راهنمای کیت

MBCR 210 RQ

جهت تشخیص و کمیت سنجی
BCR-ABL (p210)
به روش Real-Time PCR

جهت کار با دستگاه Rotor-Gene یا StepOne
مخصوص تحقیقات

NG-WI-ASL-11-500
ویرایش ۵/۱
تیر ۱۳۹۷

Novin Gene

فهرست مندرجات:

۱.مقدمه..... ۲

۲. محتویات کیت..... ۳

۳. شرایط نگهداری و پایداری کیت..... ۴

۴. سایر موارد مورد نیاز..... ۴

۵. نکات قابل توجه..... ۵

۶. نمونه مناسب و شرایط نگهداری و انتقال آن..... ۶

۷. استخراج RNA..... ۶

۸. تهیه cDNA..... ۷

۹. دستور کار PCR..... ۷

۱۰. تنظیم دستگاه RotorGene..... ۹

۱۱. تنظیم دستگاه StepOne..... ۹

۱۲. تنظیم سایر دستگاه ها..... ۱۰

۱۳. آنالیز نتایج RotorGene..... ۱۰

۱۴. آنالیز نتایج StepOne ۱۳

۱۵. محاسبه درصد BCR-ABL..... ۱۵

۱۶. حساسیت ۱۶

کیت **MBCR 210 RQ** جهت تشخیص ناهنجاری کروموزومی یا ترانسلوکاسیون BCR-ABL (p210) در خون محیطی و محاسبه درصد BCR-ABL در بیماران تحت درمان می باشد. این کیت مخصوص استفاده تحقیقاتی است و برای استفاده با دستگاه RotorGene و StepOne طراحی شده است.

توجه: *این کیت فاقد مواد لازم برای استخراج RNA یا تهیه cDNA می باشد!*

۱. مقدمه

ناهنجاری کروموزومی BCR-ABL یا کروموزوم فیلادلفیا حاصل از جابجایی کروموزومی 9;22 می باشد. در نتیجه این جابجایی، ژن ABL در کروموزوم شماره ۹ در مجاورت ژن BCR در کروموزوم ۲۲ قرار می گیرد و یک ژن هیبرید تشکیل می شود. این مجاورت سبب تولید پروتئین هیبرید BCR-ABL با وزن مولکولی غالبا ۲۱۰ یا ۱۹۰ کیلو دالتون می شود. این پروتئین دارای فعالیت مداوم تیروزین کیناز می باشد و به نوبه خود باعث افزایش رشد سلولی و مهار آپاپتوز می شود. mRNA حاصل از نسخه برداری این ژن تقریبا در ۹۵٪ بیماران CML و برخی موارد ALL یافت می شود. بر اساس تجربیات بیست سال گذشته، بررسی دوره ای بیماران برای اندازه گیری میزان بیان این ژن، نقش مهمی در تخمین پاسخ درمانی و پیش بینی میزان پیشرفت بیماری دارا می باشد.

کیت حاضر مواد لازم برای تشخیص بیان ژن BCR-ABL (p210) (فقط برای جابجایی های b2a2, b3a2) و محاسبه درصد BCR-ABL پس از تشخیص و طی دوره درمان را فراهم می کند.

این کیت جهت تشخیص این ناهنجاری کروموزومی از روش Real-Time PCR بهره می گیرد. در این روش با استفاده از پروب های نشاندار شده به رنگ های فلورسنت می توان محصول PCR را بررسی نمود بدون اینکه پس از پایان

واکنش نیاز به انجام مراحل بعدی باشد. لذا امکان ایجاد آلودگی نیز به لحاظ تئوری وجود نخواهد داشت.

این کیت برای استفاده با دستگاه RotorGene یا دستگاه StepOne طراحی شده است.

۲. محتویات کیت

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

برچسب	محتوا	حجم
MBCR 210 MIX	میکس آماده برای MBCR *	۴۸۰ میکرولیتر
ABL MIX	میکس آماده برای ABL *	۴۸۰ میکرولیتر
MA1	استاندارد ۱: یک صد هزار کپی در میکرولیتر	۲۵۰ میکرولیتر
MA2	استاندارد ۲ ده هزار کپی در میکرولیتر	۲۵۰ میکرولیتر
MA3	استاندارد ۳: یک هزار کپی در میکرولیتر	۲۵۰ میکرولیتر
MA4	استاندارد ۴: یک صد کپی در میکرولیتر	۲۵۰ میکرولیتر
MA5	استاندارد ۵: ده کپی در میکرولیتر	۲۵۰ میکرولیتر
Water	آب مخصوص PCR	۲۰۰ میکرولیتر

* یک، دو یا چهار عدد، به ترتیب برای کیت های ۲۴، ۴۸ و ۹۶ واکنشی

۳. شرایط نگهداری و پایداری کیت

تمامی مواد کیت که در جدول بالا ذکر شده است 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 و بیش از سه بار این مواد به ویژه میکس PCR خودداری کنید، زیرا باعث کاهش حساسیت و عدم کارایی آن ها می شود.

۴. 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.
- هنگام استخراج RNA و سنتز cDNA برای پرهیز از آلودگی با آنزیم RNase توجه لازم را 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 cDNA 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.

- هنگام استفاده، مواد کیت را روی یخ خرد شده نگه دارید تا کاملا ذوب شده و با چند تکان ملایم از مخلوط و یکنواخت شدن محتویات هر لوله اطمینان حاصل کنید. سپس برای چند ثانیه آن ها 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.

