کیت RT-PCR کیفی یک مرحله‌ای تشخیص فیوژن t(8;21)/RUNX1-RUNX1T1 یا AML1-ETO

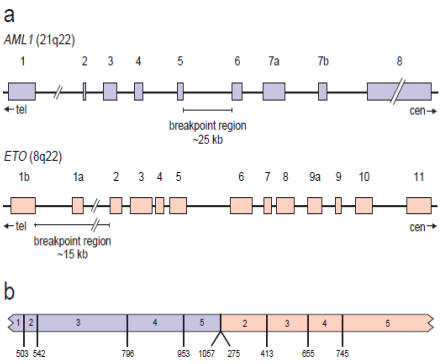
Ref: APRUNK1
(Investigation Use Only, IUO)

مقدمه:

t(8;21)(q22;q22) در درجه اول در de novo AML به ویژه در زیر گروه FAB-M2 یافت می‌شود. t(8;21) ژن RUNX1 یا AML1 را به ژن RUNX1T1 یا ETO (ژن هشت بیست و یک) متصل می کند. شکست نقطه‌ای AML1، میان اگزون های ۵ و ۶ (شکل ۱) قرار دارد ، شکست نقطه‌ای ETO در قسمت بالای اگزون ۲ قرار دارند.

t(8;21) با پیش آگهی نسبتاً خوب همراه با پاسخ ویژه به برخی از عوامل درمانی خاص همراه است. از نظر سیتوژنتیک، t(8;21) تقریباً ۷٪ از de novo AML را ، که در بیماران جوان تر شایع است، را نشان می‌دهد. این شرایط در زیرگروه AML-M2، که در ۴۰-۲۰٪ موارد مشاهده می شود، شایع ترین است. همچنین در موارد نادر AML-M1 و AML-M4 و در AML مربوط به درمان تعریف شده است. شیوع RT-PCR AML1-ETO به صورت مثبت در ۸ تا ۱۲٪ ازموارد AML متفاوت است بنابراین نشان دهنده افزایش قابل توجهی در مقایسه با بروز سیتوژنتیک است.

این کیت تنها برای استفاده در مقاصد تحقیقاتی (IUO) برای شناسایی کیفی رونوشت های فیوژن RUNX1-RUNX1T1 در موارد AML تولید شده است.



شکل ۱ ، نمودار شماتیک ساختار اگزون / اینترون از ژنهای *AML1* و *ETO* ، در ارتباط با t(8;21)(q22;q22).

اصول انجام آزمایش:

شرکت توسعه و پژوهش امیرپیوند این کیت را برای تشخیص دقیق جابه‌جایی بین کروموزوم های ۸ و ۲۱ [t(8;21)] یا رونوشت های فیوژن RUNX1/RUNX1T1 در خون محیطی یا آسپیره مغز استخوان در بیماران مبتلا به AML ارائه داده است.

تمامی RNA ها در زمان تشخیص از خون بیمار یا مغز استخوان استخراج شده و mRNA به صورت معکوس به cDNA رونویسی می شود و همزمان تحت واکنش PCR ، TAQMAN BASED تک مرحله‌ای در همان لوله قرار می گیرد. گزارش‌دهی نتایج به صورت کیفی خواهد بود؛

- mRNA *RUNX1-RUNX1T1* مثبت: تشخیص داده شده است.
- mRNA *RUNX1-RUNX1T1* منفی: تشخیص داده نشده است.

محتویات کیت:

ردیف	اجزا	مقدار
۱	مسترمیکس آماده برای استفاده در RT-PCR تک مرحله ای	۴۵۰µl
۲	کنترل مثبت RUNX1-RUNX1T1	۱۵ µl
۳	کنترل منفی	۱۵ µl

مواد و ابزار مورد نیاز:

- هر نوع دستگاه تایید شده و تحت کنترل Real Time PCR با کانال سبز (FAM) و زرد (HEX ،VIC ،JOE).
- کیت استخراج RNA (در این کیت ارائه نشده است)
- مواد پلاستیکی از جمله سرسمپلرها، میکروتوب های ۰/۲ میلی لیتری عاری از DNase / RNase

شرایط نگهداری و انتقال کیت:

محتویات کیت را در دمای(۲۰°C-) تا تاریخ انقضا درج شده بر روی بسته بندی کیت نگهداری و حمل کنید. از انجماد و ذوب مکرر اجزاء کیت، که می‌تواند منجر به کاهش کیفیت تشخیصی کیت گردد پرهیز نمایید.

