

راهنمای کیت

PML-RARA RQ

جهت تشخیص و کمیت سنجی رونویسی

PML-RARA

به روش Real-Time PCR

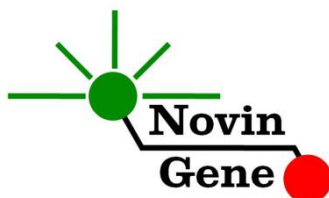
جهت کار با دستگاه Rotor-Gene یا StepOne

مخصوص تحقیقات

NG-WI-ASL-30-100

ویرایش ۱/۱

پاییز ۱۳۹۸



فهرست مندرجات

۱. مقدمه.....	۲
۲. محتویات کیت.....	۳
۳. شرایط نگهداری و پایداری کیت.....	۴
۴. سایر موارد مورد نیاز.....	۴
۵. نکات قابل توجه.....	۵
۶. نمونه مناسب و شرایط نگهداری و انتقال آن.....	۶
۷. استخراج RNA.....	۶
۸. تهیه cDNA.....	۷
۹. دستور کار PCR.....	۷
۱۰. تنظیم دستگاه RotorGene.....	۸
۱۱. تنظیم دستگاه StepOne.....	۹
۱۲. تنظیم سایر دستگاه ها.....	۱۰
۱۳. آنالیز نتایج RotorGene.....	۱۰
۱۴. آنالیز نتایج StepOne.....	۱۳
۱۵. محاسبه درصد PML-RARA.....	۱۵
۱۶. حساسیت.....	۱۶

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

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

۱. مقدمه

ناهنجاری کروموزومی PML-RARA حاصل از جابجایی کروموزومی 15;17 می باشد. در نتیجه این جابجایی، ژن RARA (Retinoic Acid Receptor Alpha) در مجاورت ژن PML (promyelocytic leukemia) قرار می گیرد و یک ژن هیبرید تشکیل می شود. این مجاورت سبب تولید پروتئین هیبریدی PML-RARA می شود که به عنوان مهارکننده رونویسی عمل می کند و سبب اختلال در تمایز رده میلویدی (myeloid) می شود. این ترانسلوکاسیون در بیش از ۹۰٪ موارد APL (acute progranulocytic leukemia)، حدود ۱۰ تا ۱۵٪ کل موارد AML (acute myeloid leukemia) مشاهده می شود.

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 بیفتند. 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 می شوند.

کیت حاضر مواد لازم برای تشخیص این ترانسلوکاسیون و محاسبه درصد آن پس از تشخیص و طی دوره درمان به روش Real-Time PCR را فراهم می کند. در این روش با استفاده از پروب های نشاندار شده به رنگ های فلورسنت

می توان محصول PCR را بررسی نمود بدون اینکه پس از پایان واکنش نیاز به انجام مراحل بعدی باشد. لذا امکان ایجاد آلودگی نیز به لحاظ تئوری وجود نخواهد داشت.

این کیت برای استفاده با دستگاه RotorGene یا دستگاه StepOne طراحی شده است.

۲. محتویات کیت

این کیت شامل یک دفترچه راهنما، یک لوح فشرده و مواد زیر می باشد:
توجه داشته باشید در هر کیت تنها حاوی میکس و استانداردهای یکی از انواع bcr1 یا bcr2 و یا bcr3 می باشد.

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

* یک، دو یا چهار عدد، به ترتیب برای کیت های ۲۴، ۴۸ و ۹۶ واکنشی

۳. شرایط نگهداری و پایداری کیت

تمامی مواد کیت که در جدول بالا ذکر شده است 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 و بیش از سه بار این مواد به ویژه میکس PCR خودداری کنید، زیرا باعث کاهش حساسیت و عدم کارایی آن ها می شود.

۴. 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 ۱/۷ میلی لیتری و میکروتیوب مخصوص Real-Time PCR
- دستکش لاتکس یا نیتریل بدون پودر
- بلوک آلومینیومی (بلوک سرد)

۵. نکات قابل توجه

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.

۶. نمونه مناسب و شرایط نگهداری و انتقال آن

نمونه مناسب برای آزمایش PML-RARA با این کیت، خون کامل (peripheral blood) و مغز استخوان 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 می توان تا ۷۲ ساعت در ۴ درجه نگهداری و به آزمایشگاه منتقل نمود.

