راهنمای کیت

PML-RARA 3X RQ

پاییز ۱۴۰۴، ویرایش ۱/۰

جهت تشخیص رونویسی PML-RARA (bcr1, bcr2, bcr3)

به روش Real-Time PCR

مخصوص تحقیقات

Σ 24 (Cat# PML-RARA3XRQ24)

Σ 48 (Cat# PML-RARA3XRQ48)

Σ 96 (Cat# PML-RARA3XRQ96)

HB NG-WI-ASL-65-100

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 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 ۱۲
۱۹. تنظیم سایر دستگاه ها ۱۳

۲۰. آنالیز نتایج Rotor-Gene ۱۴
۲۱. آنالیز نتایج StepOne ۱۷
۲۲. حساسیت ۲۲
۲۳. روش امحاء ۲۲
۲۴. پشتیبانی فنی ۲۲
۲۵. اطلاعات تماس ۲۲
۲۶. منابع ۲۳
۲۷. توضیحات برچسب ۲۳

۱. مقدمه

کیت PML-RARA 3X RQ جهت تشخیص ناهنجاری کروموزومی یا ترانسلوکاسیون PML-RARA می‌باشد. این کیت به منظور بررسی سه نوع ایزوفرم این ترنسلوکاسیون با عنوان bcr1 ، bcr2 و bcr3 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 کیفی می‌باشد. این کنترل از گزارش منفی کاذب ناشی از استخراج نامناسب 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 PML-RARA 3X RQ امکان تشخیص ۳ ایزوفرم رونوشت ترانسلوکاسیون PML-RARA با عنوان bcr1 ، bcr2 و bcr3 در نمونه را با روش Real-Time PCR فراهم می‌کند. این کیت جهت استفاده با دستگاه‌های Rotor-Gene، StepOne و MIC طراحی شده است.

۳. اطلاعات زمینه ای

ناهنجاری کروموزومی PML-RARA حاصل از جابجایی کروموزومی 15;17 می‌باشد. در نتیجه این جابجایی، ژن RARA (Retinoic Acid Receptor Alpha) در مجاورت ژن PML (promyelocytic leukemia) قرار می‌گیرد و ژن هیبرید تشکیل می‌شود. این مجاورت سبب تولید پروتئین هیبریدی PML-RARA می‌شود که به عنوان مهارکننده رونویسی عمل می‌کند و سبب

اختلال در تمایز رده میلوییدی (myeloid) می‌شود. این ترانسلوکاسیون در بیش از ۹۰٪ موارد APL (acute progranulocytic leukemia) ، حدود ۱۰ تا ۱۵٪ کل موارد AML (acute myeloid leukemia) مشاهده می‌شود.

محل شکست و اتصال برای ژن RARA در اینترون ۲ واقع شده است. اما نقاط شکست و اتصال ژن PML متفاوت بوده می‌تواند در اینترون ۶، اگزون ۶ و اینترون ۳ اتفاق بیفتد. در نتیجه سه نوع ایزوفرم برای رونوشت PML-RARA با عنوان بلند (Long, L, bcr1)، متغیر (Variant, V, bcr2) و کوتاه (Short, S, bcr3) تولید می شود. این زیرگروه ها به ترتیب هریک ۵۵٪، ۵٪ و ۴۰٪ از موارد PML-RARA را شامل می‌شوند.

۴. اساس آزمایش

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 توالی 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 می‌باشد:

برچسب	محتوا	حجم
bcr1 Mix*	میکس آماده برای bcr1 *	۴۸۰ میکرولیتر
bcr2 Mix*	میکس آماده برای bcr2 *	۴۸۰ میکرولیتر
bcr3 Mix*	میکس آماده برای bcr3 *	۴۸۰ میکرولیتر
ABL Mix*	میکس آماده برای ABL *	۴۸۰ میکرولیتر
PML/ABL Pos Ctrl	حاوی هزار کپی در میکرولیتر bcr و ده هزار کپی در میکرولیتر ABL	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 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 حرفه‌ای 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 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 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 PML-RARA با این کیت، خون محیطی (peripheral blood)، خون کامل (whole blood) و مغز استخوان 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 می توان 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 می‌ماند.

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 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, 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 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، CT برای ABL در نمونه باید کمتر از CT کنترل مثبت ABL باشد.

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 bcr1، bcr2، bcr3 و ABL باید بررسی شود. به این منظور برای هر نمونه، چهار واکنش PCR در چهار سری لوله‌ی جداگانه باید انجام شود. در سری اول برای بررسی bcr1 علاوه بر یک لوله برای نمونه هر بیمار، یک لوله برای شاهد مثبت و یک لوله برای شاهد منفی (NTC) در نظر بگیرید. در سری دوم جهت بررسی bcr2 علاوه بر یک لوله برای نمونه هر بیمار، یک لوله برای شاهد مثبت و یک لوله برای شاهد منفی (NTC) قرار

دهید. در سری سوم به منظور بررسی نمونه از نظر وجود bcr3، برای هر یک از نمونه های بیمار، شاهد مثبت و شاهد منفی (NTC) ، یک لوله قرار دهید.

در سری چهارم، جهت بررسی ABL، یک لوله برای نمونه هر بیمار، یک لوله برای شاهد مثبت و یک لوله برای شاهد منفی (NTC) در نظر بگیرید. تعداد مورد نیاز لوله را در چهار سری جداگانه روی بلوک سرد بگذارید.

