random Hexamers به cDNA تبدیل شود. کیت های متعددی برای

این کار در دسترس می‌باشد. پس از تهیه cDNA آن را با آب، دو و نیم برابر رقیق کنید. یعنی به طور مثال به ۲۰ میکرولیتر cDNA مقدار ۳۰ میکرولیتر آب (آب بدون نوکلئاز یا آب مخصوص PCR) اضافه کنید.

**روش استفاده:** هر نمونه از نظر وجود mRNA برای دو ژن WT1 و ABL باید بررسی شود. به این منظور دو آزمایش PCR در دو سری لوله های جداگانه باید انجام شود. در سری اول برای بررسی WT1 علاوه بر یک لوله برای نمونه هر بیمار، پنج لوله برای استانداردها (WT1 S1-S5) و یک لوله برای شاهد منفی (NTC) در نظر بگیرید. در سری دوم و برای بررسی ABL علاوه بر یک لوله برای نمونه هر بیمار، چهار لوله نیز برای استانداردها (A1-A4) و یک لوله برای شاهد منفی در نظر بگیرید. تعداد مورد نیاز لوله در دو سری جداگانه روی بلوک سرد بگذارید.

به هر لوله سری اول، ۲۰ میکرولیتر از **WT1 Mix** و به هر لوله سری دوم، ۲۰ میکرولیتر از **ABL Mix** اضافه نمایید. سپس ۵ میکرولیتر از **cDNA** نمونه و یا **استاندارد و یا کنترل** به هر لوله اضافه کنید و 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	45
	60°C x 60 sec	

اندازه گیری تابش فلورسانس باید در دمای ۶۰ درجه و برای رنگ های FAM و VIC تنظیم شود. WT1 Mix و ABL 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 **WT1** و افزایش **تابش زرد (Yellow)** حاصل از **ABL** می باشد.

**همچنین نمونه تنها زمانی مثبت در نظر گرفته می شود که دارای منحنی سیگموئیدی و فاز لگاریتمی باشد و تنها در این حالت CT معتبر بوده و قابل استناد و تفسیر می باشد. در غیاب منحنی سیگموئیدی، نمونه منفی محسوب می شود و آن CT (در صورت وجود) فاقد ارزش می باشد.**

بر اساس نکات بالا نتایج به طور خلاصه در جدول زیر نشان داده شده اند:

	Green/FAM	Yellow/VIC	Result
1	+	+	Positive
	(CT 20-40)	(CT 20-30)	
2	-	+	Negative
		(CT 20-27)	
3	-	-	Invalid
4	-	+	Invalid
		(CT>27)	

**نرمالایز کردن WT1:** برای ارزیابی پاسخ درمانی هر بیمار تحت درمان باید میزان WT1 بیمار را محاسبه کنید. مبنای این محاسبه روش NCN می باشد، (D Cilloni, 2002, Leukemia 16:2115). در این روش، نسبت میزان رونویسی WT1 با میزان رونویسی ABL نرمال شده و به ازای ده هزار کپی ABL گزارش می شود. به عبارت دیگر تیترا WT1 را به تیترا ABL تقسیم کرده و در ده هزار ضرب کنید.

**میزان حساسیت:** حساسیت این کیت با استفاده از رقت های متوالی پلاسمید حاوی توالی هدف تعیین شده است و معادل ۲ کپی در میکرولیتر برای WT1 محاسبه گردید. برای دستیابی به این میزان حساسیت نمونه cDNA باید حاوی حداقل ده هزار نسخه از mRNA ژن ABL در هر 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	 -30°C -10°C	شماره سریال	<b>SN</b>	شماره کاتالوگ	<b>REF</b>

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](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.