راهنمای کیت
MBCR 210 RQ

پاییز ۱۴۰۴، ویرایش ۶/۰

جهت تشخیص و کمیت سنجی BCR-ABL (p210)

به روش Real-Time PCR

مخصوص تحقیقات

24 (Cat# MBCR210RQ24)

48 (Cat# MBCR210RQ48)

96 (Cat# MBCR210RQ96)

NG-WI-ASL-11-600

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..... ۶
۹. سایر موارد مورد نیاز..... ۶
۱۰. احتیاط و نکات لازم..... ۷
۱۱. نمونه مناسب و شرایط نگهداری و انتقال آن..... ۸
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..... ۱۲

۱۹. تنظیم سایر دستگاه ها..... ۱۳
۲۰. آنالیز نتایج Rotor-Gene..... ۱۳
۲۱. آنالیز نتایج StepOne ۱۶
۲۲. محاسبه BCR-ABL% ۱۸
۲۳. تبدیل نتایج به مقیاس بین المللی (IS Conversion) ۲۰
۲۴. حساسیت..... ۲۱
۲۵. روش امحاء..... ۲۱
۲۶. پشتیبانی فنی..... ۲۲
۲۷. اطلاعات تماس..... ۲۲
۲۸. منابع..... ۲۲
۲۹. توضیحات برچسب..... ۲۳

۱. مقدمه

کیت mbcr 210 IS-MMR RQ جهت تشخیص ناهنجاری کروموزومی یا ترانسلوکاسیون BCR-ABL (p210) و برای محاسبه درصد BCR-ABL در بیماران به روش Real-time PCR طراحی شده است. در این روش، توالی مورد نظر به کمک پرایمرها و پروب اختصاصی شناسایی می‌شود و تیتر نمونه بیمار با استفاده از تیتر بدست آمده از IS-MMR کالیبر می‌گردد. همچنین میکس دیگر این کیت حاوی سری ثانویه ای 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 می باشد!*

۲. حیطه کاربرد

کیت mbcr 210 IS-MMR RQ امکان تشخیص بیان ژن BCR-ABL (p210) (فقط برای جابجایی های b2a2, b3a2) در نمونه بیمار و محاسبه درصد BCR-ABL در بیماران تحت درمان را با روش Real-Time PCR را فراهم می‌کند. همچنین با استفاده از IS-MMR نتایج را می‌توان کالیبر کرده و بر اساس استاندارد بین المللی گزارش نمود. این کیت برای استفاده با دستگاه‌های Rotor-Gene، StepOne و MIC طراحی شده است.

۳. اطلاعات زمینه ای

ناهنجاری کروموزومی BCR-ABL یا کروموزوم فیلادلفیا حاصل از جابجایی کروموزومی 9;22 می‌باشد. در نتیجه این جابجایی، ژن ABL در کروموزوم شماره

۹ در مجاورت ژن BCR در کروموزوم ۲۲ قرار می‌گیرد و یک ژن هیبرید تشکیل می‌شود. این مجاورت سبب تولید پروتئین هیبرید BCR-ABL با وزن مولکولی غالبا ۲۱۰ یا ۱۹۰ کیلو دالتون می‌شود. این پروتئین دارای فعالیت مداوم تیروزین کیناز می‌باشد و به نوبه خود باعث افزایش رشد سلولی و مهار آپاپتوز می‌شود. mRNA حاصل از نسخه برداری این ژن تقریبا در ۹۵٪ بیماران Chronic myelogenous leukemia (CML) و برخی موارد Acute lymphoblastic leukemia (ALL) یافت می‌شود. 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 می‌باشد.

۴. اطلاعات زمینه ای

در این کیت، شناسایی توالی ژنتیکی با استفاده از روش واکنش زنجیره ای پلیمراز Polymerase Chain Reaction/PCR انجام می‌شود. طی این واکنش، توالی مورد نظر 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 عامل ژنتیکی 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، یک فلش کارت و مواد زیر می باشد:

برچسب	محتوا	حجم
MBCR 210 Mix	میکس آماده برای MBCR *	۴۸۰ میکرولیتر
ABL Mix	میکس آماده برای ABL *	۴۸۰ میکرولیتر
MA1	استاندارد ۱: یک صد هزار کپی در میکرولیتر	۲۵۰ میکرولیتر
MA2	استاندارد ۲: ده هزار کپی در میکرولیتر	۲۵۰ میکرولیتر
MA3	استاندارد ۳: یک هزار کپی در میکرولیتر	۲۵۰ میکرولیتر
MA4	استاندارد ۴: یک صد کپی در میکرولیتر	۲۵۰ میکرولیتر
MA5	استاندارد ۵: ده کپی در میکرولیتر	۲۵۰ میکرولیتر
IS-MMR Calib	کالیبراتور IS-MMR (کنترل RNA)	۱۵ میکرولیتر
High Pos RNA	کنترل مثبت RNA با تیتر بالا	۱۵ 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 می باشد.

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 می شود.

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 نمود.
- 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 سمپلر، 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 آنها 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.

۱۱. نمونه مناسب و شرایط نگهداری و انتقال آن

نمونه مناسب برای آزمایش 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 حدود 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 می ماند.