۵. 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 یخچالدار مخصوص میکروتیوب
- ورتکس (Vortex Mixer)
- بلوک حرارتی رومیزی (Dry Block Heater)
- سمپلر متغیر و سر سمپلر فیلتردار (Nuclease free)
- کیت استخراج RNA
- کیت سنتز cDNA
- تیوب ۱/۷ میلی لیتری و میکروتیوب مخصوص Real-Time PCR
- دستکش لاتکس یا نیتریل بدون پودر
- بلوک آلومینیومی (بلوک سرد)

۶. نمونه مناسب و شرایط نگهداری و انتقال آن

نمونه مناسب برای آزمایش BCR-ABL با این کیت، خون کامل (peripheral blood) می باشد که در لوله استریل حاوی ماده ضد انعقاد جمع آوری شده است. ماده ضد انعقاد می تواند EDTA یا سیترات باشد. خون کامل را می توان تا ۷۲ ساعت در ۴ درجه نگهداری و به آزمایشگاه منتقل نمود.

RNA را می توان مستقیماً از خون استخراج کرد. همچنین برای افزایش حساسیت تست می توان از بافی (buffy coat) استفاده کرد. یک نمونه مناسب باید حاوی ۵ تا ۱۰ میلیون گلبول سفید در هر ۱۵۰ میکرولیتر باشد. برای نگه داری خون کامل یا بافی در زمان های طولانی تر از سه روز بهتر است آن را به حجم های کوچک تقسیم نموده و سپس در دمای ۷۰ درجه زیر صفر نگهداری نمود. در چنین شرایطی نمونه تا چند ماه پایدار می ماند.

۷. استخراج RNA

برای استخراج RNA از نمونه از روش ها و کیت های مختلفی می توان استفاده نمود. ما استفاده از موارد زیر را توصیه می کنیم:

- TriPure isolation reagent (Cat# 1667157, Roche Applied Science, Mannheim, Germany)
- TRIzol isolation reagent (Cat# 15596026, Invitrogene/ Thermo Fisher, USA)
- Isol-RNA isolation reagent (Cat# 2302700, 5 prime/ Thermo Fisher, Germany)
- Accuzol isolation reagent (Cat# K-3090, Bioneer, Korea)

۸. تهیه cDNA

در حدود یک میکروگرم total RNA برای این تست مورد نیاز می باشد که باید با استفاده از Random Hexamers یا پرایمرهای اختصاصی به cDNA تبدیل شود. کیت های متعددی برای این کار در دسترس می باشند.

لازم به یادآوری است که استفاده از پرایمرهای اختصاصی p210/MBCR و ABL برای تهیه cDNA باعث کاهش CT ژن ABL و افزایش حساسیت تست میشود. این پرایمرها در صورت درخواست به همراه کیت در اختیار شما قرار می گیرد.

در صورتی که برای سنتز cDNA از Random Hexamer استفاده شود و CT مشاهده شده برای ABL از ۲۷ بالاتر باشد، بهتر است از پرایمرهای اختصاصی برای تهیه cDNA استفاده شود.

برای استفاده، ابتدا رسوب RNA را در ۲۰ میکرولیتر از محلول پرایمرها حل نموده و سپس سایر مواد واکنش را به آن اضافه کنید.

پس از تهیه cDNA آن را با آب، دو و نیم برابر رقیق کنید. یعنی به طور مثال به ۲۰ میکرولیتر cDNA مقدار ۳۰ میکرولیتر آب (آب بدون نوکلئاز یا آب مخصوص PCR) اضافه کنید.

۹. دستور کار PCR

ابتدا تمامی لوله ها را روی یخ خرد شده قرار دهید تا بطور کامل محتویات آن ها ذوب شوند. با چند تکان ملایم از مخلوط شدن مواد داخل آن ها اطمینان حاصل کرده و برای چند ثانیه آن ها را در دور پایین سانتریفوژ کنید.

هر نمونه از نظر وجود mRNA برای دو ژن BCR-ABL (p210) و ABL باید بررسی شود. به این منظور دو آزمایش PCR در دو سری لوله های جداگانه باید انجام شود. در سری اول برای بررسی BCR-ABL علاوه بر یک لوله برای نمونه

هر بیمار، پنج لوله برای استانداردها (MA1-5) و یک لوله برای شاهد منفی (NTC) در نظر بگیرید. در سری دوم و برای بررسی ABL علاوه بر یک لوله برای نمونه هر بیمار، پنج لوله نیز برای استانداردها (MA1-5) و یک لوله برای شاهد منفی در نظر بگیرید. تعداد مورد نیاز لوله در دو سری جداگانه روی بلوک سرد بگذارید.

به هر لوله سری اول، ۲۰ میکرولیتر از MBCR 210 Mix و به هر لوله سری دوم، ۲۰ میکرولیتر از ABL Mix اضافه نمایید. سپس ۵ میکرولیتر از cDNA نمونه و یا استاندارد و یا کنترل 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.

۱۰. تنظیم دستگاه RotorGene

ابتدا اطمینان حاصل کنید که رینگ محافظ را روی روتور قرار داده اید!

دستگاه RotorGene را توسط کابل مخصوص آن با کامپیوتر متصل کرده و آن را به برق وصل کنید تا چراغ آبی جلوی آن روشن شود.

در لوح فشرده همراه کیت روی فایل "M-BCR 0.2" و یا "M-BCR Strip" (با توجه به نوع میکروتیوب استفاده شده) دوبار کلیک کنید تا برنامه باز شود.

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. دقت کنید که دو صفحه جداگانه با نام های MBCR و ABL تعریف شده اند و لوله های حاوی MBCR Mix فقط در صفحه MBCR و لوله های حاوی ABL Mix فقط در صفحه ABL باید نامگذاری شوند. در ستون "Type" نوع هر نمونه را نیز مشخص کنید، یعنی نمونه بیمار را با unknown، استانداردها را با standard و شاهد منفی را با NTC یا Negative Control تعریف کنید. غلظت استانداردها را نیز در ستون مربوطه وارد کنید.

