راهنمای کیت

AML1-ETO RQ

پاییز ۱۴۰۴، ویرایش ۱/۲

جهت تشخیص و کمیت سنجی AML1-ETO

به روش Real-Time PCR

مخصوص تحقیقات

24 (Cat# AML1-ETORQ24)

48 (Cat# AML1-ETORQ48)

96 (Cat# AML1-ETORQ96)

NG-WI-ASL-31-102

RUO

شرکت نوین ژن پارس ویرا

تهران، خیابان ایرانشهر، پلاک ۵. کد پستی: ۱۵۸۱۶۳۳۳۳۶

Novin Gene

فهرست مندرجات:

۱. مقدمه ۳
۲. حیطه کاربرد ۳
۳. اطلاعات زمینه ای ۳
۴. اساس آزمایش ۴
۵. محتویات کیت ۴
۶. مدل های بسته بندی ۵
۷. شرایط نگهداری و حمل و نقل کیت ۵
۸. محدودیت کاربرد ۵
۹. سایر موارد مورد نیاز ۶
۱۰. احتیاط و اقدامات لازم ۶
۱۱. نمونه مناسب و شرایط نگهداری و انتقال آن ۷
۱۲. عوامل مزاحم ۸
۱۳. استخراج RNA ۸
۱۴. تهیه cDNA ۹
۱۵. دستورکار PCR و مراحل آزمایش ۹
۱۶. دستگاه ها و نرم افزارها ۱۰
۱۷. تنظیم دستگاه Rotor-Gene ۱۰
۱۸. تنظیم دستگاه StepOne ۱۱
۱۹. تنظیم سایر دستگاه ها ۱۱

۲۰. آنالیز نتایج Rotor-Gene ۱۳
۲۱. آنالیز نتایج StepOne ۱۶
۲۲. محاسبه درصد AML1-ETO ۱۹
۲۳. حساسیت ۱۹
۲۴. روش امحاء ۲۰
۲۵. پشتیبانی فنی ۲۰
۲۶. اطلاعات تماس ۲۰
۲۷. منابع ۲۰
۲۸. توضیحات برچسب ۲۱

۱. مقدمه

کیت AML-1 ETO RQ جهت تشخیص ناهنجاری کروموزومی یا ترانسلوکاسیون AML1-ETO و محاسبه درصد ترانسلوکاسیون AML1-ETO در بیماران به روش Real-time PCR طراحی شده است. در این روش، توالی مورد نظر به کمک پرایمرها و پروب اختصاصی شناسایی می‌شود. همچنین میکس دیگر این کیت حاوی سری ثانویه‌ای از پرایمرها و پروب جهت شناسایی ژن ABL به عنوان کنترل داخلی می‌باشد. کنترل داخلی از گزارش منفی کاذب ناشی از استخراج نامناسب و یا مهار PCR جلوگیری می‌کند. این کیت جهت مصارف تحقیقاتی کاربرد دارد.

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

۲. حیطه کاربرد

کیت AML1-ETO RQ جهت تشخیص بیان ژن AML1-ETO در خون محیطی و محاسبه درصد رونویسی آن در بیماران تحت درمان با روش Real-Time PCR را فراهم می‌کند. این کیت برای استفاده با دستگاه‌های Rotor-Gene و StepOne و MIC طراحی شده است.

۳. اطلاعات زمینه ای

شایع ترین نوع ناهنجاری کروموزومی در مبتلایان به لوسمی میلوییدی حاد (Acute Myeloid Leukemia/AML) ترانسیوکاسیون AML1-ETO است. این ناهنجاری حاصل جابجایی کروموزومی (8;21) می‌باشد که در نتیجه آن، ژن AML1 در کروموزوم شماره ۲۱، در مجاورت ژن ETO در کروموزوم شماره ۸ قرار می‌گیرد و یک ژن هیبرید تشکیل می‌شود. این مجاورت سبب تولید پروتئین

هیبرید AML1-ETO می‌شود. این پروتئین با مهار فعالیت فاکتورهای رونویسی موثر در تمایز میلوییدی، مانع تمایز سلولی می‌شود.
این ناهنجاری کروموزومی تقریبا در ٪۷ بزرگسالان و ٪۱۲ کودکان مبتلا به AML مشاهده می‌شود.

۴. اساس آزمایش

در این کیت، شناسایی توالی مورد نظر با استفاده از روش واکنش زنجیره ای پلیمراز Polymerase Chain Reaction/PCR انجام می‌شود. طی این واکنش ماده ژنتیکی با استفاده از پرایمرهای اختصاصی شناسایی و تکثیر می‌شود. در روش Real-Time PCR توالی تکثیر شده با استفاده از پروب‌های فلورسنت قابل تشخیص می‌گردد. بنابراین، با بررسی میزان فلورسنت در طی واکنش می‌توان وجود توالی هدف را در نمونه تشخیص داد، بدون آنکه پس از پایان واکنش نیاز به انجام مراحل بعدی باشد. با توجه به اینکه در این روش نیازی به بررسی محصول واکنش با روش‌هایی مشابه الکتروفورز وجود ندارد، امکان ایجاد آلودگی نیز به لحاظ تئوری وجود نخواهد داشت.

۵. محتویات کیت

این کیت شامل یک دفترچه راهنما، فلش کارت و مواد زیر می‌باشد:

برچسب	محتوا	حجم
AML1-ETO Mix	میکس آماده برای AML1-ETO *	۴۸۰ میکرولیتر
ABL Mix	میکس آماده برای ABL *	۴۸۰ میکرولیتر
AE1	استاندارد ۱ AML1-ETO: صد هزار کپی در میکرولیتر	۱۵۰ میکرولیتر
AE2	استاندارد ۲ AML1-ETO: ده هزار کپی در میکرولیتر	۱۵۰ میکرولیتر
AE3	استاندارد ۳ AML1-ETO: هزار کپی در میکرولیتر	۱۵۰ میکرولیتر

AE4	استاندارد ۴ AML1-ETO: صد کپی در میکرولیتر	۱۵۰ میکرولیتر
AE5	استاندارد ۵ AML1-ETO: ده کپی در میکرولیتر	۱۵۰ میکرولیتر
A1	استاندارد ۱ ABL: صد هزار کپی در میکرولیتر	۱۵۰ میکرولیتر
A2	استاندارد ۲ ABL: ده هزار کپی در میکرولیتر	۱۵۰ میکرولیتر
A3	استاندارد ۳ ABL: هزار کپی در میکرولیتر	۱۵۰ میکرولیتر
A4	استاندارد ۴ ABL: 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 واکنشی

۶. مدل های بسته بندی

کیت در قالب های بیست وچهار، چهل و هشت، و نود و شش واکنش بیست و پنج میکرولیتری در دسترس می‌باشد.

