



Instruction for Use

JAK2 Mutation Detection PCR Kit

با روش

Real-Time PCR

Cat-No: BONJAK- 24



Doc. #: IFU-JAK2-01 Doc. Version: 06 Revision Date: 1403-12-14

۲.....	شماره رفرانس
۳.....	شرح کیت
۳.....	اصول
۶.....	اطلاعات جهش
۶.....	محتویات کیت
۶.....	نگهداری و انتقال کیت
۷.....	نکات احتیاط عمومی
۹.....	هشدارها و محدودیت‌ها
۱۰.....	عوامل تداخلی
۱۰.....	آماده سازی
۱۱.....	برنامه دمایی
۱۲.....	تعریف طیف سنجش فلورسنت در دستگاه‌ها
۱۴.....	آنالیز نتایج Rotor-Gene
۱۵.....	جدول تفسیر نتایج
۱۵.....	میزان حساسیت (Analytical sensitivity)
۱۵.....	پشتیبان فنی
۱۶.....	نشانه‌ها
۱۶.....	اطلاعات تماس

این کیت بر اساس واکنش زنجیره‌ای پلیمراز (PCR) به صورت Real-Time ساخته شده است. این محصول برای تشخیص جهش JAK2 در شرایط آزمایشگاهی تهیه شده است. نتایج تشخیصی به دست آمده توسط این محصول باید همراه با سایر داده‌های بالینی یا آزمایشگاهی تفسیر شوند.

اصول

تشخیص پلی مورفیسم توسط واکنش زنجیره‌ای پلیمراز (PCR) بر اساس تکثیر ناحیه JAK-2 انجام می‌گیرد. در واکنش Real-Time PCR محصولات تکثیر شده از طریق فلورسنت شناسایی می‌شوند. مشاهده شدت فلورسنت در حین واکنش PCR (به صورت Real-Time) تشخیص محصولات در حال تکثیر را بدون نیاز به باز کردن مجدد لوله‌های واکنش پس از اجرای PCR ممکن می‌سازد.

به طور معمول، تشخیص MPN ها بر اساس معیارهای بالینی، بیولوژیکی، بافت شناسی مغز استخوان و سیتوژنتیک بود. کشف یک نشانگر مولکولی خاص بیماری هم به ساده سازی فرآیند تشخیصی و هم افزایش دقت تشخیصی منجر میشود.

تشخیص جهش JAK2 V617F بخشی از دستورالعمل WHO 2016 برای طبقه بندی نئوپلاسم های میلوئیدی و لوسمی حاد است (جدول ۱). وجود جهش JAK2V617F یا جهش اگزون ۱۲ JAK2 یکی از معیارهای اصلی تشخیصی است (برای جزئیات به جدول ۱ مراجعه کنید).

Table 1. WHO 2016 criteria for the diagnosis of PV (6)

Criteria for a diagnosis of Polycythemia Vera (PV)	
Major	1. Hemoglobin (Hgb) >16.5 g/dl in men, hemoglobin >16.0 g/dl in women or, hematocrit >49% in men, hematocrit >48% in women or, increased red cell mass (RCM)*. 2. Bone marrow (BM) biopsy showing hypercellularity for age with trilineage growth (panmyelosis) including prominent erythroid, granulocytic and megakaryocytic proliferation with pleomorphic, mature megakaryocytes (differences in size). 3. Presence of JAK2V617F or JAK2 exon 12 mutation.
Minor	1. Subnormal serum erythropoietin level. Diagnosis of PV requires meeting either all three major criteria, or the first two major criteria and the minor criterion[†].

* More than 25% above mean normal predicted value.

[†] Criterion number two (BM biopsy) may not be required in cases with sustained absolute erythrocytosis: hemoglobin levels >18.5 g/dl in men (hematocrit, 55.5%) or >16.5 g/dl in women (hematocrit, 49.5%), if major criterion number three and the minor criterion are present. However, initial myelofibrosis (present in up to 20% of patients) can only be detected by performing a BM biopsy; this finding may predict a more rapid progression to overt myelofibrosis (post-PV MF).

