

Code: FAMTA.MA.IN.35

Rev: 05-01

Date: 1405/04



دفترچه راهنما

***famta*SCREEN BCR-ABL, Mbcr (p210)
Real-Time PCR Kit**

کیت تشخیص مولکولی (p210) Mbcr، BCR-ABL

به روش Real-Time PCR

Version 05-01



Cat. No:

2040226 (24 Reactions)

2040227 (48 Reactions)

2040228 (96 Reactions)



info@famta.co

www.famta.co



0939-188 3994

02122004254-5

صفحه	عنوان
۲.....	کاربرد
۲.....	مقدمه
۲.....	اساس آزمایش
۳.....	محتویات کیت
۳.....	مواد و تجهیزات لازم
۴.....	دستگاه های سازگار با کیت
۴.....	شرایط نگهداری کیت
۴.....	نمونه و شرایط نگهداری آن
۴.....	احتیاط ها و هشدار ها
۵.....	استخراج ژنوم
۵.....	آماده سازی واکنش
۶.....	اضافه کردن الگو
۷.....	تنظیم برنامه دستگاه
۷.....	تفسیر نتایج
۸.....	مداخله گر ها
۸.....	پایداری
۹.....	عبث یابی
۱۰.....	پشتیبانی

کاربرد

این کیت جهت تشخیص ترانسلوکاسیون t(9;22) (کروموزوم فیلادلفیا) است که مارکر اصلی در تشخیص و تأیید بیماری لوسمی میلوئید مزمن (CML) میباشد.

مقدمه

کروموزوم فیلادلفیا یک ناهنجاری کروموزومی حاصل از جابجایی بین کروموزوم های ۹ به ۲۲ می باشد. در نتیجه این جابجایی، ژن ABL در کروموزوم شماره ۹ در کنار ژن BCR در کروموزوم ۲۲ قرار می گیرد ((t(9;22)(q34;q11) و ژن فیوژن BCR-ABL تشکیل می شود. بیان این ژن باعث تولید پروتئین نوترکیب BCR-ABL با وزن مولکولی ۲۱۰، یا ۱۹۰ کیلو دالتون می شود. رونوشت p210 که به رونوشت ماژور (MbcR) معروف است شایع ترین نوع آن است. این ژن فیوژن تقریباً در اکثر بیماران CML (p210) و برخی بیماران ALL (p190) مشاهده می شود.

اساس آزمایش

کیت تشخیص کیفی *famtaSCREEN BCR-ABL MbcR (p210)* برای شناسایی رونوشت های p210 BCR-ABL1 در RNA استخراج شده از نمونه های بالینی انسانی طراحی گردیده است. این کیت به عنوان یک آزمون تشخیصی و در کنار سایر یافته های بالینی و آزمایشگاهی مورد استفاده قرار می گیرد. این کیت بر پایه فناوری Real-Time RT-PCR و روش TaqMan Probe عمل می کند. طراحی کیت حاضر به صورت OneStep RT-PCR بوده و RNA استخراج شده از نمونه مستقیماً به میکس واکنش Real-Time PCR اضافه شده و سنتز cDNA داخل میکروتیوپ واکنش انجام میگردد، سپس ناحیه اختصاصی p210 BCR-ABL1 با استفاده از آغازگرها و پروب اختصاصی تکثیر و آشکارسازی می شود. سیگنال فلورسانس تولید شده در طی فرآیند تکثیر به صورت همزمان توسط دستگاه Real-Time PCR پایش شده و امکان تشخیص کیفی حضور رونوشت p210 BCR-ABL1 را فراهم می آورد. وجود کنترل داخلی در کیت مذکور، صحت مراحل استخراج، رونویسی معکوس و تکثیر را ارزیابی می کند.

کیت ها بر اساس تعداد تست قابل انجام، به صورت ۲۴، ۴۸ و ۹۶ واکنشی طراحی شده اند.

