

دستورالعمل انجام PCR

کیت تشخیص کیفی جهش Jak2 V617F

(Investigation Use Only, IUO)

Ref: APJAK2K1

مقدمه و اصول:

جهش Jak2 V617F یک محرک سیگنالینگ برای MyeloProliferative Neoplasms (MPNs) است که با تکثیر و فعال سازی ۳ نوع اصلی میلوئید (اریتروئید، گرانولوسیتی و MK / پلاکت) همراه است.

این جهش (V617F) منجر به تغییر اسیدآمینو والین به اسیدآمینو فنیل آلانین در موقعیت ۶۱۷ شده و بنابراین موجب می شود که سلول های خونساز نسبت به عواملی مانند اریتروپویتین و ترومبوپویتین حساس تر شوند.

جهش (V617F) Jak-2 از اهمیت تشخیصی، پیش آگهی و درمان بالایی برخوردار بوده و تشخیص کمی این جهش در نظارت بر بیماران به عنوان یک مارکر باقیمانده بیماری مفید است.

این کیت برای شناسایی کیفی جهش Jak2 V617F به عنوان کیت IUO ساخته شده است.

۱. تمام میکروتوب ها را بر روی رک سرد قرار دهید.
* در کلیه آزمایشات برای هر بیمار دو میکروتیوب (duplicate) همراه با میکروتیوب های کنترل مثبت، منفی و NTC نام گذاری نمایید.

۲. ۱۸ میکرولیتر مسترمیکس آماده را به تمامی میکروتیوب های نام گذاری شده اضافه کنید.

۳. ۲ میکرولیتر از کنترل منفی، نمونه DNA بیمار و کنترل مثبت را به ترتیب به میکروتیوب های نام گذاری شده اضافه کنید. به میکروتیوبی که به عنوان NTC کنار گذاشته اید، ۲ میکرولیتر آب مقطر استریل اضافه کنید.

نکته:

* ویال های کنترل مثبت و منفی را به منظور همگن سازی محتویات داخل آنها به مدت کوتاهی مخلوط (Vortex) نمایید.

* توصیه می شود جهت جلوگیری از ایجاد نتیجه مثبت کاذب در نمونه بیمار، به هنگام کار بر روی کنترل مثبت دقت بیشتری بعمل آید. شرکت تولید کننده کیت هیچ مسئولیتی در قبال این مورد نخواهد داشت.

* جهت کاهش آلودگی از سر سمپلرهای استریل دارای فیلتر استفاده نمایید.

۴. سپس میکروتیوب ها را داخل دستگاه ترمال سایکلر کالیبر شده قرار دهید.

پروفایل واکنش حرارتی

جز خه	زمان	دما	
۱	۱۰ دقیقه	۹۵°C	Initial denaturation
۳۵	۳۰ ثانیه	۹۵°C	Amplification
	۳۰ ثانیه	۶۰/۵°C	
	۳۰ ثانیه	۷۲°C	
۱	۵ دقیقه	۷۲°C	Final extension

نتایج

پس از اتمام سیکل PCR، محصولات PCR را باید بر روی ژل آگارز ٪۱ به مدت ۳۰ دقیقه با ولتاژ ۱۰۰ میلی آمپر و یا به مدت ۵۰ دقیقه با ولتاژ ۱۵۰ میلی آمپر بر روی PAGE انجام داد.

روش PAGE به علت تفکیک پذیری بالاتر و افزایش سطح حساسیت جهت تشخیص مقدار کمتر الی های مورد نظر نسبت به ژل آگارز ارجحیت دارد.