۷. شرایط نگهداری و حمل و نقل کیت

تمامی مواد کیت 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 محتویات کیت بیش از سه بار خودداری کنید زیرا باعث کاهش حساسیت و عدم کارایی آن ها می‌شود.

همچنین برای حمل و نقل کیت از یخ خشک استفاده نمایید.

۸. محدودیت کاربرد

- این کیت تنها برای استفاده توسط کاربران حرفه ای و آموزش دیده طراحی شده است.

- تمامی مراحل کار بایستی مطابق دفترچه راهنمای کامل کیت انجام شود و هرگونه تغییری در آن منجر به بروز خطا در نتایج میگردد.
- از محتویات کیت نباید پس از گذشت تاریخ انقضای درج شده روی کیت استفاده شود.
- در صورت تغییر رنگ لیبل حرارتی (به صورتی یا قرمز) حتی به صورت جزئی کیت نباید مورد استفاده قرار گیرد.
- این کیت تنها برای مصارف تحقیقاتی طراحی شده و برای تشخیص طبی (IVD) مورد تایید نمی‌باشد.

۹. 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 ۱/۵ میلی لیتری و میکروتیوب مخصوص Real-Time PCR
- دستکش لاتکس یا نیتریل بدون پودر
- بلوک آلومینیومی (بلوک سرد)

۱۰. احتیاط و نکات لازم

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 میکروپیپت، 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 یخ های قالبی و سایر موارد به غیر از یخ خرد شده پرهیز کنید.

۱۱. نمونه مناسب و شرایط نگهداری و انتقال آن

نمونه مناسب برای آزمایش AML1-ETO با این کیت، خون کامل (peripheral blood) می‌باشد که در لوله استریل حاوی ماده ضد انعقاد جمع آوری شده است. ماده ضد انعقاد می‌تواند EDTA یا سیترات باشد. خون کامل را می‌توان تا ۴۸ ساعت در ۴ درجه نگهداری و به آزمایشگاه منتقل نمود.

RNA را می‌توان مستقیماً از خون استخراج کرد. همچنین برای افزایش

حساسیت تست می‌توان از بافی (buffy coat) استفاده کرد. یک نمونه مناسب باید حاوی ۱۰ میلیون گلبول سفید در هر ۱۵۰ میکرولیتر باشد. برای نگهداری خون کامل یا بافی در زمان های طولانی تر از دو 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 می‌ماند.

۱۲. عوامل مزاحم

هپارین با غلظت بیش از ۱۰ واحد در میلی لیتر باعث مهار PCR می شود. به همین دلیل لوله حاوی هپارین به عنوان ضد انعقاد مناسب نیست و نباید استفاده شود. همچنین نمونه بیماران تحت درمان با هپارین نیز برای PCR مناسب نمی‌باشد.

مقادیر بالای بیلیروبین (تا حداکثر ۴/۵ میلی گرم در دسی لیتر) و چربی (تا حداکثر ۱۰۰۰میلی گرم در دسی لیتر) و نیز همولیز خون برای این آزمایش مزاحمتی ایجاد نمی‌کند.

۱۳. استخراج RNA

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

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

۱۴. تهیه cDNA

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

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.

در صورتی که مراحل استخراج RNA و سنتز cDNA موفق باشند تیتر ABL به بالای ۲۰ هزار کپی در میکرولیتر خواهد رسید.

۱۵. دستور کار PCR و مراحل آزمایش

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 AML1-ETO 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 AML1-ETO علاوه بر یک لوله برای نمونه هر بیمار، پنج لوله برای استانداردها (AE1-5) 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، چهار لوله نیز برای استانداردها (A1-4) 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 AML1-ETO 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.

۱۶. دستگاه ها و نرم افزارها

کیت AML1-ETO RQ جهت کار با دستگاه های Rotor-Gene، StepOne و MIC طراحی شده است.

۱۷. تنظیم دستگاه RotorGene

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

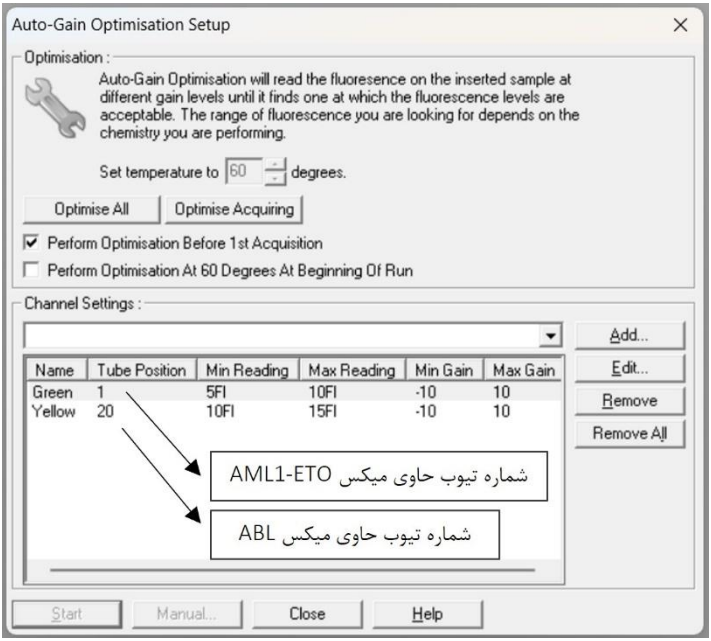
دستگاه Rotor-Gene را توسط کابل مخصوص آن به کامپیوتر وصل کرده و آن را به برق بزنید تا چراغ آبی جلوی آن روشن شود.