محتویات کیت

جدول (۱) محتویات کیت

Color	Title	Volume per vial	No. of vials 24 Reactions	No. of vials 48 Reactions	No. of vials 96 Reactions
Blue	PCR Buffer Mix ¹	520 µl	1	2	4
Blue	RT Enzyme mix ²	104 µl	1	2	4
Purple	p210 Primers & Probe Mix ³	52 µl	1	2	4
Green	ABL Primers & Probe Mix ⁴	52 µl	1	2	4
Red	p210 Positive Control ⁵	100 µl	1	1	2
Yellow	ABL Positive Control ⁶	100 µl	1	1	2
White	DDW ⁷	600 µl	1	1	2

۱. بافر میکس

۲. Reverse Transcriptase, RNase inhibitor and hot-start version of PCR enzyme شامل Enzyme Mix

۳. پرایمرها و پروب p210

۴. پرایمرها و پروب ABL

۵. حاوی ژنوم p210

۶. حاوی ژنوم ABL

۷. آب DNase-RNase Free

مواد و تجهیزات لازم

✓ دستگاه Real-Time PCR که دارای رنگ های خوانش FAM باشد.

✓ هود زیستی کلاس II و Workstation

✓ بلوک های آلومینیومی (Ice Racks) که از قبل در یخچال قرار گرفته و سرد باشند.

✓ سمپلر های متغیر (0.5-10 µL و 10-100 µL)

✓ سر سمپلر فیلتردار DNase-RNase Free

✓ میکروتیوب DNase-RNase Free، 1.5 ml

✓ میکروتیوب های مخصوص PCR

✓ دستگاه مینی اسپین ورتکس

✓ کیت استخراج Total RNA

✓ دستکش لاتکس بدون پودر

دستگاه های سازگار با کیت

این کیت بر روی دستگاه ریل تایم پی سی آر Rotor-Gene Q شرکت QIAGEN ارزیابی شده است و در تمامی دستگاه های Real time PCR که دارای کانال خوانش سبز (رنگ FAM) باشند قابل استفاده است.

شرایط نگهداری کیت

کیت را تا زمان انقضا که بر روی کیت درج شده است در فریز ۲۰- درجه سانتیگراد نگهداری نمایید. از مخلوط کردن محلولها و موادی که شماره سریال (Lot Number) متفاوت دارند خودداری نمایید و از کیتی که تاریخ انقضای آن گذشته است استفاده نکنید. کیت به همراه یخ خشک ارسال می شود. دقت کنید که اجزای کیت پس از دریافت منجمد بوده و از نظر ظاهری نیز سالم باشند.

ذوب مکرر (بیشتر از ۳ بار) اجزای کیت ممکن است بر عملکرد سنجش تاثیر بگذارد به همین منظور در ابتدا، اجزای کیت را تقسیم (Aliquot) کنید.

در صورت نگهداری کیت مطابق با شرایط فوق، مواد داخل آن حداکثر به مدت ۱۲ ماه پایدار خواهند بود.

نمونه و شرایط نگهداری آن

نمونه مناسب جهت انجام آزمون p210، خون محیطی و نمونه مغز استخوان است. نمونه باید در لوله استریل حاوی ماده ضد انعقاد EDTA گرفته شده و بعد از جداسازی، بلافاصله نسبت به استخراج Total RNA اقدام گردد. در صورتی که امکان استخراج RNA فراهم نباشد میبایست به نسبت مناسب با محلول تریزول مخلوط شده (طبق دفترچه راهنمای محلول تریزول)، سپس تا زمان استخراج در فریزر ۲۴- درجه سانتیگراد نگهداری شود. پیشنهاد می شود قبل از فریز کردن، ۲ ویال جهت استخراج انجام تست و احیاناً تکرار آن، و یک ویال جهت Backup، در میکروتیوب های 1.5 mL DNase-RNase Free جداسازی نمایید.

به هیچ وجه از نمونه حاوی هپارین و EDTA در غلظت های بالا استفاده نشود.

نمونه هایی که به صورت زیر باشند، کیفیت لازم جهت استفاده برای تست p210 را دارا نمی باشند:

- ۱- نمونه هایی که خون آنها همولیز شده باشد.
- ۲- نمونه هایی که در اطراف لوله نمونه گیری لکه های خون مشاهده گردد.
- ۳- نمونه هایی که بیش از دو ساعت در دمای محیط نگهداری شده باشند.
- ۴- نمونه هایی که بیش از ۱۲ ساعت در دمای یخچال نگهداری شوند.
- ۵- نمونه هایی که بیش از ۲ سال در دمای ۲۰- نگهداری شده باشد.

