

راهنمای کیت WT1 RQ

پاییز ۱۴۰۴، ویرایش ۱/۲

جهت اندازه گیری بیان ژن WT1
به روش Real-Time PCR
مخصوص تحقیقات

 24 (Cat# WT1RQ24)

 48 (Cat# WT1RQ48)

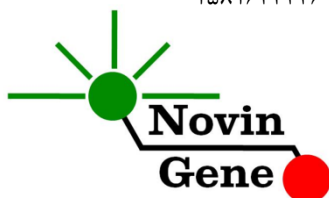
 96 (Cat# WT1RQ96)

 NG-WI-ASL-46-102

RUO

شرکت نوین ژن پارس ویرا

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



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	6
۹. سایر موارد مورد نیاز	۶
۱۰. احتیاط و اقدامات لازم	7
۱۱. نمونه مناسب و شرایط نگهداری و انتقال آن	۷
۱۲. عوامل مزاحم	۸
۱۳. استخراج RNA	۸
۱۴. تهیه cDNA	۹
۱۵. دستور کار 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	۱۲
۲۰. آنالیز نتایج Rotor-Gene	۱۳

۲۱. آنالیز نتایج StepOne	۱۶
۲۲. نرمالایز کردن WT1	18
۲۳. حساسیت	۱۹
۲۴. روش امحاء	۱۹
۲۵. پشتیبانی فنی	۱۹
۲۶. اطلاعات تماس	19
۲۷. منابع	۲۰
۲۸. توضیحات برچسب	۲۱

۱. مقدمه

کیت WT1 RQ جهت ارزیابی کمی بیان ژن WT1 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 WT1 RQ امکان ارزیابی کمی بیان ژن WT1 در مقایسه با ژن ABL را در نمونه با روش Real-Time PCR فراهم می‌کند. این کیت برای استفاده با دستگاه‌های Rotor-Gene، StepOne، و MIC طراحی شده است.

۳. اطلاعات زمینه‌ای

در مدیریت و درمان لوسمی AML (Acute Myeloid Leukemia) وضعیت جزء باقیمانده قابل اندازه‌گیری بیماری (Measurable Residual Disease/MRD) نقش تعیین‌کننده‌ای دارد. MRD را می‌توان با روش‌های مختلفی از جمله بررسی بیان ژن حاصل از ترانسلوکاسیون مرتبط ارزیابی نمود. اما بیش از نیمی از بیماران AML فاقد چنین ژن خاص مرتبط با بیماری می‌باشند. مطالعات نشان می‌دهد در مواردی که بررسی MRD با سایر روش‌ها امکان‌پذیر نباشد، میزان بیان ژن WT1 می‌تواند به عنوان یک نشانگر استفاده شود.

(A Hochhaus, 2020, Leukemia, 34:966)

بر اساس تحقیقات بالینی، ژن WT1 در افراد سالم نیز بیان می‌شود. در افراد سالم میانگین سطح بیان این ژن در خون محیطی تا ۵۰ نسخه به ازای هر ده هزار نسخه ABL و در نمونه مغز استخوان تا ۲۵۰ نسخه به ازای هر ده هزار نسخه ABL گزارش شده است (D Cilloni, 2009, Journal of Clinical Oncology 27:5195).

۴. اساس آزمایش

در این کیت، شناسایی توالی مورد نظر با استفاده از روش واکنش زنجیره ای پلیمرز 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، یک فلش کارت و مواد زیر می‌باشد:

برچسب	محتوا	حجم
WT1 Mix	میکس آماده برای WT1 *	۴۸۰ میکرولیتر
ABL Mix	میکس آماده برای ABL *	۴۸۰ میکرولیتر
WT1 S1	استاندارد ۱ WT1: صد هزار کپی در میکرولیتر	۱۵۰ میکرولیتر
WT1 S2	استاندارد ۲ WT1: ده هزار کپی در میکرولیتر	۱۵۰ میکرولیتر
WT1 S3	استاندارد ۳ WT1: هزار کپی در میکرولیتر	۱۵۰ میکرولیتر