۱۱. تنظیم دستگاه StepOne

نرم افزار دستگاه را باز کنید (StepOne software 2.*). از منوی Set Up روی دکمه Template کلیک کنید و فایل داخل لوح فشرده همراه کیت را انتخاب کنید.

از منوی سمت چپ Plate Setup و سپس دکمه Assign Targets and Samples را انتخاب کنید. یک کنترل منفی به همراه پنج استاندارد برای MBCR، یک کنترل منفی و چهار استاندارد برای ABL و چند نمونه از پیش تعریف شده اند. استانداردها، کنترل منفی و تعداد نمونه مورد نظر خود را در ردیف دلخواه کپی کنید. برای این کار 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.

۱۲. تنظیم سایر دستگاه ها

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

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

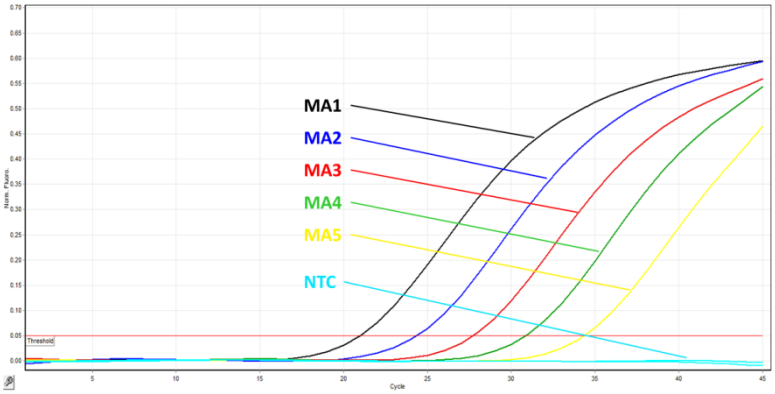
اندازه گیری تابش فلورسانس باید در دمای ۶۰ درجه و برای رنگ های FAM و VIC تنظیم شود.

MBCR Mix و ABL Mix حاوی ROX می باشند. غلظت نهایی ROX در واکنش 300nM میباشد.

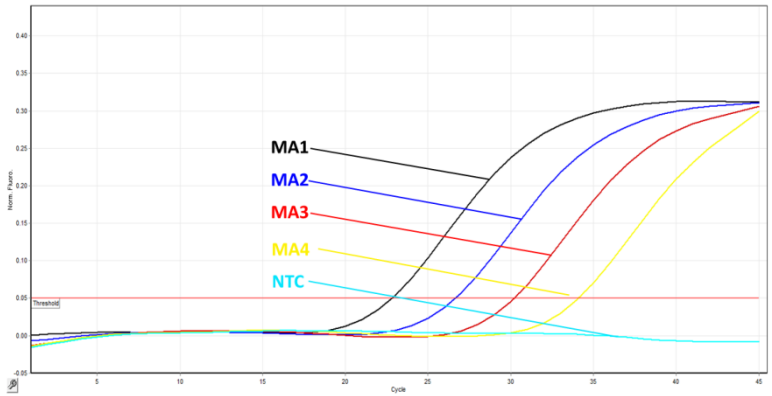
۱۳. آنالیز نتایج RotorGene

برای آنالیز نتایج به راهنمای RotorGene مراجعه کنید. به طور خلاصه از منوی Analysis، Quantitation را انتخاب کرده و روی Green دوبار کلیک کنید. در پنجره autofind threshold، دکمه cancel را بزنید و آستانه را روی ۰/۰۵ قرار داده و دکمه OK را بزنید تا منحنی استاندارد رسم و نتایج نشان داده شوند. سپس در منوی Analysis، مجدداً Quantitation و سپس Yellow را کلیک کرده و آستانه را روی ۰/۰۵ قرار دهید.

برای مشاهده نمودار مورد انتظار استانداردها، شاهد منفی و کنترل داخلی تصاویر یک و دو را ملاحظه فرمایید.



تصویر ۱: منحنی استانداردهای MBCR در کانال سبز دستگاه روتورژن



تصویر ۲: منحنی استانداردهای ABL در کانال زرد دستگاه روتورژن

نتایج را با توجه به نکات زیر تفسیر کنید:

توجه داشته باشید که افزایش تابش سبز (Green) مربوط به BCR-ABL و افزایش تابش زرد (Yellow) حاصل از ABL می باشد.

توجه داشته باشید نمونه تنها زمانی مثبت در نظر گرفته می شود که دارای منحنی سیگموییدی 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 می شود و (CT آن) در صورت وجود فاقد ارزش می باشد.

- در صورتی که نمونه در کانال MBCR/Green مثبت و دارای منحنی سیگموییدی و CT بین ۲۰ تا ۴۰ باشد، و نیز در کانال ABL/Yellow مثبت و دارای منحنی سیگموییدی و CT بین ۲۰ تا ۳۰ باشد، نمونه **مثبت** می باشد.
- در صورتی که یک نمونه در کانال MBCR/Green منفی باشد ولی در کانال ABL/Yellow مثبت و دارای منحنی سیگموییدی و CT بین ۲۰ تا ۲۷ باشد، نمونه **منفی** در نظر گرفته می شود.
- در صورتی که یک نمونه در هر دو کانال MBCR/Green و ABL/Yellow منفی باشد، نتیجه **نامعتبر** بوده و آزمایش باید **تکرار** شود. استخراج نامناسب نمونه یا نحوه نادرست انجام آزمایش میتواند دلیل چنین نتایجی باشد.
- در صورتی که یک نمونه در کانال MBCR/Green منفی باشد اما در کانال ABL/Yellow مثبت بوده و CT آن بالاتر از ۲۷ باشد، نتیجه **نامعتبر** بوده و آزمایش باید **تکرار** شود. غلظت پایین RNA می تواند دلیل این مشکل باشد.

