



famtaSCREEN BCR-ABL mbcr (p190)

Real-Time PCR Kit

کیت تشخیص مولکولی (p190) BCR-ABL mbcr

به روش Real-Time PCR

راهنمای سریع

Cat Number: 2040229 (24 Reactions)

2040230 (48 Reactions)

2040231 (96 Reactions)



مشخصات محصول

کیت تشخیص کیفی (p190) famtaSCREEN BCR-ABL mbcr برای شناسایی رونوشت‌های p190 BCR-ABL1 در RNA استخراج شده از نمونه‌های بالینی انسانی طراحی گردیده است. این کیت به عنوان یک آزمون تشخیصی و در کنار سایر یافته‌های بالینی و آزمایشگاهی مورد استفاده قرار می‌گیرد. این کیت بر پایه فناوری Real-Time RT-PCR و روش TaqMan Probe عمل می‌کند. طراحی کیت حاضر به صورت OneStep RT-PCR بوده و RNA استخراج شده از نمونه مستقیماً به میکس واکنش Real-Time اضافه شده و سنتز cDNA داخل میکروتیوب واکنش انجام می‌گردد، سپس ناحیه اختصاصی p190 BCR-ABL1 با استفاده از آغازگرها و پروب اختصاصی تکثیر و آشکارسازی می‌شود. سیگنال فلورسانس تولیدشده در طی فرایند تکثیر به صورت همزمان توسط دستگاه Real-Time PCR پایش شده و امکان تشخیص کیفی حضور رونوشت p190 BCR-ABL1 را فراهم می‌آورد. وجود کنترل داخلی در واکنش، صحت مراحل استخراج، رونویسی معکوس و تکثیر را ارزیابی می‌کند.

محتویات کیت

جدول ۱) محتویات کیت

Color	Title	Volume per vial	24 Rxns	48 Rxns	96 Rxns
Blue	PCR Buffer Mix	520 µl	1	2	4
Blue	RT Enzyme Mix	104 µl	1	2	4
Purple	P190 Primers & Probes Mix	52 µl	1	2	4
Green	ABL Primers & Probes Mix	52 µl	1	2	4
Red	P190 Positive Control	100 µl	1	1	2
Yellow	ABL Positive Control	100 µl	1	1	2
White	DDW	600 µl	1	1	2

شرایط نگهداری

- کیت را تا زمان انقضا در فریز ۲۰- درجه سانتیگراد نگهداری نمایید.
- از کیتی که تاریخ انقضای آن گذشته است استفاده نکنید.
- از مخلوط کردن محلولها و موادی که شماره سریال (Lot Number) متفاوت دارند خودداری نمایید.
- ذوب مکرر (بیشتر از ۲ بار) اجزای کیت ممکن است بر عملکرد سنجش تأثیر بگذارد به همین منظور در ابتدا اجزای کیت را Aliquot کنید.

مواد و تجهیزات لازم

- دستگاه Real-Time PCR که دارای رنگ خوانش FAM باشد.
- بلوک های آلومینیومی (Ice Racks) که از قبل در یخچال قرار گرفته و سرد باشند.
- سمپلرهای متغیر (10-100 µL و 0.5-10 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 Real-Time PCR

دستگاه های Real-Time PCR که دارای رنگ خوانش FAM باشد، جهت استفاده با کیت حاضر مناسب هستند.

نمونه و شرایط نگهداری آن

نمونه مناسب جهت انجام آزمون p190، 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 می‌شود 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 هیپارین و EDTA در غلظت های بالا استفاده نشود.

نمونه هایی که به صورت زیر باشند، کیفیت لازم جهت استفاده برای تست p190 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.

نمونه هایی که بیش از ۲ سال در دمای ۲۰- نگهداری شده باشد

احتیاط ها و هشدار ها

این کیت در مصارف تشخیصی کاربرد دارد. استاندارد 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 سطوح کاری را به وسیله وایتکس ۱۰٪ و سپس الکل ۷۰٪ ضدعفونی نمایید.
- سپس به مدت حداقل ۲۰ دقیقه لامپ UV هود و یا Workstation را روشن نموده تا فضای زیر آن ضد عفونی گردد.
- 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.
- هرگز درب ویال های تکثیر شده را باز نکنید. بعد از اتمام آزمون فوراً ویال های تکثیر شده را از دستگاه Real-Time PCR خارج نموده و در ظرف محتوی هیپوکلریت سدیم ۱۰٪ قرار داده و نسبت به اتوکلاو آن اقدام و در فضایی خارج از آزمایشگاه معدوم نمایید.
- چنانچه نمونه های آزمایشگاه شما به تعداد کافی نمیباشند، به محض دریافت کیت آن را در حجم های کمتر Aliquot کرده و تا زمان استفاده، در فریزر و دمای ۲۰- درجه سانتی گراد نگهداری نمایید.