۱۵۰ میکرولیتر	استاندارد ۴ WT1: صد کپی در میکرولیتر	WT1 S4
۱۵۰ میکرولیتر	استاندارد ۵ WT1: ده کپی در میکرولیتر	WT1 S5
۱۵۰ میکرولیتر	استاندارد ۱ ABL: صد هزار کپی در میکرولیتر	A1
۱۵۰ میکرولیتر	استاندارد ۲ ABL: ده هزار کپی در میکرولیتر	A2
۱۵۰ میکرولیتر	استاندارد ۳ ABL: هزار کپی در میکرولیتر	A3
۱۵۰ میکرولیتر	استاندارد ۴ ABL: صد کپی در میکرولیتر	A4
۲۰۰ میکرولیتر	آب مخصوص PCR	Water

* 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 و چهار، 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 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 یخچال دار 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 کاملاً 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 WT1 با این کیت، خون کامل (whole blood) و خون محیطی (peripheral blood) می باشد که در لوله استریل حاوی ماده ضد انعقاد جمع آوری شده است. ماده ضد انعقاد می تواند 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 زمان‌های طولانی‌تر از دو روز بهتر است آن را به حجم‌های 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 ۴/۵ میلی 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 روش‌ها و کیت‌های 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 می‌باشد 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 تیتراژ 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 آنها ذوب شوند. با چند تکان ملایم از مخلوط شدن مواد داخل آنها اطمینان حاصل کرده و برای چند ثانیه آنها را در دور پایین سانتریفیوژ کنید.

هر نمونه از نظر وجود mRNA برای دو ژن WT1 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 WT1 علاوه بر یک لوله برای نمونه هر بیمار، پنج لوله برای استانداردها (WT1 S1-S5) 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-A4) 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 **WT1 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 WT1 RQ جهت کار با دستگاه های Rotor-Gene، StepOne و MIC طراحی شده است.

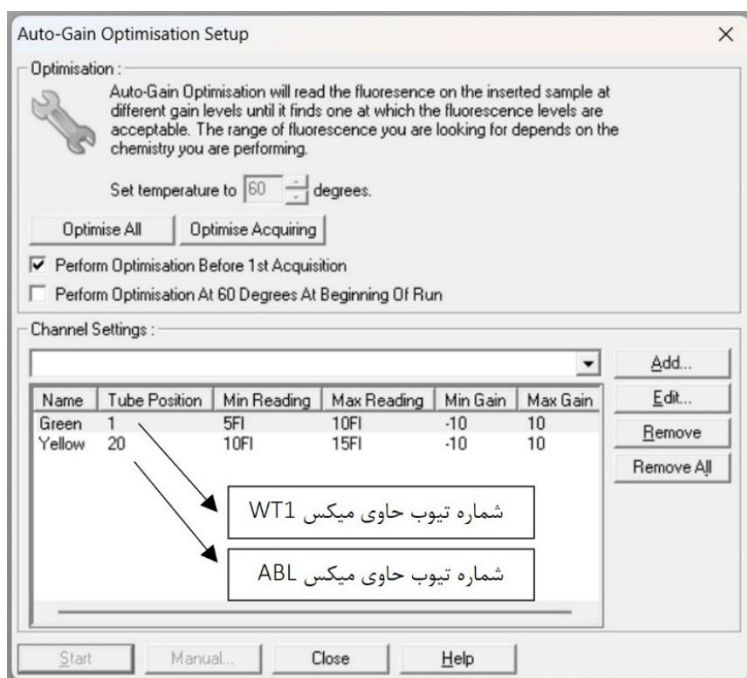
۱۷. تنظیم دستگاه RotorGene

ابتدا اطمینان حاصل کنید که رینگ محافظ را روی روتور قرار داده اید! دستگاه RotorGene را توسط کابل مخصوص آن با کامپیوتر متصل کرده و آن را به برق وصل کنید تا چراغ آبی جلوی آن روشن شود. فایل تمپلیت WT1 را از فلش کارت همراه کیت باز نمایید (همچنین قابل دسترس از طریق اسکن QR Code روی جعبه کیت). توجه فرمایید فایل WT1 0.1 یا WT1 0.2 را با توجه به نوع میکروتیوب 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 دقیقاً مطابق تصویر صفحه بعد برای هر دو کانال انجام دهید.

WT1 RQ (V1.2)

دقت داشته باشید Tube Position را برای کانال سبز روی شماره تیوبی تنظیم کنید که حاوی میکس WT1 است و برای کانال زرد شماره تیوبی را ثبت نمایید که حاوی میکس ABL می باشد.