به هر لوله سری اول، ۲۰ میکرولیتر از bcr1 Mix اضافه نمایید.

به هر لوله سری دوم، ۲۰ میکرولیتر از bcr2 Mix اضافه نمایید.

به هر لوله سری سوم، ۲۰ میکرولیتر از bcr3 Mix اضافه نمایید.

به هر لوله سری چهارم، ۲۰ میکرولیتر از ABL Mix اضافه نمایید. سپس ۵ میکرولیتر از cDNA نمونه و شاهد مثبت و شاهد منفی 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 PML-RARA 3X RQ جهت کار با دستگاه‌های 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.

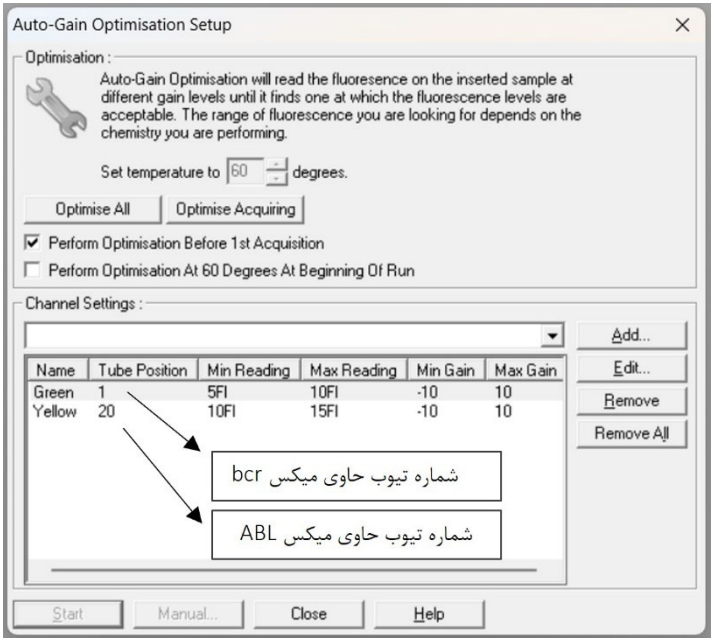
فایل تمپلیت PML-RARA 3X را از فلش کارت همراه کیت باز نمایید (همچنین قابل دسترس از طریق اسکن QR Code روی جعبه کیت). توجه فرمایید فایل PML-RARA 3X 0.1 یا PML-RARA 3X 0.2 را با توجه به نوع لوله استفاده شده انتخاب کنید.

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 یکی از میکس های bcr1، bcr2 و bcr3 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 ذخیره کنید (save) تا دستگاه روشن شود.

در پنجره نمونه ها (samples) نام هر نمونه را وارد کنید. در ستون "Type" نوع هر نمونه را نیز مشخص کنید، یعنی نمونه بیمار را با unknown، کنترل مثبت را با Positive Control و شاهد منفی را با NTC یا Negative Control تعریف 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 مثبت، یک کنترل منفی و چند نمونه از پیش تعریف شده اند. کنترل ها و تعداد نمونه های 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 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:

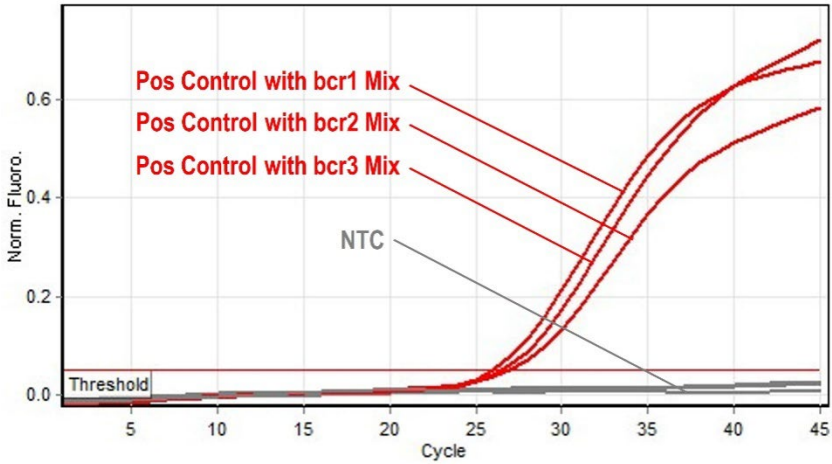
Step	Temperature and time	Cycles
1	**95°C x 10 min**	1
2	**95°C x 15 sec**	45
	60°C x 60 sec	

اندازه گیری تابش فلورسانس باید در دمای ۶۰ درجه و برای رنگ های FAM و VIC تنظیم شود. تمامی میکس های PCR کیت حاوی ROX می‌باشند. غلظت نهایی ROX در واکنش 300nM می‌باشد.