RNA را می توان مستقیماً از خون استخراج کرد. همچنین برای افزایش حساسیت تست می توان از بافی (buffy coat) استفاده کرد. یک نمونه مناسب باید حاوی ۵ تا ۱۰ میلیون گلبول سفید در هر ۱۵۰ میکرولیتر باشد. برای نگهداری خون کامل یا بافی در زمان های طولانی تر از سه 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 می ماند.

۷. استخراج RNA

برای استخراج RNA از نمونه از روش ها و کیت های مختلفی می توان 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)

۸. 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. کیت های متعددی برای این کار در دسترس می باشند.

لازم به یادآوری است که استفاده از پرایمرهای اختصاصی PML-RARA و ABL برای تهیه cDNA باعث کاهش CT ژن ABL و افزایش حساسیت تست میشود. این پرایمرها در صورت درخواست به همراه کیت در اختیار شما قرار می گیرد. در صورتی که برای سنتز cDNA از Random Hexamer استفاده شود و CT مشاهده شده برای ABL از ۲۷ بالاتر باشد، بهتر است از پرایمرهای اختصاصی برای تهیه cDNA استفاده شود. به طور خلاصه، ابتدا رسوب RNA را در ۲۰ میکرولیتر از محلول پرایمرها حل نموده و سپس سایر مواد واکنش را به آن اضافه 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.

۹. دستور کار PCR

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 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 **bcr 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.

توجه: در صورت استفاده از دستگاه **StepOne** لوله ها را ابتدا به مدت کوتاهی سانتیفریژ نموده و سپس داخل دستگاه قرار دهید.

توجه: هنگام استفاده از دستگاه روتورژن، رینگ محافظ را نیز در پایان اضافه کنید.

۱۰. 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.

در لوح فشرده همراه کیت روی فایل "PML-RARA 0.2" و یا "PML-RARA Strip" (با توجه به نوع میکروتیوب استفاده شده) دوبار کلیک کنید تا برنامه باز شود.

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 PML-RARA و ABL تعریف شده اند و لوله های حاوی bcr Mix فقط در صفحه PML-RARA 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.

۱۱. تنظیم دستگاه StepOne

نرم افزار دستگاه را باز کنید (StepOne software 2.*). از منوی Set Up روی دکمه Template کلیک کنید و فایل داخل لوح فشرده همراه کیت را انتخاب کنید.

از منوی سمت چپ Plate Setup و سپس دکمه Assign Targets and Samples را انتخاب کنید. یک کنترل منفی به همراه پنج استاندارد برای bcr و 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.

۱۲. 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:

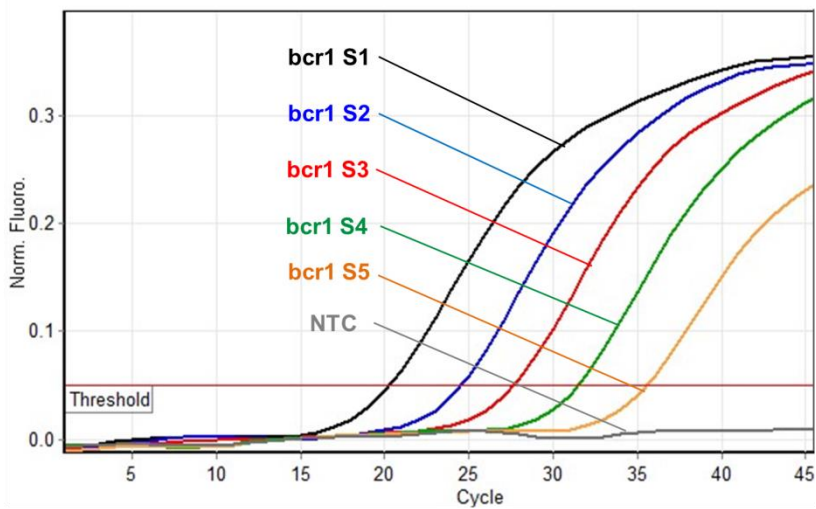
Step	Temperature and time	Cycles
1	95°C x 10 min	1
2	95°C x 15 sec	45
	60°C x 60 sec	