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 WT1 و ABL تعریف شده اند و لوله های حاوی WT1 Mix

فقط در صفحه WT1 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 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 WT1، 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 می توانید 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 می کنید، 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	

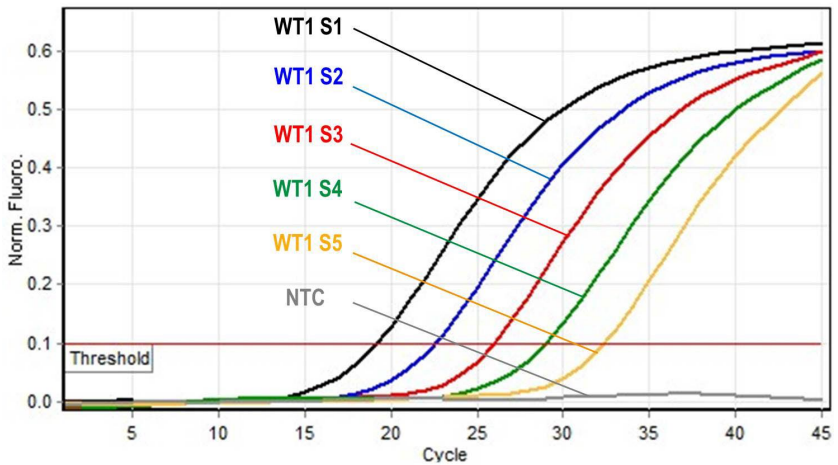
اندازه گیری تابش فلورسانس باید در دمای ۶۰ درجه و برای رنگ های FAM و VIC تنظیم شود. WT1 Mix و ABL Mix حاوی ROX می باشند. غلظت نهایی ROX در واکنش 300nM می باشد.

۲۰. آنالیز نتایج RotorGene

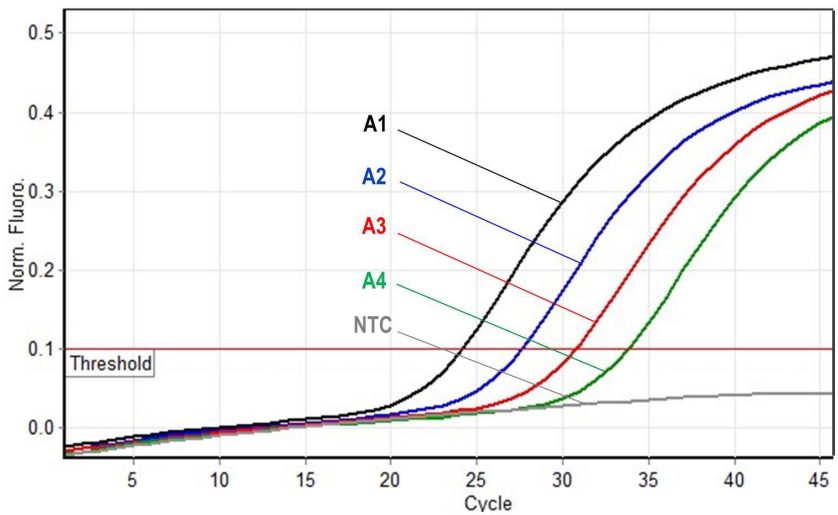
برای آنالیز نتایج به راهنمای RotorGene مراجعه کنید. به طور خلاصه از منوی Quantitation, Analysis را انتخاب کرده و روی Green دوبار کلیک کنید. در پنجره autofind threshold, دکمه cancel را بزنید و آستانه را روی ۰/۱ قرار داده و دکمه OK را بزنید تا منحنی استاندارد رسم و نتایج نشان داده شوند. سپس در منوی Analysis مجدداً Quantitation و سپس Yellow را کلیک کرده و آستانه را روی ۰/۱ 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 **WT1** و افزایش **تابش زرد (Yellow)** حاصل از **ABL** می باشد.

WT1 RQ (v1.2)



تصویر ۱. منحنی استانداردهای WT1 در کانال سبز دستگاه روتورژن



تصویر ۲. منحنی استانداردهای ABL در کانال زرد دستگاه روتورژن

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.