احتیاط ها و هشدارها

این کیت در مصارف تشخیصی کاربرد دارد. استناد به نتایج این کیت بدون استفاده از سایر داده های بالینی، آزمایشگاهی و پاراکلینیکی توصیه نمی شود.

رعایت اقدامات ایمنی عمومی در هنگام کار با نمونه های عفونی، محلول ها و ریجنتها الزامیست. قبل از انجام آزمون دستکش لاتکس بدون پودر پوشیده و با استفاده از یک گاز استریل آغشته به وایتکس ۱۰٪ سطوح کاری را تمیز و ضد عفونی نمایید. در پایان دستکش و گاز استریل را دور انداخته و دستکش جدیدی پوشیده و با گاز استریل آغشته به الکل ۷۰٪ سطوح کاری را کاملاً پاک و ضد عفونی نمایید. سپس به مدت حداقل ۲۰ دقیقه لامپ UV هود و یا Workstation را روشن نموده تا فضای زیر آن ضد عفونی گردد. استفاده از کیت باید توسط افرادی که آشنایی کامل با اصول و روش های تشخیص مولکولی Real-Time PCR همچنین توانایی آنالیز و تفسیر داده ها را داشته باشند، انجام پذیرد. به دلیل حضور پروب های دارای فلورسنت در ویال مستر میکس، از تماس نور مستقیم با مخلوط واکنش جلوگیری نمایید و تمامی مراحل آماده سازی و انجام مراحل تست را در شرایط بدون نور انجام دهید. مقررات کار با نمونه های عفونی باید بر اساس رعایت اصول صحیح آزمایشگاهی (GLP) انجام گیرد. جهت جلوگیری از بروز آلودگی حین کار (Carry over contamination) استفاده از مکان های مجزا جهت آماده سازی و انجام واکنش ضروری است. از سه اتاق مجزا برای عملیات هایی نظیر استخراج نمونه، آماده سازی واکنش ها و فرایند تکثیر استفاده کنید. تست را دقیقاً مطابق با پروتکل ارائه شده در دفترچه ی راهنما کیت انجام دهید. از تغییر دادن حجم واکنش خودداری نمایید، زیرا سبب کاهش حساسیت کیت می گردد.

استخراج Total RNA

توصیه می گردد از محلول تریزول جهت استخراج RNA مورد استفاده در آزمایشات تشخیص ترانسلوکاسیون ها استفاده گردد.

مشخصات RNA مناسب جهت تستهای مذکور بصورت زیر می باشد:

جدول ۲) جدول مشخصات RNA

ویژگی RNA	RNA مناسب	RNA نامناسب
غلظت	200 - 500 ng	کمتر از 10 یا بیشتر از 1000 ng
نسبت A260/A280	1.8 - 2.0	کمتر از 1.7
نسبت A260/A230	≥ 2	کمتر از 2

آماده سازی واکنش

تهیه مستر میکس

از کالیبره بودن سمپلرها قبل از آماده سازی واکنش اطمینان حاصل نمایید. بر اساس تعداد واکنش هایی که میخواهید انجام دهید ویال های کیت شامل RT Enzyme Mix، PCR Buffer Mix، Primers & Probes، Positive Control

و DDW را از فریزر خارج کرده و اجازه دهید تا بر روی Ice Rack به تدریج ذوب شوند و پس از اطمینان از ذوب شدن، ویال ها را به طور مختصر ورتکس و سپس اسپین نمایید.

جهت اطمینان از نتایج به دست آمده از نمونه ها تست را به صورت دوتایی (Duplicate) ران نمایید. اینکار به خصوص در مورد نمونه هایی که به طور نامناسب استخراج شده باشند و یا RNA استخراج شده از کیفیت مناسب برخوردار نباشد، ضروری است.

برای هر ران کاری حتما از هر دو کنترل مثبت و منفی استفاده نمایید.