۱۲. عوامل مزاحم

هپارین با غلظت بیش از ۱۰ واحد در میلی لیتر باعث مهار PCR می‌شود. 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 ۴/۵میلی گرم در دسی لیتر) و چربی (تا حداکثر ۱۰۰۰ میلی 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 می‌کنیم:

- 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)

۱۴. تهیه cDNA

در حدود چهار 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 می‌باشند.

نکته: در نظر داشته باشید که علاوه بر نمونه های بیمار برای استفاده از کالیبراتور IS در این مرحله RNA موجود در تیوب IS-MMR Calib یا High Pos RNA را به cDNA تبدیل 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.

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 آنها اطمینان حاصل کرده و برای چند ثانیه آنها را در دور پایین سانتریفوژ کنید.

هر نمونه از نظر وجود mRNA برای دو ژن BCR-ABL (p210) 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 (MA1-5) 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، پنج لوله نیز برای استانداردها (MA1-5) 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 MBCR 210 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.

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 p210 RQ جهت کار با دستگاه های Rotor-Gene، StepOne و MIC طراحی شده است.

۱۷. تنظیم دستگاه RotorGene

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

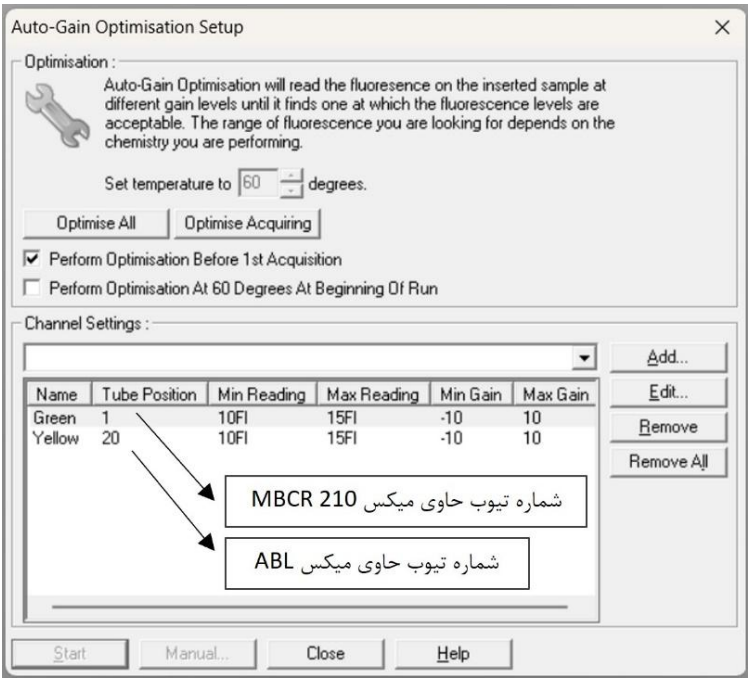
دستگاه Rotor-Gene را توسط کابل مخصوص آن به کامپیوتر وصل کرده و آن را به برق بزنید تا چراغ آبی جلوی آن روشن شود.

فایل تمپلیت p210 را از فلش کارت همراه کیت باز نمایید (همچنین قابل دسترس از طریق اسکن QR Code روی جعبه کیت). توجه فرمایید فایل MBCR 0.2 یا MBCR 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 p210 است و برای کانال زرد شماره تیوبی را ثبت نمایید که حاوی میکس ABL می‌باشد.

سپس 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 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 نام گذاری 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 فلش کارت همراه کیت را انتخاب کنید. (همچنین قابل دسترس از طریق اسکن QR Code روی جعبه کیت). 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 این کار از گزینه های کلیک راست (copy, paste, clear) می توانید 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	**95C x 3 min**	1
2	**95C x 15 sec**	45
	60C x 60 sec	

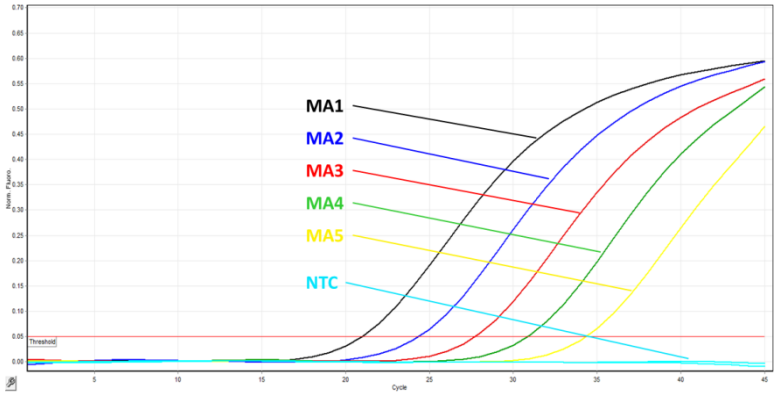
گیری تابش فلورسانس باید در دمای ۶۰ درجه و برای رنگ های FAM و VIC تنظیم شود. MBCR Mix و ABL Mix حاوی ROX می‌باشند. غلظت نهایی ROX در واکنش 300nM می‌باشد.