Table 2. WHO 2016 criteria for the diagnosis of ET (6)

Criteria for a diagnosis of Essential Thrombocythemia (ET)	
Major	1. Platelet count $\geq 450 \times 10^9/L$. 2. BM biopsy showing proliferation mainly of the megakaryocyte lineage with increased numbers of enlarged, mature megakaryocytes with hyperlobulated nuclei. No significant increase or left shift in neutrophil granulopoiesis or erythropoiesis and very rarely minor (grade 1) increase in reticulin fibers. 3. Not meeting WHO criteria for BCR-ABL1+ CML, PV, PMF, myelodysplastic syndromes, or other myeloid neoplasms. 4. Presence of JAK2, CALR or MPL mutation.
Minor	1. Presence of a clonal marker or absence of evidence for reactive thrombocytosis. Diagnosis of ET requires meeting all four major criteria or the first three major criteria and the minor criterion.

Table 3. WHO 2016 criteria for the diagnosis of PMF (6)

Criteria for a diagnosis of Primary Myelofibrosis (PMF)	
Major	1. Presence of megakaryocytic proliferation and atypia, accompanied by either reticulin and/or collagen fibrosis grades 2 or 3.* 2. Not meeting WHO criteria for ET, PV, BCR-ABL1+ CML, myelodysplastic syndromes or other myeloid neoplasm. 3. Presence of JAK2, CALR or MPL mutation or in absence of these mutations, presence of another clonal marker,[†] or absence of reactive myelofibrosis.[‡]
Minor	Presence of at least one of the following, confirmed in two consecutive determinations: 1. Anemia not attributed to a comorbid condition. 2. Leukocytosis $\geq 11 \times 10^9/L$. 3. Palpable splenomegaly. 4. LDH increased to above upper normal limit of institutional reference range. 5. Leukoerythroblastosis. Diagnosis of PMF requires meeting all three major criteria, and at least one minor criterion.

* See reference 6.

[†] In the absence of any of the three major clonal mutations, the search for the most frequent accompanying mutations (e.g., ASXL1, EZH2, TET2, IDH1/2, SRSF2, SF3B1) helps determine the clonal nature of the disease.

[‡] BM fibrosis secondary to infection, autoimmune disorder or other chronic inflammatory conditions, hairy cell leukemia or other lymphoid neoplasm, metastatic malignancy or toxic (chronic) myelopathies.

ژن JAK2 کد کننده‌ی یک پروتئین تیروزین کیناز می‌باشد که در تحریک رشد و تقسیم سلولی نقش دارد. این نقش به‌طور ویژه‌ای در کنترل تولید سلول‌های خونی در مغز استخوان مشاهده می‌شود. جهش در ژن JAK2 می‌تواند منجر به انواعی از نئوپلازی‌های میلوپرولیفراتیو (MPN) شود که شامل ترومبوسیتوز اولیه (ET)، پلی‌سیتمی ورا (PV) و میلوفیبروزیس اولیه (PMF) می‌باشد. جهش JAK2 V617F در اگزون ۱۴ شایع‌ترین جهش در نئوپلاسم‌های میلوپرولیفراتیو مزمن (MPNs) است. حذف کل اگزون ۱۴ به‌ندرت تشخیص داده می‌شود. بنابراین، تشخیص مولکولی این جهش، برای تشخیص انواعی از بیماری‌های MPN می‌تواند استفاده شود. به‌علاوه، اثربخشی درمان دارویی و مهار JAK2 نیز با انجام این تست می‌تواند بررسی گردد.