جهت انجام تست، دو میکس مختلف برای هر بیمار مطابق جداول ۳ و ۴ آماده نمایید.

براساس تعداد بیماران، میکروتیوب روی بلوک آلومینیومی خنک بگذارید. (برای هر بیمار دو میکروتیوب برمی داریم، یکی برای میکس ۱ و دیگری برای میکس ۲).

جهت میکس p210 علاوه بر بیماران، یک میکروتیوب برای کنترل مثبت p210 و یک میکروتیوب برای NTC اضافه کنید.

جهت میکس ABL علاوه بر بیماران، یک میکروتیوب برای کنترل مثبت ABL و یک میکروتیوب برای NTC اضافه کنید و بر اساس جداول زیر نسبت به تهیه ماستر میکس اقدام کنید.

جدول (۳) آماده سازی p210 Mix

p210Mix	1 (rxns)
PCR Buffer Mix	10 µL
RT Enzyme mix	2 µL
p210 Primers & Probe	2 µL
DDW	1 µL
Master Mix Volume	15 µL

جدول (۴) آماده سازی ABL Mix

ABL Mix	1 (rxns)
PCR Buffer Mix	10 µL
RT Enzyme mix	2 µL
ABL Primers & Probe	2 µL
DDW	1 µL
Master Mix Volume	15 µL

اضافه کردن الگو

ماستر میکس آماده شده را به کمک پیتینگ و یا ورتکس آرام، هموزن و سپس اسپین نمایید.

مقدار 15 µL از ماستر میکس تهیه شده را به میکروتیوب ها که بر روی بلوک آلومینیومی سرد شده (Ice Rack) قرار دارند اضافه نمایید.

مقدار 5 µL از RNA استخراج شده (برای بیماران)، همچنین کنترل مثبت را در میکروتیوب های مربوطه اضافه کنید.

نکته: برای جلوگیری از آلودگی حین کار به ترتیب میکروتیوب NTC، نمونه های بیماران و سپس میکروتیوب کنترل مثبت را آماده نمایید.

سپس بلوک آلومینیومی سرد (Ice Rack) را به اتاقی که دستگاه Real-Time PCR قرار دارد منتقل کنید.

تنظیم برنامه دستگاه

دستگاه های Real-Time PCR که دارای رنگ خوانش FAM باشند، جهت استفاده با کیت حاضر مناسب هستند. در انتخاب دتکتور دقت کنید.

برنامه دمایی برای آزمون Real-Time PCR

جدول ۵) برنامه دمایی

	Temperature	Hold	Acquisition	Cycle
cDNA Synthesis	50°C	30 min	-----	1X
Initial denaturation and polymerase activation	95°C	15 min	-----	1X
Denaturation	95°C	20 sec	-----	40X
Annealing and elongation	60°C	60 sec	Green	

تنظیمات اختصاصی دستگاه Rotorgene جهت بهینه سازی خوانش:

Gain optimization:

Optimize Acquiring → perform optimization before 1st Acquisition

تفسیر نتایج

در دستگاه روتورژن جهت تست دو صفحه p210 و ABL تعریف کنید از منوی Analysis گزینه Quantitation را انتخاب کرده و روی گزینه های p210 و ABL کلیک کنید و Threshold را روی 0.05 قرار دهید.

از نوار بالای پنجره Quantitation Analysis، گزینه های Dynamic Tube و Slope Correct را روشن نموده و گزینه Outlier Removal (جهت مماس کردن نمودار NTC با خط صفر) را در بازه ۱ تا ۱۰ درصد تنظیم نمایید. در صورتیکه نمونه با میکس ABL دارای منحنی سیگموئیدی بوده و Ct آن کمتر از ۲۷ باشد و با میکس p210 دارای منحنی سیگموئیدی بوده و Ct آن کمتر از ۳۷ باشد، نمونه مثبت می باشد.

در صورتیکه نمونه با میکس ABL فاقد منحنی سیگموئیدی باشد یا Ct آن بالاتر از ۲۷ باشد استخراج باید تکرار شود.

