

ژن BCR سه نوع مختلف ژن غیرطبیعی BCR-ABL می تواند ایجاد شود. این ژن ها به ترتیب با نام های P190 (اگزون 1)، P210 (اگزون 13 یا 14) و P230 (اگزون 19) شناخته می شوند که فراوانی پروتئین P210 در مقایسه با P190 و P230 حدود ده برابر است. این اتصال غیرطبیعی به نام کروموزوم فیلادلفیا نیز شناخته می شود. ژن غیرطبیعی BCR-ABL1 یک تغییر ژنتیکی اکتسابی است. حضور این ژن غیرطبیعی منجر به تولید پروتئین غیرطبیعی می شود که با القای میتوز کنترل نشده در سلول های خونی باعث ایجاد سلول های سرطانی می شود.

حضور این ژن غیرطبیعی در انواع خاصی از سرطان خون از جمله: acute lymphoblastic leukemia (ALL) و به ندرت در acute myeloid leukemia (AML) شناسایی این ژن هم در تشخیص نوع سرطان ایجاد شده و هم در ردیابی اثر درمان در بیماران مبتلا اهمیت دارد.

کیت BehDx BCR-ABL P210 Real Time PCR جهت شناسایی RNA تولید کننده پروتئین P210 در سلول های خونی بیماران بر اساس روش TaqMan Real Time PCR طراحی و عرضه شده است.

4. حیطه کاربری

کیت BehDx BCR-ABL P210 Real Time PCR یک کیت کیفی با کاربرد تحقیقاتی است که بر مبنای روش Real-Time PCR و همچنین استفاده از تکنیک TaqMan طراحی شده است. این کیت بر اساس تکثیر ژن BCR-ABL (P210) و هیبریداسیون پروب اختصاصی آن قادر به تشخیص این ژن از نمونه های خون و نمونه های آسپیره مغز و استخوان می باشد.

5. نکات مهم : لطفا قبل از استفاده مطالعه شود.

- قبل از شروع فرآیند تمامی ریجنت ها بایستی در دمای محیط قرار گیرند تا ذوب شوند.
- زمان ذوب شدن ریجنت ها بیش از 30 دقیقه نباشد تا از تخریب مواد جلوگیری شود.
- پس از ذوب ریجنت ها، همگن و میکروفیوژ شوند.
- کلیه مراحل بایستی بر روی بلوک سرد انجام گیرد.
- از میکروتیوب های DNase & RNase free و تیپ های فیلتردار DNase & RNase free استفاده شود.

6. تجهیزات و مواد لازم که در کیت فراهم نشده است

- دستگاه های Real-Time PCR سازگار (به بخش 8 دستگاه های سازگار مراجعه شود)
- کیت ها و یا دستگاه های استخراج RNA مناسب (به بخش 10-1 استخراج RNA مراجعه شود)
- دستگاه سانتریفیوژ و میکرواسپین

1. محتویات کیت

CAT.NO	محتویات	BCR-ABL P210 (24RXN)	BCR-ABL P210 (48RXN)	BCR-ABL P210 (96RXN)	رنگ درب تیوب
BD406	BCR-ABL P210 Master Mix	1x432 µl	2x432 µl	4x432 µl	آبی
BD407	BCR-ABL P210 Mix	1x120 µl	2x120 µl	4x120 µl	قهوه ای
BD408	ABL Mix	1x120 µl	2x120 µl	4x120 µl	قهوه ای
BD409	BCR-ABL P210 RTase Enzyme	1x48 µl	2x48 µl	4x48 µl	زرد
BD410	BCR-ABL P210 Positive Control	1x40 µl	1x80 µl	2x80 µl	قرمز
BD411	ABL Positive Control	1x40 µl	1x80 µl	2x80 µl	قرمز
BD412	BCR-ABL P210 Negative Control	1x40 µl	1x80 µl	1x160 µl	سبز

2. شرایط پایداری و نگهداری

- حمل کیت بایستی در شرایط دمای -20 °C و در حداقل زمان ممکن صورت گیرد.
- پس از دریافت کیت، محتویات بایستی مطابق شرایط درج شده بر روی جعبه کیت نگه داری شوند.
- در صورت نگه داری کیت در دمای نامناسب در حین حمل از آن استفاده نشود.
- در صورت سالم نبودن بسته بندی کیت و یا عدم تطابق شکل ظاهری مواد مصرفی با توضیحات از آن استفاده نشود.
- کیت را در دمای ثابت نگه داری نموده و از نور خورشید محافظت کنید.
- از تکرار متعدد چرخه انجماد / ذوب پرهیزید.
- در صورت باز نشدن مواد مصرفی و نگه داری در دمای توصیه شده این محصول تا پایان تاریخ انقضای مندرج بر روی جعبه کیت پایدار خواهد ماند.