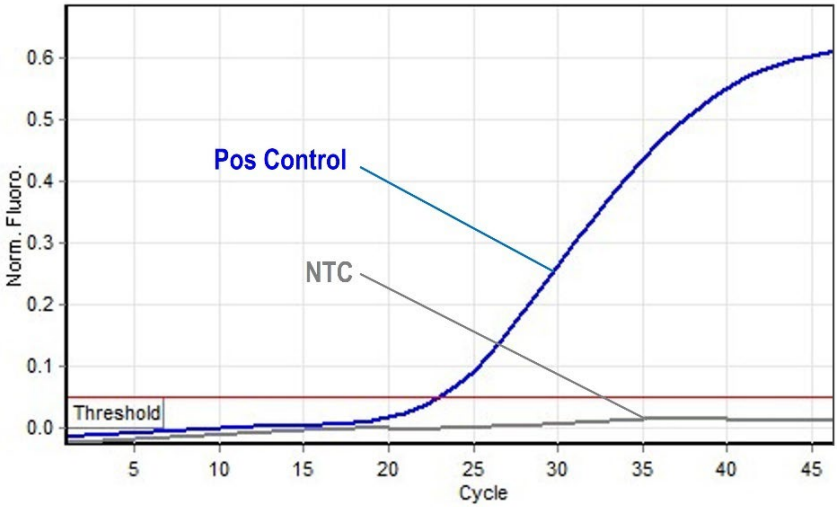
۲۰. آنالیز نتایج Rotor-Gene

برای آنالیز نتایج به راهنمای Rotor-Gene مراجعه کنید. به طور خلاصه از منوی Analysis، Quantitation را انتخاب کرده و روی Green دوبار کلیک کنید و در پنجره autofind threshold، دکمه cancel را بزنید و آستانه را روی ۰/۰۵ قرار داده و دکمه OK را بزنید تا نتایج نشان داده شوند. سپس در منوی Analysis، مجدداً Quantitation را انتخاب و مراحل فوق را برای کانال Yellow تکرار کرده و آستانه را روی ۰/۰۵ قرار دهید. برای مشاهده نمودار مورد انتظار شاهد مثبت، شاهد منفی و کنترل داخلی تصاویر یک و دو را ملاحظه فرمایید. در نظر داشته باشید که افزایش **تابش سبز (Green)** مربوط به **bcr1**، **bcr2** و **bcr3** و افزایش **تابش زرد (Yellow)** حاصل از **ABL** می باشد.

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.



تصویر ۱. منحنی شاهدها با میکس های bcr در کانال سبز دستگاه RotorGene



تصویر ۲. منحنی شاهدها با میکس ABL در کانال زرد دستگاه RotorGene

نتایج را با توجه به نکات زیر تفسیر کنید:

- در صورتی که نمونه در کانال Green و با میکس bcr1 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 از نظر bcr1 **مثبت** می‌باشد.
- در صورتی که نمونه در کانال Green و با میکس bcr2 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 از نظر bcr2 **مثبت** می‌باشد.
- در صورتی که نمونه در کانال Green و با میکس bcr3 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 از نظر bcr3 **مثبت** می‌باشد.
- در صورتی که یک نمونه در کانال Green با هر **سه میکس bcr1 ، bcr2 و bcr3** منفی باشد ولی در کانال ABL/Yellow مثبت و دارای منحنی سیگموییدی و CT آن مساوی و یا کمتر از CT کنترل مثبت با میکس ABL باشد، نمونه **منفی** در نظر گرفته می‌شود.
- در صورتی که یک نمونه در هر دو کانال bcr/Green و ABL/Yellow منفی باشد، نتیجه **نامعتبر** بوده و آزمایش باید **تکرار** شود. استخراج نامناسب نمونه، همچنین سنتز cDNA با کیفیت پایین، و نحوه نادرست انجام آزمایش می‌تواند دلایل چنین نتایجی باشد.
- در صورتی که یک نمونه در کانال bcr/Green منفی باشد اما در کانال ABL/Yellow مثبت بوده و CT آن بالاتر از CT کنترل مثبت با میکس ABL باشد، نتیجه **نامعتبر** بوده و آزمایش باید **تکرار** شود. غلظت

پایین RNA و همچنین سنتز cDNA با کیفیت پایین، می‌تواند از دلایل این مشکل باشد.

توجه! تمام نمونه‌های بیماران در کانال زرد باید مثبت و دارای منحنی سیگموییدی و CT کمتر از کنترل مثبت با میکس ABL باشند. از جمله دلایلی که می‌تواند به CT بالاتر 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 های بالاتر از CT کنترل مثبت با میکس ABL باعث کاهش حساسیت تست و نتایج **منفی کاذب** می‌شود.

