

راهنمای کیت PML-RARA RQ

کیت PML-RARA RQ جهت تشخیص ناهنجاری کروموزومی یا ترانسلوکاسیون PML-RARA در خون محیطی و محاسبه درصد آن در بیماران تحت درمان می‌باشد. این کیت مخصوص استفاده تحقیقاتی است و برای استفاده با دستگاه RotorGene StepOne و MIC طراحی شده است.

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
BCR1/2/3 Mix	میکس آماده برای PML-RARA	۴۸۰ میکرولیتر
ABL Mix	میکس آماده برای ABL	۴۸۰ میکرولیتر
bcr1/2/3 S1	استاندارد ۱ bcr1/2/3: صد هزار کپی در میکرولیتر	۱۵۰ میکرولیتر
bcr1/2/3 S2	استاندارد ۲ bcr1/2/3: ده هزار کپی در میکرولیتر	۱۵۰ میکرولیتر
bcr1/2/3 S3	استاندارد ۳ bcr1/2/3: هزار کپی در میکرولیتر	۱۵۰ میکرولیتر
bcr1/2/3 S4	استاندارد ۴ bcr1/2/3: صد کپی در میکرولیتر	۱۵۰ میکرولیتر
bcr1/2/3 S5	استاندارد ۵ bcr1/2/3: ده کپی در میکرولیتر	۱۵۰ میکرولیتر
A1	استاندارد ۱ ABL: صد هزار کپی در میکرولیتر	۱۵۰ میکرولیتر
A2	استاندارد ۲ ABL: ده هزار کپی در میکرولیتر	۱۵۰ میکرولیتر
A3	استاندارد ۳ ABL: هزار کپی در میکرولیتر	۱۵۰ میکرولیتر
A4	استاندارد ۴ ABL: صد کپی در میکرولیتر	۱۵۰ میکرولیتر
Water	آب مخصوص PCR	۲۰۰ میکرولیتر

توجه داشته باشید هر کیت تنها حاوی میکس و استانداردهای یکی از انواع bcr1, bcr2 یا bcr3 می‌باشد.

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 می باشد که باید با استفاده از Random Hexamers یا پرایمرهای اختصاصی به cDNA تبدیل شود. بهتر است از پرایمرهای اختصاصی برای این کار استفاده کنید که در صورت درخواست همراه با کیت ارسال می شود. اما استفاده از Random Hexamers نیز مانعی ندارد. 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 PML-RARA 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 PML-RARA علاوه بر یک لوله برای نمونه هر بیمار، پنج لوله برای استانداردها (bcr 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 **PML-RARA 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 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. PML-RARA 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 تابش سبز (Green) مربوط به PML-RARA 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	+ (CT 20-40)	+ (CT 20-30)	Positive
2	-	+ (CT 20-27)	Negative
3	-	-	Invalid
4	-	+ (CT>27)	Invalid

محاسبه PML-RARA %: برای ارزیابی پاسخ درمانی هر بیمار تحت درمان باید میزان PML-RARA % بیمار را محاسبه کنید. مبنای این محاسبه روش NCN می باشد (Beillard E. 2003, Leukemia 17:2474). در این روش نسبت میزان رونویسی PML-RARA با میزان رونویسی ABL نرمال شده و درصد آن محاسبه می شود. به عبارت

دیگر تیتراژ PML-RARA را به تیتراژ ABL تقسیم کرده و در ۱۰۰٪ ضرب کنید. نتایج نسبت PML-RARA/ABL را در نمونه بیماران در زمان تشخیص بین ۹٪ تا ۱۸۲٪ با میانگین ۳۶-۳۰٪ نشان می دهند. (Gabert 2003 Leukemia 17:2318)

میزان حساسیت: حساسیت این کیت با استفاده از رقت های متوالی پلاسمید حاوی متوالی هدف تعیین شده است و معادل ۲ کپی در میکرولیتر یا ۰/۰۲٪ برای PML-RARA محاسبه گردید. برای دستیابی به این میزان حساسیت نمونه cDNA باید حاوی ده هزار نسخه از mRNA ژن 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	 -30°C -10°C	شماره سریال	SN	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.