

راهنمای کیت JC RQ

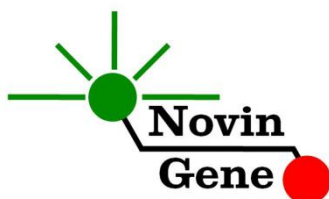
جهت تشخیص و کمیت سنجی ویروس JC
به روش Real-Time PCR

جهت کار با دستگاه Rotor-Gene یا StepOne
مخصوص تحقیقات

NG-WI- ASL-26-100

Version 1.0

تابستان ۱۳۹۸



فهرست مندرجات:

۱. مقدمه.....	۲
۲. محتویات کیت.....	۳
۳. شرایط نگهداری و پایداری کیت.....	۳
۴. سایر موارد مورد نیاز.....	۴
۵. نکات قابل توجه.....	۴
۶. نمونه مناسب و شرایط نگهداری و انتقال آن.....	۵
۷. عوامل مزاحم.....	۵
۸. کنترل داخلی.....	۶
۹. استخراج DNA.....	۷
۱۰. دستور کار PCR.....	۷
۱۱. تنظیم دستگاه Rotor-Gene.....	۸
۱۲. تنظیم دستگاه StepOne.....	۹
۱۳. تنظیم سایر دستگاه ها.....	۹
۱۴. آنالیز نتایج Rotor-Gene.....	۱۰
۱۵. آنالیز نتایج StepOne.....	۱۲
۱۶. محاسبه تیتروسیروس.....	۱۴
۱۷. محدوده خطی.....	۱۵
۱۸. میزان حساسیت.....	۱۵

کیت JC RQ برای تشخیص و کمیت سنجی DNA ویروس JC در نمونه پلاسما، مایع مغزی نخاعی یا ادرار می باشد. این کیت برای کار با دستگاه های Rotor-Gene و StepOne طراحی شده و مخصوص مصارف تحقیقاتی است.

۱. مقدمه

ویروس JC به گونه پولیوما ویروس ها (polyomaviruses) تعلق دارد. از سایر ویروسهای این گروه می توان به ویروس BK نیز اشاره کرد. ژنوم این ویروس متشکل از DNA دو رشته ای (dsDNA) می باشد.

عفونت با این ویروس بسیار شایع بود و در ابتدای سنین کودکی و بدون علائم بالینی واضح اتفاق می افتد. پس از آن ویروس تا پایان عمر در بدن فرد باقی می ماند به گونه ای که حدود ۸۰٪ جمعیت بزرگسال به این ویروس مبتلا هستند. پس از عفونت اولیه، این ویروس را در بافتهای کلیه، سیستم عصبی مرکزی و لنفوسیتها می توان یافت. گرچه در افراد سالم این ویروس موجب بیماری نمی شود، اما در صورت وجود نقص یا ضعف سیستم ایمنی می تواند عواقب ناگواری به همراه داشته باشد. از جمله می توان به نوعی عفونت مغزی به نام لکوانسفالوپاتی چندکانونی پیشرونده (progressive multifocal leukoencephalopathy, PML) اشاره کرد. لذا در بیماران مبتلا به ایدز، لنفوم، مالتیپل اسکلروزیس و همچنین افراد گیرنده ی پیوند، بررسی عفونت و تیتراژ این ویروس در پلاسما یا ادرار بیمار الزامی است.

کیت حاضر امکان بررسی نمونه جهت تشخیص و تعیین تیتراژ ویروس JC را به روش Real-Time PCR فراهم می کند که در مقایسه با سایر روشهای سنجش تیتراژ ویروس، دارای بیشترین حساسیت و وسیع ترین دامنه اندازه گیری می باشد. در این روش با استفاده از پروبهای فلورسنت می توان کینتیک واکنش را

بررسی نمود و بر اساس آن تعداد ویروس را در نمونه تعیین نمود بدون اینکه پس از پایان واکنش نیاز به انجام مراحل بعدی باشد. با توجه به اینکه در این روش نیازی به بررسی محصول PCR وجود ندارد، امکان ایجاد آلودگی نیز به لحاظ تئوری وجود نخواهد داشت.

این کیت برای استفاده با دستگاه Rotor-Gene یا دستگاه StepOne طراحی شده است. این کیت همچنین حاوی کنترل داخلی می باشد که از گزارش منفی کاذب حاصل از مهار PCR پیشگیری می کند.

۲. محتویات کیت

این کیت شامل یک دفترچه راهنما، یک لوح فشرده و مواد زیر می باشد:

برچسب	محتوا	حجم
JC Mix	میکس آماده برای PCR*	۳۶۰ میکرولیتر
JC S1	استاندارد ۱: صد هزار کپی در میکرولیتر	۱۵۰ میکرولیتر
JC S2	استاندارد ۲: ده هزار کپی در میکرولیتر	۱۵۰ میکرولیتر
JC S3	استاندارد ۳: هزار کپی در میکرولیتر	۱۵۰ میکرولیتر
JC S4	استاندارد ۴: صد کپی در میکرولیتر	۱۵۰ میکرولیتر
JC IC	کنترل داخلی	۲۵۰ میکرولیتر
Water	آب مخصوص PCR	۲۰۰ میکرولیتر

* ۱، ۲ یا ۴ عدد، به ترتیب برای کیت های ۲۴، ۴۸ و ۹۶ واکنشی

۳. شرایط نگهداری و پایداری کیت

تمامی مواد کیت باید در دمای ۲۰ درجه زیر صفر حمل و نگهداری شوند. در

این صورت این مواد تا پایان زمان انقضا کیت که روی کیت و نیز روی هر لوله درج شده است پایدار و قابل استفاده می باشند.