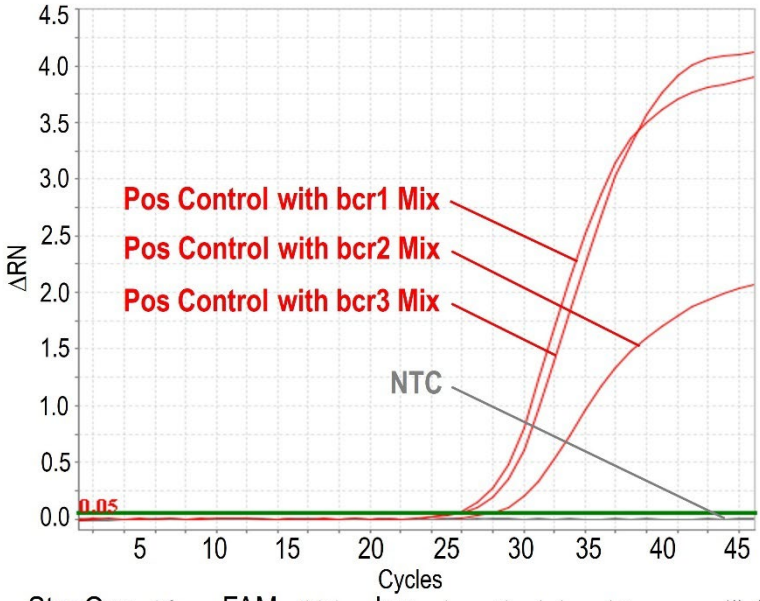
- توجه: ممکن است نمونه در کانال Green با هر **سه میکس bcr1 ، bcr2 و bcr3** مثبت و دارای منحنی سیگموییدی باشد، و نیز در کانال ABL/Yellow مثبت و دارای منحنی سیگموییدی و CT بین ۲۰ تا ۳۰ باشد، در چنین حالتی نمونه برای میکسی که کمترین CT را با آن در کانال Green دارد، مثبت است که غالبا **bcr1** می‌باشد.
- توجه: ممکن است نمونه در کانال Green با **دو میکس bcr2 و bcr3** مثبت و دارای منحنی سیگموییدی باشد، و نیز در کانال ABL/Yellow مثبت و دارای منحنی سیگموییدی و CT بین ۲۰ تا ۳۰ باشد، در چنین حالتی نمونه برای میکسی که کمترین CT را با آن در کانال Green دارد، مثبت است که غالبا **bcr2** می‌باشد.

۲۱. آنالیز نتایج StepOne

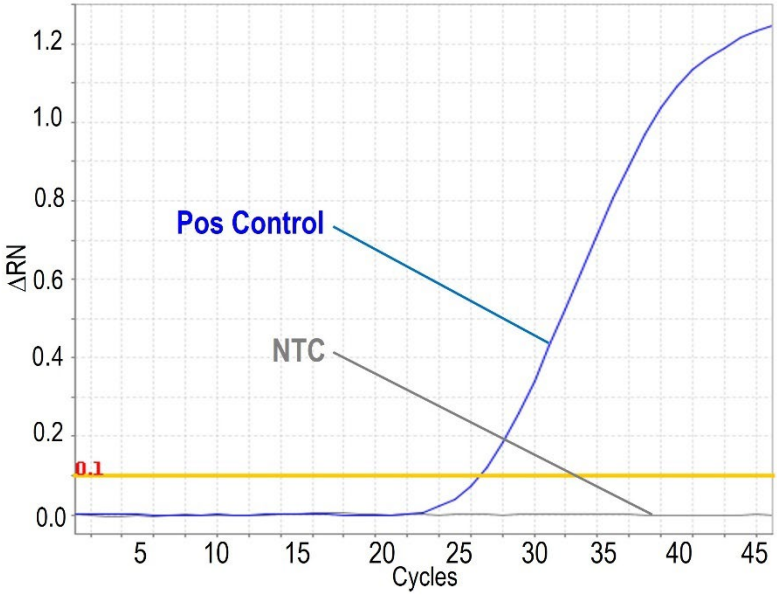
برای آنالیز نتایج به راهنمای StepOne مراجعه کنید. به طور خلاصه دکمه Analysis را کلیک کنید. برای bcr/FAM آستانه (threshold) را روی ۰/۰۵ و برای ABL/VIC نیز روی ۰/۱ قرار دهید.

برای مشاهده نمودار مورد انتظار شاهد مثبت و منفی و کنترل داخلی تصاویر سه و چهار را ملاحظه فرمایید. در نظر داشته باشید که افزایش **تابش FAM** حاصل از **bcr1/bcr2/bcr3** و افزایش **تابش VIC** حاصل از **ABL** می باشد.

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 می شود و (CT آن) در صورت وجود فاقد ارزش می باشد.



شکل ۳. منحنی شاهدها با میکس‌های bcr در کانال FAM دستگاه StepOne



تصویر ۴. منحنی شاهدها با ABL Mix در کانال VIC دستگاه StepOne

نتایج را با توجه به نکات زیر تفسیر کنید:

- در صورتی که نمونه در کانال FAM با میکس bcr1 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 از نظر bcr1 **مثبت** می‌باشد.
- در صورتی که نمونه در کانال FAM با میکس bcr2 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 از نظر bcr2 **مثبت** می‌باشد.
- در صورتی که نمونه در کانال FAM با میکس bcr3 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 از نظر bcr3 **مثبت** می‌باشد.
- در صورتی که یک نمونه در کانال FAM با هر **سه میکس bcr1 ، bcr2 و bcr3** منفی باشد ولی در کانال ABL/VIC مثبت و دارای منحنی سیگموییدی و CT آن مساوی و یا کمتر از CT کنترل مثبت با میکس ABL باشد، نمونه **منفی** در نظر گرفته می‌شود.
- در صورتی که یک نمونه در هر دو کانال bcr/FAM و ABL/VIC منفی باشد، نتیجه **نامعتبر** بوده و آزمایش باید **تکرار** شود. استخراج نامناسب نمونه و همچنین سنتز cDNA با کیفیت پایین یا نحوه نادرست انجام آزمایش می‌تواند، دلایل چنین نتایجی باشد.
- در صورتی که یک نمونه در کانال bcr/FAM منفی باشد اما در کانال ABL/VIC مثبت بوده و CT آن بالاتر از CT کنترل مثبت ABL باشد،

نتیجه **نامعتبر** بوده و آزمایش باید **تکرار** شود. غلظت پایین RNA یا سنتز cDNA با کیفیت پایین می‌تواند، دلایل این مشکل باشد.