نوع نمونه:

۵ میلی لیتر خون کامل و یا ۳ میلی لیتر آسپیره مغز استخوان را در لوله های (EDTA) جمع آوری کنید (حداقل: ۱ میلی لیتر خون کامل یا ۱ میلی لیتر مغز استخوان قابل قبول است).

- به دلیل حفظ ثبات RNA ، می‌بایست نمونه ها ظرف مدت ۲۴ ساعت پس از جمع آوری، استخراج شوند.

آماده سازی بیمار: هیچگونه آماده سازی مورد نیاز نیست، تنها می‌بایست نمونه، پیش از شروع هر گونه درمان جمع آوری گردد. اگر بیمار هرگونه داروی TKI دریافت می کند می‌بایست آزمایشگاه بالینی از آن مطلع گردد.

دمای نگهداری/ انتقال: ۸-۲ درجه سانتیگراد (یخچال)

ثبات نمونه:

- در دمای محیط یا اتاق: ۱ ساعت
- درون یخچال (۲-۸ درجه سانتیگراد): ۲۴ ساعت

شرایط عدم پذیرش نمونه:

- سرم یا پلاسما
- نمونه های جمع آوری شده در لوله ضد انعقادی غیر از EDTA.
- نمونه های به شدت همولیز شده.
- نمونه های منجمد یا لخته شده

موارد احتیاطی عمومی:

۱. کیفیت نمونه RNA از اهمیت بالایی برخوردار است و می‌تواند نتایج آزمایش را تحت تأثیر قرار دهد. به منظور به حداقل رساندن تخریب RNA توسط ریبونوکلئاز، توصیه می‌شود بلافاصله پس از جمع آوری نمونه، استخراج RNA آغاز گردد. هنگام کار با RNA، به منظور پیشگیری از آلودگی ریبونوکلئاز از طریق دست، همیشه از دستکش استفاده کنید.

شرکت پژوهش و توسعه امیرپیوند

ایران، تهران، خیابان شریعتی، خیابان شهید دستگردی (ظفر)، بعد از خیابان شمس تبریزی، ساختمان بهاران، پلاک ۱۴۸، واحد ۱ / کد پستی: ۱۹۱۹۷۵۴۹۴۱

021-26422362
Co.ap-rad.com
order@co.ap-rad.com

۲. RT-PCR روش بسیار حساسی است. بنابراین، می‌بایست جهت جلوگیری از دریافت نتایج مثبت کاذب ناشی از آلودگی با RNA، cDNA یا سایر محصولات PCR، اقدامات احتیاطی انجام گیرد. مجموعه ای از میکروپیپت‌ها، سرسمپلرهای دارای فیلتر آئروسل، دستکش یکبار مصرف و روپوش آزمایشگاهی تمیز باید در آزمایشگاه در دسترس باشد.

۳. تعویض دستکش‌ها هنگام دست زدن به میکروتیوب‌های حاوی RNA یا cDNA ،امری ضروری است. پس از انجام PCR باید میکروتیوب ها با احتیاط باز شوند تا از ریختن محصولاتی که تکثیر یافته اند جلوگیری شود.

ایمنی:

- پیش از انجام آزمایش، دستورالعمل را به صورت کامل مطالعه کنید.
- قبل از انجام آزمایش از ضدعفونی بودن محل انجام تست اطمینان حاصل کنید.
- تمامی نمونه‌ها را عفونی در نظر بگیرید.
- در تمام مراحل انجام آزمایش، از محافظ چشم و دستکش‌های یکبار مصرف استفاده کنید.

شناسه‌های فنی:

توالی هدف: رونویسی فیوژن RUNX1-RUNX1T1 ، که حاصل از ترانسلوکیشن بین کروموزوم ۸ و ۲۱ است می باشد.

