راهنمای کیت NRAS RQ

کیت NRAS RQ جهت بررسی جهش در کدون های ۱۲، ۱۳، ۵۹ و ۶۱ در ژن NRAS با استفاده از دستگاه Rotor-Gene و StepOne 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
Ctrl Mix	میکس PCR برای کنترل کیفی تست	۲	۴۸۰ میکرولیتر
G12 Mix	میکس PCR برای بررسی جهش G12	۱	۴۸۰ میکرولیتر
G13 Mix	میکس PCR برای بررسی جهش G13	۱	۴۸۰ میکرولیتر
A59D Mix	میکس PCR برای بررسی جهش A59D	۱	۴۸۰ میکرولیتر
Q61H Mix	میکس PCR برای بررسی جهش Q61H	۱	۴۸۰ میکرولیتر
Q61K Mix	میکس PCR برای بررسی جهش Q61K	۱	۴۸۰ میکرولیتر
Q61L Mix	میکس PCR برای بررسی جهش Q61L	۱	۴۸۰ میکرولیتر
Q61R Mix	میکس PCR برای بررسی جهش Q61R	۱	۴۸۰ میکرولیتر
NRAS Pos	شاهد مثبت	۱	۲۵۰ میکرولیتر
NRAS 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 NRAS، 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 NRAS 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 مثبت و نمونه آب در نظر بگیرید.

به هر میکروتیوب، ابتدا ۲۰ میکرولیتر از Ctrl Mix و سپس ۵ میکرولیتر از DNA نمونه، شاهد مثبت 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 Rotor-Gene و StepOne از فایل تمپلیت مخصوص این کیت استفاده کنید. همچنین می‌توانید 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 در کانال های سبز (FAM/Green) و زرد (VIC/Yellow) تنظیم شود. میکس های کیت حاوی ROX می‌باشند. غلظت نهایی ROX در واکنش ۳۰۰ 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 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
شاهد منفی (آب)	Neg	Pos (CT 28-31)
شاهد مثبت	Pos (CT 24-28)	Pos (CT 28-31)

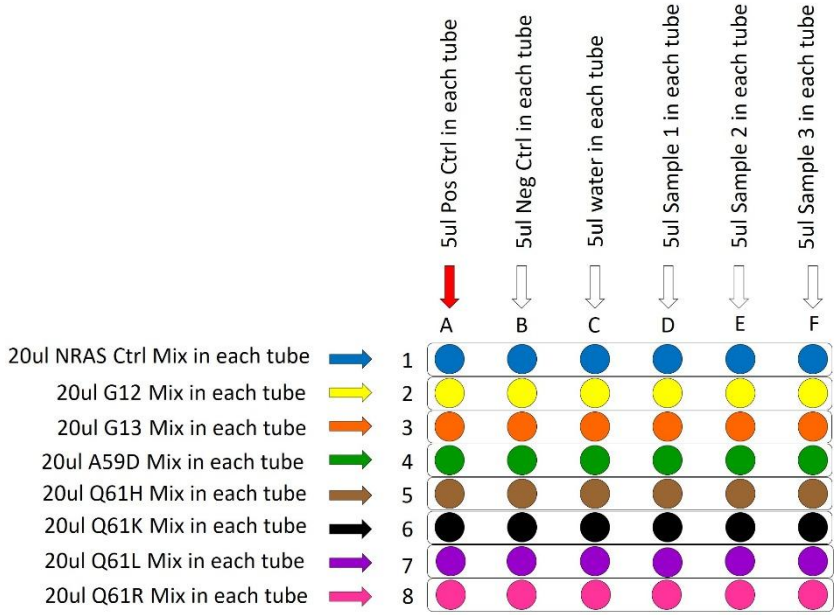
ب- بررسی نمونه بیمار: در صورتی که کیفیت نمونه مورد تایید باشد، آنگاه مطابق جدول زیر، نتایج را تفسیر کنید:

	FAM/Green	VIC/Yellow	Result
1	+ CT: 22-28	+ CT: 27-33	Valid
2	+ CT<22	+ CT: 27-33	Sample dilution
3	+ CT>28	+ CT: 27-33	Invalid
4	+ CT: 22-28	+ 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 NRAS انجام می شود.