از ذوب و انجماد مکرر این مواد و بیش از سه بار خودداری کنید زیرا باعث کاهش حساسیت و عدم کارایی آنها می شود.

۴. سایر موارد مورد نیاز

- برای استفاده از این کیت به تجهیزات و اقلام زیر نیاز دارید:
- دستگاه Real-Time PCR به همراه تجهیزات جانبی آن
 - سانتریفوژ مخصوص میکروتیوب
 - ورتکس (Vortex Mixer)
 - بلوک حرارتی رومیزی (Dry Block Heater)
 - سمپلر متغیر و سر سمپلر فیلتردار (Nuclease free)
 - کیت استخراج DNA
 - تیوب ۱/۷ میلی لیتری و میکروتیوب مخصوص Real-Time PCR
 - دستکش لاتکس یا نیتریل بدون پودر
 - بلوک آلومینیومی (بلوک سرد)

۵. نکات قابل توجه

- برای پیشگیری از تولید نتایج کاذب به نکات زیر توجه کنید:
- هنگام کار با نمونه بیمار، همیشه فرض را بر آلوده بودن نمونه بگذارید و خطرات بالقوه آن را در نظر داشته باشید.
 - در فضای pre-PCR یا Clean Room سه ناحیه را مشخص و از هم تفکیک کنید. این سه فضا شامل فضای نگهداری نمونه و استخراج ، فضای

آماده سازی مواد (برای افزودن میکس به لوله های PCR) و فضای آماده سازی واکنش (برای افزودن نمونه DNA به لوله PCR) می باشند. هر یک از سه فضای فوق باید وسایل مخصوص به خود، به ویژه سمپلر، را داشته باشند. از جابجایی وسایل بین این سه فضا پرهیز کنید.

- سطوح کار را همیشه قبل از شروع و پس از خاتمه کار با الکل ۷۰ درجه تمیز کنید.
- پیش از باز کردن درپوش لوله های درون کیت، آنها را کاملاً ذوب نموده و با چند تکان ملایم از مخلوط و یکنواخت شدن محتویات هر لوله اطمینان حاصل کنید. سپس برای چند ثانیه آنها را در دور پایین سانتریفوژ کنید.
- در حین کار، محتویات کیت را همیشه روی یخ خرد شده نگهداری کنید. از استفاده از یخهای قالبی و سایر موارد به غیر از یخ خرد شده پرهیز کنید.
- در حین کار، میکروتیوب های PCR را روی بلوک سرد گذاشته، و از گذاشتن آنها بر یخ خرد شده خودداری کنید.

۶. نمونه مناسب و شرایط نگهداری و انتقال آن

نمونه مناسب برای آزمایش ویروس JC با این کیت، پلاسمای خون محیطی (peripheral blood)، مایع مغزی نخاعی و یا ادرار می باشد که در لوله استریل جمع آوری شده است. ماده ضد انعقاد برای خون محیطی می تواند EDTA یا سیترات باشد. نمونه را می توان تا دو روز در ۴ درجه نگهداری و به آزمایشگاه منتقل نمود. پس از آن باید نمونه را در دمای ۲۰ درجه زیر صفر نگهداری کرد.

۷. عوامل مزاحم

هیپارین با غلظت بیش از ۱۰ واحد در میلی لیتر باعث مهار PCR می شود. به

همین دلیل لوله حاوی هیپارین به عنوان ضد انعقاد مناسب نیست و نباید استفاده شود. همچنین نمونه بیماران تحت درمان با هیپارین نیز برای PCR مناسب نمی باشد.

مقادیر بالای بیلیروبین (تا حداکثر ۴/۵ میلی گرم در دسی لیتر) و چربی (تا حداکثر ۱۰۰۰ میلی گرم در دسی لیتر) و نیز همولیز خون برای این آزمایش مزاحمتی ایجاد نمیکنند.

۸. کنترل داخلی

برای ارزیابی احتمال استخراج نامناسب یا مهار واکنش و جلوگیری از نتایج منفی کاذب، این کیت حاوی کنترل داخلی می باشد.

کنترل داخلی را می توانید در مرحله استخراج استفاده نموده یا صرفاً در مرحله PCR آن را به JC Mix اضافه نمایید. در حالت اول، کنترل داخلی علاوه بر بررسی مهار واکنش، نشانگر کیفیت استخراج نیز می باشد. برای استفاده در مرحله استخراج، کنترل داخلی را پس از افزودن بافر Lysis به نمونه، اضافه کنید. میزان مورد نیاز از کنترل داخلی ده درصد حجم حلال نهایی (elution buffer) می باشد. یعنی در صورتی که DNA را نهایتاً در ۱۰۰ میکرولیتر بافر حل می کنید، ۱۰ میکرولیتر از کنترل داخلی را به مخلوط نمونه و بافر Lysis اضافه نمایید. **توجه داشته باشید که کنترل داخلی نباید مستقیماً به نمونه بیمار (یعنی پیش از افزودن بافر lysis) اضافه شود زیرا کارایی خود را از دست خواهد داد.**

در صورتی که کنترل داخلی را به JC Mix اضافه می نمایید، تنها می توانید مهار واکنش PCR را بررسی کنید. به این منظور به ازای هر واکنش PCR، یک میکرولیتر از کنترل داخلی را به JC Mix اضافه نمایید. به طور مثال برای ۱۰

