

راهنمای کیت PML-RARA 3X RQ

کیت PML-RARA 3X RQ جهت تشخیص ناهنجاری کروموزومی PML-RARA در خون محیطی می‌باشد. این کیت به منظور بررسی ۳ ایزوفرم این ترنسلوکاسیون با عنوان bcr1، bcr2 و bcr3 طراحی شده است. این کیت مخصوص استفاده تحقیقاتی است و برای استفاده با دستگاه‌های RotorGene، StepOne و MIC کاربرد دارد. توجه داشته باشید، این کیت فاقد مواد لازم برای استخراج RNA یا تهیه cDNA می‌باشد!

محتویات کیت: این کیت شامل یک راهنما 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 ده هزار کپی در میکرولیتر ABL	۱۵۰ 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 یک میکروگرم total RNA برای این تست مورد نیاز می‌باشد که باید با استفاده از Random Hexamers به cDNA تبدیل شود. 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 bcr1، bcr2، bcr3 و ABL باید بررسی شود. به این منظور برای هر نمونه، چهار واکنش PCR در چهار سری لوله‌ی

NG-WI-ASL-65-100-S

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.

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 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 می باشند. غلظت نهایی ROX در واکنش 300nM می باشد.

آنالیز نتایج: توجه داشته باشید که افزایش **تابش سبز (Green)** مربوط به **bcr1**، **bcr2** و **bcr3** 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	Pos with bcr1 Mix (CT 20-40)	+ (CT 20-30)	Positive for bcr1
2	Pos with bcr2 Mix (CT 20-40)	+ (CT 20-30)	Positive for bcr2
3	Pos with bcr3 Mix (CT 20-40)	+ (CT 20-30)	Positive for bcr3
4	-	+ Sample CT < Pos Ctrl CT	Negative
5	-	-	Invalid
6	-	+ Sample CT > Pos Ctrl CT	Invalid

- 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 دارد، مثبت است که غالباً **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 دارد، مثبت است که غالباً **bcr2** می‌باشد.

میزان حساسیت: حساسیت این کیت با استفاده از رقت های متوالی پلاسمید حاوی توالی هدف تعیین شده است و معادل ۲ کپی در میکرولیتر یا ۰.۲٪ برای bcr می‌باشد. برای دستیابی به این میزان حساسیت نمونه cDNA باید حاوی ده هزار نسخه از mRNA ABL در هر میکرولیتر باشد.

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	شماره کاتالوگ	REF

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.