فایل تمپلیت AML1-ETO را از فلش کارت همراه کیت باز نمایید (همچنین قابل دسترس از طریق اسکن QR Code روی جعبه کیت). توجه فرمایید فایل AML1-ETO 0.2 یا AML1-ETO 0.1 را با توجه به نوع لوله استفاده شده انتخاب کنید.

نکته: مطابق تصویر برای تنظیم ضریب تابش در منوی نرم افزار، گزینه View، سپس Gain Optimisation را انتخاب کنید. در پنجره باز شده در Auto-Gain Optimisation Setup ابتدا گزینه Optimise Acquiring را بزنید. تنظیمات را دقیقا مطابق تصویر صفحه بعد برای هر دو کانال انجام دهید.

دقت داشته باشید Tube Position را برای کانال سبز روی شماره تیوبی تنظیم کنید که حاوی میکس AML1-ETO است و برای کانال زرد شماره تیوبی را ثبت نمایید که حاوی میکس ABL می‌باشد.

گزینه Perform Optimisation Before 1st Acquisition را فعال کنید و پنجره را ببندید.



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 AML1-ETO و ABL تعریف شده اند و لوله های

حاوی AML1-ETO Mix فقط در صفحه AML1-ETO 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.

۱۸. 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 AML1-ETO، 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) می‌توانید استفاده کنید. همچنین با استفاده از منوی Define Targets and Samples می‌توانید 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.

۱۹. تنظیم سایر دستگاه ها

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

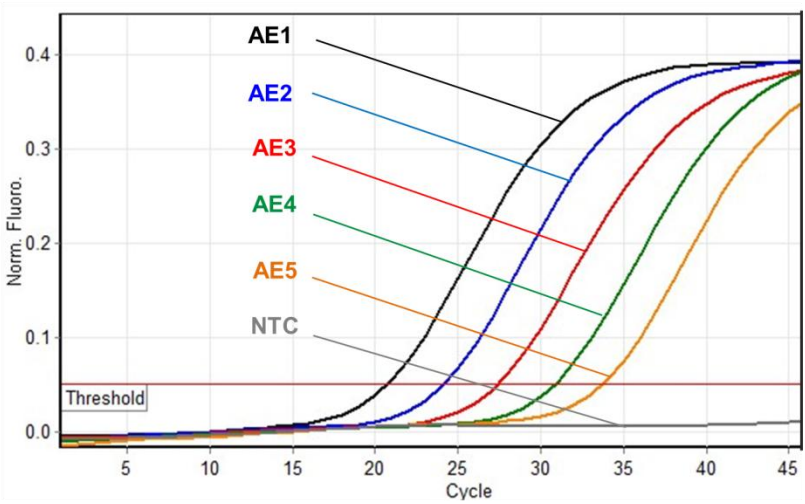
Step	Temperature and time	Cycles
1	**95°C x 3 min**	1
2	**95°C x 15 sec**	45
	60°C x 60 sec	

اندازه گیری تابش فلورسانس باید در دمای ۶۰ درجه و برای رنگ های FAM و VIC تنظیم شود. AML1-ETO Mix و ABL Mix حاوی ROX می‌باشند. غلظت نهایی ROX در واکنش 300nM می‌باشد.

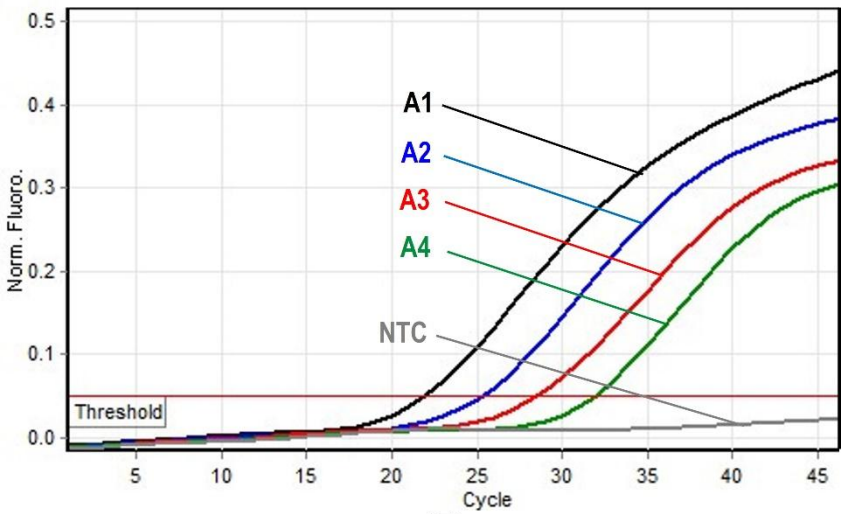
۲۰. آنالیز نتایج RotorGene

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 دهید تا منحنی استاندارد رسم و نتایج نشان داده شوند. سپس مراحل فوق را برای کانال Yellow نیز تکرار 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. در نظر داشته باشید که افزایش **تابش سبز (Green)** مربوط به **AML1-ETO** و افزایش **تابش زرد (Yellow)** حاصل از **ABL** می باشد.

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.



تصویر ۱. منحنی استانداردهای AML1-ETO در کانال سبز دستگاه روتورژن



تصویر ۲. منحنی استانداردهای ABL در کانال زرد دستگاه روتورژن

نتایج را با توجه به نکات زیر تفسیر کنید:

- در صورتی که نمونه در کانال AML1-ETO /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** می‌باشد.
- در صورتی که یک نمونه در کانال AML1-ETO/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 می‌شود.
- در صورتی که یک نمونه در هر دو کانال AML1-ETO/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 AML1-ETO/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 می‌تواند دلیل این مشکل باشد.

