

راهنمای کیت MBCR 210 RQ

کیت MBCR 210 RQ جهت تشخیص ناهنجاری کروموزومی یا ترانسلوکاسیون BCR-ABL در خون محیطی و محاسبه درصد BCR-ABL در بیماران می‌باشد. همچنین با استفاده از IS-MMR نتایج را می‌توان کالیبر کرده و بر اساس استاندارد بین المللی گزارش نمود. این کیت جهت مصارف تحقیقاتی و کار با دستگاه های Rotor-Gene و StepOne طراحی شده است.

توجه داشته باشید این کیت فاقد مواد لازم برای استخراج RNA یا تهیه cDNA می باشد!

محتویات کیت: این کیت شامل یک راهنما 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: صد هزار کپی در میکرولیتر	۲۵۰ میکرولیتر
MA2	استاندارد ۲: ده هزار کپی در میکرولیتر	۲۵۰ میکرولیتر
MA3	استاندارد ۳: هزار کپی در میکرولیتر	۲۵۰ میکرولیتر
MA4	استاندارد ۴: 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 RNA با تیترا بالا	۱۵ میکرولیتر
Water	آب مخصوص PCR	۲۰۰ میکرولیتر

تمامی مواد کیت باید در دمای ۱۰ تا ۳۰ درجه زیر صفر نگهداری شوند.

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. در نظر داشته باشید که علاوه بر نمونه های بیمار برای استفاده از کالیبراتور IS-MMR در این مرحله 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.

روش استفاده: هر نمونه از نظر وجود mRNA برای دو ژن ABL و BCR-ABL (p210) 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 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 و درپوش لوله ها را ببندید. سپس آن ها را مطابق شماره ها داخل دستگاه قرار دهید.

تنظیم دستگاه: برای تنظیم دستگاه Rotor-Gene یا StepOne از فایل تمپلیت مخصوص این کیت استفاده کنید. همچنین می توانید 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. MBCR Mix و ABL Mix موجود در کیت حاوی ROX می باشند. غلظت نهایی ROX در واکنش 300nM می باشد.

آنالیز نتایج: توجه داشته باشید که افزایش افزایش تابش سبز (Green) مربوط به BCR-ABL و افزایش تابش زرد (Yellow) حاصل از ABL می باشد.

همچنین 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 می باشد. در غیاب منحنی سیگموییدی، نمونه منفی محسوب می شود و (CT آن) در صورت وجود فاقد ارزش می باشد.

بر اساس نکات بالا نتایج به طور خلاصه در جدول زیر نشان داده شده اند:

	Green/FAM	Yellow/VIC	Result
1	+	+	Positive
2	-	+	Negative
3	-	-	invalid
4	-	+	Invalid


محاسبه %BCR-ABL: برای ارزیابی پاسخ درمانی هر بیمار تحت درمان باید میزان %BCR-ABL بیمار را محاسبه کنید. مبنای این محاسبه روش NCN می باشد (Beillard (E. 2003, Leukemia 17:2474). در این روش نسبت میزان بیان BCR-ABL با میزان بیان ABL نرمال شده و درصد آن محاسبه می شود. به عبارت دیگر تیترا BCR-ABL را به تیترا ABL تقسیم کرده و در ۱۰۰ ضرب کنید. 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. برای توضیحات بیشتر به مقاله (2003, Leukemia 17:2318) J. Gabert مراجعه کنید.

تبدیل نتایج به مقیاس بین المللی (IS Conversion): جهت استانداردسازی نتایج نمونه ها، بخش ۲۳ دفترچه راهنما، ورژن ۶/۰ و یا بالاتر را ملاحظه فرمایید.

میزان 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.

توضیحات برچسب:

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

جهت توضیحات بیشتر در مورد کیت های نوین ژن، دریافت فایل کامل دفترچه راهنمای کیت و فایل تمپلیت برای تنظیم دستگاه و آشنایی با نمایندگان فروش، به وبسایت ما به نشانی www.novingene.com مراجعه فرمایید یا QR Code موجود بر روی جعبه کیت را اسکن نمایید. جهت کسب اطلاعات بیشتر با پشتیبانی فنی تماس بگیرید.