توجه! تمام نمونه های بیماران در کانال ABL/VIC باید مثبت و دارای منحنی سیگموییدی و CT کمتر از CT کنترل مثبت ABL باشند. از جمله دلایلی که می‌تواند به CT بالاتر 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 می باشد. CT های بالاتر از CT کنترل مثبت با میکس ABL باعث کاهش حساسیت تست و نتایج **منفی کاذب** می‌شود.

توجه! تمام نمونه های بیماران در کانال VIC و برای ABL باید دارای منحنی سیگموییدی و CT کمتر از CT کنترل مثبت ABL باشند. از جمله دلایلی که می‌تواند به CT بالاتر 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 که سبب کاهش حساسیت تست و نتایج **منفی کاذب** می‌شود.

- توجه: ممکن است نمونه در کانال FAM با هر **سه میکس bcr1 ، bcr2 و bcr3** مثبت و دارای منحنی سیگموییدی باشد، و نیز در کانال ABL/VIC مثبت و دارای منحنی سیگموییدی و CT بین ۲۰ تا ۳۰ باشد، در چنین حالتی نمونه برای میکسی که کمترین CT را با آن در کانال FAM دارد، مثبت است که غالبا **bcr1** می‌باشد.
- توجه: ممکن است نمونه در کانال FAM با **دو میکس bcr2 و bcr3** مثبت و دارای منحنی سیگموییدی باشد، و نیز در کانال ABL/VIC مثبت و دارای منحنی سیگموییدی و CT بین ۲۰ تا ۳۰ باشد، در چنین حالتی نمونه برای

میکسی که کمترین CT را با آن در کانال FAM دارد، مثبت است که غالبا **bcr2** می‌باشد.

۲۲. 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 bcr محاسبه گردید. برای دستیابی به این میزان حساسیت نمونه cDNA باید حاوی ده هزار نسخه از mRNA ژن ABL در هر میکرولیتر باشد.

۲۳. 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.

۲۴. پشتیبانی فنی

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

۰۹۹۳۶۲۲۳۲۴۱
Info@novingene.com

۲۵. 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.ir

۲۶. منابع

- Bain, B.J., 2017. Leukaemia diagnosis. Hoboken, Nj John Wiley & Sons, Inc.
- De Braekeleer, E., Douet-Guilbert, N. and De Braekeleer, M., 2014. RARA fusion genes in acute promyelocytic leukemia: a review. Expert review of hematology, 7(3), pp.347-357.
- Liquori, A., Ibañez, M., Sargas, C., Sanz, M.Á., Barragán, E. and Cervera, J., 2020. Acute Promyelocytic Leukemia: A Constellation of Molecular Events around a Single PML-RARA Fusion Gene. Cancers, 12(3).
- Mackay IM. Real-time PCR in the microbiology laboratory. Clin. Microbiol. Infect. 2004; 10 (3): 190 – 212.

۲۷. 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.

PML-RARA 3X RQ
Kit Manual

Autumn 2025, Version 1.0

For Real-Time PCR Detection of PML-RARA (bcr1, bcr2, bcr3) Transcripts
For Research Use Only

Σ 24 (Cat# PML-RARA3XRQ24)
Σ 48 (Cat# PML-RARA3XRQ48)
Σ 96 (Cat# PML-RARA3XRQ96)
NG-WI-ASL-65-100

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 4
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 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 13
22. Analytical Sensitivity 16
23. Disposal Method 17
24. Technical Support 17
25. Contact Information 17
26. References 17
27. Symbols 18

1. Introduction

PML-RARA 3X RQ kit provides a ready-to-use Real-Time polymerase chain reaction (PCR) test designed for detecting 3 isoforms of PML-RARA transcripts named bcr1, bcr2 and bcr3. All required reagents are included in the PCR Mixes provided in the kit. The kit also contains ABL Mix for the detection of *ABL* gene transcripts to 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

PML-RARA 3X RQ kit is intended for detecting 3 isoforms of PML-RARA, bcr1, bcr2 and bcr3 transcripts. Detection is achieved using Real-Time PCR and is compatible with Rotor-Gene, StepOne and MIC.

3. Background Information

PML-RARA is an abnormality resulted from t (15;17) (q22; q21) translocation. This translocation results in fusion of PML (promyelocytic) gene with RARA (retinoic acid receptor alpha) gene, and production of chimeric PML-RARA protein which is a transcription repressor and impairs the myeloid differentiation. While RARA breakpoints always occur in intron 2, PML breakpoints involve three different regions of intron 6 (55%), exon 6 (5%) and intron 3 (40%). These isoforms of PML-RARA are respectively called bcr1/Long/L, bcr2/Variant/V and bcr3/Short/S.

PML-RARA accounts for more than 90% of APL (acute progranulocytic leukemia) cases, 10-15% of AML (acute myeloid leukemia) cases.