اختصاصیت: این کیت به طور انحصاری قادر به تشخیص رونویسی فیوژن RUNX1-RUNX1T1 ، درAML است. پنج مورد AML با استفاده از تشخیص کیفی فیوژن RUNX1-RUNX1T1 ، با کیت RT-PCR تک مرحله‌ای در مقایسه با کانونشنال RT-PCR و تطبیق ۱۰۰٪ نتایج حاصل می‌شود. پنج نمونه طبیعی و پنج نمونه ALL دارای t(9;22) و یا دیگر جابه‌جایی‌ها با استفاده از این روش مورد بررسی قرار گرفت و هیچ واکنش مثبت کاذب مشاهده نشد.

حساسیت: آزمایش رقت کنترل مثبت پلاسمید با فیوژن RUNX1-RUNX1T1 با قابلیت تشخیص تا ۱/۹۲ نشان‌دهنده حساسیت بالا حتی در بیماران با رونویسی فیوژن RNA ، که غیر معمول نیست، وجود دارد. به ویژه در بیماران درمان نشده.

کنترل کیفیت: در این آزمایش، NAGK (N-acetylglucosamine kinase) به عنوان یک کنترل داخلی یا تکثیر ژن در همان لوله انجام خواهد شد و باید موجب افزایش در هر لوله‌ای به جز NTC در کانال زرد شود.

تخلیص نوکلئیک اسید:

RNA را می توان به طور مستقیم از نمونه خون محیطی جمع‌آوری شده در لوله حاوی ضد انعقاد EDTA و یا آسپیره مغز استخوان به وسیله کیت‌های استخراج RNA معتبر و یا روش های دستی استخراج کرد. بافی کت و گرانولوسیت‌ها را میتوان مورد استفاده قرار داد. کیفیت RNA استخراج شده می‌بایست خوب باشد و با استفاده از بیوفوتومتر یا نانودراپ بررسی شود.

TaqMan یک مرحله‌ای مبتنی برروش RT-PCR کیفی:

RT-PCR تک مرحله‌ای به روش زیر انجام می شود.

۱. به ترتیب میکروتیوب‌های آماده استفاده را به صورت دوتایی برای هر بیمار و به صورت تکی برای کنترل مثبت، کنترل منفی و بدون الگو (NTC) مرتب و برچسب‌گذاری کنید.

توجه: برای دستیابی به نتایج قابل اعتماد و دقیق ، تاکید بر تکرار انجام دو PCR برای هر بیمار می‌شود.

۲. تمام میکرو تیوب ها را برروی رک سرد قرار دهید.

۳. ۱۸ µl مسترمیکس به تمامی میکروتیوب های نام گذاری شده اضافه کنید.

٤. ۲ µl آب مقطر استریل به میکروتیوب NTC اضافه کنید.

٥. ۲ µl کنترل منفی به لوله دارای برچسب کنترل منفی، اضافه کنید.

٦. ۲ µl از RNA بیمار را به دو میکروتیوبی که نام بیمار بر روی آن نوشته شده است اضافه کنید.

۷. ۲ µl کنترل مثبت به میکروتیوب دارای برچسب کنترل مثبت، اضافه کنید.

۸. مواد را با یکدیگر مخلوط کرده و برای مدت زمان کوتاهی اسپین کنید.

۹. سپس آن را در دستگاه Real Time PCR قرار دهید و برنامه را همانگونه که در برنامه واکنش حرارتی ذکر شده است اجرا کنید.

پروفایل واکنش حرارتی:

	دما	زمان	چرخه
رونویسی معکوس RT	۵۰°C	۱۰ دقیقه	۱
فعال سازی اولیه	۹۵°C	۳ دقیقه	۱
دناتوراسیون	۹۵°C	۱۰ ثانیه	۴۵
انیلینگ/گسترش	۶۰°C	۳۰ ثانیه	

*FAM برای RUNX1-RUNX1T1 ، JOE برای NAGK (کنترل داخلی) تنظیم شود.

