راهنمای کیت mbcr 190 RQ

جهت تشخیص و کمیت سنجی(BCR-ABL (P190

به روش Real-Time PCR

جهت کار با دستگاه Rotor-Gene یا StepOne

مخصوص تحقیقات

NG-WI-ASL-12-302

ویرایش ۳/۳

اردیبهشت ۱۳۹۶

Novin Gene

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. استخراج RNA..... ۶

۸.تهیه cDNA..... ۶

۹. دستور کار PCR..... ۶

۱۰. تنظیم دستگاه Rotor-Gene..... ۷

۱۱. تنظیم دستگاه StepOne..... ۸

۱۲. تنظیم سایر دستگاه ها..... ۹

۱۳. آنالیز نتایج Rotor-Gene..... ۹

۱۴. آنالیز نتایج StepOne ۱۲

۱۵. محاسبه ٪BCR-ABL..... ۱۴

کیت **mbcr 190 RQ** جهت تشخیص ناهنجاری کروموزومی یا ترانسلوکاسیون BCR-ABL (p190) 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 Rotor Gene 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 می شود که در اغلب موارد وزن مولکولی آن ۲۱۰ یا ۱۹۰ کیلو دالتون است. این این پروتئین که 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 ژن هیبرید 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 (p190) (فقط برای جابجایی e1a2) 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 می‌گیرد. در این روش با استفاده از پروب های نشاندار شده به رنگ های فلورسنت می توان محصول PCR را بررسی نمود بدون این که 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 Rotor-Gene 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 190 MIX	میکس آماده برای mbcr *	۴۸۰ میکرولیتر
ABL MIX	میکس آماده برای ABL *	۴۸۰ میکرولیتر
m1	استاندارد mbcr1: یک‌صد هزار کپی در میکرولیتر	۱۵۰ میکرولیتر
m2	استاندارد mbcr2: ده هزار کپی در میکرولیتر	۱۵۰ میکرولیتر
m3	استاندارد mbcr3: یک هزار کپی در میکرولیتر	۱۵۰ میکرولیتر
m4	استاندارد mbcr4: یک صد کپی در میکرولیتر	۱۵۰ میکرولیتر
m5	استاندارد mbcr5: ده کپی در میکرولیتر	۱۵۰ میکرولیتر
A1	استاندارد ABL1: یک صد هزار کپی در میکرولیتر	۱۵۰ میکرولیتر
A2	استاندارد ABL2: ده هزار کپی در میکرولیتر	۱۵۰ میکرولیتر
A3	استاندارد ABL3: یک هزار کپی در میکرولیتر	۱۵۰میکرولیتر
A4	استاندارد ABL4: یک صد کپی در میکرولیتر	۱۵۰ میکرولیتر
Water	آب مخصوص PCR	۲۰۰ میکرولیتر

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

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 این مواد به ویژه میکس PCR بیش از سه بار خودداری کنید زیرا باعث کاهش حساسیت و عدم کارایی آن ها 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 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)

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.

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 داشته باشند به ویژه سمپلر. 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 درب 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 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.
- 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 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 میتواند 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 نگهداری 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 کیت 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 به‌طور 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 اسپین کنید.

هر نمونه از نظر وجود mRNA برای دو ژن BCR-ABL (p190) 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 (m1-5) و یک لوله برای شاهد منفی یا NTC در نظر بگیرید. در سری دوم و برای بررسی ABL علاوه بر یک لوله برای نمونه هر بیمار، چهار لوله نیز برای استانداردها (A1-4) و یک لوله برای شاهد منفی یا NTC در نظر بگیرید. تعداد مورد نیاز لوله PCR یا استریپ در دو سری مجزا از هم روی بلوک آلومینیوم (با دمای صفر تا ۴ درجه سانتیگراد) بگذارید.

به هر لوله سری اول ۲۰ میکرولیتر از mbcr 190 MIX و به هر لوله سری دوم ۲۰ میکرولیتر از ABL MIX اضافه کنید. 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 Rotor-Gene

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

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

در لوح فشرده همراه کیت روی فایل mbcr 0.2 و یا mbcr 0.1 (با توجه به نوع لوله های 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

لوح فشرده همراه کیت را در کامپیوتر مرتبط به 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 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 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 (save) 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	**95°C x 10 min**	1
2	**95°C x 15 sec**	45
	60°C x 60 sec	