بررسی جهش های NRAS: برای بررسی جهش های NRAS، هر نمونه باید با هشت میکس آزمایش شود. در این آزمایش هفت جهش ژن NRAS هر کدام در یک میکروتیوب جداگانه با یکی از میکس های اختصاصی NRAS بررسی می‌شوند. علاوه بر هفت

میکروتیوب مذکور، یک میکروتیوب نیز به بررسی نمونه با میکس کنترل اختصاص می‌یابد. تصویر زیر نحوه چیدمان برای بررسی سه 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.

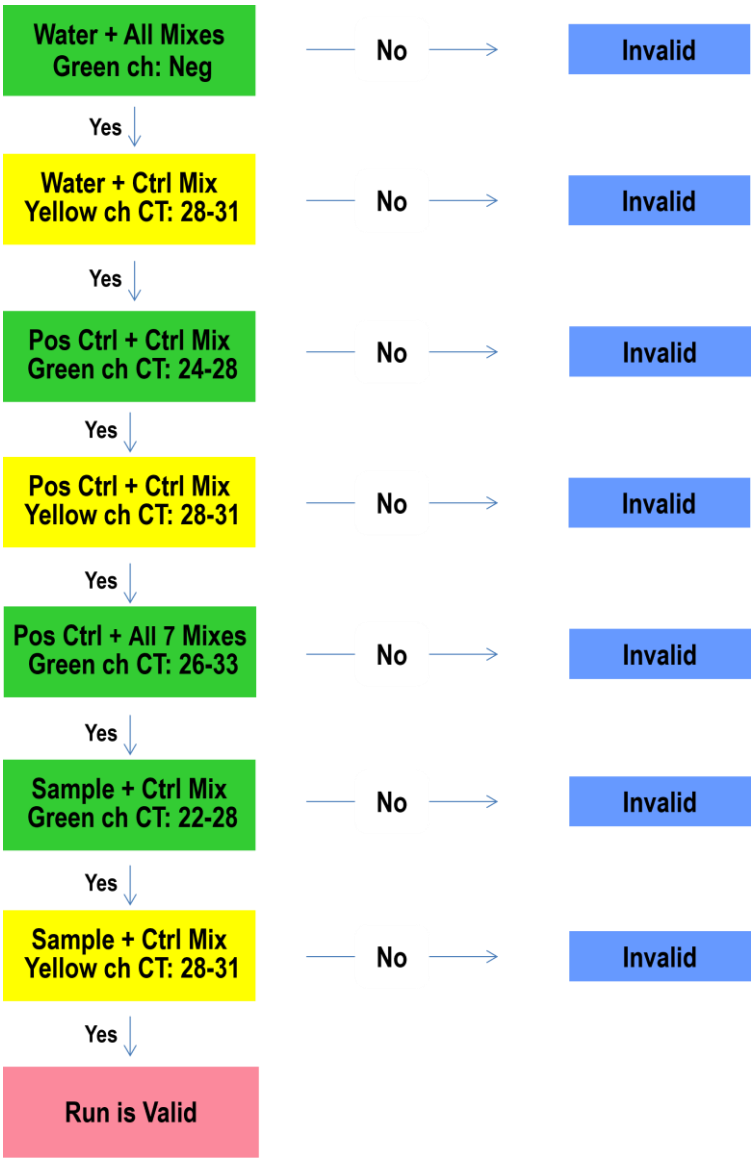
ردیف اول Ctrl Mix، ردیف دوم G12 Mix ، ردیف سوم G13 Mix ، ردیف چهارم A59D Mix ، ردیف پنجم Q61H Mix ، ردیف ششم Q61K Mix ، ردیف هفتم Q61L Mix و به ردیف هشتم ۲۰ میکرولیتر از Q61R Mix اضافه کنید.