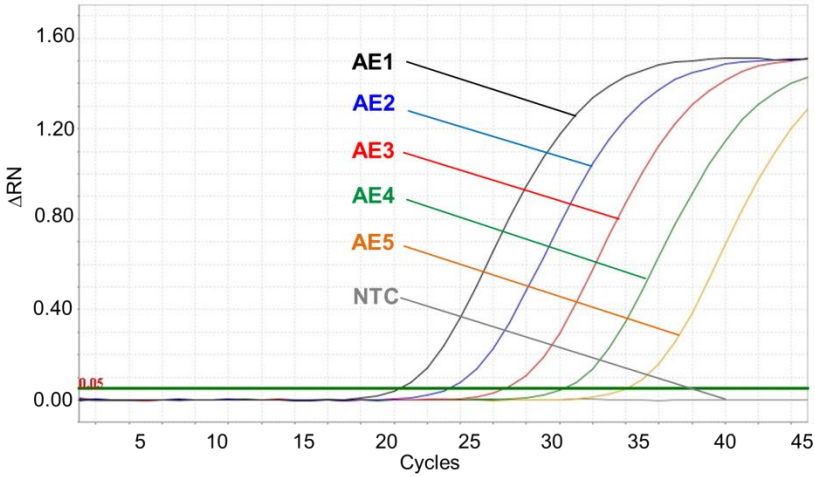
توجه! تمام نمونه های بیماران در کانال زرد و برای ABL باید مثبت و دارای منحنی سیگموییدی و CT بین ۲۰ تا ۲۷ باشند. از جمله دلایلی که می‌تواند به CT بالاتر از ۲۷ منجر شود استخراج RNA از تعداد کم گلبول های سفید (کمتر از صد هزار) و یا استفاده از total RNA به میزان کمتر از ۱۰۰ نانوگرم برای تهیه cDNA می‌باشد.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

۲۱. آنالیز نتایج StepOne

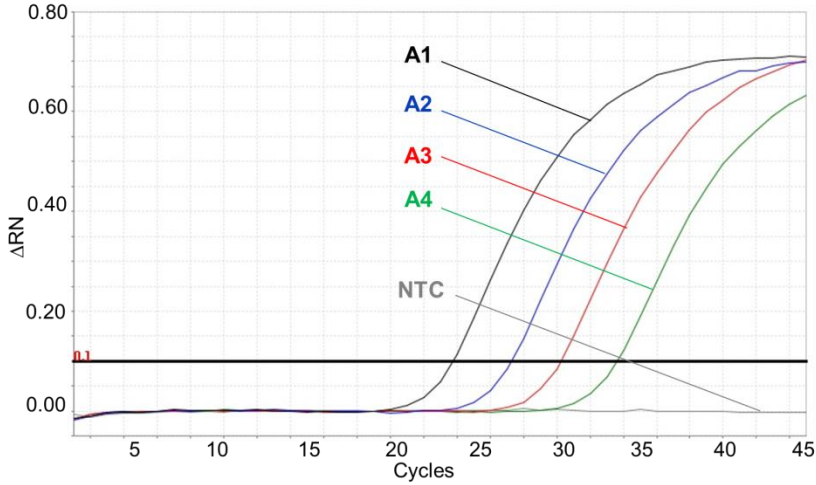
برای آنالیز نتایج به راهنمای StepOne مراجعه کنید. به طور خلاصه دکمه Analysis را کلیک کنید. برای AML1-ETO/FAM آستانه (threshold) را روی ۰/۰۵ و برای ABL/VIC نیز روی ۰/۱ قرار دهید. برای مشاهده نمودار مورد انتظار استانداردها، شاهد منفی و کنترل داخلی تصاویر سه و چهار را ملاحظه فرمایید.

در نظر داشته باشید که افزایش **تابش FAM** حاصل از **AML1-ETO** و افزایش **تابش VIC** حاصل از **ABL** می‌باشد.

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 می باشد.



تصویر ۳. منحنی استانداردهای AML1-ETO در کانال FAM دستگاه استپ وان



تصویر ۴. منحنی استانداردهای ABL در کانال VIC دستگاه استپ وان

نتایج را با توجه به نکات زیر تفسیر کنید:

- در صورتی که نمونه در کانال AML1-ETO/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 AML1-ETO/FAM منفی بوده ولی در کانال ABL/VIC مثبت و دارای منحنی سیگموییدی و CT بین ۲۰ تا ۲۷ و با تیتر بالای ۲۰ هزار کپی در میکرولیتر باشد، نمونه **منفی** در نظر گرفته می شود. باشد، نمونه **منفی** در نظر گرفته می‌شود.
- در صورتی که یک نمونه در هر دو کانال AML1-ETO/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 AML1-ETO/FAM منفی بوده ولی در کانال ABL/VIC مثبت و دارای منحنی سیگموییدی با CT بالاتر از ۲۷ و تیتر آن کمتر از ۲۰ هزار کپی در میکرولیتر باشد، 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 ۱ میکروگرم برای تهیه cDNA می‌باشد. CT بالاتر از ۲۷ برای ABL و تیتر کمتر از ۲۰ هزار کپی در میکرولیتر باعث کاهش حساسیت تست شده و باعث نتایج **منفی کاذب** می‌شود.

۲۲. محاسبه درصد AML1-ETO

برای ارزیابی پاسخ درمانی هر بیمار تحت درمان باید میزان درصد رونویسی AML1-ETO بیمار را محاسبه کنید. مبنای این محاسبه روش NCN می‌باشد (Beillard E. 2003, Leukemia 17:2474). در این روش، نسبت میزان رونویسی AML1-ETO با میزان رونویسی ABL نرمال شده و درصد آن محاسبه می شود. به عبارت دیگر تیتر AML1-ETO را به تیتر ABL تقسیم کرده و در ۱۰۰٪ ضرب کنید.