محتویات کیت

Title	24 Tests
JAK2 Master mix	360 µl/tube × 1
Positive Control (0.1%)	60 µl/tube × 1

جدول ۴. محتویات کیت

نگهداری و انتقال کیت

- ✓ کلیه محتویات این کیت باید در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد و در تاریکی نگهداری، همچنین به‌منظور انتقال و جابه‌جایی کیت از یونولیت با درب و یخ خشک استفاده نمایید.
- ✓ نگهداری کیت در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد هیچ‌گاه نباید بیشتر از یک‌ساعت شود.
- ✓ این کیت نیاز به حمل بر روی بسته‌های یخ‌زده (Frozen Ice Pack) را دارد.
- ✓ همه مواد موجود در کیت تا تاریخ انقضا، همان‌طور که روی برچسب بسته‌بندی محصول مشخص شده است، در شرایط مشخص شده پایدار هستند.

- ✓ از چرخه‌های متعدد ذوب و انجماد (Freeze-Thaw) خودداری کنید زیرا سبب کاهش حساسیت و در نتیجه عدم کارایی کیت می‌شود.
 - ✓ از قرار دادن مستقیم اجزای کیت در معرض نور، گرما یا رطوبت خودداری کنید.
 - ✓ معرف‌ها را قبل از استفاده در دمای اتاق (۱۵ تا ۲۵ درجه سانتی‌گراد) ذوب کنید. پس از ذوب شدن مواد موجود در کیت، لوله‌ها را به‌طور مختصر سانتریفیوژ کنید تا مطمئن شوید که مواد موجود در کیت به‌طور یکنواخت مخلوط شده‌اند.
- مواد و تجهیزات موردنیاز که باید توسط کاربر تدارک دیده شود:

۱. کیت استخراج DNA
۲. سمپلر قابل تنظیم در اندازه‌های مختلف و نوک سمپلر فیلتر دار
۳. سانتریفیوژ رومیزی
۴. بلوک خنک‌کننده
۵. وایتکس ۱۰ درصد
۶. گان و دستکش
۷. دستگاه Rotor-Gene, MIC یا دستگاه‌های دیگر با ۲ کانال فلوروسنت رنگ Green و Yellow و یا انتخاب فلورفورهای FAM و HEX
۸. نرم‌افزار دستگاه مورد استفاده
۹. استریپ و کپ مناسب دستگاه مورد استفاده

نکات احتیاط عمومی

۱. لطفاً دستورالعمل را با دقت بخوانید و قبل از استفاده محصول با تمام اجزای کیت آشنا شوید و در حین کار دستورالعمل را دقیقاً دنبال کنید.
۲. لطفاً قبل از استفاده، ابزارهای Real-Time PCR سازگار را بررسی کنید و فرآیند را با آن‌ها جلو ببرید.
۳. از کیت یا اجزای کیت پس از تاریخ انقضا استفاده نکنید.
۴. در کیت آزمایش از ماده دیگری استفاده نکنید.
۵. از سرمپلرهای فیلتر دار و RNase & DNase free استفاده نمایید.