نتایج را با توجه به نکات زیر تفسیر کنید:

- در صورتی که نمونه در کانال WT1/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 نمونه در کانال WT1/Green منفی باشد ولی در کانال ABL/Yellow مثبت و دارای منحنی سیگموییدی و CT بین ۲۰ تا ۲۷ و با تیتراژ بالای ۲۰ هزار کپی در میکرولیتر باشد، نمونه **منفی** در نظر گرفته می‌شود.
- در صورتی که یک نمونه در هر دو کانال WT1/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 WT1/Green منفی باشد اما در کانال ABL/Yellow مثبت بوده و CT آن بالاتر از ۲۷ و تیتراژ 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 زرد باید مثبت و دارای منحنی

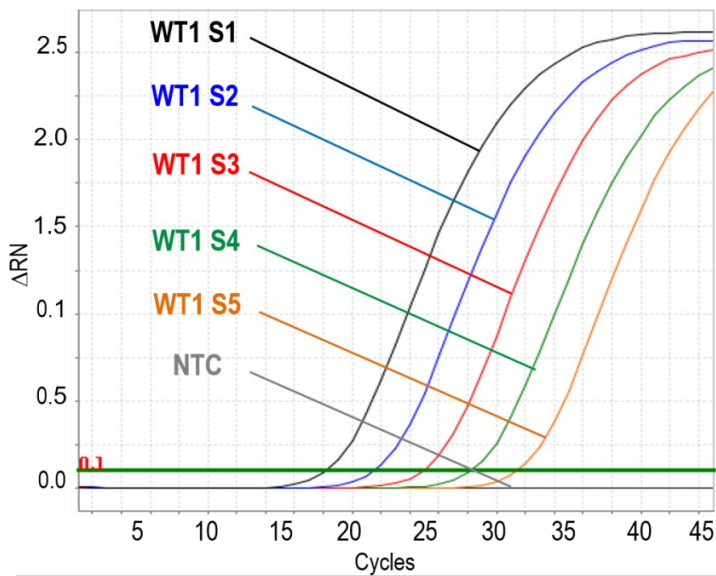
سیگموییدی و CT بین ۲۰ تا ۲۷ باشند. از جمله دلایلی که می‌تواند به CT بالاتر از ۲۷ منجر شود استخراج RNA از تعداد کم گلبول‌های سفید (کمتر از صد هزار) و یا استفاده از total RNA به میزان کمتر از ۱ میکروگرم برای تهیه cDNA می‌باشد. CT بالاتر از ۲۷ برای ABL و تیتراژ کمتر از ۲۰ هزار کپی در میکرولیتر باعث کاهش حساسیت تست و نتایج **منفی کاذب** می‌شود.

۲.۱. آنالیز نتایج StepOne

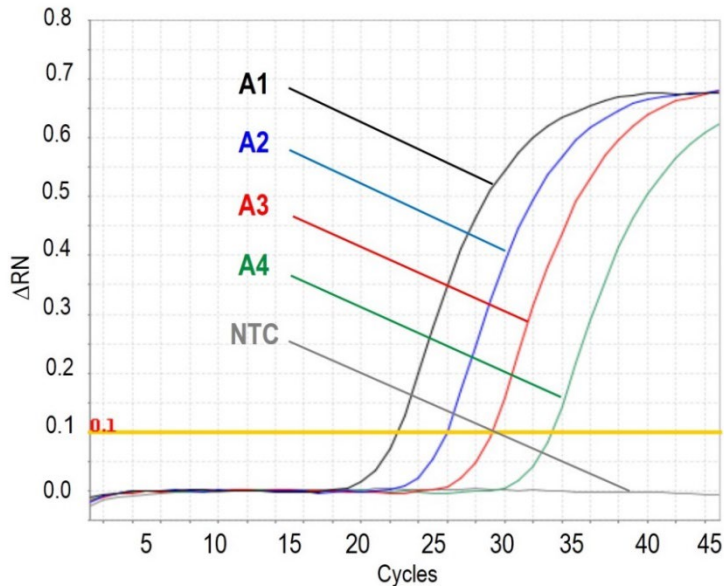
برای آنالیز نتایج به راهنمای StepOne مراجعه کنید. به طور خلاصه دکمه Analysis را کلیک کنید. برای WT1/FAM آستانه (threshold) را روی ۰/۱ و برای ABL/VIC نیز روی ۰/۱ قرار دهید. برای مشاهده نمودار مورد انتظار استانداردها، شاهد منفی و کنترل داخلی تصاویر سه و چهار را ملاحظه فرمایید. در نظر داشته باشید که افزایش **تابش FAM** حاصل از **WT1** و افزایش **تابش VIC** حاصل از **ABL** می‌باشد.