۲۰. آنالیز نتایج RotorGene

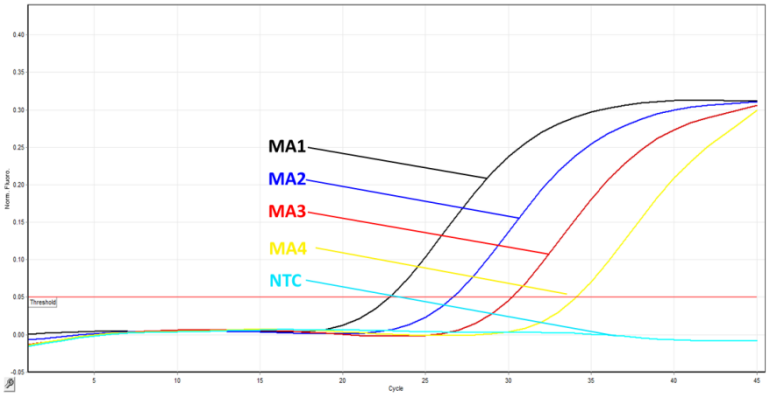
برای آنالیز نتایج به راهنمای RotorGene مراجعه کنید. به طور خلاصه از منوی Analysis، Quantitation را انتخاب کرده و روی Green دو بار کلیک کنید. در پنجره autofind threshold، دکمه cancel را بزنید و آستانه را روی ۰/۰۵ قرار داده و دکمه OK را بزنید تا منحنی استاندارد رسم و نتایج نشان داده شوند. سپس در منوی Analysis، مجدداً Quantitation و سپس Yellow را کلیک 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. توجه داشته باشید که افزایش **تابش سبز (Green)** مربوط به **BCR-ABL** و افزایش **تابش زرد (Yellow)** حاصل از **ABL** می‌باشد.

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 می‌باشد. در غیاب منحنی سیگموییدی، نمونه منفی محسوب می‌شود و (CT آن) در صورت وجود فاقد ارزش می‌باشد.



شکل ۱. منحنی استانداردهای MBCR در کانال سبز دستگاه روتورژن



شکل ۲. منحنی استانداردهای ABL در کانال زرد دستگاه روتورژن

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** می‌باشد.
- 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 و با تیتر بالای ۲۰ هزار کپی در میکرولیتر باشد، نمونه **منفی** در نظر گرفته می شود.، نمونه **منفی** در نظر گرفته می‌شود.
- 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 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 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 ۱ میکروگرم برای تهیه cDNA می‌باشد. CT بالاتر از ۲۷ برای ABL و تیتر آن کمتر از ۲۰ هزار کپی در میکرولیتر باشد باعث کاهش حساسیت تست و نتایج **منفی کاذب** می‌شود.

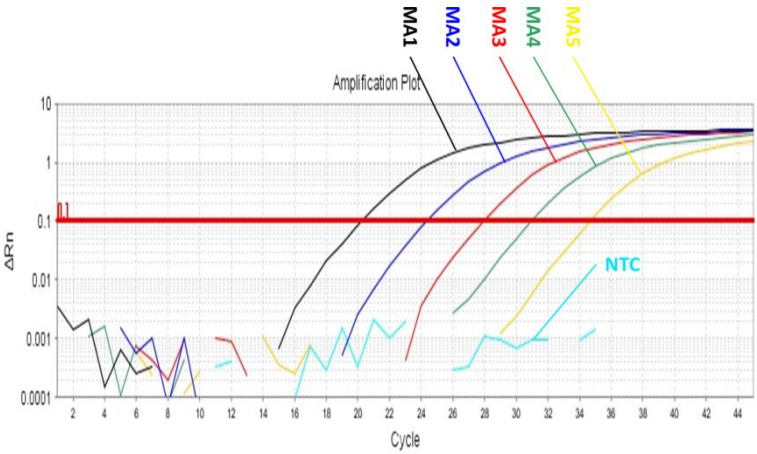
۲۱. آنالیز نتایج StepOne

برای آنالیز نتایج به راهنمای StepOne مراجعه کنید. به طور خلاصه دکمه Analysis را کلیک کنید. برای MBCR/FAM آستانه (threshold) را روی ۰/۱ و برای ABL/VIC نیز روی ۰/۱ قرار دهید.

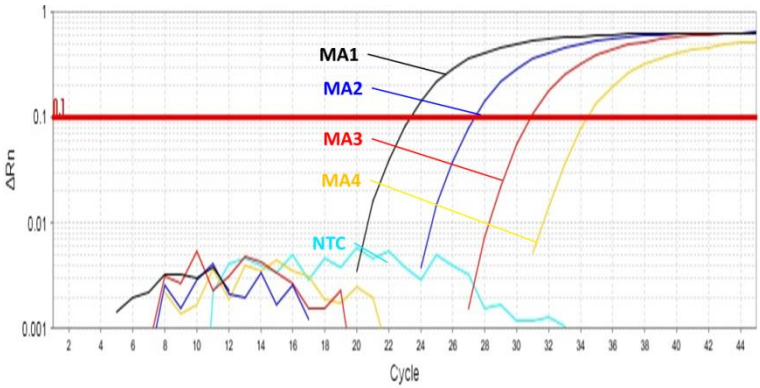
برای مشاهده نمودار مورد انتظار استانداردها، شاهد منفی و کنترل داخلی تصاویر سه و چهار را ملاحظه فرمایید.