به طور معمول میزان رونویسی ژن ABL بیشتر از رونویسی AML1-ETO می‌باشد لذا نتیجه حاصل از محاسبه بالا عددی کمتر از ۱۰۰٪ می‌شود. در طول درمان نیز این میزان می‌تواند 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 رونویسی ژن هدف یا AML1-ETO می‌تواند بالاتر از میزان رونویسی 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 ۱۲ مقاله J. Gabert (2003 Leukemia 17:2318) توجه کنید. در مقاله فوق نسبت AML1-ETO/ABL در خون محیطی بیماران بین ۱۱۰٪ تا ۲۰۰۰٪ با میانگین ۴۲۰٪ گزارش شده است. این میزان برای نمونه مغز استخوان بین ۲۹٪ تا ۵۳۰٪ با میانگین ۲۱۰٪ گزارش شده است.

۲۳. میزان حساسیت

حساسیت این کیت با استفاده از رقت های متوالی پلاسمید حاوی توالی هدف تعیین شده است و معادل ۲ کپی در میکرولیتر یا ۰/۰۲٪ برای AML1-ETO محاسبه گردید. برای دستیابی به این میزان حساسیت نمونه cDNA باید حاوی ۲۰ هزار نسخه از mRNA ژن ABL در هر میکرولیتر باشد.

۲۴.روش امحاء

محتویات کیت فاقد خطرات بیولوژیکی یا شیمیایی بوده و می‌توان آنها را مستقیما به سطل زباله انتقال داد. اما نمونه های عفونی آزمایشگاه را در محلول هیپوکلریت سدیم ۵٪ به مدت حداقل یک شبانه روز قرار دهید و سپس آنها را به سطل زباله منتقل کنید.

۲۵. پشتیبانی فنی

برای پشتیبانی فنی می‌توانید با شماره تلفن یا آدرس ایمیل زیر تماس حاصل فرمایید:

۰۹۹۳۶۲۲۳۲۴۱

Info@novingene.com

۲۶. اطلاعات تماس

شرکت نوین ژن پارس ویرا

آدرس: تهران، خیابان ایرانشهر، پلاک ۵. کد پستی: ۱۵۸۱۶۳۳۳۳۶

تلفن تماس:

۰۲۱-۸۸۸۳۷۳۹۳

۰۹۹۰۱۸۱۳۱۲۴

ایمیل: info@novingene.com

وبسایت: www.novingene.com

۲۷. منابع

- Balkhi, M.Y., Christopeit, M., Chen, Y., Geletu, M. and Behre, G., 2008. AML1/ETO–induced survivin expression inhibits

transcriptional regulation of myeloid differentiation. Experimental hematology, 36(11), pp.1449-1460.

- Groner, Y., Ito, Y., Liu, P., Neil, J.C., Speck, N.A., Andre Van Wijnen and Springerlink., 2017. RUNX Proteins in Development and Cancer. Singapore: Springer Singapore.
- Lin, S., Mulloy, J.C. and Goyama, S., 2017. RUNX1-ETO Leukemia. RUNX proteins in development and cancer, pp.151-173.
- Mackay, Ian M., 2004. "Real-time PCR in the microbiology laboratory." Clinical microbiology and infection 10, no. 3: 190-212.

۲۸. توضیحات برچسب

RUO	جهت مصارف پژوهشی		تولید کننده		دستورالعمل برای استفاده را بررسی نمایید
LOT	کدبهر (شماره بچ)	Σ	تعداد <n> آزمون کافی		تاریخ انقضاء
REF	شماره کاتالوگ	SN	شماره سریال	-30°C / -10°C	محدوده دمایی

برای دریافت فایل دفترچه راهنمای سریع کیت و فایل تمپلیت برای تنظیم دستگاه، به وبسایت ما به نشانی www.novingene.com مراجعه فرمایید یا با پشتیبانی تماس بگیرید.

AML1-ETO RQ

Autumn 2025, Version 1.2

For Real-Time PCR Quantitative Detection of
AML1-ETO Transcripts
For Research Use Only

24 (Cat# AML1-ETORQ24)
48 (Cat# AML1-ETORQ48)
96 (Cat# AML1-ETORQ96)
NG-WI-ASL-31-102

RUO

NovinGene ParsVira
No. 5, Iranshahr St, Tehran, Iran 1581633336.

Novin Gene

Table of Contents

1. Introduction 3
2. Intended Use 3
3. Background Information 3
4. Test Principle 3
5. Kit Contents 4
6. Packaging models 4
7. Storage and Stability 4
8. Product Use Limitations 5
9. Additionally Required Materials 5
10. General Precautions 5
11. Specimen, Storage and Transport 6
12. Interfering Substances 6
13. RNA Isolation 7
14. cDNA Synthesis 7
15. PCR Protocol 7
16. Devices and software 8
17. Programming RotorGene 8
18. Programming of StepOne 9
19. Programming Other Machines 10

20. Data Analysis: RotorGene 10
21. Data Analysis: StepOne 12
22. AML1-ETO% calculation 15
23. Analytical Sensitivity 15
24. Disposal Method 15
25. Technical Support 16
26. Contact Information 16
27. References 16
28. Symbols 17

1. Introduction

AML1-ETO RQ kit provides a ready-to-use Real-Time polymerase chain reaction (PCR) test designed for detecting and quantifying AML1-ETO Transcripts. All required reagents are included in the PCR Mix provided in the kit. The kit also contains ABL Mix for the detection of *ABL* gene transcripts to calculate BCR-ABL% and prevent false negative results due to failure in extraction.
This kit is intended for Research Use Only!

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

2. Intended Use

AML1-ETO RQ kit is intended for the detecting of AML1-ETO transcripts in peripheral blood and AML1-ETO percentage calculation in patients undergoing therapy. Detection is achieved using Real-Time PCR and is compatible with Rotor-Gene, MIC and StepOne machines.

3. Background Information

AML1-ETO is the most common chromosomal aberration in de novo acute myeloid leukemia (AML) patients. This abnormality is resulted from t(8;21)(q22;q22) translocation. The translocation produces a fusion protein which inhibits myeloid transcriptional factors and as a result, cellular differentiation is blocked. This alteration occurs in approximately 7% of adult and 12% of pediatric with AML.