۶. نگهداری و تخلیص نمونه‌های گرفته‌شده از مریض و محصولات حاصل از PCR باید در محلی کاملاً جدا از محل نگهداری و آماده‌سازی Master Mix صورت پذیرد.
۷. همه مواد موردنیاز کیت قبل از شروع کار باید به‌طور کامل در دمای اتاق ذوب شود.
۸. بعد از ذوب شدن، کلیه مواد را به‌خوبی پیپتاژ نمایید و به‌طور مختصر اسپین کنید. این امر برای جلوگیری از کاهش عملکرد کیت در طی زمان به‌طور کامل توصیه می‌شود.
۹. تمام مراحل مربوط به تهیه Master Mix باید بر روی یخ یا جعبه‌های سرد (Cooling Box) انجام شود. استوک اصلی مربوط به Master Mix بعد از برداشتن مقدار موردنیاز از آن باید به‌سرعت به فریزر منتقل شود.
۱۰. هنگام کار با مواد شیمیائی، همیشه روپوش مناسب آزمایشگاهی، دستکش یک‌بارمصرف و عینک‌های محافظ داشته باشید.
۱۱. کیت حاوی کنترل مثبت است. برای جلوگیری از آلودگی که ممکن است باعث ایجاد مثبت کاذب شود، کنترل مثبت را از سایر مواد موجود در کیت کاملاً جدا کنید.
۱۲. PCR بسیار حساس به آلودگی متقابل است، پس فرآیند کار را با دقت انجام دهید.
۱۳. هنگام کار با نمونه‌ها و مواد موجود در کیت، برای جلوگیری از آلودگی، دستکش‌ها باید مرتباً تعویض شوند.
۱۴. از تیپ‌های جداگانه و اختصاصی استفاده کنید. هنگام کار با نمونه‌ها و مواد موجود در کیت از میکرو تیپ‌های فیلتر دار برای جلوگیری از ورود آلودگی RNA و DNA استفاده کنید.
۱۵. لطفاً لوله‌های PCR را با دو دستکش یک‌بارمصرف بسته‌بندی کرده و به‌درستی دور بیندازید. لوله‌های PCR را پس از اмпیلی فای باز نکنید.
۱۶. از مواد یک‌بارمصرف، بیش از یک‌بار استفاده نکنید.
۱۷. مواد موجود در کیت که بلااستفاده هستند، کیت استفاده‌شده و زباله‌ها باید به‌درستی دور انداخته شوند.
۱۸. پس از آزمایش، محل کار را پاک کنید، پیپت‌ها و تجهیزات را با اتانول ۷۵٪ و وایتکس ۱۰٪ اسپری کنید.

هشدارها و محدودیت‌ها

۱. تمامی مراحل آزمایش باید بر اساس اصول GLP^۱ توسط کارکنان آموزش‌دیده دارای پوشش حرفه‌ای و محافظ^۲ (PPE) انجام شود. آزمایش‌های بالینی بر نمونه‌های عفونی باید در هود کلاس دو (Class II Biological Safety Cabinet) در محیط BSL-2 انجام شود.
۲. پیشنهاد می‌شود هود و یا استیشن مورد استفاده قبل و بعد از کار با وایتکس ۱۰ درصد تمیز شود و همین‌طور بعد از کار لامپ UV زده شود.
۳. پیشنهاد می‌شود ۳ مکان مجزا برای استخراج DNA، آماده‌سازی مخلوط واکنش و اضافه کردن نمونه و نمونه استاندارد در نظر گرفته شود تا از ایجاد نتایج مثبت کاذب جلوگیری شود.
۴. پس از آماده‌سازی مخلوط واکنش، آن را در تاریکی نگهداری نمایید.

کنترل‌ها

۱. نمونه بیمار: از محتویات اسید نوکلئیک DNA حاصل از استخراج نمونه استفاده شود.
۲. کنترل منفی (NTC): همواره یک نمونه کنترل منفی حاوی آب بجای نمونه استفاده شود.
۳. کنترل مثبت 0.1% (PTC): از کنترل مثبت کیت به جای نمونه در یک واکنش استفاده شود.

نگهداری نمونه‌های گرفته‌شده

نمونه می‌تواند کمتر از ۸ ساعت در یخچال با محدوده دما از ۲ تا ۸ درجه سانتی‌گراد و برای نگهداری طولانی‌مدت آن، باید در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد منجمد شده و نگهداری شود.

تاریخ انقضای کیت

تاریخ انقضای کیت بر روی جعبه محصول درج شده است.

^۱ Good Laboratory Practice

^۲ Personal Protective Equipment

عوامل تداخلی

حضور EDTA (0.5M)، HCl (1N)، دانه‌های سیلیس (1μl)، خون (1μl)، اوره (۴۰ گرم در ۱۰۰ میلی‌لیتر) و بافر لیز موجب مهار واکنش PCR می‌شود. وجود مهارکننده در واکنش با ژن کنترل داخلی قابل‌ردیابی است.