وجه 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.

WT1 RQ (V1.2)



تصویر ۳. منحنی استانداردهای WT1 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 WT1/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 WT1/FAM منفی بوده ولی در کانال ABL/VIC مثبت و دارای منحنی سیگموییدی و CT بین ۲۰ تا ۲۷ و با تیترا بالای ۲۰ هزار کپی در میکرولیتر باشد، نمونه **منفی** در نظر گرفته می‌شود.
- در صورتی که یک نمونه در هر دو کانال WT1/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 WT1/FAM منفی بوده ولی در کانال ABL/VIC مثبت و دارای منحنی سیگموییدی با CT بالاتر از ۲۷ و تیترا 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 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 تیترا کمتر از ۲۰ هزار کپی در میکرولیتر باعث کاهش حساسیت تست شده و باعث نتایج منفی کاذب می‌شود.

۲۲. نرمالایز کردن WT1

برای ارزیابی پاسخ درمانی هر بیمار تحت درمان باید میزان WT1 بیمار را محاسبه کنید. مبنای این محاسبه روش NCN می باشد. (D Cilloni, 2009, Journal of Clinical Oncology 27: 5195). در این روش، نسبت میزان رونویسی WT1 با میزان رونویسی ABL نرمال شده و به ازای ده هزار کپی ABL گزارش می شود. به عبارت دیگر تیترا WT1 را به تیترا ABL تقسیم کرده و در ده هزار ضرب کنید.

۲۳. حساسیت

حساسیت این کیت با استفاده از رقت های متوالی پلاسمید حاوی توالی هدف تعیین شده است و معادل ۲ کپی در میکرولیتر برای WT1 محاسبه گردید. برای دستیابی به این میزان حساسیت نمونه cDNA باید حاوی حداقل ده هزار نسخه از mRNA ژن ABL در هر میکرولیتر باشد.

۲۴. روش امحاء

محتویات کیت فاقد خطرات بیولوژیکی یا شیمیایی بوده و می توان آنها را مستقیماً 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 ارتباط با بخش پشتیبانی فنی می توانید 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

- Cilloni, D., Renneville, A., Hermitte, F., Hills, R.K., Daly, S., Jovanovic, J.V., Gottardi, E., Fava, M., Schnittger, S., Weiss, T. and Izzo, B., 2009. Real-time quantitative polymerase chain reaction detection of minimal residual disease by standardized WT1 assay to enhance risk stratification in acute myeloid leukemia: a European LeukemiaNet study. *Journal of Clinical Oncology*, 27(31), pp.5195-5201.
- Hastie, N., 2016. The Wilms' tumor (WT1) gene: methods and protocols. New York, NY: Humana Press.
- 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. and Hjorth-Hansen, H., 2020. European LeukemiaNet 2020 recommendations for treating chronic myeloid leukemia. *Leukemia*, 34(4), pp.966-984.

- Mackay IM. Real-time PCR in the microbiology laboratory. Clin. Microbiol. Infect. 2004; 10 (3): 190 – 212.
- Yang, L., Han, Y., Saurez Saiz, F. and Minden, M.D., 2007. A tumor suppressor and oncogene: the WT1 story. Leukemia, 21(5), pp.868-876.

۲۸. توضیحات برچسب

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

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

WT1 RQ Kit Manual

Autumn 2025, Version 1.2

For Real-Time PCR Quantitation of WT1 Transcripts
For Research Use Only

 24 (Cat# WT1RQ24)

 48 (Cat# WT1RQ48)

 96 (Cat# WT1RQ96)

 NG-WI-ASL-46-102

RUO



NovinGene ParsVira

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

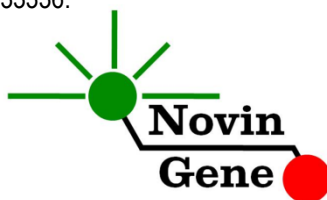


Table of Contents

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. WT1 Normalization	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

WT1 RQ kit provides a ready-to-use Real-Time polymerase chain reaction (PCR) test designed for detecting and quantifying WT1 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 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

WT1 RQ kit is intended for detecting and quantifying of WT1 expression in sample. Detection is achieved using Real-Time PCR and is compatible with Rotor-Gene, StepOne and MIC machines.