توجه داشته باشید که افزایش **تابش FAM** حاصل از **BCR-ABL** 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 می‌باشد.



شکل ۳. منحنی استانداردهای MBCR در کانال FAM دستگاه StepOne



شکل ۴. منحنی استانداردهای ABL در کانال VIC دستگاه StepOne

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 و با تیتر بالای ۲۰ هزار کپی در میکرولیتر 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 سیگموییدی با CT بالاتر از ۲۷ باشد و تیتر آن کمتر از ۲۰ هزار کپی در میکرولیتر 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 می‌تواند 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 BCR-ABL

برای ارزیابی پاسخ درمانی هر بیمار تحت درمان باید میزان درصد BCR-ABL بیمار را محاسبه کنید. مبنای این محاسبه روش NCN می‌باشد (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.

$$\mathbf{NCN\ (BCR\text{-}ABL\%)} = \frac{\mathbf{BCR\text{-}ABL\ \ (titre)}}{\mathbf{ABL\ (titre)}} \times \mathbf{100}$$

به طور معمول میزان بیان ژن ABL بیشتر از بیان BCR-ABL 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 بیان ژن هدف یا BCR-ABL می‌تواند بالاتر از میزان بیان 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 ۱۸مقاله J. Gabert (2003 Leukemia 17:2318) توجه کنید. در مقاله فوق نسبت BCR-ABL/ABL در خون محیطی بیماران CML بین ۴۴٪ تا ۳۰۰٪ با میانگین ۸۶٪ گزارش شده است. این میزان برای نمونه مغز استخوان بین ۴۸٪ تا ۴۴۰٪ با میانگین ۱۱۷٪ گزارش شده است. بنابراین نتایجی بالاتر از ۱۰۰٪ دور از انتظار نبوده و به سادگی نشان می‌دهد که بیان ژن هدف از بیان ژن کنترل بیشتر می‌باشد.

لازم به توجه است که از نظر بالینی اعدادی بالاتر از ۱۰٪ حدود ۶ ماه و یا بیشتر از ۱٪ حدود دوازده ماه پس از شروع درمان به معنای عدم موفقیت روش درمانی می باشد؛ در حالی که نتایجی معادل کمتر از ۱٪ حدود شش ماه پس از درمان و کمتر از ۰/۱ ٪ حدود دوازده ماه پس از درمان نشانه پاسخ مناسب به درمان می‌باشد (Baccarani M.2003, Blood 122: 872).

۲۳. تبدیل نتایج به مقیاس بین المللی IS Conversion

نظر به اعلام سازمان جهانی بهداشت WHO در سال ۲۰۱۰ اولین پنل مرجع بین المللی جهت سنجش BCR-ABL RNA به عنوان مقیاسی برای یک استاندارد جهانی معرفی شد. به این ترتیب IS (International scale) امکان دستیابی به نتایج قابل مقایسه در سراسر جهان را با اطمینان از پایش دقیق تر پاسخ مولکولی بیماران به درمان فراهم میکند. به این منظور IS-MMR جهت استاندارد سازی نتایج بیماران به کیت های BCR-ABL نوین ژن افزوده شده است.

- در نظر داشته باشید IS-MMR Cal و High Pos RNA حاوی RNA بوده و بایستی همزمان با RNA نمونه بیماران، سنتر cDNA انجام شود سپس نمونه ها با روش Real-Time PCR بررسی شود.
- NCN را برای نمونه ی بیماران و کالیبراتور IS-MMR محاسبه نمایید.

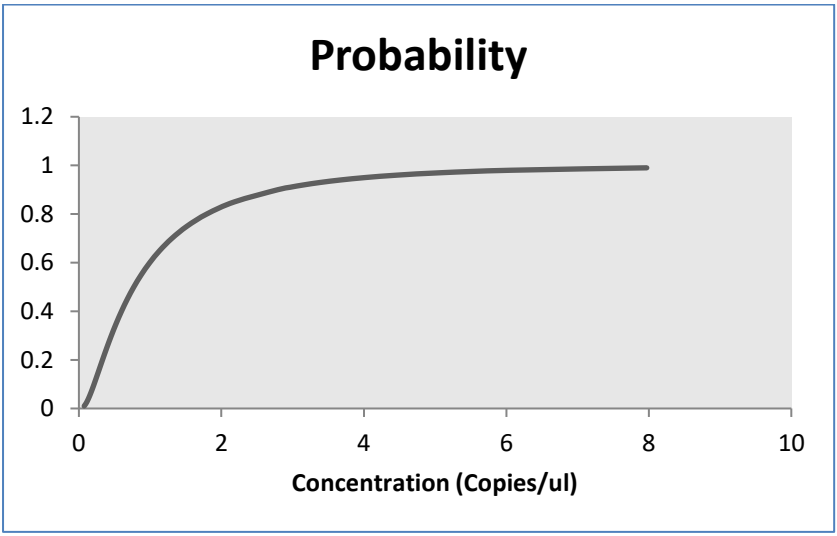
نکته: NCN برای کالیبراتور IS-MMR در برگه گواهی آنالیز همراه کیت با عنوان IS-MMR value مشخص شده است و با استفاده از پنل Acrometrix BCR-ABL, ThermoFisher Scientific (cat: 956980TS, Lot: 083023 تعیین شده است.