Run Settings	
Name	Gain
Green	4
Yellow	9

تجزیه و تحلیل داده ها و گزارش:

نتایج با استفاده از نرم افزار دستگاه‌های Real Time PCR با مشاهده منحنی سیگنال فلورسنت که از خط Threshold(آستانه) عبور می‌کند و مطابق دستورالعمل‌های دستگاه تفسیر می شود.

- مشاهده منحنی سیگنال فلورسنت در کانال زرد که از خط آستانه کنترل داخلی عبور می کند باید در تمامی لوله‌ها نمایان شود (ct:20-30) به جز لوله NTC، و نشان دهد که RT و واکنش PCR به درستی انجام شده اند، در غیر اینصورت واکنش باید تکرار شود.
- در لوله کنترل مثبت، مشاهده منحنی سیگنال فلورسنت در کانال سبز که از خط آستانه عبور می کند (ct: 20-30) به این معنی است که کنترل مثبت خوب است.
- در لوله های بیمار، مشاهده منحنی سیگنال فلورسنت در کانال سبز (ct: 20-35) که از خط آستانه عبور می کند به این معنی است که نتیجه مثبت است و باید به صورت زیر گزارش شود:

RUNX1-RUNX1T1 Fusion Transcripts detected

- در لوله های بیمار، مشاهده سیگنال فلورسنت در کانال سبز به صورت خط صاف و یا عدم عبور از خط آستانه (or ct>40) به این معنی است که نتیجه منفی است و باید به صورت زیر گزارش شود:

RUNX1-RUNX1T1 Fusion Transcripts not detected

- در صورت وجود هر گونه افزایش فلورسنت در لوله NTC در هر دو کانال سبز و زرد می‌بایست آزمایش تکرار شده و مشکوک به بروز آلودگی است.
- در صورت وجود هر گونه افزایش فلورسنت در کنترل نرمال در کانال سبز، می‌بایست آزمایش تکرار شده و مشکوک به بروز آلودگی است.

شرکت پژوهش و توسعه امیرپیوند

ایران، تهران، خیابان شریعتی، خیابان شهید دستگردی (ظفر)، بعد از خیابان شمس تبریزی، ساختمان بهاران، پلاک ۱۴۸، واحد ۱ / کد پستی: ۱۹۱۹۷۵۴۹۴۱

021-26422362
Co.ap-rad.com
order@co.ap-rad.com

نکات مورد توجه:

توجه به تمام یافته های بالینی، داده های آزمایشگاهی و پارامترهای هماتولوژی شامل CBC و مورفولوژی، می‌بایست در تفسیر و تصمیم گیری در نظر گرفته شود.

تداخل:

هیچ گونه تداخلی با سایر ترانسلوکیشن ها مشاهده نشد. (سنجش اختصاصیت)

دفع ضایعات:

- برای دفع ضایعات به قوانین مصوب وزارت بهداشت توجه کنید.
- در صورتی که ضایعات منشا انسانی یا حیوانی داشته باشند به عنوان مواد خطرناک زیستی شناخته شده و باید با احتیاط دفع گردند. در هنگام استفاده و یا دفع نمونه ها از اقدامات احتیاطی عمومی استفاده کنید.

علائم و توضیحات	
سری ساخت	LOT
شماره رفرنس	REF
تاریخ تولید	
تاریخ انقضا	
مطالعه بروشور	
استفاده در موارد تشخیصی و بالینی	IVD
استفاده در موارد تحقیقاتی	IUO
شرایط نگهداری	
آدرس شرکت	
علائم خطر	

جهت ارتباط با واحد پشتیبانی با شماره ۰۲۱-۲۶۴۲۲۹۴۰ تماس بگیرید.

شرکت پژوهش و توسعه امیرپیوند

ایران، تهران، خیابان شریعتی، خیابان شهید دستگردی (ظفر)، بعد از خیابان شمس تبریزی، ساختمان بهاران، پلاک ۱۴۸، واحد ۱ / کد پستی: ۱۹۱۹۷۵۴۹۴۱

021-26422362

Co.ap-rad.com

order@co.ap-rad.com