خالص‌سازی نوکلئیک اسید

جداسازی اسیدنوکلئیک باید توسط کیت‌های جداسازی و استخراج DNA موجود در بازار مطابق پروتکل‌های جداسازی مواد بالینی خاص انجام شود. نمونه مناسب برای این کیت، خون محیطی می‌باشد که در لوله استریل حاوی ماده ضد انعقاد (EDTA یا سترات) جمع‌آوری شده باشد. اگرچه هپارین یکی از پرکاربردترین مواد ضد انعقاد می‌باشد به هیچ‌عنوان نباید برای نمونه‌های خونی که برای آنالیز توسط این کیت مورد استفاده قرار می‌گیرد به کار رود. خون کامل را می‌توان تا ۷۲ ساعت در ۴ درجه نگهداری و سپس به آزمایشگاه منتقل نمود. کیت استخراج DNA در این کیت گنجانده نشده است.

کنترل داخلی

برای ارزیابی کیفیت استخراج DNA و احتمال مهار PCR و جلوگیری از نتایج منفی کاذب، میکس حاوی پرایمرها و پروب یک ژن انسانی نیز می‌باشد. کنترل داخلی باید در کانال زرد در Ct بین ۲۲ تا ۲۵ برای Gene-Rotor دیتکت شود.

آماده‌سازی

۱. ابتدا لوله‌ها را روی رک یخ بگذارید تا محتویات آن‌ها ذوب شوند و محتویات لوله‌ها را به آرامی پیپتاژ و یا ورتکس کنید و به‌طور مختصر سانتریفیوژ کنید.
۲. مقدار ۱۵ میکرو لیتر از MasterMix را به لوله‌های PCR اضافه کنید.

۳. پس از انتقال مستر میکس ها به تیوب های واکنش، ابتدا نمونه کنترل منفی (NTC) را آماده کنید. برای این کار، ۵ میکرو لیتر از آب بدون نوکلئاز را به تیوب کنترل منفی اضافه نمایید و درب آن را ببندید. سپس لوله ها را به منطقه کار با اسید نوکلئیک انتقال دهید، ۵ میکرو لیتر از کنترل مثبت و ۵ میکرو لیتر از نمونه های بیمار را به تیوب های مربوطه اضافه نمایید. در حین تهیه PCR لازم است همه اجزا در دمای ۲ تا ۸ درجه سانتی گراد نگهداری شوند (جدول ۵).

Reaction Setup	Volume
Master Mix	15 μ l
Sample or Control	5 μ l
Final Volume	20 μ l

جدول شماره ۵. آماده سازی اجزای واکنش

۴. لوله ها را ببندید، مختصراً سانتریفیوژ کنید، آن ها را داخل دستگاه قرار دهید و اجازه دهید مطابق مشخصات برنامه قید شده در جدول شماره ۶ تکثیر شوند. هنگام استفاده از کنترل مثبت یا مواد بالینی بسیار مراقب باشید.

- نکته: در هر بار انجام تست یک لوله به عنوان No Template Control باید گذاشته شود. در NTC به جای نمونه استخراج شده از آب استفاده می شود که برای کنترل آلودگی واکنش کاربرد دارد.
- بهتر است از فضاهای جداگانه برای اضافه کردن مستر واکنش و نمونه های بیمار استفاده کرد و همچنین در نظر داشته باشید که در ویال کنترل مثبت را تنها در محل آماده سازی نمونه و فضای آلوده باز نمایید.

برنامه دمایی

دستورالعمل برای دستگاه های Real-Time PCR دارای کانال Green (FAM) و Yellow (HEX) توصیف شده است. پس از تنظیم کردن دستگاه مطابق برنامه زیر (جدول شماره ۶)، واکنش را راه اندازی کنید. برای آگاهی از نحوه تعریف کانال در دستگاه Rotor Gene به کاتالوگ دستگاه

مراجعه کنید. در صورت استفاده از دستگاه ABI StepOne گزینه رنگ رفرنس داخلی (PassiveReference) را حذف کنید. مقادیر دمایی هر قسمت در جدول شماره ۶ آورده شده است.