واکنش، به ۱۵۰ میکرولیتر از میکس، ۱۰ میکرولیتر کنترل داخلی اضافه کنید و مخلوط حاصل را مطابق توضیحات قسمت ۱۰ استفاده نمایید. در صورت موفق بودن PCR کنترل داخلی منجر به تولید فلورسانس با تابش زرد (VIC/Yellow) و CT بین ۲۸ تا ۳۵ می شود

۹. استخراج DNA

برای استخراج DNA از نمونه از روشها و کیت‌های مختلفی می توان استفاده نمود. ما استفاده از کیت‌های زیر را توصیه می کنیم:

- High Pure Viral Nucleic Acid Kit (Cat# 11858874001, Roche Applied Science, Mannheim, Germany)
- QIAamp DNA Blood Mini Kit (Cat. no. 51104, Qiagen GmbH, Hilden, Germany)
- QIAamp UltraSens® Virus Kit (Cat. no. 53704, Qiagen GmbH, Hilden, Germany).
- QIAamp MiniElute Virus Spin Kit (Cat. no. 57704, Qiagen GmbH, Hilden, Germany)

۱۰. دستور کار PCR

ابتدا تمامی لوله ها را روی یخ خرد شده قرار دهید تا بطور کامل محتویات آنها ذوب شوند. با چند تکان ملایم از مخلوط شدن مواد داخل آنها اطمینان حاصل کرده و برای چند ثانیه آنها را در دور پایین سانتریفوژ کنید. تعداد مورد نیاز لوله PCR روی بلوک سرد بگذارید. علاوه بر تعداد نمونه های مورد آزمایش، ۴ لوله برای استانداردها و یک لوله برای کنترل منفی نیز در نظر بگیرید.

به هر لوله ۱۵ میکرولیتر از میکس **JC Mix** اضافه کنید. سپس ۱۰ میکرولیتر از DNA استخراج شده و یا **استاندارد** یا آب به هر لوله اضافه کنید و درپوش لوله ها را ببندید. سپس آن ها را مطابق شماره ها داخل دستگاه قرار دهید.

توجه: در صورت استفاده از دستگاه **StepOne** لوله ها را ابتدا به مدت کوتاهی سانتریفوژ نموده و سپس داخل دستگاه قرار دهید.
توجه: هنگام استفاده از دستگاه روتورژن، رینگ محافظ را نیز در پایان اضافه کنید.

۱۱. تنظیم دستگاه Rotor-Gene

ابتدا اطمینان حاصل کنید که رینگ محافظ را روی روتور قرار داده اید! روی کامپیوتر جانبی دستگاه روتورژن، از لوح فشرده همراه کیت فایل JC 0.2 و یا JC 0.1 (با توجه به لوله های استفاده شده) را باز کنید.
در منوی بالای صفحه دکمه استارت (دکمه سبز رنگ) را کلیک کنید. روی پنجره باز شده نیز دکمه استارت را کلیک کنید و فایل آزمایش را در محل مورد نظر ذخیره کنید تا دستگاه روشن شود.
در پنجره نمونه ها (samples) نام هر نمونه را وارد کنید. در ستون نوع نمونه با عنوان type، برای نمونه بیمار unknown و برای استانداردها standard را انتخاب کنید. سپس غلظت استانداردها را در ستون سمت راست با عنوان given concentration وارد کنید. برای نمونه کنترل منفی نیز می توانید NTC یا Negative Control را انتخاب کنید.

۱۲. تنظیم دستگاه StepOne

لوح فشرده همراه کیت را در کامپیوتر جانبی دستگاه قرار دهید. نرم افزار دستگاه را باز کنید (StepOne software 2.*). از منوی Set Up روی دکمه Template کلیک کنید و فایل داخل لوح فشرده را انتخاب کنید. از منوی سمت چپ Plate Setup و سپس دکمه Assign Targets and Samples را انتخاب کنید. یک کنترل منفی به همراه چهار استاندارد و چند نمونه از پیش تعریف شده اند. استانداردها، کنترل منفی و تعداد نمونه مورد نظر خود را در ردیف دلخواه کپی کنید. برای اینکار از گزینه های کلیک راست (copy, paste, clear) می توانید استفاده کنید. همچنین با استفاده از منوی Define Targets and Samples می توانید تعداد نمونه های مورد بررسی را نیز اضافه کنید و نام نمونه ها را نیز مطابق نام بیماران تغییر دهید. در پایان تنظیمات دکمه Start Run را کلیک کنید و فایل آزمایش را در محل مورد نظر ذخیره کنید تا دستگاه شروع به کار کند.

۱۳. تنظیم سایر دستگاه ها

چنانچه این کیت را برای استفاده با سایر دستگاههای Real-Time PCR استفاده می کنید، دستگاه را مطابق برنامه زیر تنظیم نمایید:

Step	Temperature and time	Cycles
1	95°C x 10 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 رنگهای FAM و VIC تنظیم شود.
JC Mix موجود در کیت حاوی ROX می باشد. غلظت نهایی ROX در واکنش 300nM می باشد.

۱۴. آنالیز نتایج Rotor-Gene

برای آنالیز نتایج به راهنمای Rotor-Gene مراجعه کنید. به طور خلاصه از منوی Quantitation, Analysis را انتخاب کرده و روی Green دوبار کلیک کنید. پنجره autofind threshold را ببندید و آستانه (threshold) را روی ۰/۱ قرار دهید. مراحل بالا را برای کانال Yellow نیز تکرار کنید.
برای مشاهده نمودار مورد انتظار استانداردها، کنترل منفی و کنترل داخلی، تصاویر یک و دو را ملاحظه فرمایید.
توجه داشته باشید که افزایش تابش سبز (Green) مربوط به ویروس JC و افزایش تابش زرد (Yellow) حاصل از کنترل داخلی می باشد.

