Delta JAK2 (V617F Mutation) Real-time PCR Kit

دستورالعمل کیت تشخیص جهش V617F
در ژن JAK2 بر اساس ریل تایم پی‌سی‌آر

REF DD070-001-24

24 tests

DELTA BIOTECHNOLOGY
دلسا تشخیص آریا (دلتا)

۱) مقدمه

برخی از سایتوکاین‌ها و فاکتورهای رشد از طریق مسیر سیگنالینگ JAK-STAT باعث تنظیم تکثیر سلولی، تمایز، آپپتوزیس و پاسخ‌های ایمنی می‌شوند. آنزیم JAK2 یکی از اعضای خانواده‌ی تیروزین کینازهای فاقد رسپتور است که برخی از موتاسیون (جهش) ها در ژن کد کننده‌ی آن می‌تواند باعث فعال شدن مسیر سیگنالینگ JAK-STAT و در نتیجه تکثیر کنترل نشده‌ی سلول‌های پیش‌ساز خونی در مغز استخوان شود. یک جهش در نوکلئوتید شماره‌ی ۱۸۴۹ ORF ژن *JAK2* به نام G1849T باعث تبدیل آمینو اسید والین شماره ۶۱۷ به فنیل‌الانین شده (V617F) که می‌تواند با اختلالات میلوپرولیفراتیو (Myeloproliferative disorders, MPD) همبستگی معناداری داشته باشد. بعنوان مثال جهش V617F در ۹۰ درصد موارد مبتلا به پلی‌سایتمیا ورا (Polycythemia vera, PV)، ۵۰ درصد موارد مبتلا به ترومبوسایتمیا ضروری (Essential thrombocythemia, ET) و ۵۰ درصد مبتلایان به میلوفیبروزیس اولیه (Primitive myelofibrosis, PMF) مشاهده شده است. بنابراین، جهش V617F در ژن *JAK2* مهمترین اندیکاتور تشخیصی اختلالات میلوپرولیفراتیو می‌باشد.

۲) کاربرد کیت

کیت Delta JAK2 (V617F Mutation) Real-time PCR جهت شناسایی وجود یا عدم وجود جهش در ژن *JAK2* (ناحیه‌ی G1849T / V617F) در نمونه‌های DNA ژنومی استخراج شده از خون افراد مشکوک به MPD (MPN) استفاده می‌شود. این تست تشخیصی بر اساس تکنیک Probe-based real-time PCR طراحی شده است.

۳) اساس تست

در این روش، ابتدا DNA ژنومی موجود در نمونه‌ی خون با استفاده از یک کیت تجاری معتبر استخراج می‌شود و بدنبال آن، واکنش تکثیر هدف ژنومی با استفاده از ریل تایم PCR انجام می‌شود. برای این منظور، یک ناحیه‌ی اختصاصی اطراف جهش G1849T (V617F) در ژن *JAK2* بر روی ژنوم انسانی بعنوان هدف تشخیصی درنظر گرفته می‌شود. به‌منظور بررسی وجود و عدم وجود جهش V617F در ژن *JAK2* از یک جفت پرایمر و دو پروب اختصاصی الیگونوکلئوتیدی دارای دو رنگ فلوروسنت متفاوت (فلوروکروم FAM و HEX) در انتهای ´۵ و کوئنچر در انتهای ´۳ استفاده می‌شود (TaqMan probe). پروب دارای فلوروکروم FAM به‌گونه‌ای طراحی شده است که قادر به شناسایی **آلل جهش یافته (617F)** است. در حالیکه پروب دارای فلوروکروم HEX می‌تواند **الل وحشی (V617)** را شناسایی کند. حین انجام ریل تایم PCR در صورت وجود آلل جهش یافته، پرایمرها و پروب اختصاصی (دارای FAM) به نواحی مربوطه متصل می‌شوند. به‌منظور تکثیر DNA هدف، آنزیم پلیمراز فعال شده و شروع به سنتز رشته‌های جدید می‌کند. در حین سنتز رشته‌های جدید، این آنزیم با استفاده از فعالیت اگزونوکلئازی باعث هیدرولیز پروب متصل شده به ناحیه‌ی هدف مربوطه شده و در نتیجه کوئنچر از فلوروکروم جدا شده و در نتیجه رنگ فلوروسانت FAM ساطع می‌شود که دستگاه Real-time PCR قادر به خوانش و ثبت آن‌ها به صورت منحنی می‌باشد. در صورت وجود الل وحشی پروب اختصاصی (دارای HEX) به ناحیه اختصاصی مربوطه متصل شده و مشابه با آنچه در بالا توضیح داده شد در اثر فعالیت نوکلئازی آنزیم پلیمراز، هیدرولیز پروب رخ داده و رنگ فلوروسنت HEX آزاد شده و ساطع می‌شود که توسط دستگاه Real-time PCR ثبت می‌شود. با توجه به اینکه جهش V617F یک جهش سوماتیک است چنانچه فردی دچار جهش شود هر دو نوع سلول جهش‌یافته و وحشی را داراست. بنابراین، بعد از انجام تست Real-time PCR برای نمونه‌ی این فرد در هر دو کانال FAM و HEX منحنی سیگموئیدی یا لگاریتمی مشاهده خواهد شد.