سپس ۵ میکرولیتر از DNA استخراج شده، شاهد یا آب به هر میکروتیوب اضافه کنید. به این منظور سری اول را برای شاهد مثبت، سری دوم 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 نمائید.

آنالیز نتایج برای جهش های NRAS: تحلیل نتایج آزمایش جهش های NRAS 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
Green ch: Neg
No
Invalid
Yes
Water + Ctrl Mix
Yellow ch CT: 28-31
No
Invalid
Yes
Pos Ctrl + Ctrl Mix
Green ch CT: 24-28
No
Invalid
Yes
Pos Ctrl + Ctrl Mix
Yellow ch CT: 28-31
No
Invalid
Yes
Pos Ctrl + All 7 Mixes
Green ch CT: 26-33
No
Invalid
Yes
Sample + Ctrl Mix
Green ch CT: 22-28
No
Invalid
Yes
Sample + Ctrl Mix
Yellow ch CT: 28-31
No
Invalid
Yes
Run is Valid

ب- تحلیل نتایج بررسی جهش های NRAS: 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 NRAS 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 NRAS	CT نمونه	ΔCT نمونه در RotorGene	ΔCT نمونه در StepOne	نتیجه گیری
G12 Mix	>۴۰	-	-	برای جهش G12 منفی
	۴۰-۲۰	>۷/۴	>۷/۴	برای جهش G12 منفی
	۴۰-۲۰	≤۷/۴	≤۷/۴	برای جهش G12 مثبت
G13 Mix	>۴۰	-		برای جهش G13 منفی
	۴۰-۲۰	>۱۱/۲	>۱۱/۸	برای جهش G13 منفی
	۴۰-۲۰	≤۱۱/۲	≤۱۱/۸	برای جهش G13 مثبت
A59D Mix	>۴۰	-	-	برای جهش A59D منفی
	۴۰-۲۰	>۸/۴	>۹/۷	برای جهش A59D منفی
	۴۰-۲۰	≤۸/۴	≤۹/۷	برای جهش A59D مثبت
Q61H Mix	>۴۰	-	-	برای جهش Q61H منفی
	۴۰-۲۰	>۸	>۱۰/۲	برای جهش Q61H منفی
	۴۰-۲۰	≤۸	≤۱۰/۲	برای جهش Q61H مثبت
Q61K Mix	>۴۰	-	-	برای جهش Q61K منفی
	۴۰-۲۰	>۹/۶	>۱۰/۹	برای جهش Q61K منفی
	۴۰-۲۰	≤۹/۶	≤۱۰/۹	برای جهش Q61K مثبت

Q61L Mix	>۴۰	-	-	برای جهش Q61L منفی
	۴۰-۲۰	>۱۲/۴	>۱۲/۸	برای جهش Q61L منفی
	۴۰-۲۰	≤۱۲/۴	≤۱۲/۸	برای جهش Q61L مثبت
Q61R Mix	>۴۰	-	-	برای جهش Q61R منفی
	۴۰-۲۰	>۱۲/۴	>۱۲/۸	برای جهش Q61R منفی
	۴۰-۲۰	≤۱۲/۴	≤۱۲/۸	برای جهش Q61R مثبت

میزان حساسیت: حساسیت تشخیصی این کیت در صورتی که CT نمونه در کانال سبز با میکس کنترل بین ۲۲ تا ۲۷ باشد، بین ۰/۵ تا ۱/۲ درصد می باشد. (جهت اطلاعات بیشتر لطفا به دفترچه راهنمای کامل رجوع نمایید).

برای توضیحات بیشتر و کسب اطلاع در مورد کیت های جدید نوین ژن، دریافت فایل کامل دفترچه راهنمای کیت و فایل تمپلیت برای تنظیم دستگاه به وبسایت ما به نشانی www.novingene.com مراجعه فرمایید یا با پشتیبانی تماس بگیرید. همچنین از طریق این وب سایت می‌توانید با نمایندگی های فروش ما آشنا شوید.