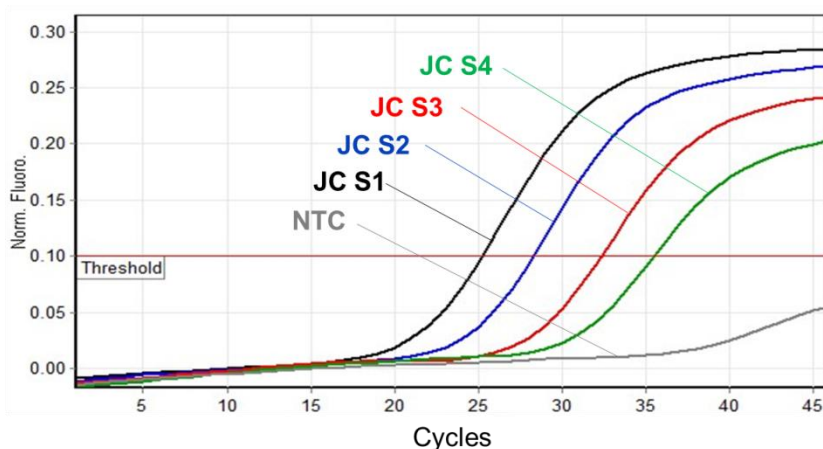
توجه داشته باشید نمونه تنها زمانی مثبت در نظر گرفته میشود که دارای منحنی سیگموئیدی و فاز لگاریتمی باشد و تنها در این حالت CT معتبر بوده و قابل استناد و تفسیر می باشد. در غیاب منحنی سیگموئیدی، نمونه منفی محسوب میشود و CT آندر صورت وجود، فاقد ارزش میباشد.

نتایج را با توجه به نکات زیر تفسیر کنید:

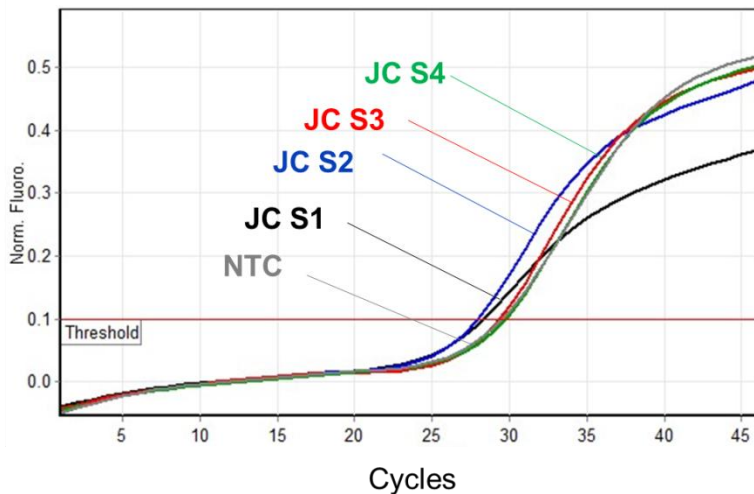
- در صورتی که نمونه در کانال سبز مثبت و دارای منحنی سیگموئیدی و **CT کمتر از ۴۰** باشد، بدون در نظر گرفتن نتیجه آن در کانال زرد

می توان آن را **مثبت** تلقی نمود و تیترا محاسبه شده توسط دستگاه را گزارش نمود.

- در صورتی که یک نمونه در کانال سبز منفی باشد یا **CT آن بالاتر از ۴۰** باشد ولی در کانال زرد مثبت و دارای منحنی سیگموییدی و CT بین ۲۸ تا ۳۵ باشد، نمونه **منفی** در نظر گرفته می شود.
- در صورتی که یک نمونه در هر دو کانال سبز و زرد منفی باشد، نتیجه **نامعتبر** بوده و آزمایش باید **تکرار** شود.



تصویر ۱: منحنی استاندارد های JC در کانال سبز دستگاه Rotor-Gene



تصویر ۲: منحنی کنترل داخلی در کانال زرد دستگاه دستگاه Rotor-Gene

۱۵. آنالیز نتایج StepOne

برای آنالیز نتایج به راهنمای StepOne مراجعه کنید. به طور خلاصه دکمه Analysis را کلیک کنید. برای FAM آستانه (threshold) را روی ۰/۱ و برای VIC آستانه را روی ۰/۰۵ قرار دهید.

برای مشاهده نمودار مورد انتظار استانداردها، کنترل منفی و کنترل داخلی، تصاویر سه و چهار را ملاحظه فرمایید.

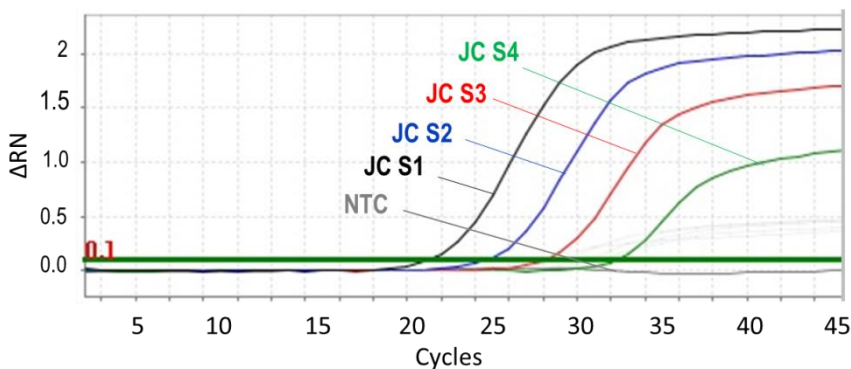
توجه داشته باشید که افزایش تابش FAM مربوط به ویروس JC و افزایش تابش VIC حاصل از کنترل داخلی می باشد.