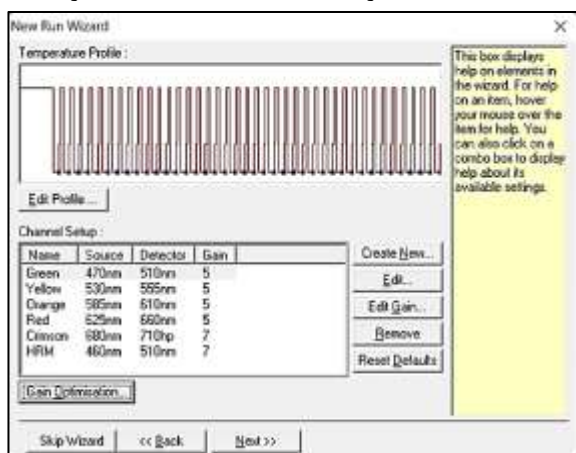
	Temperature	Hold	Cycle
Pre-Denaturation	95 °C	4 min	1
Denaturation	95 °C	15 sec	45
Annealing and Acquisition on Channel Green (FAM) and Yellow (HEX)	60°C	30 sec	
Extention	72°C	20 sec	

جدول شماره ۶. برنامه دمایی دستگاه

تعریف طیف سنجش فلورسنت در دستگاه‌ها

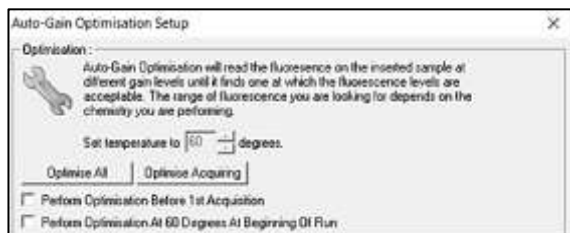
دستگاه Rotor-Gene

بدین منظور در دستگاه Rotor-gene گزینه‌ی Gain Optimization را انتخاب کنید (شکل ۱).



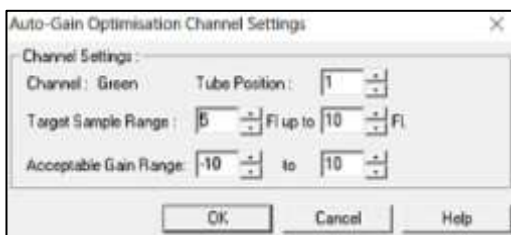
شکل ۱. تنظیمات دستگاه Rotor-Gene برای Gain Optimization

در این صفحه با انتخاب گزینه‌ی Optimise Acquiring برای هر ۲ کانال سبز و زرد بازه‌ی Target sample range از ۵ تا ۱۰ (حالت پیش‌فرض دستگاه) انتخاب شود (شکل ۲).



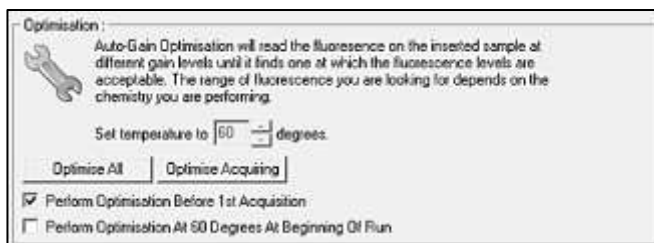
شکل ۲. تنظیمات دستگاه Rotor-Gene برای Auto Gain Optimization

همچنین Gain دستگاه باید بر مبنای تیوب اول که حاوی مسترمیکس کیت به همراه Positive Control (0.1%) کیت است، انجام شود (شکل ۳).



شکل ۳. تنظیمات دستگاه Rotor-Gene برای Auto Gain Optimization

پس از انتخاب بازه‌ی مناسب برای هر کانال، گزینه‌ی Perform Optimization Before 1st Acquisition را انتخاب کرده، و پنجره را ببندید (شکل ۴).