٤) محتوای کیت

کیت حاضر برای انجام ۲۴ تست تشخیصی است و دارای اجزای زیر می‌باشد:

	ریجنت‌ها*	مقادیر
۱	V617F Master Mix	۱ تیوب X ۳۶۰ میکرولیتر
۲	V617 Wildtype Control	۱ تیوب X ۱۰۰میکرولیتر
۳	617F Mutant Control	۱ تیوب X ۱۰۰میکرولیتر
٤	No Template Control (NTC)	۱ تیوب X ۱۰۰ میکرولیتر

* **توجه:**

- ✓ تمامی اجزای کیت در دمای ۱۵- تا ۲۵- درجه سانتیگراد نگهداری شوند.
- ✓ تاریخ انقضای کیت بر روی آن درج شده است.
- ✓ تا حد امکان از ذوب و فریز شدن اجزای کیت خودداری شود. زیرا ممکن است حساسیت تست را کاهش دهد.
- ✓ در صورت نگهداری کیت در دمای ۴ درجه سانتیگراد، در کمتر از یک هفته استفاده شود.
- ✓ در صورت نیاز از هرکدام از اجزا بر اساس نیاز الیکوت تهیه شود.
- ✓ محلول Master mix حاوی پرایمر و پروب نشاندار شده با فلوروکروم است و تا حد امکان در معرض نور مستقیم قرار نگیرد.
- ✓ حتما قبل از استفاده از هرکدام از محلول‌های موجود در کیت، ورتکس/ اسپین انجام شود.

۵) سایر تجهیزات و مصرفی‌های لازم

	دستگاه / مصرفی	تعداد	توضیحات
۱	ورک استیشن (کابینت PCR)	۲ عدد	یکی برای تهیه PCR mix و دیگری برای اضافه کردن DNA ژنومی و کنترل‌های کیت است.
۲	ست سمپلر با حجم‌های مختلف	۲ ست	هر یک ست در زیر هر ورک استیشن قرار داده شود.
۳	مینی اسپین / ورتکسر	۲ عدد	هر کدام در زیر هر ورک استیشن قرار داده شود.
٤	مینی اسپین با روتور استریپ خور یا سانتریفیوژ پلیت خور	۱ عدد	به منظور سانتریفوژ کردن استریپ تیوب‌ها یا پلیت حاوی واکنش PCR قبل از قرار دادن در دستگاه Real-time PCR استفاده می‌شود.
۵	دستگاه Real-time PCR	۱ عدد	دستگاه دارای قابلیت خوانش در حداقل ۲ کانال FAM، HEX (VIC) یا معادل طول موج آن‌ها باشد.
٦	کول رک (کرایو رک)	به تعداد لازم	برای حمل و نگهداری اجزای کیت و نمونه‌های DNA در حین کار استفاده می‌شود.
۷	استریپ تیوب یا پلیت مخصوص Real-time PCR	به تعداد لازم	بر اساس نوع دستگاه Real-time PCR از نوع سفید یا شفاف استفاده می‌شود.
۸	اسپری حاوی محلول از بین برنده نوکلئازها (RNaseZAP)	به مقدار لازم	به منظور تمیز کردن سطوح و تمامی وسایل استفاده می‌شود.
۹	سر سمپلر فیلتر دار در حجم‌های مختلف	به تعداد لازم	باید عاری از DNase و RNase باشند.