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 and the following reagents:

Label	Content	Quantity
bcr1 Mix*	Mix for bcr1	480 µl
bcr2 Mix*	Mix for bcr2	480 µl
bcr3 Mix*	Mix for bcr3	480 µl
ABL Mix*	Mix for ABL	480 µl
PML/ABL Pos Ctrl	Equal to 1,000 copies/µl bcr, and 10,000 copies/µl ABL	150 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 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.

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 should be shipped and stored at +4°C for 48 hrs. 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 on 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, CT of ABL for sample should be less than CT of ABL Positive Control.

15. PCR Protocol

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

Each sample should be examined for bcr1,2,3 fusion gene and for ABL control gene. So, four sets of reactions are required for each sample. In each bcr set, consider one tube for each sample as well as one tube for Pos Control and one for Negative control or NTC. In ABL set, consider one tube for each sample and one tube for ABL Pos Control and one tube for Negative control or NTC. Place the required number of the tubes on cold block.

Pipette 20µl of bcr 1 Mix to the first series of tubes,
Pipette 20µl of bcr 2 Mix to the second series of tubes,
Pipette 20µl of bcr 3 Mix to the third series of tubes,
Pipette 20µl of ABL Mix to the fourth series of tubes.
Continue by adding 5µl of cDNA, and Controls 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 tubes briefly before loading on the block.

Note: If using RotorGene attach the locking ring.

16. Devices and software

PML-RARA 3X RQ kit is designed to work with Rotor-Gene, StepOne and MIC.

17. Programming RotorGene

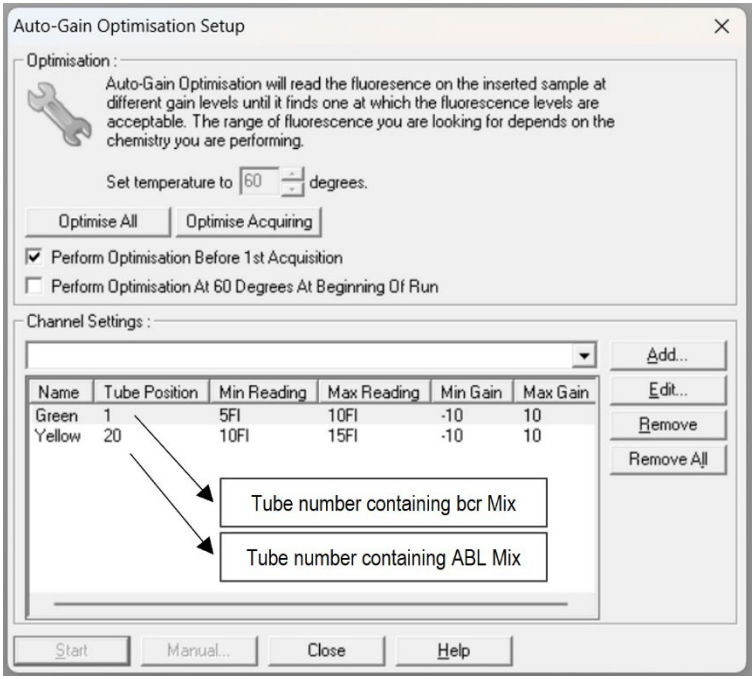
Before you start the machine, make sure you have attached the locking ring on the rotor!

Open the PML-RARA template file for RotorGene (provided in the flash card, or accessible by kit QR code); PML-RARA 3X 0.1 is for strip tubes and PML-RARA 3X 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 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 run file.
Edit sample names.
Make sure in the “Type” column, Positive control have been defined as “Positive Control”. 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. Positive and Negative controls for bcr and ABL and a few samples are defined. You may change the 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 10 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 bcr Mix and ABL Mix contain ROX with a final concentration of 300nM in reaction.

20. Data Analysis: Rotor-Gene

Before analyzing results, make sure that in the sample menu 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 Rotor-Gene manual. Perform quantitative analysis for **bcr (the Green channel)** and **ABL (the Yellow channel)**. Briefly, click on analysis menu and then, under Quantitation tab double click on “Cycling A. Green” and 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.