3. Background Information

Measurable Residual Disease (MRD) is an important factor for risk stratification and treatment planning for AML patients. MRD could be evaluated according to different parameters including AML related gene expression. According to current LeukemiaNet guidelines, when no other parameter is available, WT1 expression may be used as MRD marker (A Hochhaus, 2020, Leukemia, 34:966).

Clinical studies revealed, WT1 is expressed in normal hematopoietic cells. The average expression level of this gene has been reported up to 50 copies per 10^4 ABL copies in peripheral blood and up to 250 copies/ 10^4 ABL in bone marrow. (D Cilloni, 2009, Journal of Clinical Oncology 27:5195).

This kit provides a ready-to-use system for quantitation of WT1 and ABL transcripts.

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, a flash card, and the following reagents:

Label	Content	Quantity
WT1 Mix	Mix for WT1*	480 µl
ABL Mix	Mix for ABL*	480 µl
WT1 S1	WT1 Standard 1: 100,000 copies/µl	150 µl
WT1 S2	WT1 Standard 2: 10,000 copies/µl	150 µl
WT1 S3	WT1 Standard 3: 1,000 copies/µl	150 µl
WT1 S4	WT1 Standard 4: 100 copies/µl	150 µl
WT1 S5	WT1 Standard 5: 10 copies/µl	150 µl
A1	ABL Standard 1: 100,000 copies/µl	150 µl
A2	ABL Standard 2: 10,000 copies/µl	150 µl
A3	ABL Standard 3: 1,000 copies/µl	150 µl
A4	ABL Standard 4: 100 copies/µl	150 µl
Water	PCR Grade Water	200 µl

* 1, 2 and 4 tubes for 24, 48 and 96 reactions 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 pipettors 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 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 about 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, 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, 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.

WT1 RQ (V1.2)

Each sample should be examined for both in WT1 fusion gene and for ABL control gene. So, two sets of reactions are required. In WT1 set, consider 1 tube for each sample as well as 6 tubes for the 5 standards (WT1 S1 to WT1 S5) 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 WT1 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 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

WT1 RQ kit is designed to work with Rotor-Gene, StepOne and MIC.

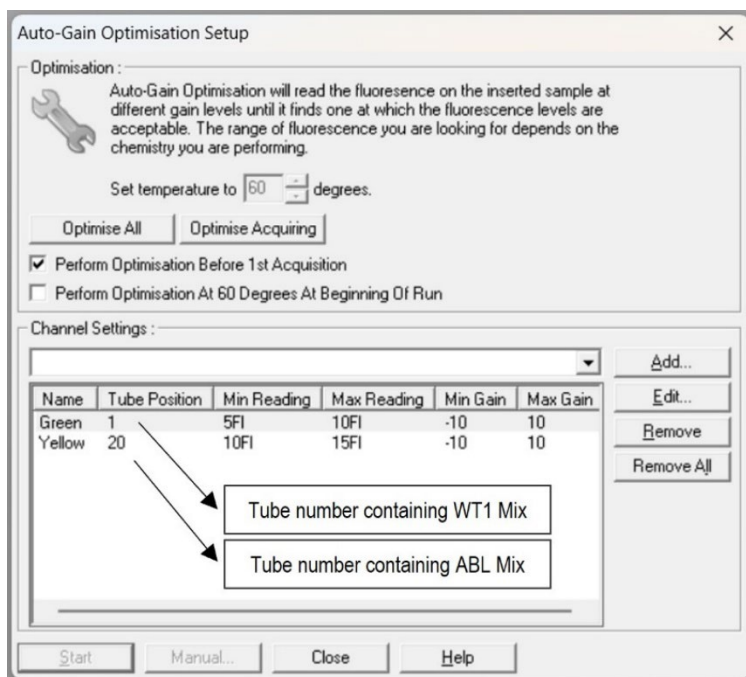
17. Programming RotorGene

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

Open the WT1 template file for Rotor-Gene (provided in the flash card, or accessible by kit QR code); WT1 0.1 is for strip tubes and WT1 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 below image. Select a tube number containing WT1 Mix for the Green channel and tube with ABL Mix for the Yellow channel.