Technology	Conventional PCR
نوع آنالیز	کیفی
پایگاه ژن	exon 14 of chromosome 9
محتوای کیت	ویال حاوی مستر میکس (۴۵۰ میکرولیتر)، کنترل مثبت (۱۵ میکرولیتر)، کنترل منفی (۱۵ میکرولیتر)
شرایط نگهداری	-۲۰ °C
نمونه مناسب	نمونه خون همراه با ضد انعقاد EDTA، باقی کت، گرانولوسیت
حساسیت	ال جهش یا فته ۱/۲۵٪
اختصاصیت	۱۵ نمونه بیمار ترمال، ۱۵ نمونه بیمار CML، ۱۰ نمونه بیمار AML، ۱۰ نمونه بیمار ALL، که در هیچ کدام جواب مثبت کاذب گزارش نشده است.
کنترل کیفی	قطعه DNA به طول 364 جفت باز که به عنوان کنترل داخلی ژن نرمال (Wide Type) تکثیر می یابد.
دستگاه PCR	Thermal cycler PCR machines : Model: Veriti / Sense Quest / Simpli AMP(LIFE) / Peqstar2x / Proflex PCRsystem / techne TC412/ PeQ lab

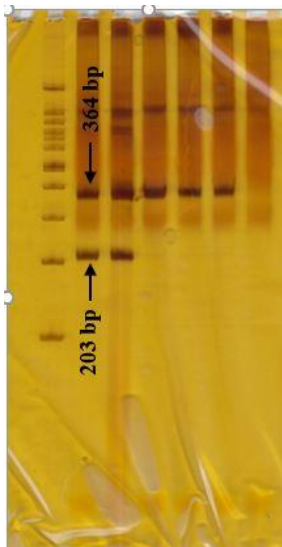


021-26422362

co.ap-rad.com








order@co.ap-rad.com

تهران - خیابان شریعتی - خیابان شهید دستگردی (ظفر) - بعد از
خیابان شمس تبریزی - ساختمان بهاران - پلاک ۱۴۸ - واحد ۱



شکل ۱

علائم و توضیحات

	سری ساخت
	شماره رفرنس
	تاریخ تولید
	تاریخ انقضا
	مطالعه بروشور
	استفاده در موارد تحقیقاتی
	استفاده در موارد تشخیصی و بالینی
	شرایطه نگه داری
	آدرس شرکت

- نتایج زیر بر روی ژل الکتروفورز قابل مشاهده هستند. (شکل ۱)
۱. باند DNA ی ۳۶۴ جفت باز در نوع طبیعی یا کنترل منفی (به عنوان کنترل داخلی)
 ۲. باند DNA ی ۲۰۳ جفت بازی در کنترل مثبت (نشان دهنده جهش)
 ۳. در کنترل بدون نمونه (NTC) هیچ بانده وجود ندارد.
 ۴. باندهای مربوط به نمونه بیمار به شرح زیر است:
 - ✓ بیماران مبتلا به جهش Jak2 V617F دو باند دارند؛ یک باند در ناحیه ۳۶۴ bp (نوع طبیعی) و یک باند در ناحیه ۲۰۳ bp (جهش یافته)
 - ✓ بیماران طبیعی بدون جهش Jak2 V617F فقط یک باند در ناحیه ۳۶۴ bp (نوع طبیعی) دارند.
 - ✓ مشاهده باند در کنترل بدون نمونه (NTC) ، نشان دهنده آلودگی است و می‌بایست پروسه تکرار شود.

نکات مورد توجه

لازم است در تفسیر و تصمیم‌گیری به تمام یافته‌های بالینی، داده‌های آزمایشگاهی و پارامترهای هماتولوژی نظیر CBC و مورفولوژی سلول‌ها توجه شود.

تداخل

هیچ گونه تداخلی با سایر ترانسلوکیشن‌ها مشاهده نشده است. (سنجش اختصاصیت)

دفع ضایعات

- برای دفع ضایعات به قوانین مصوب وزارت بهداشت توجه کنید.
- در صورتی که ضایعات منشا انسانی یا حیوانی داشته باشند به عنوان مواد خطرناک زیستی شناخته شده و باید با احتیاط دفع گردند. در هنگام استفاده و یا دفع نمونه‌ها از اقدامات احتیاطی عمومی استفاده کنید.

جهت ارتباط با واحد پشتیبانی با شماره ۰۲۱-۲۶۴۲۲۹۴۰ تماس بگیرید.



021-26422362

co.ap-rad.com

order@co.ap-rad.com

تهران - خیابان شریعتی - خیابان شهید دستگردی (ظفر) - بعد از خیابان شمس تبریزی - ساختمان بهاران - پلاک ۱۴۸ - واحد ۱