- توجه داشته باشید نتیجه NCN برای کالیبراتور IS-MMR باید در حد فاصل ۰/۳ الی ۳ برابر IS-MMR value باشد. در غیر این صورت آزمایش معتبر نمی‌باشد.
- IS-NCN را برای نمونه بیمار مطابق فرمول زیر محاسبه نمایید:

$$\text{IS-}NCN\ sample = \frac{\text{NCN}\ sample \times \text{IS-MMR value}}{\text{NCN (IS-MMR)}}$$

۲۴.حساسیت

حساسیت این کیت با استفاده از رقت های متوالی نمونه مثبت در نمونه منفی تعیین شده است. نتایج با روش پروبیت (Probit analysis) با اطمینان ۹۵٪ بررسی شده و میزان حساسیت کیت معادل ۴ کپی در میکرولیتر یا ۰/۰۰۲٪ برای BCR-ABL محاسبه گردید. برای دستیابی به این میزان حساسیت نمونه cDNA باید حاوی پنجاه هزار نسخه از mRNA ژن ABL در هر میکرولیتر باشد. نمودار به دست آمده از روش پروبیت در تصویر شماره پنج قابل مشاهده است.



شکل ۵: بررسی حساسیت کیت به روش Probit analysis

۲۵. روش امحاء

محتویات کیت فاقد خطرات بیولوژیک 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.

۲۶. پشتیبانی فنی

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

۰۹۹۳۶۲۲۳۲۴۱

Info@novingene.com

۲۷. 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

۲۸. منابع

- Hochhaus, A., Baccarani, M., Silver, R.T., Schiffer, C., Apperley, J.F., Cervantes, F., Clark, R.E., Cortes, J.E., Deininger, M.W., Guilhot, F., Hjorth-Hansen, H., Hughes, T.P., Lipton, J.H., Mahon, F.X., Mayer, J. and Nicolini, F., 2020. European LeukemiaNet 2020 recommendations for treating chronic myeloid leukemia. Leukemia, 34.

- Mackay, Ian M. "Real-time PCR in the microbiology laboratory." Clinical microbiology and infection 10, no. 3., 2004: 190-212.
- Score, J., Calasanz, M.J., Ottman, O., Pane, F., Yeh, R.F., Sobrinho-Simões, M.A., Kreil, S., Ward, D., Hidalgo-Curtis, C., Melo, J.V. and Wiemels, J., 2010. Analysis of genomic breakpoints in p190 and p210 BCR–ABL indicate distinct mechanisms of formation. Leukemia, 24(10), pp.1742-1750.
- Witt, M., Malgorzata Dawidowska and Szczepanski, T., 2012. Molecular Aspects of Hematologic Malignancies. Springer Science & Business Media.

۲۹. 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	10°C -30°C محدوده دمایی

برای دریافت اطلاعات و منابع بیشتر، به وبسایت ما به نشانی www.novingene.ir مراجعه فرمایید یا با پشتیبانی تماس بگیرید.

MBCR 210 RQ
Kit Manual

Autumn 2025, Version 6.0

For Real-Time PCR Quantitative Detection of
BCR-ABL transcripts (p210)
For Research Use Only

Σ 24 (Cat# MBCR210RQ24)
Σ 48 (Cat# MBCR210RQ48)
Σ 96 (Cat# MBCR210RQ96)
NG-WI-ASL-11-600

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

20. Data Analysis: Rotor-Gene 10
21. Data Analysis: StepOne 13
22. BCR-ABL% calculation 15
23. IS Conversion 16
24. Analytical Sensitivity 17
25. Disposal Method 17
26. Technical Support 18
27. Contact Information 18
28. References 18
29. Symbols 19

1. Introduction

MBCR 210 RQ kit provides a ready-to-use Real-Time polymerase chain reaction (PCR) test designed for detecting and quantifying BCR-ABL (p210) 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. Note that IS-MMR calibrators are also provided with the kit.
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

MBCR 210 RQ kit is intended for detecting of BCR-ABL (p210) transcripts (p210, b2a2 or b3a2 break points only) as well as calculation of BCR-ABL% in patients sample undergoing therapy. Additionally, by using IS-MMR, results can be calibrated and reported according to the international standard (IS).
This kit is designed for use with RotorGene, MIC and StepOne machines.

3. Background Information

BCR-ABL also known as 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 (b2a2 or b3a2). This fusion produces mostly 210 or 190 kDa BCR-ABL protein with constitutively active tyrosine kinase activity promoting cell proliferation and inhibition of apoptosis. The fusion gene transcript is detectable in about 95% of Chronic myelogenous leukemia (CML) patients and some cases of

Acute lymphoblastic leukemia (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.