توجه داشته باشید نمونه تنها زمانی مثبت در نظر گرفته میشود که دارای منحنی سیگموئیدی و فاز لگاریتمی باشد و تنها در این حالت CT

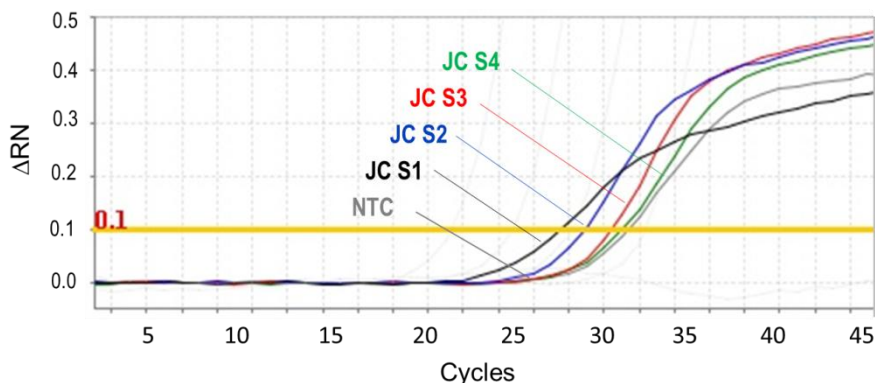
معتبر بوده و قابل استناد و تفسیر می باشد. در غیاب منحنی سیگموییدی، نمونه منفی محسوب میشود و CT آن در صورت وجود فاقد ارزش میباشد.

نتایج را با توجه به نکات زیر تفسیر کنید:

- در صورتی که نمونه در کانال FAM مثبت و دارای منحنی سیگموییدی و **CT کمتر از ۴۰** باشد، بدون در نظر گرفتن نتیجه آن در کانال VIC می توان آن را **مثبت** تلقی نمود و تیترا محاسبه شده توسط دستگاه را گزارش نمود.
- در صورتی که یک نمونه در کانال FAM منفی باشد یا **CT آن بالاتر از ۴۰** باشد ولی در کانال VIC مثبت و دارای منحنی سیگموییدی و CT بین ۲۸ تا ۳۵ باشد، نمونه **منفی** در نظر گرفته می شود.
- در صورتی که یک نمونه در هر دو کانال FAM و VIC منفی باشد، نتیجه **نامعتبر** بوده و آزمایش باید **تکرار** شود.



تصویر ۳: منحنی استاندارد های JC در کانال FAM دستگاه StepOne



تصویر ۴: منحنی کنترل داخلی در کانال VIC دستگاه StepOne

۱۶. محاسبه تیترو ویروس

هر کیت حاوی چهار استاندارد با غلظت مشخص می باشد که با استفاده از آنها منحنی استاندارد رسم شده و تیترو ویروس در نمونه بیمار معین می شود. استانداردهای کیت با واحد کپی در میکرولیتر مشخص شده اند. برای تبدیل نتایج به صورت کپی در میلی لیتر، از معادله زیر استفاده کنید:

$$\text{Result (copy/ml)} = \frac{\text{Result (copy/}\mu\text{l)} \times \text{elution volume (}\mu\text{l)}}{\text{sample volume (ml)}}$$

به طور مثال چنانچه ۲۰۰ میکرولیتر نمونه استخراج و DNA حاصل در ۵۰ میکرولیتر بافر حل شود، نتایج باید در عدد ۲۵۰ ضرب شوند تا به کپی در میلی

لیتر (copy/ml) تبدیل شوند.

۱۷. محدوده خطی

محدوده خطی این کیت با استفاده از نمونه کلون شده حاوی بخشی از ژنوم ویروس بررسی شده و شامل بازه یکصد میلیون کپی در میکرولیتر تا پنجاه کپی در میکرولیتر می باشد.

۱۸. میزان حساسیت

حساسیت تشخیصی این کیت با استفاده از نمونه کلون شده حاوی بخشی از ژنوم ویروس بررسی شده و معادل پنج کپی در میکرولیتر می باشد. یعنی در ۹۵٪ مواردی که تیتراژ نمونه مورد آزمایش بیش از این میزان باشد، توسط این کیت تشخیص داده خواهد شد. در صورت کاهش تیتراژ نمونه به کمتر از این میزان همچنان کیت قادر به تشخیص خواهد بود اما با ضریب اطمینان به مراتب کمتر.