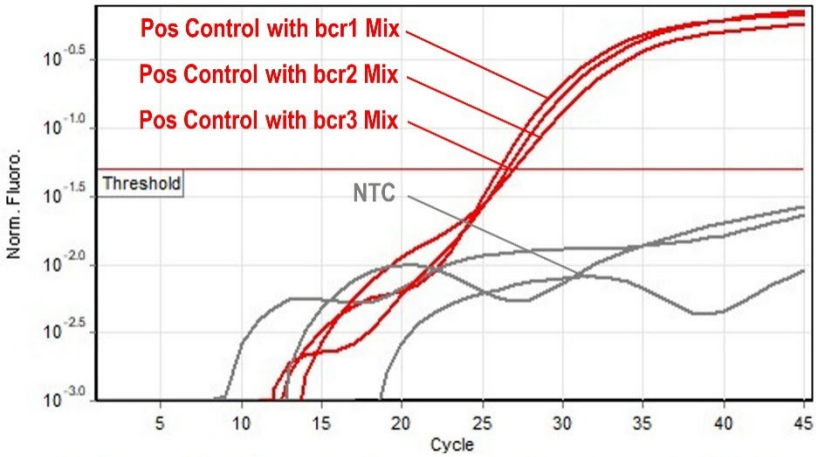


Fig 1. Typical Controls graph with bcr Mixes in Green channel for Rotor-Gene

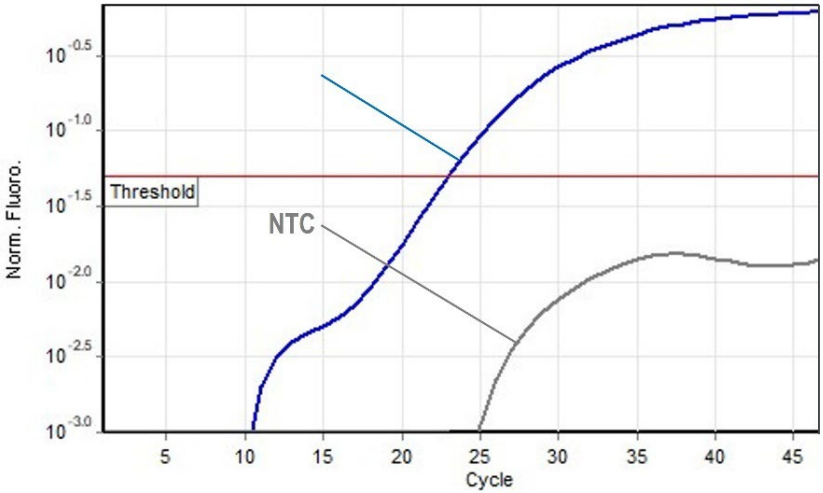


Fig 2. Typical Controls graph with ABL Mix in Yellow channel for Rotor-Gene

Consider the following points when analyzing:

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

- A sample is **Positive for bcr1** if it is positive in the Green channel with bcr1 Mix and the Yellow/ABL channels with sigmoid graphs and CT of 20-40 for Green and 20-30 for Yellow.
- A sample is **Positive for bcr2** if it is positive in the Green channel with bcr2 Mix and the Yellow/ABL channels with sigmoid graphs and CT of 20-40 for Green and 20-30 for Yellow.
- A sample is **Positive for bcr3** if it is positive in the Green channel with bcr3 Mix and the Yellow/ABL channels with sigmoid graphs and CT of 20-40 for Green and 20-30 for Yellow.
- A sample is **Negative** if it is negative in the Green channel with bcr1, bcr2 and bcr3 Mixes while it is positive in the Yellow/ABL channel with CT of equal or less than Positive Control CT with ABL Mix.
- Results are **Inconclusive** and the test should be repeated if a sample is negative in the Green channel with the all Mixes bcr1, bcr2 and bcr3 and in the Yellow/ABL channel with ABL Mix. 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/bcr channel while it is

positive in the Yellow/ABL channel with sigmoid graph and CT of above Positive Control CT with ABL Mix. 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 less than Positive Control CT with ABL Mix. CTs above Positive Control CT in Yellow/ABL channel usually happens if not enough cells have been extracted or less than 1ug RNA has been used, high ABL CTs leads to reduce the sensitivity of the test and may result in ***False negative*** *reports.*

- Note: It is possible for a sample to be positive with a sigmoid graph in the Green channel for all three mixes; bcr1, bcr2, and bcr3 and also positive with a sigmoid graph and a CT of 20-30 in the ABL/Yellow channel. In such cases, the sample is considered positive for the mix that shows the lowest CT in the Green channel, which is most often bcr1.
- Note: It is possible for a sample to be positive with a sigmoid graph in the Green channel for two mixes; bcr2 and bcr3 and also show a positive result with a sigmoid graph and a CT of 20-30 in the ABL/Yellow channel. In such cases, the sample is considered positive for the mix that shows the lowest CT in the Green channel, which is most often bcr2.

21. Data Analysis: StepOne

Analyze the data according to StepOne Manual. Briefly, click on “Analyze” and set the threshold on 0.05 for **bcr/FAM** and 0.1 for **ABL/VIC.** Figures 3 and 4 represent typical graphs 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.