4. Test Principle

The target 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, a flash card with templates and the following reagents:

Label	Content	Quantity
MBCR 210 Mix*	Mix for BCR-ABL	480 µl
ABL Mix*	Mix for ABL	480 µl
MA1	Standard 1: 100,000 copies/µl	250 µl
MA2	Standard 2: 10,000 copies/µl	250 µl
MA3	Standard 3: 1,000 copies/µl	250 µl
MA4	Standard 4: 100 copies/µl	250 µl
MA5	Standard 5: 10 copies/µl	250 µl
IS-MMR Calib	IS-MMR Calibrator (RNA Control)	15 µl
High Pos RNA	RNA Control (High titer)	15 µl
Water	PCR Grade Water	200 µl

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

6. Packaging models

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 expiry 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 the accessory computer
- Tabletop 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 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 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 about 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 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, 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)

14. cDNA Synthesis

About 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.
Prepare cDNA from patient RNA samples as well as IS-MMR calibrator and High Pos RNA.
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 BCR-ABL fusion (p210) gene and for ABL control gene. So, two set of reactions are required. In BCR-ABL set, consider 1 tube for each sample as well as 6 tubes for the 5 standards (MA1 to MA5) and Negative control or NTC. In ABL set, consider 1 tube for each sample and 6 tubes for the 5 standards (MA1 to MA5) and Negative control or NTC.

Place required number of tubes on cold block.

Pipette 20µl of MBCR 210 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 ensure all are capped securely. Place the tubes in the machine.

Note: Working with StepOne instrument, spin the tubes briefly before loading on the block.

Note: If using RotorGene attach the locking ring.

16. Devices and software

MBCR 210 RQ kit is designed to work with Rotor-Gene, MIC and StepOne.

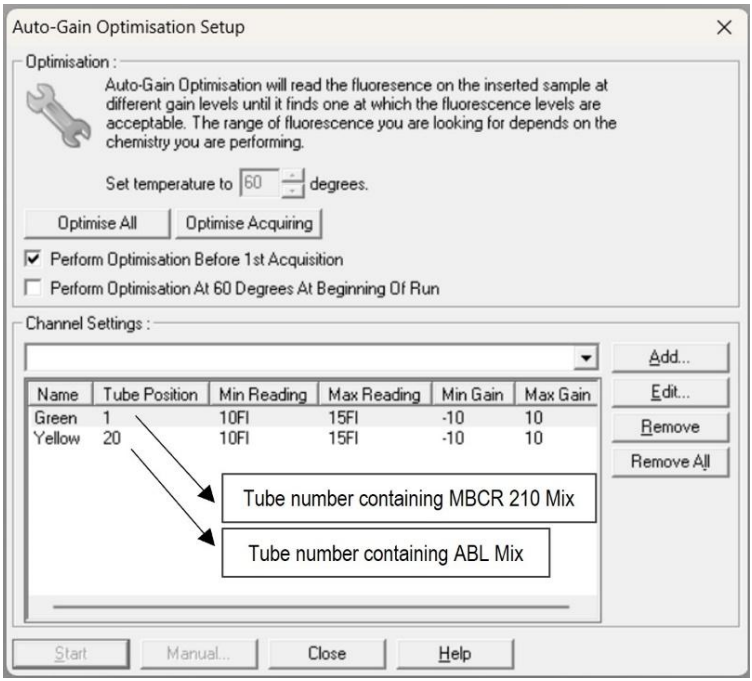
17. Programming RotorGene

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); M-BCR 0.1 is for strip tubes and M-BCR 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.

Edit sample names on both p210 and ABL pages. Remember that tubes containing MBCR Mix should only be named in p210 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.

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, 5 standards for MBCR, 4 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 the 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	**95C x 3 min**	1
2	**95C x 15 sec**	45
	60C x 60 sec	

Fluorescence should be collected at 60C for FAM and VIC dyes. Both of MBCR Mix and ABL Mix contain ROX with final concentration of 300nM in reaction.

20. 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 the data according to the Rotor-Gene Manual. Perform quantitative analysis for both the **MBCR (Green channel)** and the

ABL (Yellow channel). Briefly, click on Analysis menu and then, under the 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 on 0.05. Figures 1 and 2 represent typical graphs for RotorGene machine.

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.