4. Test Principle

The Translocation is detected using PCR, where primers specific to the target genome amplify its unique sequence. Real-Time

PCR facilitates the detection of the amplified product through fluorescent-labeled probes. Therefore, monitoring fluorescence provides a means for detecting the target without requiring post-amplification analysis. This eliminates the possibility of PCR product contamination.

5. Kit Contents

The kit contains a manual or a quick guide and the following reagents:

Label	Content	Quantity
AML1-ETO Mix*	Master mix for AML1-ETO	480 µl
ABL Mix*	Master mix for ABL	480 µl
AE1	AML1-ETO Standard 1: 100,000 copy/µl	150 µl
AE2	AML1-ETO Standard 2: 10,000 copy/µl	150 µl
AE3	AML1-ETO Standard 3: 1,000 copy/µl	150 µl
AE4	AML1-ETO Standard 4: 100 copy/µl	150 µl
AE5	AML1-ETO 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 4: 100 copy/µl	150 µl
Water	PCR Grade Water	200

* 1, 2 and 4 tubes for 24, 48 and 96 reaction kits.

6.

The kit is available in 24, 48, and 96 reactions of 25 microliters.

7. Storage and Stability

The kit components should be shipped and stored at -20°C and are stable until the expiration date mentioned. Avoid repeated freeze-thaw more than three times to prevent reduced sensitivity.

8. Product Use Limitations

- This kit is intended to be used only by specially instructed and trained personnel.
- The User manual should be strictly followed, and any modification will invalidate the results.
- The kit and its contents should not be used past the expiration date on the package.
- The kit and its contents should not be used if there is any sign of pink or red color on the Warm Mark label.
- This kit is for Research use only and is not validated for IVD (in vitro diagnostics) applications.

9. Additionally Required Materials

To use this kit, you need the following items:

- Real-Time PCR machine and accessory computer
- Refrigerated microtube centrifuge
- Vortex Mixer
- Dry Block Heater
- Adjustable pipetters and nuclease free filtered tips
- RNA extraction kit
- cDNA synthesis kit
- Nuclease free 1.5ml microtubes and PCR microtubes
- Disposable powder-free gloves
- Cold block

10. General Precautions

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 0.2 ml PCR tubes on crushed ice. Use cold blocks instead.

11. 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 48 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 10 million WBC per 150µl.
Whole blood or buffy coat can be stored at +4°C for two days. Otherwise, should be aliquoted and stored at -70°C which is stable for a few months.

12. Interfering Substances

Heparin (more than 10 IU/ml) affects the PCR. Blood collected in heparin containing tubes and samples of heparinized patients must not be used.
Elevated levels of bilirubin (≤4.5 mg/dl) and lipids (≤1000 mg/dl) and hemolytic samples do not influence the extraction and PCR.

13. 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, Germany)
- TRIzol isolation reagent (Cat. no. 15596026, Thermoscientific, USA)
- Isol-RNA isolation reagent (Cat. no. 2302700, 5 prime, Germany)
- Accuzol isolation reagent (Cat. no. K-3090, Bioneer, Korea)

14. cDNA Synthesis

4ug of total RNA is required and should be reverse transcribed to cDNA using random hexamers. Different kits are available in the market for this purpose.

Dilute prepared cDNA 2.5x with nuclease free water. For example, to 20ul of cDNA add 30ul of nuclease free water.

Upon successful RNA extraction and cDNA synthesis, ABL titer will reach above 20,000 copy/ul.

15. PCR Protocol

Thaw the reagents on ice completely, followed by brief mixing and a quick spin.

Each sample should be examined for both of AML1-ETO fusion gene and for ABL control gene. So, two sets of reactions are required. In AML1-ETO set, consider 1 tube for each sample as well as 6 tubes for the 5 standards (AE1 to AE5) 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.

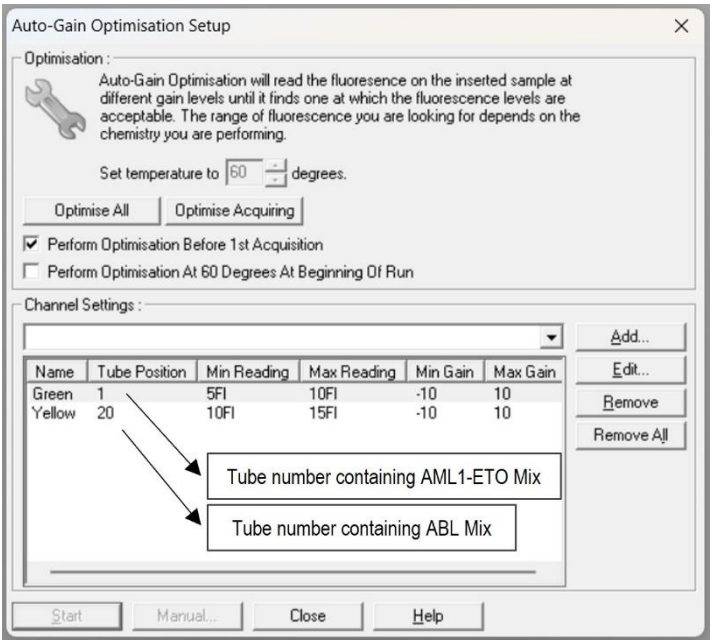
Pipette 20µl of AML1-ETO Mix to the first series of tubes and 20µl of ABL Mix to each tube of the second group. Continue by adding 5µl of cDNA or standard or control to each tube.
Cap the tubes and visually inspect to ensure all are caped securely. Place the tubes in the machine.
Note: Working with StepOne instrument, spin tubes briefly before loading on the block.
Note: If using RotorGene attach the locking ring.

16. Devices and software

AML1-ETO RQ kit is designed to work with Rotor-Gene, StepOne and MIC.