توجه: دقت نمایید که شرط دارا بودن شکل سیگموئیدی برای تفسیر نتایج نمودار ضروری است. در دستگاه

RotorGene Q می توانید جهت اصلاح شیب نمودار ها و مشاهده نمودارهای سیگموئیدی، گزینه Slope correction را روشن و یا خاموش نمایید.

جدول ۶) تفسیر نتایج یک آزمون

Detection Channel		Result Interpretation
FAM (p210, Target)	FAM (ABL)	
Positive	Positive	p210 RNA detected
Negative	Positive	p210 not detected . The sample is negative
Negative	Negative	PCR inhibition or reagent failure. Repeat test or Extraction again.

مداخله گر ها (Interference)

با توجه به تست های انجام شده بر روی تکرارهای سه تایی از نمونه هایی که دارای مواد مداخله گر احتمالی در فرایند آزمون Real-Time PCR می باشند، نتایج نشان می دهد که مواد مداخله گر به میزان اعلام شده در جدول زیر اثر مهارکنندگی بر روی تست ندارند. استفاده از نمونه هایی که دارای مقادیر بیشتر از اعداد اعلام شده در جدول زیر باشند، توصیه نمی شود.

جدول ۷) مواد مداخله کننده

ماده مداخله کننده و غلظت آن
هموگلوبین ۲۰ گرم بر دسی لیتر
EDTA با غلظت ۱.۸ میلی گرم بر میلی لیتر
سیترات سدیم ۰.۰۱ مولار
تری گلیسرید ۴۰۰ میلی گرم بر دسی لیتر
آلبومین با غلظت ۶۰ میلی گرم بر میلی لیتر
بیلی روبین ۰.۶ میلی گرم بر دسی لیتر
هیپارین ۰.۰۵ واحد بر میلی لیتر
سدیم کلرید ۱۵۰ میلی مولار
ایزوپروپانول ۵ درصد حجمی/حجمی

پایداری (Stability)

دمای نگهداری کیت حاضر ۲۰- درجه سانتی گراد می باشد. در صورت نگهداری کیت در دمای ذکرشده، محتویات کیت تا حداقل ۱۲ ماه پایدار می باشند. جهت حفظ پایداری بهینه، اکیدا توصیه می شود نگهداری کیت مطابق با شرایط اعلام شده در دفترچه صورت پذیرد. در غیر این صورت، جهت راهنمایی بیشتر لطفا با کارشناسان ما تماس حاصل فرمایید.

عیب یابی (Troubleshooting)

در صورتی که هیچ سیگنالی در میکروتیوب مربوط به کنترل مثبت خوانده نشود:

علل احتمالی:

- نمونه ی کنترل مثبت به تیوب مربوطه اضافه نشده است.
- کانال های انتخاب شده مطابق با SOP نمی باشند.
- پروفایل دمایی انتخاب شده مطابق با SOP نمی باشد.
- میکس نکردن و یا میکس ناکافی نمونه ی کنترل مثبت.
- رعایت نشدن شرایط نگهداری یکی یا بیشتر اجزاء کیت و یا اتمام تاریخ اعتبار کیت

راه حل:

- آزمون را دوبار تکرار کرده، کنترل مثبت را به آرامی ورتکس و سپس اسپین نموده و عمل پیپتینگ را به درستی انجام دهید.

دریافت منحنی تکثیر در نمونه NTC و NC جهت توالی هدف (p210):

علل احتمالی:

- آلودگی در فضای کار و یا ریجنت های کیت اتفاق افتاده است.

راه حل:

- فضای کار، سمپلر ها و ... را مطابق SOP مربوطه تمیز کرده و لامپ های UV زیر ورک استیشن ها و اتاق را به مدت حداقل ۲۰ دقیقه روشن نمایید، ریجنت های آلوده شده را دور ریخته و از ریجنت های جدید استفاده کنید.

یادداشت:

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

همکار گرامی:

در صورت هر گونه سوال و اشکال با کارشناسان شرکت فمتا تماس حاصل فرمایید.

شماره تلفن پشتیبانی: ۰۹۰۴ ۴۷۳ ۹۰۰۰

ایمیل پشتیبانی: support@famta.co