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 کالبره 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 حتماً 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 p190 علاوه بر بیماران، یک میکروتیوب برای کنترل مثبت p190 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 مستر میکس اقدام کنید.

Number of Reactions (rxns)	1
PCR Buffer Mix	10 µL
RT Enzyme mix	2 µL
p190 Primers & Probes	2 µL
DDW	1 µL
Master Mix Volume	15 µL

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

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
سدیم کلرید ۱۵۰ میلی مولار	هیبارین ۰/۰۵ واحد بر میلی لیتر
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 مطابق با شرایط اعلام شده در دفترچه، نگهداری کیت صورت پذیرد. در غیر این صورت جهت راهنمایی بیشتر، لطفا با کارشناسان ما تماس حاصل فرمایید.

یادداشت:

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

* برای دسترسی به دفترچه‌ی راهنما کد QR را اسکن نمایید.

این کیت براساس قوانین و مقررات گواهینامه ایزو 13458 تولید شده است.



آدرس: تهران، خیابان شریعتی، خیابان کدویی، کوچه‌ی طباطبایی، پلاک ۲

ایمیل پشتیبانی: support@famta.co

تلفن پشتیبانی: ۰۹۰۴ ۴۳۷ ۹۰۰۰

اضافه کردن الگو

- مستر میکس آماده شده را به کمک پیتپینگ و یا ورتکس آرام، هموژن و سپس اسپین نمایید.
- مقدار 15 µL از مستر میکس تهیه شده را به میکرو تیوب های مخصوص PCR که بر روی بلوک آلومینیومی سرد شده (Ice Rack) قرار دارند اضافه نمایید.
- مقدار 5 µL از RNA استخراج شده (برای بیماران)، همچنین از هریک از استاندارد ها را در میکروتیوب های مربوطه اضافه نموده و حداقل ۲ بار و به آرامی پیتپینگ نمایید.
- نکته: برای جلوگیری از آلودگی حین کار به ترتیب لوله NTC، نمونه‌های بیماران و سپس لوله ی 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 دکتور دقت کنید.

- نکته: بهتر است برنامه دمایی قبل از آماده کردن مستر میکس و اضافه کردن الگو، تنظیم گردد.

برنامه دمایی برای آزمون Real-Time PCR

جدول (۵) برنامه ی دمایی

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

تنظیمات اختصاصی دستگاه Rotorgene جهت بهینه سازی خوانش:

Gain optimization:

Optimize Acquiring → perform optimization before 1st Acquisition

تفسیر نتایج (Result Interpretation)

در دستگاه روتورژن جهت تست دو صفحه p190 و ABL تعریف کنید از منوی Analysis گزینه Quantitation را انتخاب کرده و روی گزینه های p190 و ABL کلیک کنید و Threshold را روی 0.05 قرار دهید.

در صورتیکه نمونه با میکس ABL دارای منحنی سیگموتیدی بوده و Ct آن کمتر از ۲۷ باشد و با میکس p190 دارای منحنی سیگموتیدی بوده و Ct آن کمتر از ۳۷ باشد، نمونه مثبت می باشد.

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

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

در دستگاه Rotor Gene Q میتوانید جهت اصلاح شیب نمودار ها و مشاهده نمودارهای سیگموتیدی، گزینه‌ی Slope correction را روشن و یا خاموش نمایید.

جدول (۶) تفسیر نتایج یک آزمون

Detection Channel		Result Interpretation
FAM (p190, Target)	FAM (ABL)	-----
Positive	Positive	p190 RNA detected
Negative	Positive	p190 not detected . The sample is negative
Negative	Negative	PCR inhibition or reagent failure. Repeat test or Extraction again.

CCTCGAGGACAAGGCGTTCC
CAGTCCAGATGACCAAA
TACCCFAMTAAGACC
AATGAAAGATC
CTAGGA
AACT