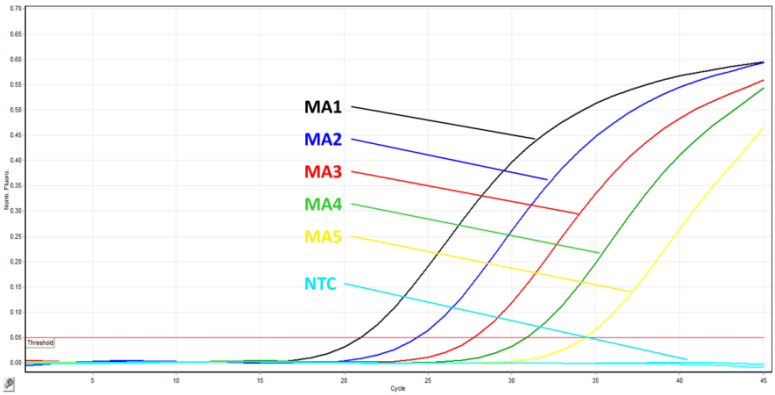


Fig 1. Typical MBCR Graph in Green Channel for RotorGene

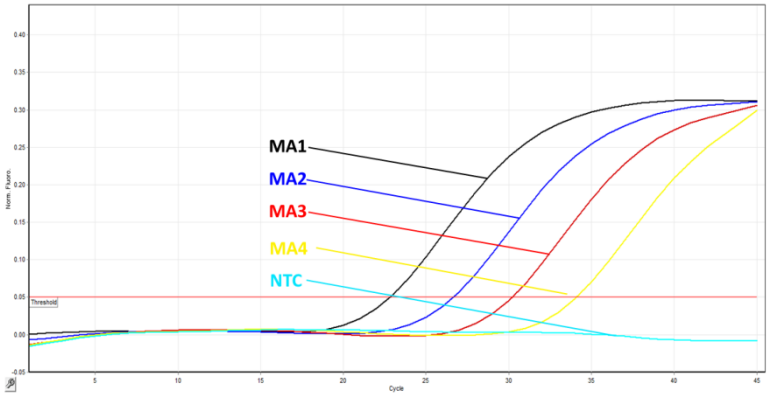


Fig 2. Typical ABL Graph in Yellow Channel for RotorGene

Consider the following points when analyzing:

- A sample is **Positive** if it is positive in both the Green/MBCR and Yellow/ABL channels with sigmoid graphs and CT of 20-40 for Green and 20-30 for the Yellow.
- A sample is **Negative** if is negative in the Green/MBCR 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/MBCR 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/MBCR channel while it is positive in the Yellow/ABL channel with sigmoid graph and CT of 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 both the **MBCR/FAM** and **ABL/VIC** on 0.1.

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

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.

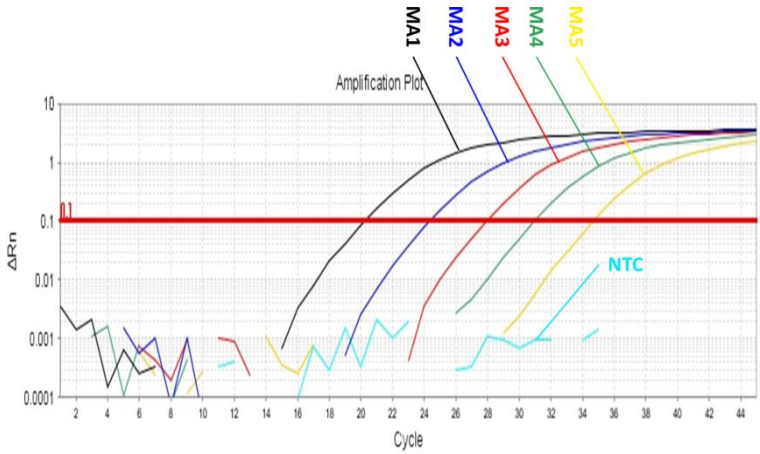


Fig 3. Typical MBCR Graph in FAM Channel for StepOne

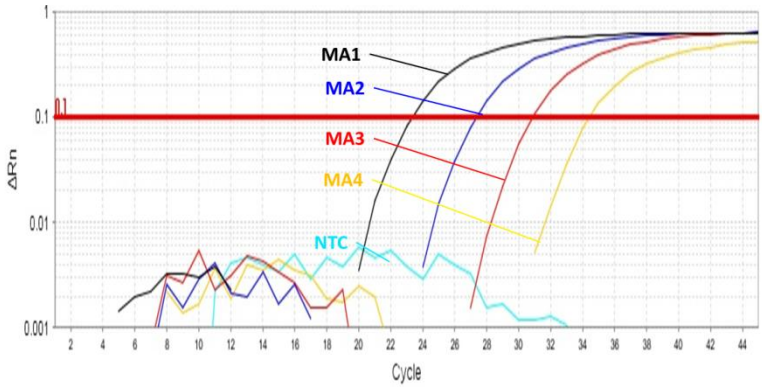


Fig 4: Typical ABL Graph in VIC Channel for StepOne

Consider the following points when analyzing:

- A sample is **Positive** if it is positive in both the FAM/MBCR and the VIC/ABL channels with sigmoid graphs and CT of 20-40 for FAM and 20-30 for the VIC.
- A sample is **Negative** if it is negative in the FAM/MBCR channel while it is positive in the VIC/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 FAM/MBCR and the 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 the FAM/MBCR channel while it is positive in the VIC/ABL channel with sigmoid graph and CT of above 27 and ABL titer above 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. 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.

$$\text{NCN (BCR-ABL\%)} = \frac{\text{BCR-ABL (titre)}}{\text{ABL (titre)}} \times 100$$

Usually, ABL gene expression is higher than BCR-ABL fusion gene expression. 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, BCR-ABL expression may surpass ABL gene expression. As a result, the ratio of BCR-ABL/ABL would be above 100%. Such results have been reported previously too. For example, please note table 18 of the paper published by J. Gabert *et al* (*2003, Leukemia 17:2318*) for CML patients. He reported a range of 44% to 300% with an average of 86% for peripheral blood and range of 48%-440% with average of 117% for bone marrow samples.
It should be mentioned that a ratio of less than 1% within 6 months or less than 0.1% within 12 months after treatment denote optimum response to treatment while ratio of above 10% 6 months after or above 1% 12 months after treatment, denote failure in treatment (*Baccarani M.2003, Blood 122: 872*).