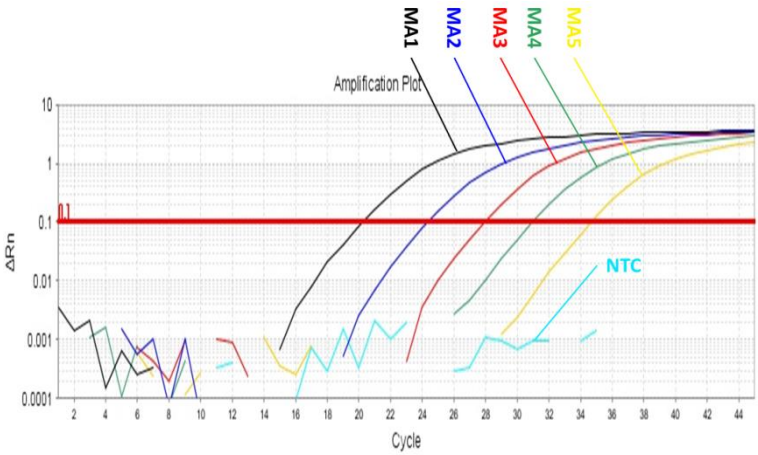
توجه! تمام نمونه های بیماران در کانال زرد باید مثبت و دارای منحنی سیگموییدی و CT بین ۲۰ تا ۲۷ باشند. از جمله دلایلی که می تواند به CT بالاتر از ۲۷ منجر شود استخراج RNA از تعداد کم گلبول های سفید (کمتر از صد هزار) و یا استفاده از total RNA به میزان کمتر از ۱۰۰ نانوگرم برای تهیه cDNA می باشد. CT بالاتر از ۲۷ برای ABL باعث کاهش حساسیت تست و

نتایج **منفی کاذب** میشود.

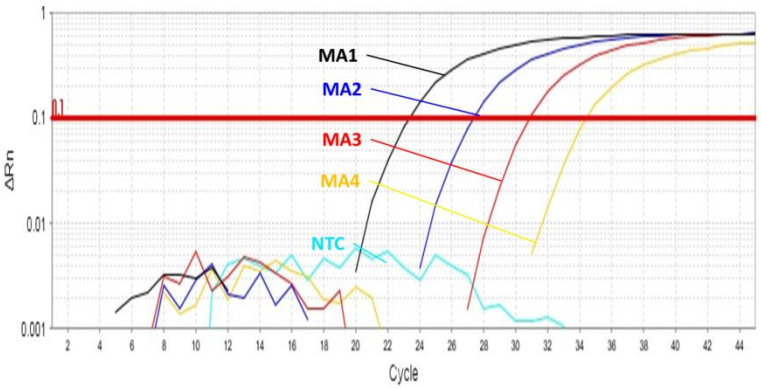
۱۴. آنالیز نتایج StepOne

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

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



تصویر ۳: منحنی استانداردهای MBCR در کانال FAM دستگاه StepOne



تصویر ۴: منحنی استانداردهای ABL در کانال VIC دستگاه StepOne

نتایج را با توجه به نکات زیر تفسیر کنید:

توجه داشته باشید که افزایش تابش FAM حاصل از BCR-ABL و افزایش تابش VIC حاصل از ABL می باشد.

توجه داشته باشید نمونه تنها زمانی مثبت در نظر گرفته می شود که دارای منحنی سیگموییدی 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 می شود و(CT آن) در صورت وجود فاقد ارزش می باشد.

- در صورتی که نمونه در کانال MBCR/FAM مثبت و دارای منحنی سیگموییدی و CT بین ۲۰ تا ۴۰ باشد، و در کانال ABL/VIC نیز مثبت و دارای منحنی سیگموییدی و CT بین ۲۰ تا ۳۰ باشد، نمونه **مثبت** می باشد.

- در صورتی که یک نمونه در کانال MBCR/FAM منفی بوده ولی در کانال ABL/VIC مثبت و دارای منحنی سیگموییدی و CT بین ۲۰ تا ۲۷ باشد، نمونه **منفی** در نظر گرفته می شود.
- در صورتی که یک نمونه در هر دو کانال MBCR/FAM و ABL/VIC منفی باشد، نتیجه **نامعتبر** بوده و آزمایش باید **تکرار** شود. استخراج نامناسب نمونه یا نحوه نادرست انجام آزمایش میتواند دلیل چنین نتایجی باشد.
- در صورتی که یک نمونه در کانال MBCR/FAM منفی بوده ولی در کانال ABL/VIC مثبت و دارای منحنی سیگموید با CT بالاتر از ۲۷ باشد، نتیجه **نامعتبر** بوده و آزمایش باید **تکرار** شود. غلظت پایین RNA می تواند دلیل این مشکل باشد.

توجه! تمام نمونه های بیماران در کانال VIC و برای ABL باید دارای منحنی سیگموییدی و CT بین ۲۰ تا ۲۷ باشند. از جمله دلایلی که می تواند به CT بالاتر از ۲۷ منجر شود استخراج RNA از تعداد کم گلبول های سفید (کمتر از صدهزار) و یا استفاده از total RNA به میزان کمتر از ۱۰۰ نانوگرم برای تهیه cDNA می باشد. CT بالاتر از ۲۷ برای ABL باعث کاهش حساسیت تست شده و باعث نتایج **منفی کاذب** میشود.