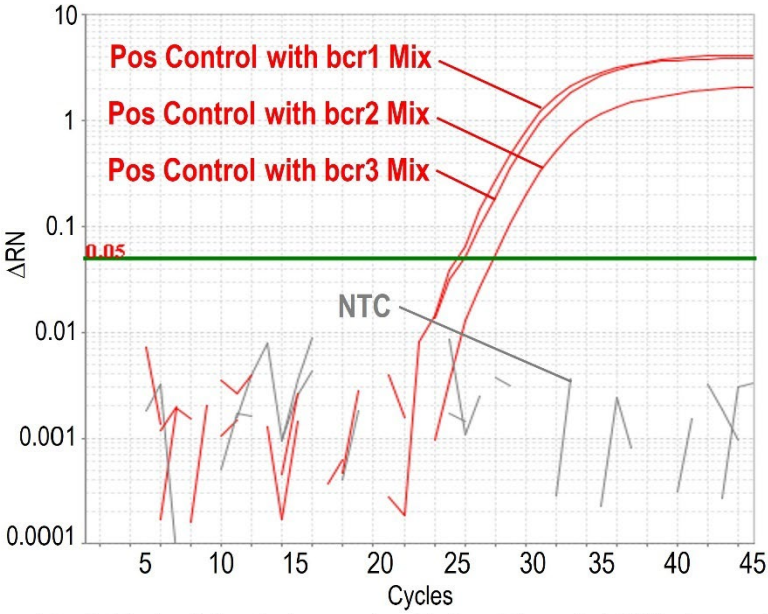


Fig 3. Typical Controls graph with bcr Mixes in FAM channel for StepOne

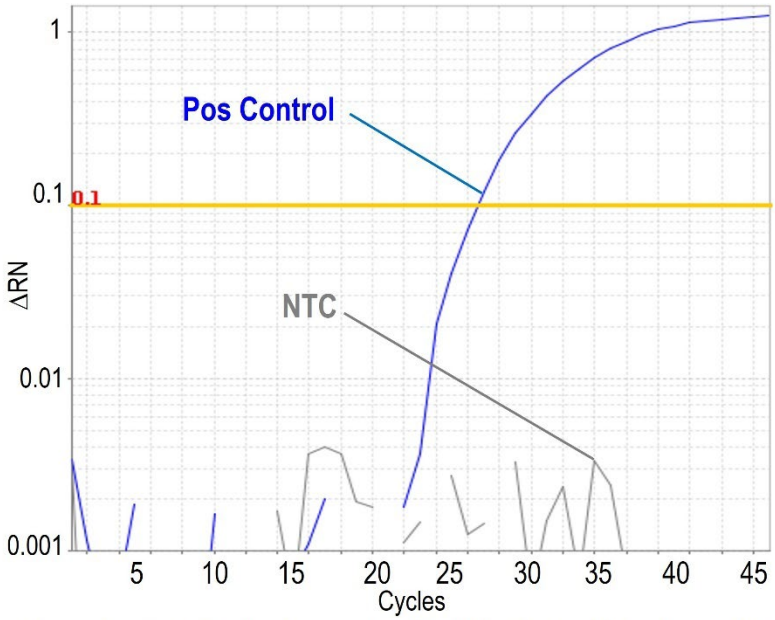


Fig 4. Typical Controls graph with ABL Mix in VIC channel for StepOne

Consider the following points when analyzing:

- A sample is **Positive for bcr1** if it is positive in the FAM channel with bcr1 Mix and in VIC/ABL channel with sigmoid graphs and CT of 20-40 for the FAM and 20-30 for the VIC.
- A sample is **Positive for bcr2** if it is positive in the FAM channel with bcr2 Mix and in VIC/ABL channel with sigmoid graphs and CT of 20-40 for the FAM and 20-30 for the VIC.
- A sample is **Positive for bcr3** if it is positive in the FAM channel with bcr3 Mix and in VIC/ABL channel with sigmoid graphs and CT of 20-40 for the FAM and 20-30 for the VIC.
- A sample is **Negative** if it is negative in the FAM channel with bcr1, bcr2 and bcr3 Mixes while it is positive in the VIC/ABL channel with CT of equal or less than Positive Control CT with ABL Mix.

- Results are **Inconclusive** and the test should be repeated if a sample is negative in the FAM channel with all Mixes bcr1, bcr2 and bcr3 and in the VIC/ABL channel with ABL Mix. Improper extraction or error in test set up could cause that.
- Results are **Inconclusive** and the test should be repeated if a sample is negative in the FAM/bcr channel while it is positive in the VIC/ABL channel with sigmoid graph and CT of above Positive Control CT with ABL Mix. Improper extraction or cDNA synthesis and 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 less than ABL Positive Control. CTs above Positive Control CT with ABL Mix, usually happens if not enough cells have been extracted or less than 1ug RNA has been used, which leads to reduce the sensitivity of the test and may result in ***False negative*** *reports.*

- Note: It is possible for a sample to be positive with a sigmoid graph in the FAM channel for all three mixes bcr1, bcr2, and bcr3 and also positive with a sigmoid graph and a CT of 20-30 in the ABL/VIC channel. In such cases, the sample is considered positive for the mix that shows the lowest CT in the FAM channel, which is most often bcr1.
- Note: It is possible for a sample to show positive results with a sigmoid graph in the FAM channel for two mixes bcr2 and bcr3 and also show a positive result with a sigmoid graph and a CT of 20-30 in the ABL/VIC channel. In such cases, the sample is considered positive for the mix that shows the lowest CT in the FAM channel, which is most often bcr2.

22. Analytical Sensitivity

Analytical sensitivity of the kit has been determined by examining dilution series of cloned cDNA and was estimated about 2

copies/ul or 0.02% to reach this sensitivity each sample should contain higher than 10,000 copies/ul ABL transcripts.

23. 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.

24. Technical Support

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

25. 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

26. References

- Bain, B.J., 2017. Leukaemia diagnosis. Hoboken, Nj John Wiley & Sons, Inc.
- De Braekeleer, E., Douet-Guilbert, N. and De Braekeleer, M., 2014. RARA fusion genes in acute promyelocytic leukemia: a review. Expert review of hematology, 7(3), pp.347-357.
- Liquori, A., Ibañez, M., Sargas, C., Sanz, M.Á., Barragán, E. and Cervera, J., 2020. Acute Promyelocytic Leukemia: A

Constellation of Molecular Events around a Single PML-RARA Fusion Gene. Cancers,12(3).

- Mackay IM., 2004. Real-time PCR in the microbiology laboratory. Clin. Microbiol. Infect.; 10 (3): 190 – 212.

27. Symbols

RUO	Research use only		Manufacturer		Consult instructions for use
LOT	Lot number	Σ	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