JC RQ Kit Manual

**For Real-Time PCR Detection and Quantitation of
JC Virus**

For use with Rotor-Gene or StepOne
Research use only

NG-WI-ASL-26-100
Version 1.0
Summer 2019

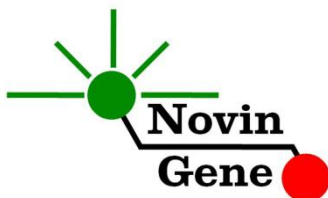


Table of Contents:

1. Introduction	2
2. Kit Contents	3
3. Storage and Stability	3
4. Additionally Required Materials	3
5. General Precautions	4
6. Specimen, storage and transport.....	4
7. Interfering substances	4
8. Internal control (IC).....	5
9. DNA isolation.....	5
10. PCR Protocol.....	6
11. Programming of the Rotor-Gene	6
12. Programming of StepOne.....	6
13. Programming other machines	7
14. Data Analysis: Rotor-Gene.....	7
15. Data Analysis: StepOne	9
16. Quantitation.....	10
17. Linear Range.....	12
18. Sensitivity.....	12

JC RQ kit is intended for the quantitative detection of JC virus DNA with Rotor-Gene or StepOne machines. This kit is for research use only.

1. Introduction

JC virus is a member of polyomaviruses genus with a double stranded DNA genome. BK virus belongs to this genus as well. Early infection occurs in early childhood and without clinical symptoms. Then JC virus establishes a lifelong infection usually in kidney, central nervous system or lymphocytes. Usually about 80% of adult population are infected with this virus without noticing it. However, JCV may lead to significant consequences in patients with immune deficiency or very weak immune system such as people with HIV/AIDs, lymphoma, multiple sclerosis (MS) and transplant patients. There, JCV reactivation may result on a serious brain infection called progressive multifocal leukoencephalopathy (PML). Therefore, it is crucial to monitor JCV titre in above mentioned target group.

JC RQ kit provides a ready-to-use Real-Time PCR system for detection and quantitation of JC virus DNA with Rotor-Gene or StepOne machines. Currently the Real-Time PCR provides the highest sensitivity and widest dynamic range among other methods. In this method, application of fluorescent probes allows detection of amplified product. Analysis of fluorescent kinetics also leads to quantification of the target sequence in the reaction without requiring post-amplification analysis, reducing the possibility of contamination with the PCR product.

This kit also incorporates an Internal Control to identify possible PCR inhibition.

2. Kit Contents

The kit contains a manual, a CD with RotorGene and StepOne templates and following reagents:

Label	Content	Quantity
JC Mix	PCR Master mix*	360 μ l
JC S1	Standard 1: 100,000 copy/ μ l	150 μ l
JC S2	Standard 2: 10,000 copy/ μ l	150 μ l
JC S3	Standard 3: 1,000 copy/ μ l	150 μ l
JC S4	Standard 4: 100 copy/ μ l	150 μ l
JC IC	Internal Control	250 μ l
Water	PCR Grade Water	200 μ l

* 1, 2 and 4 tubes for 24, 48 and 96 reaction kits.

3. Storage and Stability

The kit components should be shipped and stored at -20°C and are stable until the expiry date mentioned. Avoid repeated freeze-thaws more than few times to prevent reduced sensitivity.

4. Additionally Required Materials

To use this kit, you need the following items:

- Real-Time PCR machine and accessory computer
- Table top microtube centrifuge
- Vortex Mixer
- Dry Block Heater
- Adjustable pipettors and nuclease free filtered tips
- DNA extraction kit
- Nuclease free 1.7ml microtubes and PCR microtubes
- Disposable powder-free gloves

5. General Precautions

In order to prevent false results, always pay attention to the following points:

- **Treat all samples as potentially infectious.**
- Within the pre-PCR work area assign three separate spaces for: a) Sample storage and extraction, b) Reagent preparation where the PCR mix is aliquoted into tubes and c) Reaction preparation area for addition of extracted DNA to the tubes.
- Always wipe the working surfaces with 70% Ethanol before and after work.
- Thaw kit components on **crushed ice** completely, mix by flickering followed by a quick spin and **store on crushed ice while working.**
- Do not place PCR tubes on crushed ice. Use cooling blocks instead.

6. Specimen, Storage and Transport

Peripheral blood, cerebrospinal fluid or urine should be collected in sterile condition in proper and sterile tubes. Samples can be shipped and stored at +4°C for couple of days or at -20°C for longer periods. Upon receipt plasma should be separated from whole blood and then stored as above mentioned.

7. Interfering Substances

Heparin (more than 10 IU/ml) affects the PCR. Blood collected in heparin containing tubes should not be used. Samples of heparinized patients must not be used as well.

Elevated levels of bilirubin (≤ 4.5 mg/dl) and lipids (≤ 1000 mg/dl) and hemolytic samples do not influence the extraction and PCR.

8. Internal Control (IC)

In order to evaluate the possibility of DNA extraction failure and PCR inhibition and prevent false negative results, JC RQ kit contains internal control (IC). IC can be used during extraction process or simply added to JC Mix.

To monitor both DNA extraction and PCR reaction, internal control should be added to the mixture of lysis buffer and patient sample. Required volume of internal control is 10% of elution buffer. For instance if extracted DNA is eluted with 100ul, then 10ul of internal control should be added to the mixture of lysis buffer and patient sample. **Please note that internal control should not be added directly to the patient sample (i.e. before addition of lysis buffer) as it loses its efficiency.**

If IC is added to JC Mix, only PCR inhibition can be monitored. For this purpose, 1ul of IC reagent should be added to each reaction. For example, for 10 PCR reactions, 15ul of internal control should be added to 150ul of JC Mix before it is added to the tubes.

In a successful DNA extraction and PCR test, IC should generate a CT of 27-35 in Yellow/VIC Channel.