23. Conversion of Results to the International Scale (IS Conversion)

In 2010, the World Health Organization (WHO) introduced the first International Genetic Reference Panel for BCR-ABL RNA quantitation, establishing it as a global standard. This International Scale (IS) ensures comparable results worldwide, allowing for more precise monitoring of patients' molecular response to treatment. To achieve this standardization, the IS-MMR has been incorporated into NovinGene MBCR 210 RQ kit.

- The IS-MMR Cal and High Pos RNA contains RNA and should be converted to cDNA along with the patient sample RNA.
- cDNAs should be examined with Real-Time PCR assay provided by the kit.
- Calculate the NCN for the patient sample and the IS-MMR calibrator.

Note: The NCN result for the IS-MMR calibrator must fall within the range of 0.3-3x of the IS-MMR value (specified in the Certificate of Analysis (COA)). This NCN value for the calibrator has been determined using the Acrometrix BCR-ABL panel (ThermoFisher Scientific, cat: 956980TS, Lot: 083023).

To calculate IS-NCN for a patient sample, use the following formula:

$$\text{IS-}NCN\ sample = \frac{\text{NCN}\ sample \times \text{IS-MMR value}}{\text{NCN (IS-MMR)}}$$

24. Analytical Sensitivity

Analytical sensitivity of the kit has been determined by examining dilution series of positive cDNA in negative cDNA, providing positive samples ranging from 50% to 0.002%. Results were assessed with probit analysis. The analytical detection limit of the kit (LOD) was determined as 4 copies/ul of BCR-ABL or 0.002% in the context of 50,000 copies/ul of ABL mRNA. This means that when a cDNA contains about 50,000 copies/ul of ABL transcripts, there is 95% probability that a sample of 0.002% positive will be detected. Figure 5 shows the probit analysis graph.

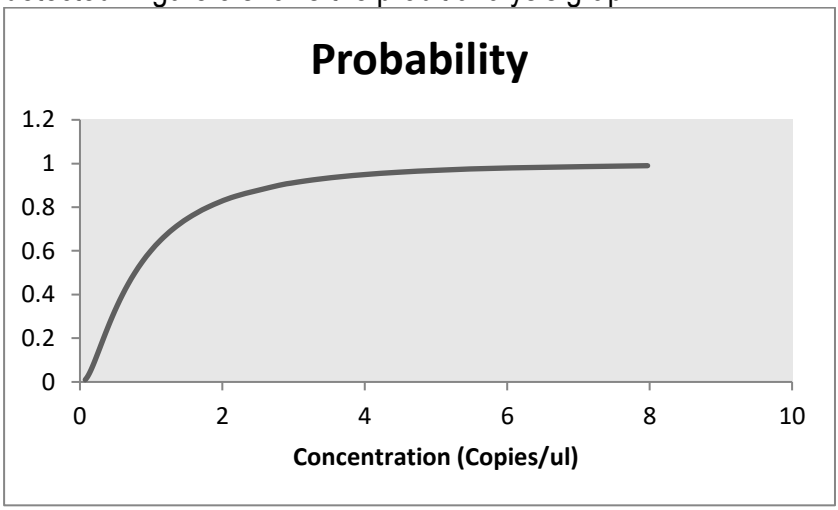


Fig 5: Probit Analysis of Test Sensitivity

25. 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.

26. Technical Support

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

27. Contact Information

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

28. References

- Hochhaus, A., Baccarani, M., Silver, R.T., Schiffer, C., Apperley, J.F., Cervantes, F., Clark, R.E., Cortes, J.E., Deininger, M.W., Guilhot, F., Hjorth-Hansen, H., Hughes, T.P., Lipton, J.H., Mahon, F.X., Mayer, J. and Nicolini, F., 2020. European LeukemiaNet 2020 recommendations for treating chronic myeloid leukemia. Leukemia, 34.
- Mackay, Ian M. "Real-time PCR in the microbiology laboratory." Clinical microbiology and infection 10, no. 3., 2004: 190-212.
- Score, J., Calasanz, M.J., Ottman, O., Pane, F., Yeh, R.F., Sobrinho-Simões, M.A., Kreil, S., Ward, D., Hidalgo-Curtis, C., Melo, J.V. and Wiemels, J., 2010. Analysis of genomic breakpoints in p190 and p210 BCR–ABL indicate distinct mechanisms of formation. Leukemia, 24(10), pp.1742-1750.

- Witt, M., Malgorzata Dawidowska and Szczepanski, T., 2012. Molecular Aspects of Hematologic Malignancies. Springer Science & Business Media.

29. 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