۱۵. محاسبه درصد BCR-ABL

برای ارزیابی پاسخ درمانی هر بیمار تحت درمان باید میزان درصد BCR-ABL بیمار را محاسبه کنید. مبنای این محاسبه روش NCN می باشد (Beillard E. 2003, Leukemia 17:2474). در این روش، نسبت میزان بیان BCR-ABL با میزان بیان ABL نرمال شده و درصد آن محاسبه می شود. به عبارت دیگر تیتر BCR-ABL را به تیتر ABL تقسیم کرده و در ۱۰۰٪ ضرب کنید.

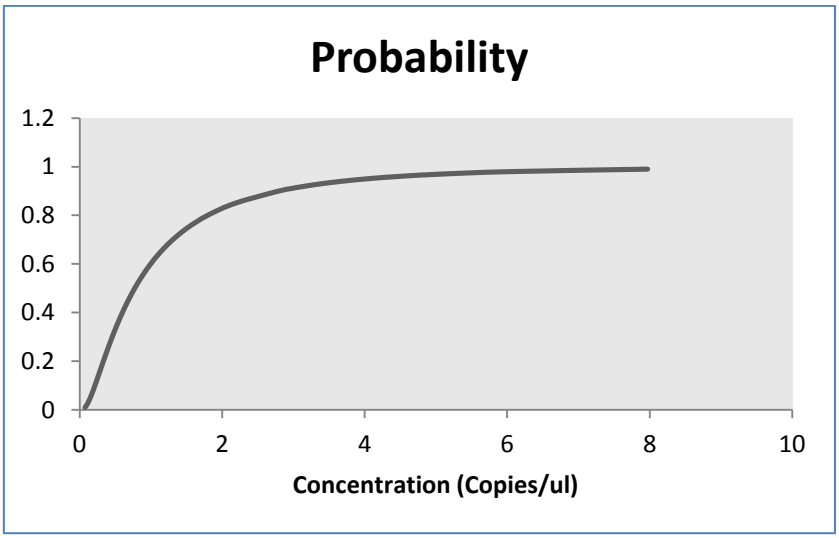
به طور معمول میزان بیان ژن ABL بیشتر از بیان BCR-ABL می باشد لذا نتیجه حاصل از محاسبه بالا عددی کمتر از ۱۰۰٪ می شود. در طول درمان نیز این میزان می تواند بسیار کاهش یافته و به ۰/۰۰۱٪ یا کمتر هم برسد. اما در مواردی مانند زمان تشخیص و پیش از شروع درمان و یا مقاومت دارویی و عود بیماری، میزان بیان ژن هدف یا BCR-ABL می تواند بالاتر از میزان بیان ژن کنترل یعنی ABL باشد. در چنین مواردی نتیجه محاسبه بالا عددی بالاتر از ۱۰۰٪ خواهد بود. چنین نتایجی پیش از این نیز گزارش شده اند. به طور مثال به جدول ۱۸مقاله J. Gabert (2003 Leukemia 17:2318) توجه کنید. در مقاله فوق نسبت BCR-ABL/ABL در خون محیطی بیماران CML بین ۴۴٪ تا ۳۰۰٪ با میانگین ۸۶٪ گزارش شده است. این میزان برای نمونه مغز استخوان بین ۴۸٪ تا ۴۴۰٪ با میانگین ۱۱۷٪ گزارش شده است. بنابراین نتایجی بالاتر از ۱۰۰٪ دور از انتظار نبوده و به سادگی نشان می دهد که بیان ژن هدف از بیان ژن کنترل بیشتر می باشد.

لازم به توجه است که از نظر بالینی اعدادی بالاتر از ۱۰٪ حدود ۶ ماه و یا بیشتر از ۱٪ حدود دوازده ماه پس از شروع درمان به معنای عدم موفقیت روش درمانی می باشد؛ در حالی که نتایجی معادل کمتر از ۱٪ حدود شش ماه پس از درمان و کمتر از ۰/۱٪ حدود دوازده ماه پس از درمان نشانه پاسخ مناسب به درمان می باشد (Baccarani M.2003, Blood 122: 872).

۱۶. حساسیت

حساسیت این کیت با استفاده از رقت های متوالی نمونه مثبت در نمونه منفی تعیین شده است. نتایج با روش پروبیت (Probit analysis) با اطمینان ۹۵٪ بررسی شده و میزان حساسیت کیت معادل ۴ کپی در میکرولیتر یا ۰/۰۸٪ برای BCR-ABL محاسبه گردید. برای دستیابی به این میزان حساسیت نمونه cDNA

باید حاوی پنج هزار نسخه از mRNA ژن ABL در هر میکرولیتر باشد. نمودار به دست آمده از روش پروبیت در تصویر شماره پنج قابل مشاهده است.



تصویر ۵: بررسی حساسیت کیت به روش Probit analysis

MBCR 210 RQ
Kit Manual

For Real-Time PCR Quantitative Detection of BCR-ABL transcripts (p210)

For use with Rotor-Gene or StepOne
Research use only

NG-WI-ASL-11-500
Version 5.1
July 2018

Novin Gene

Table of Contents:

1. Introduction.....2
2. Kit Contents 3
3. Storage and Stability 3
4. General Precautions.....4
5. Additionally Required Materials 4
6. Specimen, storage and transport.....5
7. RNA isolation.....5
8. cDNA synthesis 6
9. PCR Protocol.....6
10. Programming of RotorGene 7
11. Programming of StepOne 7
12. Programming of other machines.....8
13. Data Analysis: RotorGene.....8
14. Data Analysis: StepOne.....10
15. BCR-ABL% calculation 12
16. Analytical Sensitivity 13

MBCR 210 RQ kit is intended for the detection of BCR-ABL (p210) transcripts in peripheral blood and BCR-ABL% calculation in patients undergoing therapy. This kit is designed for use with RotorGene or StepOne machines. This kit is for research use only!