WT1 RQ (v1.2)



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 WT1 and ABL pages. Remember that tubes containing WT1 Mix should only be named in WT1 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, five standards for WT1, four standards for ABL and a few samples are defined. You may change plate set up 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 WT1 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 **WT1 (the Green channel)** and **ABL**

WT1 RQ (V1.2)

(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 0.1. Repeat above for the Yellow channel and set the threshold at 0.1. Figures 1 and 2 represent typical graphs for the 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.

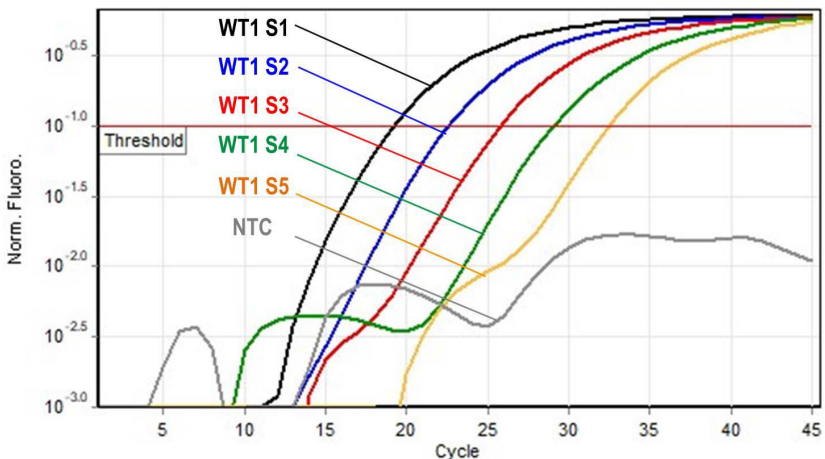


Fig 1. Typical WT1 graph in Green channel for Rotor-Gene

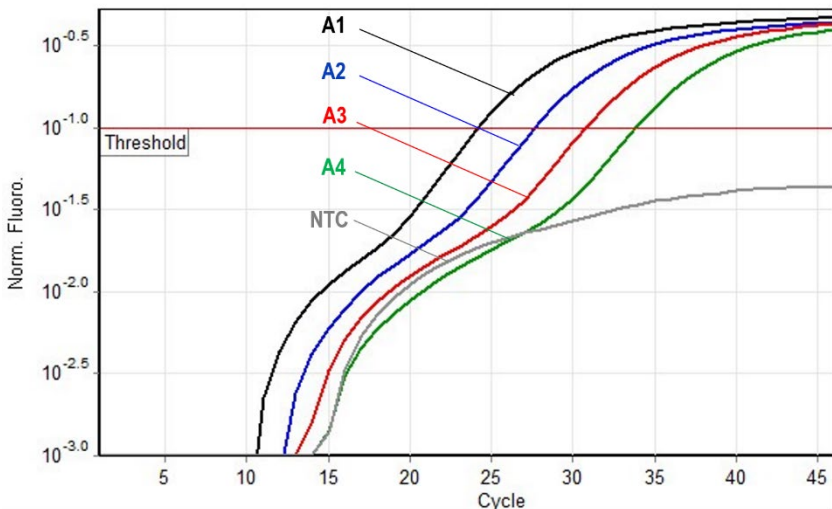


Fig 2. Typical ABL graph in Yellow channel for Rotor-Gene

Consider the following points when analyzing:

- A sample is **Positive** if it is positive in both the Green/WT1 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 it is negative in the Green/WT1 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/WT1 and 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/WT1 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 **alse negative** reports.*

21. Data Analysis: StepOne

Analyze the data according to StepOne manual. Briefly, click on “Analyze” and set the threshold for the **WT1/FAM** and the **ABL/VIC** on 0.1. Figures 3 and 4 represent typical graphs for the StepOne machine.