9. DNA Isolation

DNA isolation can be performed using different kits from various manufacturers. We recommend using either of:

- High Pure Viral Nucleic Acid Kit (Cat. no. 11858874001, Roche Applied Science, Mannheim, Germany)
- QIAamp DNA Blood Mini Kit (Cat. no. 51104, Qiagen GmbH, Hilden, Germany)
- QIAamp UltraSens ® Virus Kit (Cat. no. 53704, Qiagen GmbH, Hilden, Germany)

- QIAamp MiniElute Virus Spin Kit (Cat. no. 57704, Qiagen GmbH, Hilden, Germany).

10. PCR Protocol

Thaw the reagents on ice completely followed by a brief mixing and a quick spin. Place required number of tubes on cold block. Consider one tube for each sample plus four for standards and one for the negative control.

Pipette 15ul of JC Mix directly to each tube followed by adding 10ul of standard or isolated DNA.

Cap the tubes and visually inspect to make sure all are capped securely. Place tubes in the machine.

Note: Working with StepOne instrument, spin tubes briefly before loading on the block.

Note: If using Rotor-Gene attach the locking ring.

11. Programming Rotor-Gene

Before you start the machine, make sure you have attached the locking ring on the rotor!

Open the CD provided with the kit and double click on JC template 0.2 or JC 0.1 depending on the tubes used. Program starts. Click on Start button (Green button on the top menu). On the pop up window, click start again and save program on desired location.

12. Programming StepOne

Open the StepOne software (V 2.*). On the Set Up menu click on Template and select the file on CD provided with the kit. Click on Plate Setup. One negative control, 4 standards and 10 samples are defined. You may change plate set up using right click options (copy, paste, clear). You may also add/remove samples or

change sample names on “Define Targets and Samples” menu. When finished, click on “Start Run” and save the experiment on desired location. Instrument will start shortly.

13. Programming Other Machines

If you apply this kit to other Real-Time PCR machines, program it according to the following table:

Step	Temperature and time	Cycles
1	95°C x 10 min	1
2	95°C x 15 sec	45
	60°C x 60 sec	

Fluorescence should be collected at 60°C for FAM and VIC dyes. The JC Mix contains ROX with the final concentration of 300nM in the reaction.

14. Data Analysis: Rotor-Gene

Before analyzing results, make sure in the sample menu all the standards have been defined as “standard” and the relative concentrations have been entered. Patient samples should be defined as “unknown” and Negative control or no template control as “Negative Control” or “NTC” respectively.

Analyze data according to manufacturer recommendations. Perform quantitative analysis for **JC (Green channel)** and qualitative analysis for **Internal Control (Yellow channel)**. Briefly, click on analysis menu and then under Quantitation tab double click on cycling A. Green.

Close the pop up for Automatic and set the threshold at 0.1. Repeat the above for Cycling A. Yellow.

Figures 1 and 2 represent typical graphs for Rotor-Gene machine.

Note that a sample is considered Positive only if it has a sigmoid graph and log phase, and only then CT is reliable and can be used.

In the absence of sigmoid graph and log phase, sample is considered Negative and CT if present is not reliable.

Consider following points when analyzing:

- A sample is **Positive** if it is positive in Green channel with a sigmoid graph and a CT of less than 40. The viral load or quantitation results in the Cycling A. Green are valid.
- A sample is **Negative** if it is negative in Green channel while it is positive in Yellow channel with a sigmoid graph and CT of 28-35.
- Results are **inconclusive** and the test should be repeated if a sample is negative in both of Green and Yellow channels.