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

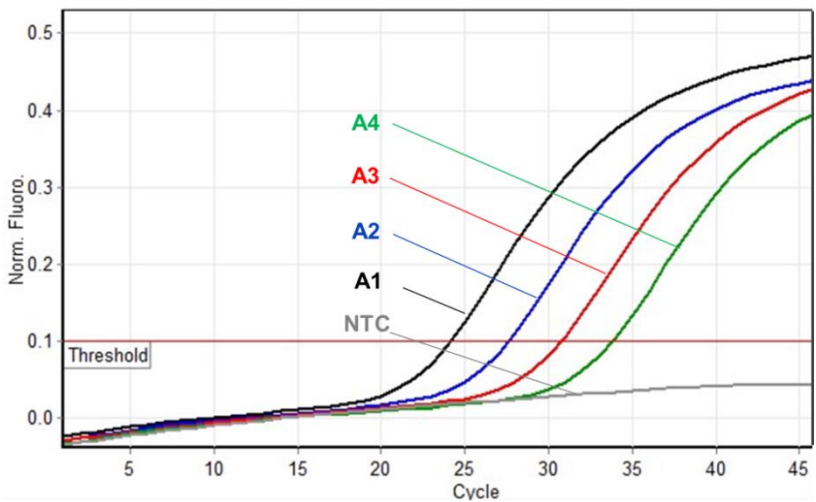
۱۳. آنالیز نتایج RotorGene

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 ۰/۰۵ 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.

PML-RARA RQ (V1.1)



تصویر ۱: منحنی استانداردهای bcr1 PML-RARA, در کانال سبز دستگاه روتورژن



تصویر ۲: منحنی استانداردهای ABL در کانال زرد دستگاه روتورژن

نتایج را با توجه به نکات زیر تفسیر کنید:

در نظر داشته باشید که افزایش **تابش سبز (Green)** مربوط به **PML-RARA** و افزایش **تابش زرد (Yellow)** حاصل از **ABL** می باشد.

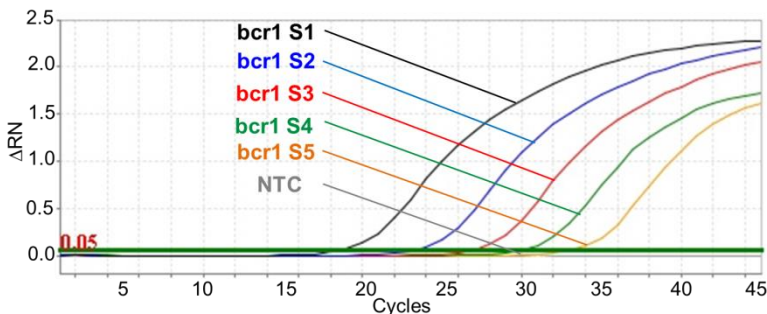
توجه داشته باشید نمونه تنها زمانی مثبت در نظر گرفته می شود که دارای منحنی سیگموییدی و فاز لگاریتمی باشد و تنها در این حالت CT معتبر بوده و قابل استناد و تفسیر می باشد. در غیاب منحنی سیگموییدی، نمونه منفی محسوب می شود و (CT آن) در صورت وجود فاقد ارزش می باشد.

- در صورتی که نمونه در کانال PML-RARA /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** می باشد.
- در صورتی که یک نمونه در کانال PML-RARA/Green منفی باشد ولی در کانال ABL/Yellow مثبت و دارای منحنی سیگموییدی و CT بین ۲۰ تا ۲۷ باشد، نمونه **منفی** در نظر گرفته می شود.
- در صورتی که یک نمونه در هر دو کانال PML-RARA/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 PML-RARA/Green منفی باشد اما در کانال ABL/Yellow مثبت بوده و CT آن بالاتر از ۲۷ باشد، نتیجه **نامعتبر** بوده و آزمایش باید **تکرار** شود. غلظت پایین RNA می تواند دلیل این مشکل باشد.

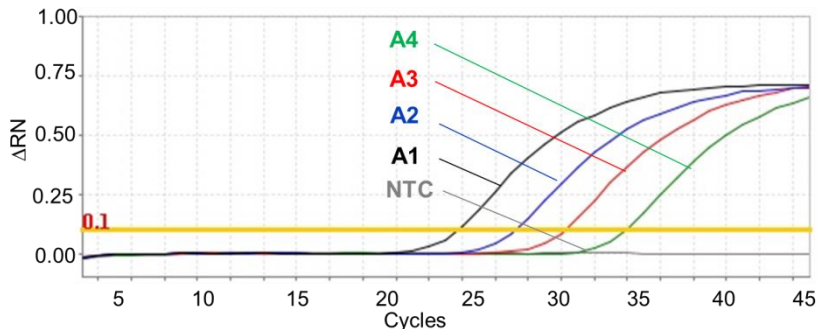
توجه! تمام نمونه های بیماران در کانال زرد باید مثبت و دارای منحنی سیگموییدی و CT بین ۲۰ تا ۲۷ باشند. از جمله دلایلی که می تواند به CT بالاتر از ۲۷ منجر شود استخراج RNA از تعداد کم گلبول های سفید (کمتر از صد هزار) و یا استفاده از total RNA به میزان کمتر از ۱۰۰ نانوگرم برای تهیه cDNA می باشد. CT بالاتر از ۲۷ برای ABL باعث کاهش حساسیت تست و نتایج **منفی کاذب** میشود.