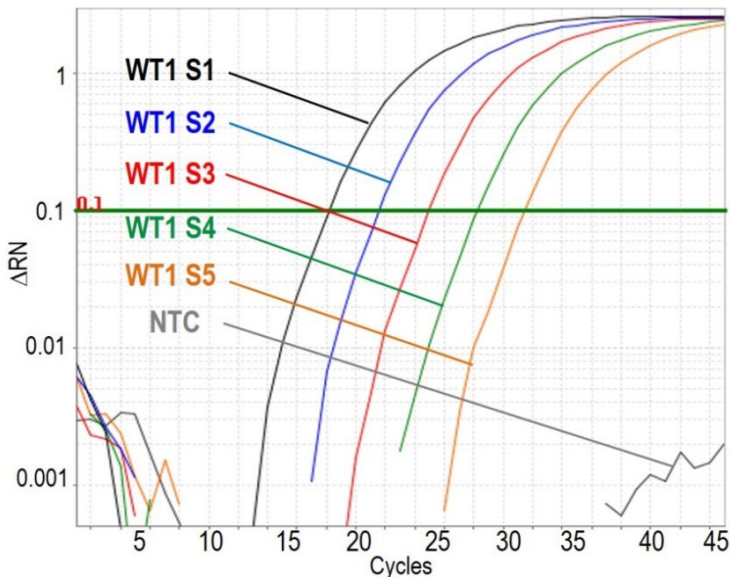


Fig 3. Typical WT1 graph in FAM channel for StepOne

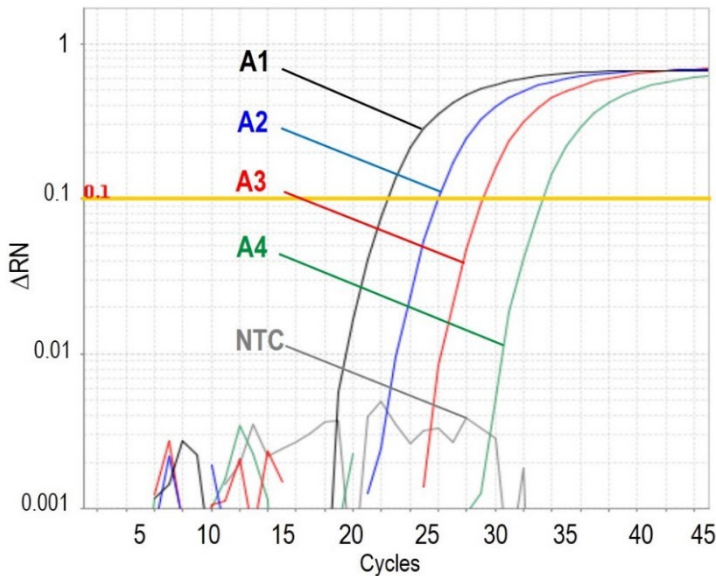


Fig 4. Typical ABL graph in VIC channel for StepOne

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/WT1 and VIC/ABL channels 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/WT1 channel while it is positive in the VIC/ABL channel with a sigmoid graph and CT of 20-27 with 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/WT1 and 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/WT1 channel while it is positive in the VIC/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 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 or ABL titer less than 20,000 copies/ul reduce the sensitivity of the test and may result in **false negative** reports.*

22. WT1 Normalization

To assess the response to therapy, WT1 value for each patient can be calculated with NCN method (D Cilloni, 2009, Journal of Clinical Oncology 27:5195).

In this method, the WT1 transcripts (titer) normalized by the ABL transcripts (titer) and then multiplied by 10,000 copies of ABL.

23. Analytical Sensitivity

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

- Cilloni, D., Renneville, A., Hermitte, F., Hills, R.K., Daly, S., Jovanovic, J.V., Gottardi, E., Fava, M., Schnittger, S., Weiss, T. and Izzo, B., 2009. Real-time quantitative polymerase chain reaction detection of minimal residual disease by standardized WT1 assay to enhance risk stratification in acute myeloid leukemia: a European LeukemiaNet study. *Journal of Clinical Oncology*, 27(31), pp.5195-5201.
- Hastie, N., 2016. The Wilms' tumor (WT1) gene: methods and protocols. New York, NY: Humana Press.
- 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. and Hjorth-Hansen, H., 2020.

European LeukemiaNet 2020 recommendations for treating chronic myeloid leukemia. Leukemia, 34(4), pp.966-984.

- Mackay IM. Real-time PCR in the microbiology laboratory. Clin. Microbiol. Infect. 2004; 10 (3): 190 – 212.
- Yang, L., Han, Y., Saurez Saiz, F. and Minden, M.D., 2007. A tumor suppressor and oncogene: the WT1 story. Leukemia, 21(5), pp.868-876.

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	 Temperature limit

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