3. معرفی

ژن غیرطبیعی BCR-ABL1 زمانی تشکیل می شود که قطعات کروموزوم های 9 و 22 شکسته شوند و مکان های خود را عوض کنند. قطعه شکسته کروموزوم 9 شامل بخشی از ژن ABL1 است و به بخشی از ژن BCR در کروموزوم 22 متصل می شود. شکست در ژن ABL به صورت معمول قبل از اگزون 2 رخ می دهد اما بسته به ناحیه شکست

- میکروتیوب PCR و تیپ های فیلتر دار DNase & RNase free
- دستکش بدون پودر یک بار مصرف

7. نمونه های قابل استفاده

- برای جلوگیری از انتقال آلودگی به محلول مسترمیکس، بلافاصله پس از دریافت کیت، تیوب های کنترل مثبت و منفی تیوب را در فریزر مجزا از تیوب حاوی مسترمیکس قرار دهید.
- از کیت و یا اجزای کیت بعد از گذشت تاریخ انقضا استفاده نشود.
- این محصول توسط افراد متخصص و آموزش دیده در زمینه تست های مولکولی قابل استفاده می باشد، هنگام کار از گان آزمایشگاهی و دستکش یکبار مصرف استفاده کنید.
- در هنگام استفاده از ریجنت های کیت توصیه می شود از دستکش های بدون پودر استفاده شود.
- تمامی نمونه ها می توانند باعث انتقال آلودگی شوند و بایستی در حمل و استفاده از آن ها دقت شود. از تماس مستقیم با نمونه ها خودداری شود. لوازم و موادی که با نمونه ها در ارتباط بوده بایستی به درستی ضد عفونی و اتوکلاو شوند.
- از تماس نمونه یا ریجنت ها با پوست، چشم و غشاهای مخاطی خودداری کنید. در صورت تماس با پوست، چشم یا غشاهای مخاطی، فوراً با آب بشویید و سریعاً به پزشک مراجعه کنید.
- تمامی محتویات کیت پس از استفاده جزء دسته ی زباله های زیستی خطرناک می باشد و باید به درستی دفع شود.

- نمونه خون جمع آوری شده در تیوب های حاوی EDTA
- نمونه های آسپیره مغز استخوان (2-3 ml) جمع آوری شده در تیوب های حاوی EDTA
- نمونه ها تا قبل از استخراج RNA بایستی نهایتاً به مدت 24 ساعت در دمای 2-8 درجه سانتی گراد نگه داری گردد. با توجه به ناپایداری RNA انسانی، پیشنهاد می شود که در صورت امکان در کمتر از 6 ساعت استخراج RNA صورت گیرد و در صورت نیاز RNA به مدت طولانی تر در دمای 20°C- نگهداری شود. برای مدت های طولانی تر (بیش از یک هفته) RNA استخراج شده را در دمای کمتر از 40°C- نگهداری کنید.

توجه: استفاده از هپارین به عنوان ضد انعقاد در فرایند PCR اختلال ایجاد می کند، به همین دلیل از لوله های حاوی هپارین استفاده نشود. همچنین نمونه بیمارانی که هپارین مصرف می کنند برای PCR مناسب نیست.

8. دستگاه های سازگار

کیت برای استفاده در دستگاه های PCR زیر توسعه و اعتبارسنجی شد.

- Rotor-Gene® Q5/6 plex Platform (QIAGEN)
- Mic qPCR cyclers (Bio Molecular Systems)
- ABI Step One Plus (Applied Biosystems)
- Tianlong Real-Time PCR systems (Xi'an Tianlong Science and Technology)
- QuantStudio™ 5 Pro Real-Time PCR System
- CFX96™ Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad)
- CFX96™ Deep Well Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad)
- LightCycler® 480 Instrument II (Roche)

توجه: این کیت برای استفاده در دستگاه های بدون نیاز به ROX طراحی گردیده است.

توجه: دستگاه های مانند ABI Step One و ABI Step One Plus که نیازمند ROX به عنوان رنگ غیر فعال (Passive Dye) هستند، این قسمت از تنظیمات بایستی در حالت خاموش قرار گیرد.

9. نکات ایمنی

- از جا به جایی و یا ترکیب ریجنت های کیت با Lot Number مختلف جدا خودداری کنید.

10. فرآیند (دستورالعمل استفاده)

1-10. استخراج RNA

برای جداسازی RNA استفاده از کیت های زیر توصیه می شود :

1. BehPrep Blood&Cells RNA Extraction Kit (Cat Number: BP109)
2. BehPrep TRI Total RNA Extraction Kit (Cat Number: BP108)
3. BehGene Trizol (Cat Number: BR133)

استخراج RNA توسط کیت و دستگاه های استخراج با کیفیت و خلوص کافی نیز مورد تایید است.