۱۴. آنالیز نتایج StepOne

برای آنالیز نتایج به راهنمای StepOne مراجعه کنید. به طور خلاصه دکمه Analysis را کلیک کنید. برای PML-RARA/FAM آستانه (threshold) را روی ۰/۰۵ 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.



تصویر ۳. منحنی استانداردهای bcr1 PML-RARA, 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 نظر داشته باشید که افزایش **تابش FAM** حاصل از **PML-RARA** و افزایش **تابش VIC** حاصل از **ABL** می باشد.

توجه داشته باشید 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.

- در صورتی که نمونه در کانال PML-RARA /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** می باشد.
- در صورتی که یک نمونه در کانال PML-RARA /FAM منفی بوده ولی در کانال ABL/VIC مثبت و دارای منحنی سیگموییدی و CT بین ۲۰ تا ۲۷ باشد، نمونه **منفی** در نظر گرفته می شود.

- در صورتی که یک نمونه در هر دو کانال PML-RARA /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 PML-RARA /FAM منفی بوده ولی در کانال ABL/VIC مثبت و دارای منحنی سیگموئید با CT بالاتر از ۲۷ باشد، نتیجه **نامعتبر** بوده و آزمایش باید **تکرار** شود. غلظت پایین RNA می تواند دلیل این مشکل باشد.

توجه! تمام نمونه های بیماران در کانال VIC و برای ABL باید دارای منحنی سیگموئیدی و CT بین ۲۰ تا ۲۷ باشند. از جمله دلایلی که می تواند به CT بالاتر از ۲۷ منجر شود استخراج RNA از تعداد کم گلبول های سفید (کمتر از صدهزار) و یا استفاده از total RNA به میزان کمتر از ۱۰۰ نانوگرم برای تهیه cDNA می باشد. CT بالاتر از ۲۷ برای ABL باعث کاهش حساسیت تست شده و باعث نتایج **منفی کاذب** میشود.

۱۵. محاسبه درصد PML-RARA

برای ارزیابی پاسخ درمانی هر بیمار تحت درمان باید میزان درصد 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 تیترا PML-RARA را به تیترا ABL تقسیم کرده و در ۱۰۰٪ ضرب کنید.

به طور معمول میزان رونویسی ژن ABL بیشتر از رونویسی PML-RARA می باشد لذا نتیجه حاصل از محاسبه بالا عددی کمتر از ۱۰۰٪ می شود. در طول

درمان نیز این میزان می تواند بسیار کاهش یافته و به ۰/۰۰۱٪ یا کمتر هم برسد. اما در مواردی مانند زمان تشخیص و پیش از شروع درمان و یا مقاومت دارویی و عود بیماری، میزان رونویسی ژن هدف یا PML-RARA می تواند بالاتر از میزان رونویسی ژن کنترل یعنی ABL باشد. در چنین مواردی نتیجه محاسبه بالا عددی بالاتر از ۱۰۰٪ خواهد بود. چنین نتایجی پیش از این نیز گزارش شده اند. به طور مثال به جدول ۲۵ مقاله (J. Gabert 2003 Leukemia 17:2318) توجه کنید. در مقاله فوق نسبت PML-RARA/ABL در نمونه بیماران در زمان تشخیص بین ۹٪ تا ۱۸۲٪ با میانگین ۳۶-۳۰٪ گزارش شده است. بنابراین نتایجی بالاتر از ۱۰۰٪ دور از انتظار نبوده و به سادگی نشان می دهد که رونویسی ژن هدف از رونویسی ژن کنترل بیشتر می باشد.

۱۶. 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 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.