شکل ۴. تنظیمات دستگاه Rotor-Gene برای Auto Gain Optimization

آنالیز نتایج Rotor-Gene

آنالیز نتایج توسط نرم افزار مربوطه و بر اساس دستورالعمل دستگاه انجام شود. در کانال رنگی سبز و زرد، آستانه را روی گزینه‌ی 0.02 قرار دهید.

چنانچه نمونه در کانال **Green (FAM)** و **Yellow (HEX)** دارای منحنی سیگموئیدی و فاز لگاریتمی باشد، آنالیز نتایج بر اساس محاسبه‌ی اختلاف Ct بین دو نتایج کانال سبز و زرد انجام می‌شود.

۱. ابتدا ΔCt را برای کنترل مثبت 0.1% و همچنین نمونه بیمار محاسبه نمایید. برای این منظور، Ct به‌دست‌آمده برای هر نمونه را در کانال زرد از Ct به‌دست‌آمده در کانال سبز کسر نمایید.

$$\Delta Ct = Ct \text{ Green Channel} - Ct \text{ Yellow Channel}$$

در صورتی که شاهد منفی در کانال سبز دارای Ct بالاتر از ۴۰ باشد یا تا پایان تست منفی بماند، Ct آن را معادل ۴۵ در نظر بگیرید.

با توجه به توضیحات فوق، آنالیز را به‌صورت زیر انجام دهید:

✓ در صورتی که ΔCt نمونه از ΔCt کنترل مثبت 0.1%، کمتر باشد نمونه از نظر جهش V617F مثبت است.

✓ در صورتی که ΔCt نمونه از ΔCt کنترل مثبت 0.1%، بیشتر باشد نمونه از نظر جهش V617F منفی است.

2. چنانچه نمونه فقط در کانال Yellow (HEX) دارای منحنی سیگموئیدی و فاز لگاریتمی باشد، نمونه دارای جهش JAK2 نمی‌باشد.

جدول تفسیر نتایج

ΔCt ($Ct_1 - Ct_2$)	Result
$\Delta Ct \text{ Sample} < \Delta Ct \text{ 0.1\% Pos Ctrl}$	JAK-2 Positive
$\Delta Ct \text{ Sample} > \Delta Ct \text{ 0.1\% Pos Ctrl}$	JAK-2 Negative

جدول شماره ۷. تفسیر نتایج

میزان حساسیت (Analytical sensitivity)

حساسیت تشخیصی این کیت معادل 0/1% است. به عبارت دیگر، اگر از هزار گلبول سفید خون تنها یکی دارای این جهش باشد، با احتمال بیشتر از 95% توسط این کیت با نمونه استخراج شده حاوی ۱۰ تا ۵۰ نانوگرم DNA در هر میکرو لیتر، تشخیص داده خواهد شد.

پشتیبان فنی

برای پشتیبانی فنی لطفاً با تلفن‌های شرکت تماس حاصل فرمایید.

✓ ۰۹۹۳۶۶۹۳۹۴۱ (آقای قره داغی)

	Research Use Only	برای مصارف پژوهشی
	Catalog Number	کد کالا
	Batch Number	شماره بچ تولیدشده
	Temprature Limitation	محدودیت دمایی
	Concult Instructon For Use	مطالعه دستورالعمل
	Content sufficent for <n> tets	تعداد تست
	Use by	تاریخ انقضا
	Manufacturer	آدرس

اطلاعات تماس

شرکت فناوری بن یاخته- گروه سین مورو

دفتر مرکزی : تهران، سعادت آباد، میدان فرهنگ، بلوار ۲۴ متری سعادت آباد، خیابان
حیدر نیا (دوم شرقی)، پلاک ۹ ، شرکت فناوری بن یاخته

کد پستی : ۱۹۹۷۷۷۵۵۵۵ تلفن تماس : ۰۲۱۲۲۰۸۲۱۲۰

Web Site: www.Senmurv.co

Email: info@senmurv.ir