٦) نمونه‌ی بالینی مورد استفاده

آزمایش شناسایی جهش V617F نقش مهمی در تشخیص، پیش آگهی و مدیریت اختلالات خونی مختلف، به ویژه نئوپلاسم‌های میلوپرولیفراتیو (MPN) مانند PV ، ET و PMF ایفا می‌کند. جهت تشخیص وجود یا عدم وجود این جهش نمونه‌ی DNA ژنومی انسان (بعنوان الگو در واکنش ریل تایم PCR) مورد نیاز است. برای این منظور، می‌توان DNA ژنومی را از نمونه‌ی خون فرد مشکوک به MPN (گرفته شده در لوله حاوی EDTA یا سیترات) استخراج کرد. جزئیات مربوط به نمونه بالینی مورد استفاده جهت تشخیص جهش V617F در ژن *JAK2* در پروتکل FDA آمریکا برای ارزیابی کیت ipsogen JAK2 MutaQuant ساخت کمپانی QIAGEN آورده شده است:

https://www.accessdata.fda.gov/cdrh_docs/reviews/K172287.pdf

کارایی و پرفورمنس کیت حاضر بستگی به مقدار و کیفیت DNA استخراج شده دارد. بنابراین، پیشنهاد می‌شود از یک کیت یا یک روش استخراج DNA معتبر (چه دستی و چه اتوماتیک) استفاده شود. تمامی مراحل انجام کار باید توسط افراد آموزش دیده انجام شود. دور ریختن بافرها، ریجنت‌ها و نمونه‌ها باید بر اساس مقررات و گایدلاین‌های مربوطه انجام شود:

https://currentprotocols.onlinelibrary.wiley.com/doi/epdf/10.1002/9780471729259.mc01a01s13

۷) پروتکل انجام تست

قبل از انجام تست تمامی اجزای کیت به مدت ۱۵ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتیگراد قرار داده شوند تا به آرامی ذوب شوند. استفاده از کرایورک به منظور نگهداری محلول‌ها در این مرحله پیشنهاد می‌شود. سپس برای حل کردن و هموژن کردن محلول‌ها از ورتکس استفاده شود. در مرحله بعد، تمامی محلول‌ها اسپین شوند تا در صورتی که قطرات محلول روی درب تیوب‌ها باشد به ته میکروتیوب کشیده شود.

۷-۱) در زیر یک ورک استیشن، به ازای هر نمونه مقدار **۱۵ میکرولیتر** از V617F Master mix را درون هر چاهک از پلیت مخصوص Real-time PCR (یا هر تیوب از استریپ تیوب ۸تایی) اضافه نمایید.

۷-۲) در زیر یک ورک استیشن دیگر مقدار **۵ میکرولیتر** از هر یک از DNAهای استخراج شده را به میکس مرحله‌ی قبل اضافه و اسپین نمایید.

نکات:

- ✓ در این مرحله، بطور موازی مقدار ۵ میکرولیتر از هر کدام از کنترل‌های مثبت V617 Wildtype Control ، 617F Mutant Control و کنترل منفی (NTC) No Template Control موجود در کیت نیز به‌صورت جداگانه به یک چاهک حاوی میکس واکنش اضافه شوند.
- ✓ در حین انجام کار به‌منظور حفظ کیفیت DNAهای استخراج شده، پس از خارج کردن آن‌ها از فریزر، آن‌ها را برروی کرایورک مخصوص حمل و نگهداری نمایید.