Important Note: *This kit doesn't provide reagents for RNA extraction or cDNA synthesis!*

1- Introduction

BCR-ABL also known as Philadelphia chromosome is an abnormality resulted from 9;22 translocation. Consequently ABL proto-oncogene on chromosome 9 is fused with BCR gene on chromosome 22 (b2a2 or b3a2). This fusion produces mostly 210 or 190 kDa BCR-ABL protein with constitutively active tyrosine kinase activity promoting cell proliferation and inhibition of apoptosis. The fusion gene transcript is detectable in about 95% of CML patients and some cases of ALL. Also, serial monitoring of patients for identifying and measuring BCR-ABL transcripts provides more precise assessment of response to specific therapies and prediction of those in higher risk of disease progression.

MBCR 210 RQ provides a ready-to-use system for detection and quantitation of BCR-ABL transcripts (p210, b2a2 or b3a2 break points only) as well as calculation of BCR-ABL%.

This kit is based on Real-Time PCR technology. In this method application of fluorescent probes allows detection of amplified product. Analysis of fluorescent kinetics also leads to detection of the target sequence in the reaction without requiring post-

amplification analysis, reducing the possibility of contamination with the PCR product. This kit is designed to be used with RotorGene or StepOne machines.

2- Kit Contents

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

Label	Content	Quantity
MBCR 210 Mix*	Master mix for BCR-ABL	480 µl
ABL Mix*	Master mix for ABL	480 µl
MA1	Standard 1: 100,000 copy/µl	250 µl
MA2	Standard 2: 10,000 copy/µl	250 µl
MA3	Standard 3: 1,000 copy/µl	250 µl
MA4	Standard 4: 100 copy/µl	250 µl
MA5	Standard 5: 10 copy/µl	250 µl
Water	PCR Grade Water	200 µl

* 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 especially for PCR Mix more than few times to prevent reduced sensitivity.

4- General Precautions

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

- Treat all samples as potentially infectious.

- Take utmost care to avoid RNase contamination during RNA extraction and cDNA synthesis.
- Within the pre-PCR work area, assign three separate spaces for: a) Sample storage and extraction; b) Reagent preparation where the Master Mix is aliquoted into tubes; and c) Reaction preparation area for addition of templates to the tubes.
- Always wipe the working surfaces with 70% Ethanol before and after work.
- Thaw kit components on ice completely, mix by flickering followed by a quick spin and store on crushed ice after.
- Do not place 0.2ml PCR tubes on crushed ice. Use cold blocks instead.

5- Additionally Required Materials

To use this kit, you need the following items:

- Real-Time PCR machine and accessory computer
- Refrigrated microtube centrifuge
- Vortex Mixer
- Dry Block Heater
- Adjustable pipetters and nuclease free filtered tips
- RNA extraction kit
- cDNA synthesis kit
- Nuclease free 1.7ml microtubes and PCR microtubes
- Disposable powder-free gloves
- Cold block

6- Specimen, Storage and Transport

Peripheral blood should be collected in sterile condition in proper and sterile tubes. We recommend EDTA or Citrate as anticoagulant. Whole blood should be shipped and stored at +4°C (stable for 72 hrs).

RNA can directly be extracted from whole blood. Alternately to increase sensitivity, buffy coat can be used. For optimum results, a sample should include 5 to 10 million WBC per 150µl.

Whole blood or buffy coat can be stored at +4°C for three days. Otherwise should be aliquoted and stored at -70°C which is stable for few months.

7- RNA Isolation

RNA isolation can be performed using different kits from various manufacturers. We recommend using:

- TriPure isolation Reagent (Cat. no. 1667157, Roche Applied Science, and Mannheim, Germany).
- TRIzol isolation reagent (Cat. no. 15596026, Invitrogene/Thermo Fisher, USA)
- Isol-RNA isolation reagent (Cat. no. 2302700, 5 prime/ Thermo Fisher, Germany)
- Accuzol isolation reagent (Cat. no. K-3090, Bioneer, Korea)

8- cDNA Synthesis

1ug of total RNA is required and should be reverse transcribed to cDNA using random hexamers or specific primers. Different kits are available in the market for this purpose.

These specific primers are available upon request. If the CT observed for ABL using Random Hexamer is above 27, it is recommended to use specific primers for decreasing CT for ABL gene and increasing sensitivity of the test.
Dissolve RNA pellet in 20ul of the Primers solution and then add other reagents required for cDNA synthesis.
Dilute prepared cDNA 2.5x with nuclease free water. For example to 20ul of cDNA add 30ul of nuclease free water.

9- PCR Protocol

Thaw the reagents on ice completely, followed by brief mixing and a quick spin.
Each sample should be examined for both BCR-ABL fusion (p210) gene and for ABL control gene. So two set of reactions are required. In BCR-ABL set, consider 1 tube for each sample as well as 6 tubes for the 5 standards (MA1 to MA5) and Negative control or NTC. In ABL set, consider 1 tube for each sample and 6 tubes for the 5 standards (MA1 to MA5) and Negative control or NTC. Place required number of tubes on cold block.
Pipette 20µl of MBCR 210 Mix to the first series of tubes and 20µl of ABL Mix to each tube of the second group. Continue by adding 5µl of cDNA or standard or control to each tube.
Cap the tubes and visually inspect to make sure all are caped securely. Place tubes in the machine.
Note: Working with StepOne instrument, spin tubes briefly before loading on the block.
Note: If using RotorGene attach the locking ring.

10- Programming RotorGene

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

Open the CD provided in the kit and double click on M-BCR 0.2 or on M-BCR Strip depending to tubes used. Click on Start button (Green button on the top menu). On the pop up window click start again and save the run file.

Edit sample names on both MBCR and ABL pages. Remember that tubes containing MBCR Mix should only be named in MBCR page and tubes containing ABL Mix should only be named in ABL page.