17. Programming RotorGene

Before you start the machine, make sure you have attached the locking ring on the rotor!
Open the p210 template file for Rotor-Gene (provided in the flash card, or accessible by kit QR code); AML1-ETO 0.1 is for strip tubes and AML1-ETO 0.2 is for 0.2ml tubes. Program starts.
Note: For Gain Optimisation, in the View menu select the Gain Optimisation. Adjust the setting according to the next page image.
Select a tube number containing bcr Mix for the Green channel and tube with ABL Mix for the Yellow channel.



Click on the Start button (Green button on the top menu). On the pop-up window click Start again and save the file to start the machine.

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.

18. Programming of StepOne

Open the StepOne software (V 2.*). On the Set-Up menu, click Template (provided in the flash card, or accessible by kit QR code).

Click on Plate Setup. One negative control, five standards for AML1-ETO, four standards for ABL and a few samples are defined. You may change plate setup 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.

19. 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 3 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 AML1-ETO Mix and ABL Mix contain ROX with final concentration of 300nM in reaction.

20. Data Analysis: RotorGene

Before analyzing results, make sure that 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 RotorGene manual. Perform quantitative analysis for both **AML1-ETO (the Green channel)** and **ABL (the 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 the Yellow channel and set the threshold at 0.05. Figures 1 and 2 represent typical graphs for the RotorGene machine.

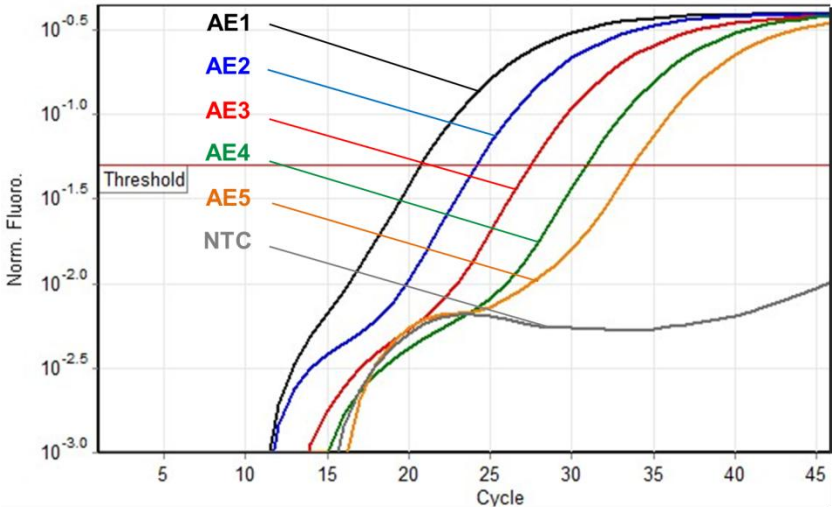


Fig 1. Typical AML1-ETO graph in Green channel for Rotor-Gene

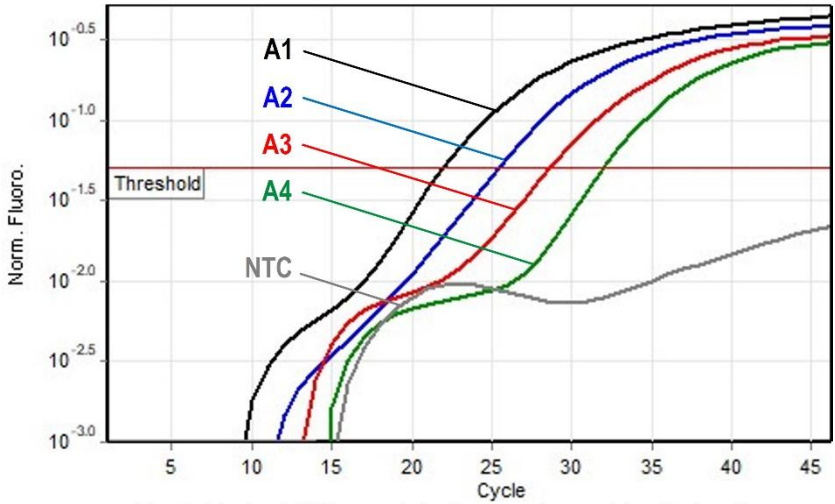


Fig 2. Typical ABL graph in Green channel for Rotor-Gene

Consider the following points when analyzing:

- A sample is **Positive** if it is positive in both the Green/AML1-ETO and Yellow/ABL channels with sigmoid graphs and CT of 20-40 for the Green and 20-30 for the Yellow.
- A sample is **Negative** if is negative in the Green/AML1-ETO channel while it is positive in the Yellow/ABL channel with a sigmoid graph and CT of 20-27 and ABL titer above 20,000 copies/ul..
- Results are **Inconclusive** and the test should be repeated if a sample is negative in both the Green/AML1-ETO and the 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 the Green/AML1-ETO channel while it is positive in the Yellow/ABL channel with sigmoid graph and CTs above 27 and ABL titer less than 20,000 copies/ul. Improper extraction or low RNA input could cause that.

*Note: All patient samples should be positive in the 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 1ug RNA has been used. CTs higher than 27 and ABL titer less than 20,000 copies/ul reduce the sensitivity of the test and may result in **false negative** reports.*

21. Data Analysis: StepOne

Analyze the data according to StepOne manual. Briefly, click on "Analyze" and set the threshold for the **AML1-ETO/FAM** on 0.05 and for the **ABL/VIC** on 0.1.

Figures 3 and 4 represent typical graphs for the StepOne machine.