10-2. آماده سازی مسترمیکس

1. برای هر بیمار دو تیوب تست در نظر گرفته شود. یک تیوب برای میکس BCR-ABL و یک تیوب برای میکس ABL.
2. برای تهیه تیوب نهایی BCR-ABL، 9 µl از BCR-ABL P210 Master Mix، 5 µl از BCR-ABL P210 Mix و 1 µl از BCR-ABL RTase Enzyme ABL P210 RTase Enzyme برای هر نمونه به لوله اصلی واکنش اضافه نمایید.

Number of reactions	1	15
BCR-ABL P210 Master Mix	9 µl	135 µl
BCR-ABL P210 Mix	5 µl	75 µl
BCR-ABL P210 RTase Enzyme	1 µl	15 µl
Total	15 µl	225 µl

11. تفسیر نتایج

نمودارهای مثبت بایستی به صورت کاملاً سیگموئیدی باشد و نمودارهایی که شکل سیگموئیدی ندارند می بایستی به عنوان منفی در نظر گرفته شوند.

خط آستانه (threshold) بر اساس نمونه مثبت و یا کنترل مثبت تعیین شود.

در جدول زیر نحوه تفسیر نتایج بطور خلاصه آورده شده است

کانال FAM		تفسیر
BCR-ABL	ABL	
+	+/-	• نمونه برای ژن غیرطبیعی BCR-ABL1 مثبت می باشد.
-	+	• نمونه برای ژن غیرطبیعی BCR-ABL1 منفی می باشد.
-	-	• وجود مهارکننده در واکنش PCR • انجام ناصحیح مراحل فرآیند تست و آماده سازی واکنش، تست از مرحله استخراج یا PCR تکرار شود.

12. حساسیت تحلیلی:

حساسیت تحلیلی کیت حاضر با تجزیه و تحلیل سری رقت پلاسمید هر دو ژن ABL و BCR-ABL P210 تعیین شده است که میزان حساسیت کیت برای هر دو ژن $1 \text{ copies}/\mu\text{l}$ محاسبه شده است.

نماد	مفهوم	نماد	مفهوم
	کاربرد تحقیقاتی		محدودیت دمایی
	اطلاعات کارخانه		تعداد تست
	تاریخ تولید		تاریخ انقضا
	از تابش نور دور نگه داشته شود		خطرات زیستی
	احتیاط		حاوی دستورالعمل استفاده از محصول
	شماره سری ساخت		کد کان

3. برای تهیه تیوب نهایی ABL، $9 \mu\text{l}$ از BCR-ABL P210 Master Mix، $5 \mu\text{l}$ از ABL Mix و $1 \mu\text{l}$ از BCR-ABL P210 RTase Enzyme برای هر نمونه به لوله اصلی واکنش اضافه نمایید.

Number of reactions	1	15
BCR-ABL P210 Master Mix	$9 \mu\text{l}$	$135 \mu\text{l}$
ABL Mix	$5 \mu\text{l}$	$75 \mu\text{l}$
BCR-ABL P210 RTase Enzyme	$1 \mu\text{l}$	$15 \mu\text{l}$
Total	$15 \mu\text{l}$	$225 \mu\text{l}$

4. میکروتیوب را ابتدا ورتکس و سپس برای مدت کوتاهی میکروفیوژر نمایید.

10-3. آماده سازی واکنش PCR

- $15 \mu\text{l}$ از مسترمیکس نهایی شده در مرحله قبل را به تیوب های PCR اضافه گردد.
- به هر تیوب تست $5 \mu\text{l}$ از RNA استخراج شده بیمار یا $5 \mu\text{l}$ از کنترل ها (کنترل مثبت یا منفی) را اضافه گردد.
- میکس نمونه و مسترمیکس، و همچنین کنترل و مسترمیکس کاملاً همگن و میکروفیوژر گردد.
- پیشنهاد می شود تمام این مراحل بر روی یخ یا بلوک سرد انجام شود.

Reaction setup	
Final Master Mix	$15 \mu\text{l}$
Sample or Control	$5 \mu\text{l}$
Total	$20 \mu\text{l}$

10-4. برنامه دمایی

تیوب ها را در دستگاه قرار داده و مطابق برنامه زیر تست را انجام دهید.

program	Temperature [°C]	Hold [hh:mm:ss]	Cycles	Analysis Mode
Revers transcription	50	00:10:00	1	None
Activation	95	00:03:00	1	None
Amplification	95	00:00:10	45	Quantification
	60*	00:00:45		

*خوانش در دمای 60°C انجام می گیرد و کانال FAM بایستی روشن شوند.

در این آزمون سیگنال FAM (سبز) نشان دهنده وضعیت ژن BCR-ABL (P210) و ABL می باشد.