Make sure in the “Type” column, all the standards have been defined as “standard” and the relative concentrations have been entered. Patient samples should be defined as "unknown" and no template control as "NTC", respectively.

11- Programming of 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, 5 standards for MBCR, 4 standards for ABL and few samples are defined. You may change plate set up using right click options (copy, past, clear). You may also add or remove samples on “Define Targets and Samples” menu. When finished click on Start Run and save the experiment. Instrument will start shortly.

12- 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	**95C x 10 min**	1
2	**95C x 15 sec**	45
	60C x 60 sec	

Fluorescence should be collected at 60C for FAM and VIC dyes. Both of MBCR Mix and ABL Mix contain ROX with final concentration of 300nM in reaction.

13- Data Analysis: RotorGene

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 the data according to manufacturer recommendations. Perform quantitative analysis for both **MBCR (Green channel)** and **ABL (Yellow channel)**. Briefly, click on analysis menu and then, under Quantitation tab double click on “Cycling A. Green”.

Close the pop up window and manually set threshold at 0.05. Repeat above for Yellow channel and set the threshold on 0.05. Figures 1 and 2 represent typical graphs for RotorGene machine.

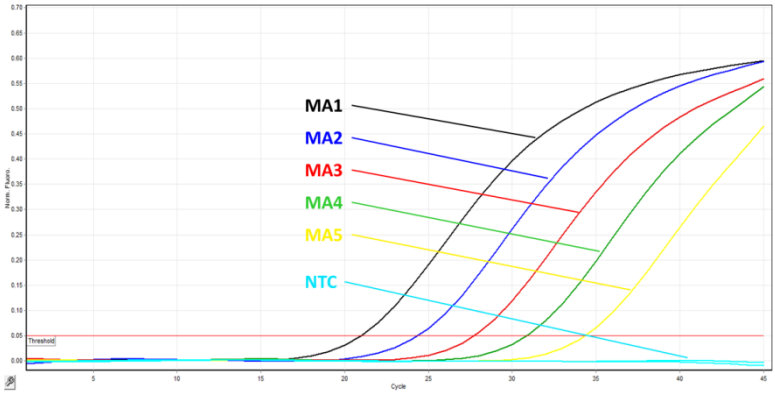


Figure 1: Typical MBCR Graph in Green Channel for RotorGene

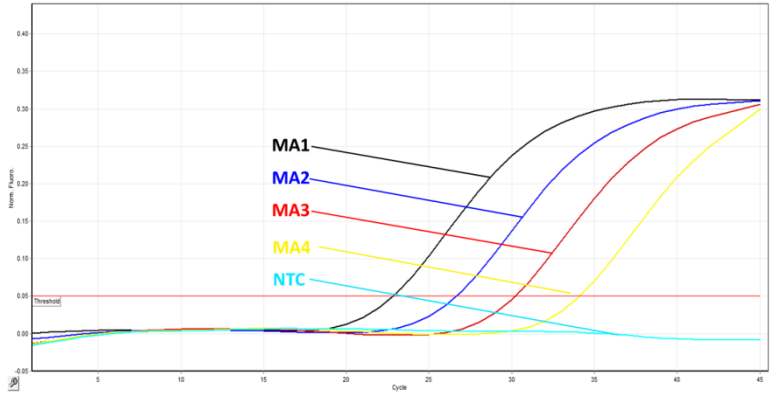


Figure 2: Typical ABL Graph in Yellow Channel for RotorGene

Consider following points when analyzing:

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.

- A sample is **Positive** if it is positive in both Green/MBCR and Yellow/ABL channels with sigmoid graphs and CT of 20-40 for Green and 20-30 for Yellow.
- A sample is **Negative** if is negative in Green/MBCR channel while it is positive in Yellow/ABL channel with a sigmoid graph and CT of 20-27.
- Results are **inconclusive** and the test should be repeated if a sample is negative in both of Green/MBCR and Yellow/ABL channels. Improper extraction or test set up could cause that.
- Results are **inconclusive** and the test should be repeated if a sample is negative in Green/MBCR channel while it is positive in Yellow/ABL channel with sigmoid graph and CT of above 27. Improper extraction or low RNA input could cause that.

*Note: All patient samples should be positive in Yellow/ABL channel with a sigmoid graph and CT of 27 or less. ABL CT greater than 27 usually happens if not enough cells have been extracted or less than 100ug RNA has been used. CTs higher than 27 reduce the sensitivity of the test and may result in **false negative** reports.*

14- Data Analysis: StepOne

Analyze the data according to manufacturer recommendations. Briefly, click on “Analyze” and set the threshold for both **MBCR/FAM** and **ABL/VIC** on 0.1.

Figures 3 and 4 represent typical graphs for StepOne machine.