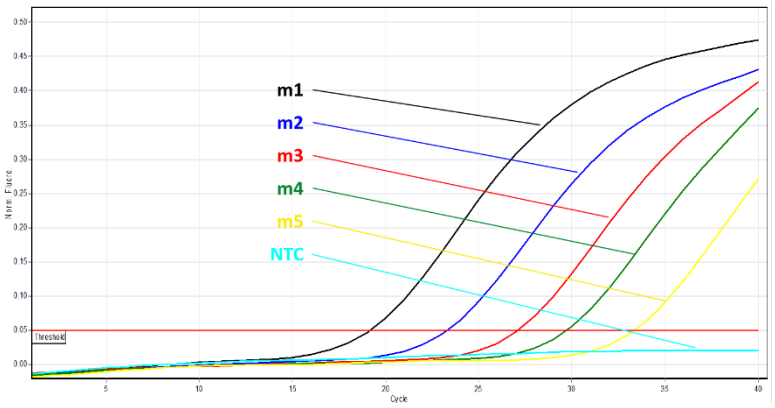
اندازه گیری تابش فلورسانس باید در دمای ۶۰ درجه و برای رنگ های FAM و VIC تنظیم شود.

mbcr Mix و ABL Mix موجود در کیت حاوی ROX می باشند. غلظت نهایی ROX در واکنش 300nM میباشد.

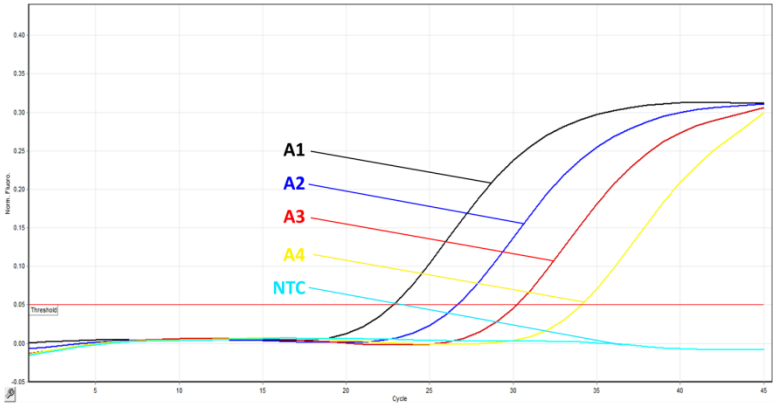
۱۳. آنالیز نتایج Rotor-Gene

برای آنالیز نتایج به راهنمای Rotor-Gene 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 پس از رسم منحنی استاندارد نتایج در جدول پایین صفحه نشان داده شوند. سپس در منوی Analysis مجدداً Quantitation و سپس Yellow را کلیک کرده و برای آن نیز 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 mbcrدر کانال سبز دستگاه روتورژن



تصویر ۲: منحنی استانداردهای ABL در کانال زرد دستگاه روتورژن

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.

نتایج را با توجه به نکات زیر تفسیر کنید:

- 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.

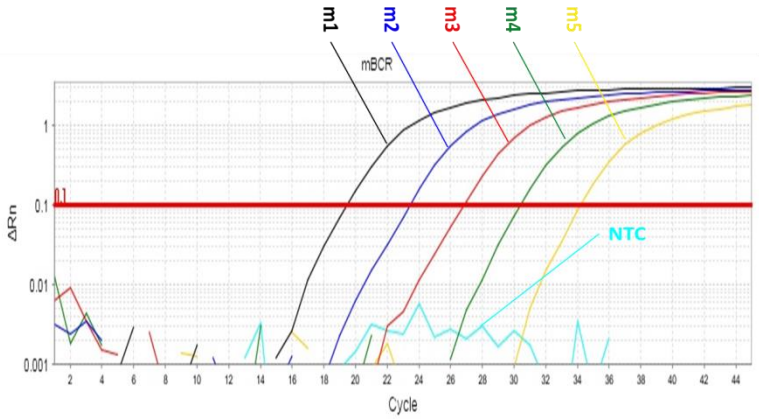
- در صورتی که یک نمونه در هر دو کانال mbcr/Green و ABL/Yellow منفی باشد، نتیجه نامعتبر بوده و آزمایش باید تکرار شود. استخراج نامناسب نمونه یا نحوه نادرست انجام آزمایش میتواند دلیل چنین نتایجی باشد.
- در صورتی که یک نمونه در کانال mbcr/Green منفی باشد اما در کانال ABL/Yellow مثبت بوده و CT آن بالاتر از 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 شده و باعث نتایج منفی کاذب می‌شود.