PML-RARA RQ Kit Manual

**For Real-Time PCR Quantitative Detection of
PML-RARA Transcripts**

For use with Rotor-Gene or StepOne
Research use only

NG-WI-ASL-30-100
Version 1.1
Fall 2019

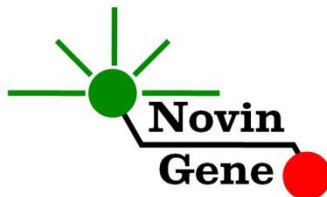


Table of Contents:

1. Introduction.....	2
2. Kit Contents	3
3. Storage and Stability	4
4. General Precautions.....	4
5. Additionally Required Materials	4
6. Specimen, storage and transport.....	5
7. RNA isolation.....	5
8. cDNA synthesis	6
9. PCR Protocol.....	6
10. Programming of RotorGene	7
11. Programming of StepOne	7
12. Programming of other machines.....	8
13. Data Analysis: RotorGene.....	8
14. Data Analysis: StepOne.....	11
15. PML-RARA% calculation	13
16. Analytical Sensitivity	14

PML-RARA RQ kit is intended for the detection of PML-RARA transcripts in peripheral blood and PML-RARA percentage calculation in patients undergoing therapy. This kit is designed for use with RotorGene or StepOne machines. This kit is for research use only!

Important Note: *This kit doesn't provide reagents for RNA extraction or cDNA synthesis!*

1- Introduction

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%). The resulted 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 promyelocytic leukemia) cases, 10-15% of AML (acute myeloid leukemia) cases.

PML-RARA RQ kit provides a ready-to-use system for detection and quantitation of PML-RARA transcripts as well as calculation of PML-RARA percentage.

This kit is based on Real-Time PCR technology. In this method application of fluorescent probes allows detection of amplified product. Analysis of fluorescent kinetics also leads to detection of

the target sequence in the reaction without requiring post-amplification analysis, reducing the possibility of contamination with the PCR product. This kit is designed to be used with RotorGene or StepOne machines.

2- Kit Contents

The kit contains a manual or a quick guide and following reagents:

Please note that each kit contains mix and standards for only one of bcr1, bcr2 or bcr3 translocations.

Label	Content	Quantity
bcr1/2/3 Mix*	Master mix for BCR1	480 µl
ABL Mix*	Master mix for ABL	480 µl
bcr1/2/3 S1	bcr1/2/3 Stanndard 1: 100,000 copy/µl	150 µl
bcr1/2/3 S2	bcr1/2/3 Stanndard 2: 10,000 copy/µl	150 µl
bcr1/2/3 S3	bcr1/2/3 Stanndard 3: 1,000 copy/µl	150 µl
bcr1/2/3 S4	bcr1/2/3 Stanndard 4: 100 copy/µl	150 µl
bcr1/2/3 S5	bcr1/2/3 Stanndard 5: 10 copy/µl	150 µl
A1	ABL Standard 1: 100,000 copy/µl	150 µl
A2	ABL Standard 2: 10,000 copy/µl	150 µl
A3	ABL Standard 3: 1,000 copy/µl	150 µl
A4	ABL Standard 4: 100 copy/µl	150 µl
Water	PCR Grade Water	200 µl

* 1, 2 and 4 tubes for 24, 48 and 96 reaction kits.

3- Storage and Stability

The kit components should be shipped and stored at -20°C and are stable until the expiry date mentioned. Avoid repeated freeze-

thaws especially for PCR Mix more than few times to prevent reduced sensitivity.

4- General Precautions

In order 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.

5- 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 1.7ml microtubes and PCR microtubes
- Disposable powder-free gloves
- Cold block

6- 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 72 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 5 to 10 million WBC per 150µl.

Whole blood or buffy coat can be stored at +4°C for three days. Otherwise should be aliquoted and stored at -70°C which is stable for few months.

7- 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, Invitrogen/Thermo Fisher, USA)
- Isol-RNA isolation reagent (Cat. no. 2302700, 5 prime/Thermo Fisher, Germany)
- Accuzol isolation reagent (Cat. no. K-3090, Bioneer, Korea)

8- cDNA Synthesis

1ug of total RNA is required and should be reverse transcribed to cDNA using random hexamers or specific primers. Different kits are available in the market for this purpose.

These specific primers are available upon request. If the CT observed for ABL using Random Hexamers is above 27, it is recommended to use specific primers for decreasing CT for ABL and PML-RARA gene and increasing sensitivity of the test.

Dissolve RNA pellet in 20ul of the Primers solution and then add other reagents required for cDNA synthesis.