۷-۳) واکنش‌ها را به دستگاه Real-time PCR منتقل کرده و برنامه‌ی آورده شده در جدول زیر را اجرا نمایید.

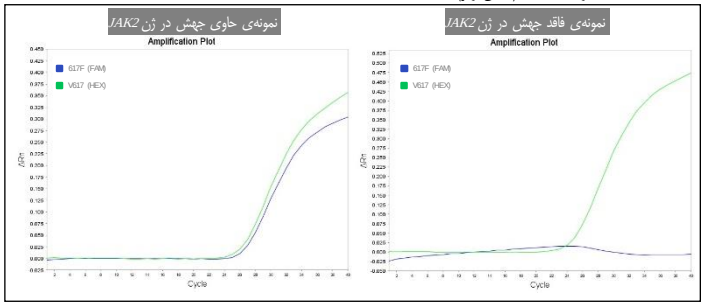
سیکل	مرحله	دما (درجه سانتیگراد)	زمان (ثانیه)
۱ x	فعال شدن آنزیم پلیمراز	۹۵	۳۰۰
۴۰ x	باز شدن رشته‌های DNA الگو	۹۵	۱۵
	جفت شدن پرایمرها	۵۵	۱۵
	سنتز رشته های جدید	۷۲	۳۰*
۱ x	خنک شدن	۲۵	۳۰

* خوانش فلوروسنت در کانال‌های **FAM** و **HEX** (**VIC**) در این مرحله انجام شود.

۷-۴) بعد از انجام PCR، تفسیر نتایج بر اساس جدول زیر انجام شود.

تفسیر	HEX	FAM
نمونه مثبت از نظر وجود جهش 617F (Mutant)	+ (Ct ≤ 35)	+ (Ct ≤ 35)
نمونه منفی از نظر وجود جهش V617 (Wildtype)	+ (Ct ≤ 35)	- (Ct > 35)
نمونه گیری به درستی انجام نشده است (تکرار آزمایش) استخراج ژنوم به درستی انجام نشده است (تکرار آزمایش) احتمال وجود مهارکننده‌ی PCR در نمونه‌ی استخراج شده (تکرار آزمایش)	- (Ct > 35)	- (Ct > 35)

○ پروب شناسایی کننده‌ی **آلل جهش یافته** با فلوروکروم **FAM** و پروب شناسایی کننده‌ی **الل وحشی** با فلوروکروم **HEX** نشاندار شده است (شکل زیر).



○ کیت حاضر دارای ۳ نوع نمونه‌ی کنترل یکی برای آلل وحشی، یکی برای آلل جهش یافته و یک کنترل NTC است. مقادیر Ct هر دو کانال FAM و HEX برای کنترل V617 Wildtype Control باید بین ۲۰ تا ۳۵ باشد. همچنین مقادیر Ct کانال HEX برای کنترل 617F Mutant Control باید بین ۲۰ تا ۳۵ باشد و برای کانال FAM منحنی ریل تایم مشاهده نمی‌شود (فاقد Ct). نمونه‌ی کنترل No Template Control کیت حاضر باید فاقد Ct یا Ct بزرگتر از ۳۵ باشد. در صورت وجود آلودگی ریجنت‌های کیت با DNA ژنومی یا آلودگی‌های تکنیکی در حین آماده سازی واکنش PCR، ممکن است که رنگ فلوروسنت در کانال‌های مذکور توسط دستگاه خوانش شود. در صورت مشاهده‌ی مقادیر Ct کمتر از ۳۵ برای نمونه‌ی NTC پیشنهاد می‌شود تا آزمایشات تکرار شوند.

REF کاتالوگ تامین
LOT لات تامین
دستورالعمل
تعداد تست‌ها
RUO استفاده تحقیقاتی
تاریخ انقضا
محدوده های نگهداری
کمپانی تولید کننده

آدرس: کاشان، دانشگاه علوم پزشکی، مرکز رشد فناوری
شماره تماس: ۰۳۱۹۱۰۱۰۶۵۱ ۰۲۱۹۱۰۱۰۶۵۱
وبسایت: www.deltabiotechno.com