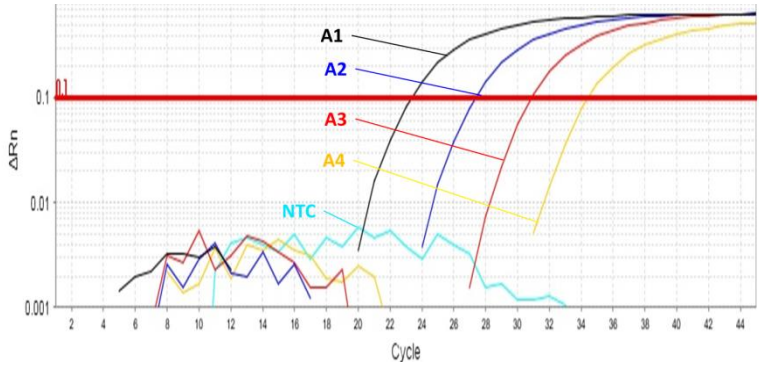
۱۴. آنالیز نتایج StepOne

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 آستانه را روی ۰/۱ قرار دهید.

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



تصویر ۳: منحنی استانداردهای mbcr 190 در کانال FAM دستگاه StepOne



تصویر ۴: منحنی استانداردهای ABL در کانال VIC دستگاه StepOne

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 میشود که دارای منحنی سیگموییدی و فاز لگاریتمی باشد و تنها در این حالت **CT** معتبر بوده و

قابل استناد و تفسیر می‌باشد. 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 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 می‌باشد.
- 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 می‌شود.
- 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 27 باشد، نتیجه نامعتبر بوده و آزمایش باید تکرار شود. غلظت پایین RNA می‌تواند 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 BCR-ABL%

برای ارزیابی پاسخ درمانی هر بیمار تحت درمان باید میزان 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 می‌شود. به عبارت دیگر تیتر BCR-ABL را به تیتر ABL تقسیم کرده و در ۱۰۰٪ ضرب کنید.

mbcr 190 RQ Kit Manual

For Real-Time PCR Quantitative Detection of BCR-ABL transcripts (p190)

For use with Rotor-Gene or StepOne
Research use only

NG-WI-ASL-12-302
Version 3.3
May 2017

Novin Gene

Table of Contents:

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

mbcr 190 RQ kit is intended for the detection of BCR-ABL (p190) transcripts in peripheral blood and BCR-ABL% calculation in patients undergoing therapy. This kit is designed for use with Rotor Gene 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

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. This fusion produces BCR-ABL protein, mostly 210kDa (b2a2 or b3a2) or 190kDa (e1a2), 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 190 RQ provides a ready-to-use system for detection and quantitation of BCR-ABL transcripts (p190, e1a2 break point 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 Rotor-Gene or StepOne machines.

2. Kit Contents

The kit contains a manual, a CD with Rotor-Gene and StepOne templates and following reagents:

Label	Content	Quantity
mbcr 190 Mix*	Master mix for BCR-ABL	480 µl
ABL Mix*	Master mix for ABL	480 µl
m1	mbcr Standard 1: 100,000 copy/µl	150 µl
m2	mbcr Standard 2: 10,000 copy/µl	150 µl
m3	mbcr Standard 3: 1,000 copy/µl	150 µl
m4	mbcr Standard 4: 100 copy/µl	150 µl
m5	mbcr Standard 5: 10 copy/µl	150 µl
A1	ABL Standard 1: 100,000 copy/µl	150 µl
A2	ABL Standard 2: 10,000 copy/µl	150 µl
A3	ABL Standard 3: 1,000 copy/µl	150 µl
A4	ABL Standard 3: 100 copy/µl	150 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.
- Keep PCR Mix tube at -20°C at all times. Take it out just before use and return it to freezer immediately 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 specific 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 (p190) gene and for ABL control gene in two separate set of reactions. In BCR-ABL set consider 1 tube for each sample as well as 6 tubes for the 5 standards (m1 to m5) and Negative control or NTC. In ABL set consider 1 tube for each sample and 5 tubes for the 4 standards (A1 to A4) and Negative control or NTC.
Place required number of tubes on cold block.
Pipette 20µl of mbcr 190 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 Rotor-Gene attach the locking ring.

10. Programming Rotor-Gene

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 mbcr 0.2 or on mbcr 0.1 (according to the tubes used) to open the program.

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 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 on desired location. 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	**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. Both of mbcr Mix and ABL Mix contain ROX with final concentration of 300nM in reaction.

13. 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 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 Rotor-Gene machine.