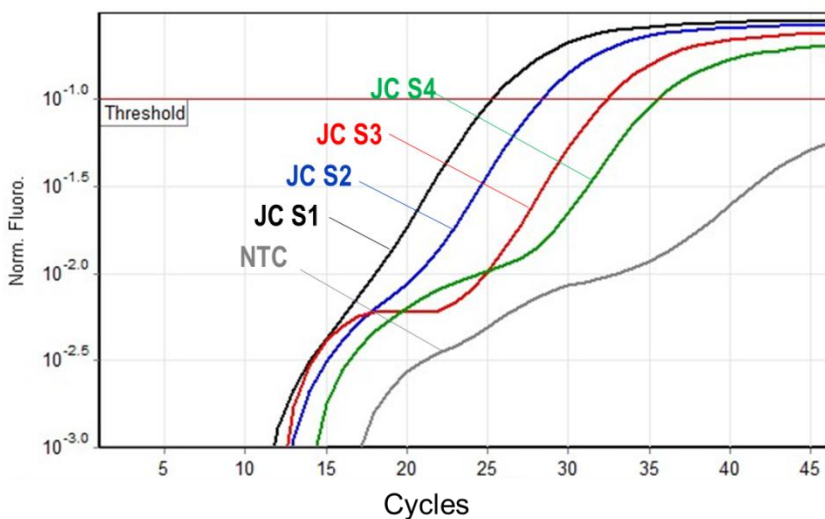


Fig 1. Typical JC graph in Green channel for Rotor-Gene

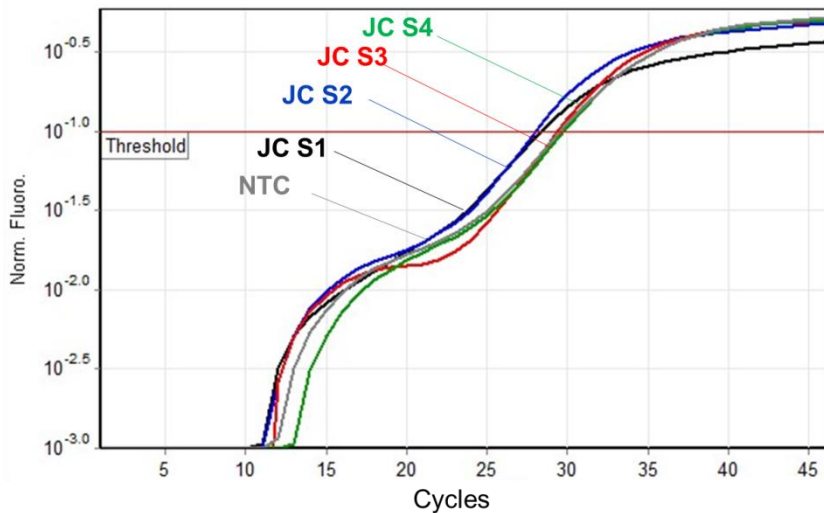


Fig2. Typical IC graph in Yellow channel for Rotor-Gene

15. Data Analysis: StepOne

Analyze data according to manufacturer recommendations. Briefly, click on Analyze and set the threshold for **JC/FAM** at 0.1 and at 0.05 for **IC/VIC**.

Figures 3 and 4 represent typical graphs for StepOne machine.

Note that a sample is considered Positive only if it has a sigmoid graph and log phase, and only then CT is reliable and can be used.

In the absence of sigmoid graph and log phase, sample is considered Negative and CT if present is not reliable.

Consider following points when analyzing:

- A sample is **Positive** if it is positive in FAM channel with a sigmoid graph and a CT of less than 40. The viral load or quantitation results are valid.
- A sample is **Negative** if it is negative in FAM channel while it is positive in VIC channel with a sigmoid graph and CT of 28-35.
- Results are **inconclusive** and the test should be repeated if a sample is negative in both of FAM and VIC channels.

16. Quantitation

The kit provides 4 quantitation standards with defined titers to generate a standard curve for quantification of samples viral load. Working with RotorGene machine, the standard curve from a previous run can also be imported for quantification of samples to the recent run. To do so, at least one standard must be used in the current run. Apparently using all four standards in each run will lead to more accurate results.

Quantitation standards are defined as copy/ μ l. To convert the result to copy/ml following equation should be used:

$$\text{Result (copy/ml)} = \frac{\text{Result (copy/}\mu\text{l)} \times \text{elution volume (}\mu\text{l)}}{\text{sample volume (ml)}}$$

“Sample volume” is the sample volume used for DNA isolation and “Elution volume” is the volume of buffer or water used to elute or dissolve isolated DNA.

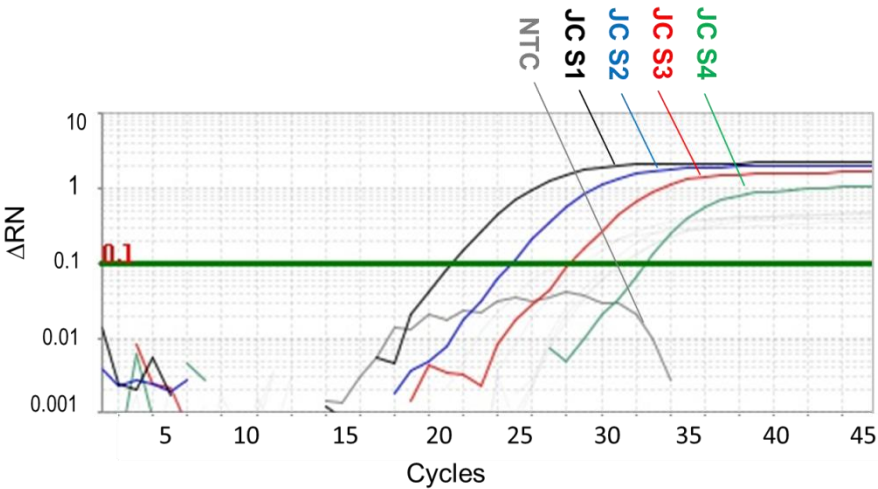


Fig 3. Typical JC graph in FAM channel for StepOne

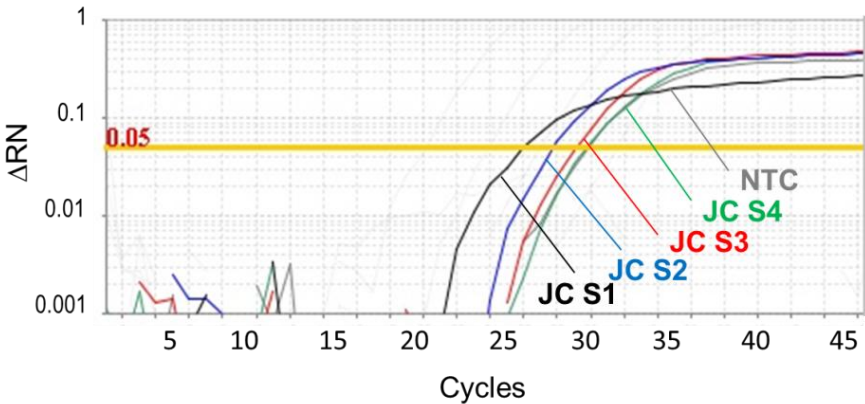


Fig 4. Typical IC graph in VIC channel for StepOne

17. Linear Range

The linear range of the kit was assessed with dilution series of the cloned target and showed to be linear in the range of 100,000,000 copy/ μ l to 50 copy/ μ l.

18. Sensitivity

The analytical detection limit of the kit was assessed with dilution series of the cloned target and showed a limit of detection equal to 5 copy/ μ l.