Dilute prepared cDNA 2.5x with nuclease free water. For example to 20ul of cDNA add 30ul of nuclease free water.

9- PCR Protocol

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

Each sample should be examined for both in PML-RARA fusion gene and for ABL control gene. So two set of reactions are required. In PML-RARA set, consider 1 tube for each sample as well as 6 tubes for the 5 standards (bcr S1 to bcr 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 bcr 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 make sure all are capped securely. Place 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.

10-Programming RotorGene

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

Open the CD provided in the kit and double click on "PML-RARA 0.2" or on "PML-RARA Strip" depending to tubes used. Click on Start button (Green button on the top menu). On the pop up window click start again and save the run file.

Edit sample names on both PML-RARA and ABL pages. Remember that tubes containing PML-RARA Mix should only be named in PML-RARA 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.

11-Programming of StepOne

Open the StepOne software (V 2.*). On the Set Up menu click on Template and select the file on CD provided with the kit. Click on Plate Setup. One negative control, 5 standards for PML-RARA, 4 standards for ABL and 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.

12-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 of bcr Mix and ABL Mix contain ROX with final concentration of 300nM in reaction.

13-Data Analysis: RotorGene

Before analyzing results, make sure 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 manufacturer recommendations. Perform quantitative analysis for both **PML-RARA (Green channel)** and **ABL (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 0.05.
Repeat above for Yellow channel and set the threshold at 0.1.
Figures 1 and 2 represent typical graphs for RotorGene machine.
Consider following points when analyzing:

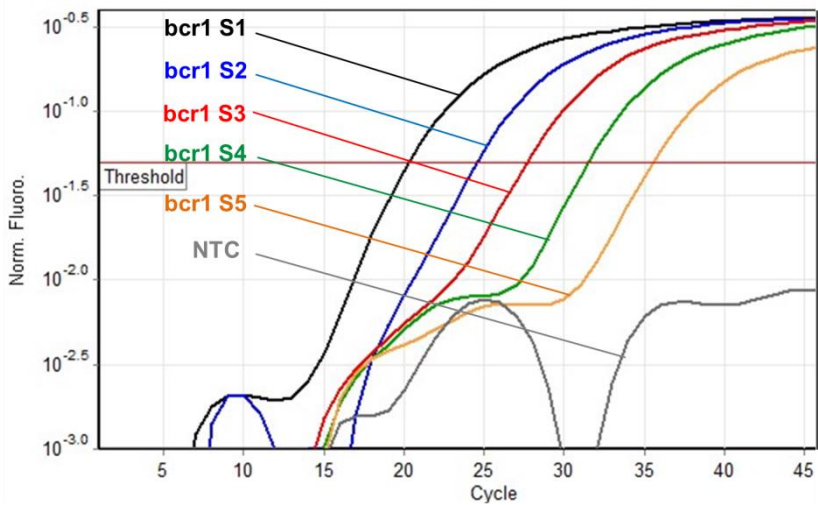


Fig 1. Typical PML-RARA, bcr1 graph in Green channel for Rotor-Gene

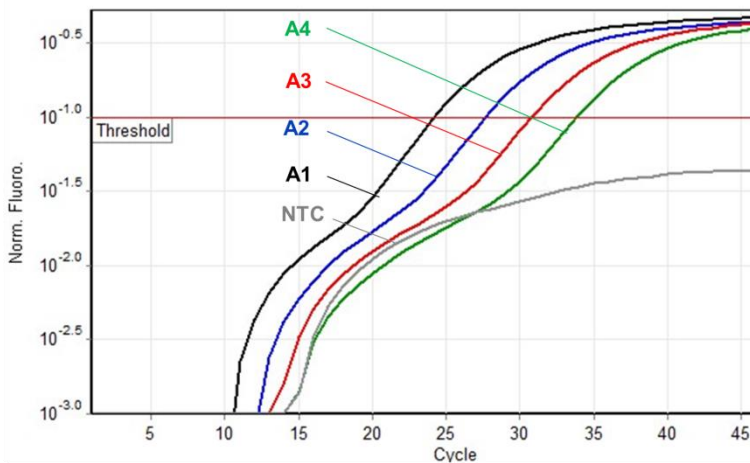


Fig 2. Typical ABL graph in Yellow channel for Rotor-Gene

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** if it is positive in both Green/ PML-RARA and Yellow/ABL channels with sigmoid graphs and CT of 20-40 for Green and 20-30 for Yellow.
- A sample is **Negative** if is negative in Green/ PML-RARA channel while it is positive in Yellow/ABL channel with a sigmoid graph and CT of 20-27.
- Results are **inconclusive** and the test should be repeated if a sample is negative in both of Green/ PML-RARA 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 Green/ PML-RARA channel while it is positive in Yellow/ABL channel with sigmoid graph and CT of above 27. Improper extraction or low RNA input could cause that.