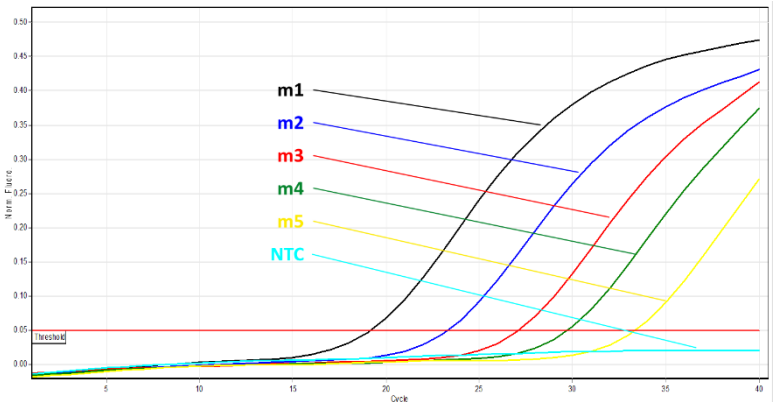


Figure 1: Typical mbcr Graph in Green Channel for Rotor-Gene

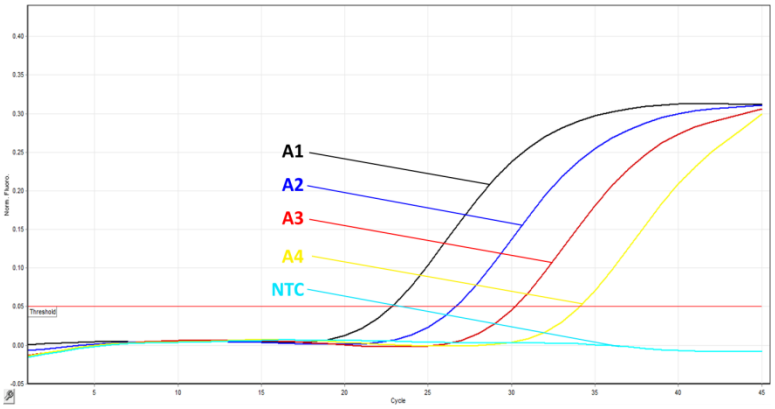


Figure 2: Typical ABL Graph in Yellow Channel for Rotor-Gene

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 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 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.

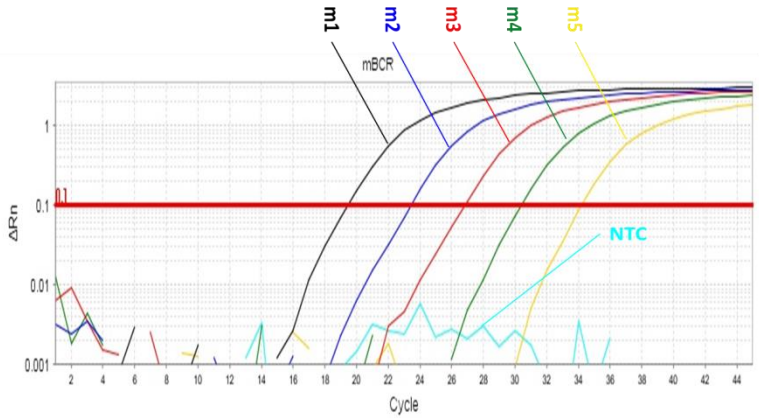


Figure 3: Typical mbcr Graph in FAM Channel in StepOne

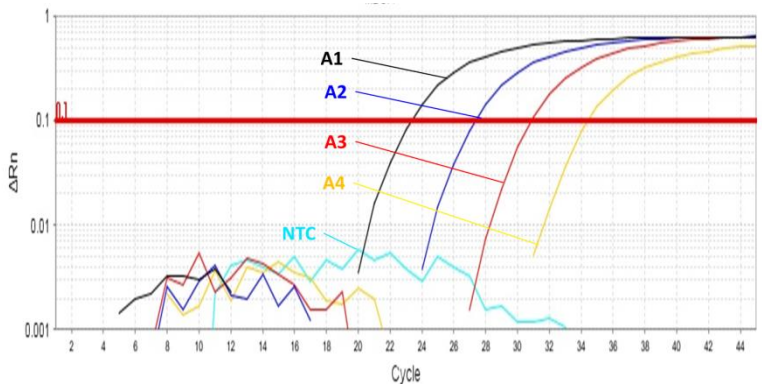


Figure 4: Typical ABL Graph in VIC Channel in StepOne.

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 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%.