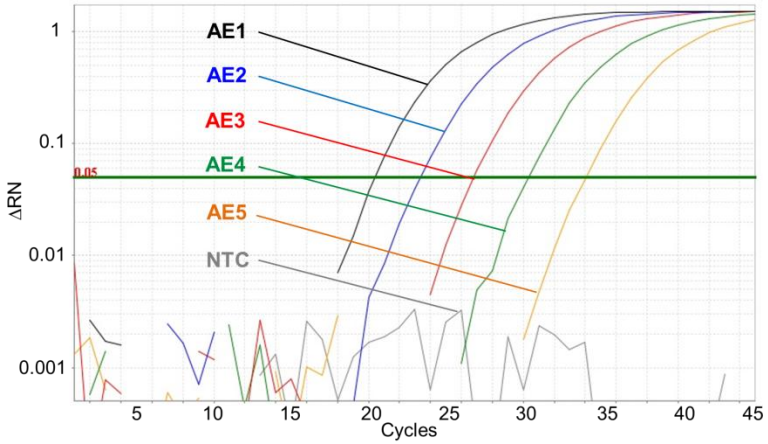


Fig3. Typical AML1-ETO graph in FAM channel for StepOne

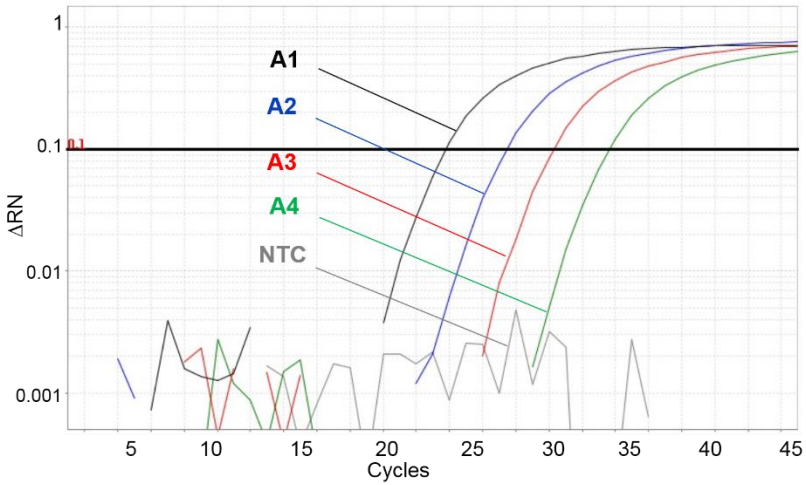


Fig 4. Typical ABL graph in VIC channel for StepOne

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 a sigmoid graph and log phase, the sample is considered Negative, and CT, if present, is not reliable.

Consider the following points when analyzing:

- A sample is **Positive** if it is positive in both the FAM/AML1-ETO and the VIC/ABL channels with sigmoid graphs and CT of 20-40 for the Green and 20-30 for the
- Yellow.
- A sample is **Negative** if it is negative in the FAM/AML1-ETO channel while it is positive in the VIC/ABL channel with a sigmoid graph and CT of 20-27 ABL titer above 20,000 copies/ul.
- Results are **Inconclusive** and the test should be repeated if a sample is negative in both the FAM/AML1-ETO and VIC/ABL channels. Improper extraction or test setup could cause that.
- Results are **Inconclusive** and the test should be repeated if a sample is negative in the FAM/AML1-ETO channel while it is positive in the VIC/ABL channel with sigmoid graph and CT of above 27 27 and ABL titer less than 20,000 copies/ul. Improper extraction or low RNA input could cause that.

Note: All patient samples should be positive in the 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 1ug RNA has been used. CTs higher than 27 and ABL titer less than 20,000 copies/ul *reduce the sensitivity of the test and may result in* ***false negative*** *reports.*

22. AML1-ETO% calculation

To assess the response to therapy, AML1-ETO% value for each patient can be calculated. This kit uses NCN method for this purpose *(Beillard E. 2003, Leukemia 17:2474)*. In this method AML1-ETO% value is the AML1-ETO transcripts (titer) normalized by the ABL transcripts (titer) and then multiplied by 100%.
Usually, titer of ABL gene transcripts is higher than for AML1-ETO fusion gene. 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, AML1-ETO transcripts may surpass ABL gene transcripts. As a result, ratio of AML1-ETO/ABL would be above 100%. Such results have been reported previously too. For example, please note table 12 of the paper published by J. Gabert *et al* (*2003, Leukemia 17:2318*) for patients. He reported a range of 110% to 2000% with average of 420% for peripheral blood and range of 29% to 530% with average of 210% for bone marrow samples. Therefore, a ratio above 100% is not unexpected and simply means higher transcripts of the fusion gene compared to the control gene.

23. Analytical Sensitivity

Analytical sensitivity of the kit has been determined by examining dilution series of cloned cDNA and was estimated to be about 2 copeis/ul.

24. Disposal Method

The contents of the kit do not require any special treatment before disposal and can be directly discarded. Infectious specimens should be maintained in 5% Sodium Hypochlorite overnight and then discarded.

25. Technical Support

For technical support, contact us via
Phone: +98 993-6223241
Email: info@novingene.com

26. Contact Information

NovinGene ParsVira
Address: No. 5, Iranshahr St, Tehran, Iran 1581633336.
Tel: +98 21-88837393
+98 990 -1813124
Website: www.novingene.com

27. References

- Balkhi, M.Y., Christopeit, M., Chen, Y., Geletu, M. and Behre, G., 2008. AML1/ETO–induced survivin expression inhibits transcriptional regulation of myeloid differentiation. Experimental hematology, 36 (11), pp.1449-1460.
- Groner, Y., Ito, Y., Liu, P., Neil, J.C., Speck, N.A., Andre Van Wijnen and Springerlink, 2017. RUNX Proteins in Development and Cancer. Singapore: Springer Singapore.
- Lin, S., Mulloy, J.C. and Goyama, S., 2017. RUNX1-ETO Leukemia. RUNX proteins in development and cancer, pp.151-173.
- Mackay, Ian M. "Real-time PCR in the microbiology laboratory." Clinical microbiology and infection 10, no. 3, 2004: 190-212.

28. Symbols

RUO	Research use only		Manufacturer		Consult instructions for use
LOT	Lot number		Content sufficient for <n> tests		Use-by date
REF	Catalogue number	SN	Serial number	-10°C -30°C	Temperature limit

For more information and resources please visit our website; www.novingene.com