*Note: All patient samples should be positive in 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 100ug RNA has been used. CTs higher than 27 reduce the sensitivity of the test and may result in **false negative** reports.*

14-Data Analysis: StepOne

Analyze the data according to manufacturer recommendations. Briefly, click on “Analyze” and set the threshold for **PML-RARA/FAM** on 0.05 and for **ABL/VIC** on 0.1. Figures 3 and 4 represent typical graphs for StepOne machine.

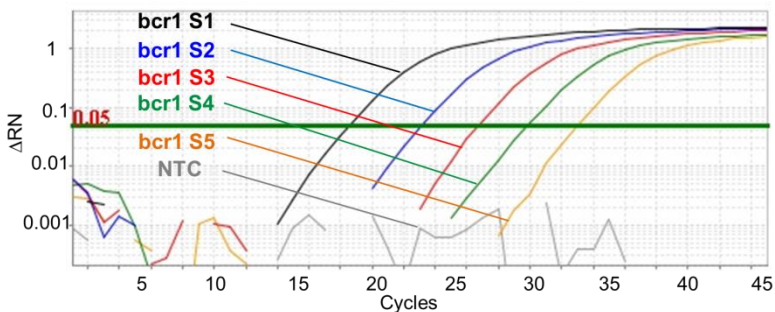


Fig3. Typical PML-RAR, bcr1 graph in FAM channel for StepOne

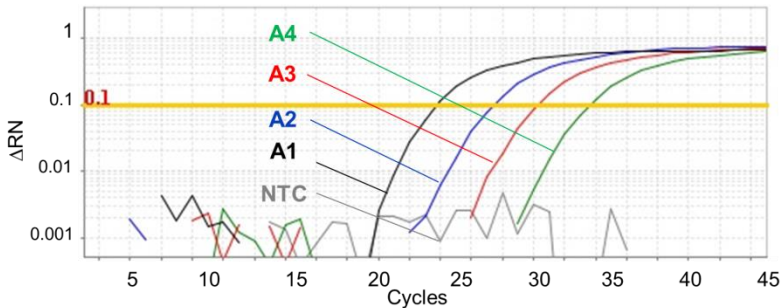


Fig 4. Typical ABL graph in VIC channel for StepOne

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

Consider following points when analyzing:

- A sample is **Positive** if it is positive in both FAM/PML-RARA and VIC/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 FAM/ PML-RARA channel while it is positive in VIC/ABL channel with a sigmoid graph and CT of 20-27.
- Results are **inconclusive** and the test should be repeated if a sample is negative in both of FAM/ PML-RARA 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 FAM/ PML-RARA channel while

it is positive in VIC/ABL channel with sigmoid graph and CT of above 27. Improper extraction or low RNA input could cause that.

*Note: All patient samples should be positive in 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 100ug RNA has been used. CTs higher than 27 reduce the sensitivity of the test and may result in **false negative** reports.*

15- PML-RARA% calculation

To assess the response to therapy, PML-RARA % value for each patient can be calculated. This kit uses NCN method for this purpose (Beillard E. 2003, *Leukemia* 17:2474). In this method PML-RARA % value is the PML-RARA transcripts (titer) normalized by the ABL transcripts (titer) and then multiplied by 100%.

Usually titer of ABL gene transcripts is higher than for PML-RARA 1 fusion gene. Therefore results of above calculation would be a number less than 100%. This value may fall even below 0.001% in optimum cases. However at diagnosis and in case of relapse, PML-RARA transcripts may surpass ABL gene transcripts. As a result, ratio of PML-RARA/ABL would be above 100%. Such results have been reported previously too. For example please note table 25 of the paper published by J. Gabert *et al* (2003, *Leukemia* 17:2318) for B-ALL patients. He reported a range of 9% to 182% with average of 30-36% for samples. Therefore a ratio above 100% is not unexpected and simply means higher transcripts of the fusion gene compared to the control gene.

16-Analytical Sensitivity

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