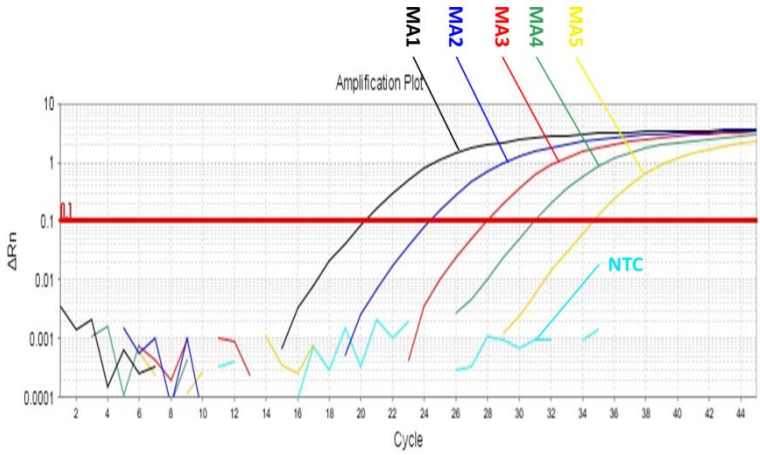


Figure 3: Typical MBCR Graph in FAM Channel for StepOne

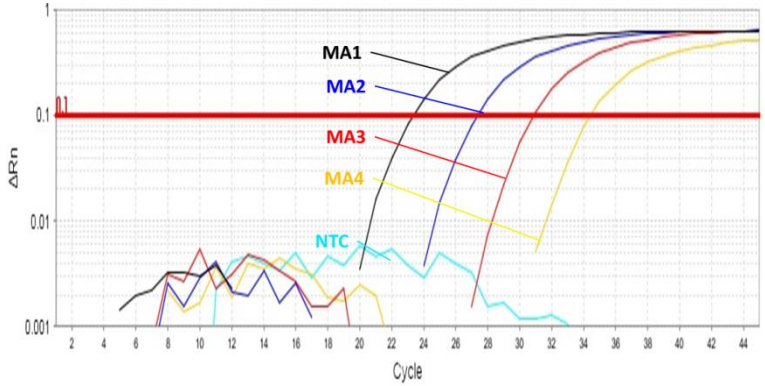


Figure 4: Typical ABL Graph in VIC Channel for StepOne

Consider following points when analyzing:

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.

- A sample is **Positive** if it is positive in both FAM/MBCR and VIC/ABL channels with sigmoid graphs and CT of 20-40 for Green and 20-30 for Yellow.
- A sample is **Negative** if it is negative in FAM/MBCR channel while it is positive in VIC/ABL channel with a sigmoid graph and CT of 20-27.
- Results are **inconclusive** and the test should be repeated if a sample is negative in both of FAM/MBCR and VIC/ABL channels. Improper extraction or test set up could cause that.
- Results are **inconclusive** and the test should be repeated if a sample is negative in FAM/MBCR channel while it is positive in VIC/ABL channel with sigmoid graph and CT of above 27. Improper extraction or low RNA input could cause that.

*Note: All patient samples should be positive in VIC/ABL channel with a sigmoid graph and CT of 27 or less. ABL CT greater than 27 usually happens if not enough cells have been extracted or less than 100ug RNA has been used. CTs higher than 27 reduce the sensitivity of the test and may result in **false negative** reports.*

15- BCR-ABL% calculation

To assess the response to therapy, BCR-ABL% value for each patient can be calculated. This kit uses NCN method for this purpose *(Beillard E. 2003, Leukemia 17:2474)*. In this method BCR-ABL% value is the BCR-ABL expression (titer) normalized by the ABL expression (titer) and then multiplied by 100%.

Usually ABL gene expression is higher than BCR-ABL fusion gene expression. Therefore results of above calculation would be a number less than 100%. This value may fall even below 0.001% in optimum cases. However at diagnosis and in case of relapse, BCR-ABL expression may surpass ABL gene expression. As a result, ratio of BCR-ABL/ABL would be above 100%. Such results have been reported previously too. For example please note table 18 of the paper published by J. Gabert *et al* (*2003, Leukemia 17:2318*) for CML patients. He reported a range of 44% to 300% with average of 86% for peripheral blood and range of 48%-440% with average of 117% for bone marrow samples. Therefore a ratio above 100% is not unexpected and simply means higher expression of the fusion gene compared to the control gene.
It should be mentioned that a ratio of less than 1% within 6 months or less than 0.1% within 12 months after treatment denote optimum response to treatment while ratio of above 10% 6 months after or above 1% 12 months after treatment, denote failure in treatment (*Baccarani M.2003, Blood 122: 872*).

16- Analytical Sensitivity

Analytical sensitivity of the kit has been determined by examining dilution series of positive cDNA in negative cDNA, providing positive samples ranging from 50% to 0.001%. Results were assessed with probit analysis. The analytical detection limit of the kit (LOD) was determined as 4 copies/ul of BCR-ABL or 0.08% in the context of 5,000 copies/ul of ABL mRNA. This means that when a cDNA contains about 5,000 copies/ul of ABL transcripts,

there is 95% probability that a sample of 0.08% positive will be detected. Figure 5 shows probit analysis graph.

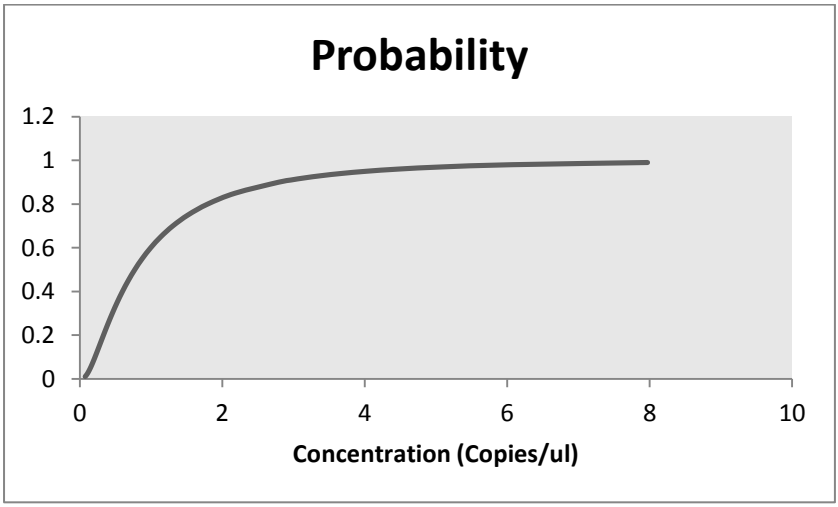


Figure 5: Probit Analysis of Test Sensitivity