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..... ۴

۶. نمونه مناسب و شرایط نگهداری و انتقال آن..... ۵

۷. استخراج **RNA**..... ۶

۸.تهیه **cDNA**..... ۶

۹. دستور کار **PCR**..... ۶

۱۰. تنظیم دستگاه **RotorGene**..... ۷

۱۱. تنظیم دستگاه **StepOne**..... ۸

۱۲. تنظیم سایر دستگاه ها..... ۹

۱۳. آنالیز نتایج **RotorGene**..... ۹

۱۴. آنالیز نتایج **StepOne** ۱۱

۱۵. محاسبه ٪**BCR-ABL**..... **۱۳**

کیت **mbcr 190 RQ** جهت تشخیص ناهنجاری کروموزومی یا ترانسلوکاسیون **BCR-ABL (p190)** در خون محیطی و محاسبه **%BCR-ABL** در بیماران تحت درمان می باشد. این کیت مخصوص استفاده تحقیقاتی است و برای استفاده با دستگاه **Rotor Gene 6000/Q** و **StepOne/StepOnePlus** طراحی شده است.

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

۱. مقدمه

ناهنجاری کروموزومی **BCR-ABL** یا کروموزوم فیلادلفیا حاصل از جابجایی کروموزومی **9;22** می باشد. در نتیجه این جابجایی ژن **ABL** در کروموزوم شماره ۹ در مجاورت ژن **BCR** در کروموزوم ۲۲ قرار می گیرد و یک ژن هیبرید تشکیل می شود. این مجاورت سبب تولید پروتئین هیبرید **BCR-ABL** می شود که در اغلب موارد وزن مولکولی آن ۲۱۰ یا ۱۹۰ کیلو دالتون است .این پروتئین که دارای فعالیت مداوم تیروزین کیناز می باشد و به نوبه خود باعث افزایش رشد سلولی و مهار آپاپتوز می شود. **mRNA** حاصل از نسخه برداری ژن هیبرید تقریبا در ۹۵ درصد بیماران **CML** و برخی موارد **ALL** یافت می شود. بر اساس تجربیات ۲۰ سال گذشته، بررسی دوره ای بیماران برای اندازه گیری میزان بیان این ژن، نقش مهمی در تخمین پاسخ درمانی و پیش بینی میزان پیشرفت بیماری دارا می باشد.

این کیت مواد لازم برای تشخیص بیان ژن **BCR-ABL (p190)** (فقط برای جابجایی **e1a2**) و محاسبه **%BCR-ABL** پس از تشخیص و طی دوره درمان را فراهم می کند.

کیت حاضر جهت تشخیص این ناهنجاری کروموزومی از روش **Real-Time PCR** بهره میگیرد. 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 6000/Q** (**Corbett Research/Qiagen**) یا دستگاه **StepOne/StepOnePlus** (**Applied Biosystems**) طراحی شده است.

۲. محتویات کیت

این کیت شامل یک دفترچه راهنما، یک لوح فشرده و مواد زیر می باشد:

برچسب	محتوا	حجم
mbcr MIX	میکس آماده برای **mbcr** *	۵۰۰ میکرولیتر
ABL MIX	میکس آماده برای **ABL** *	۵۰۰ میکرولیتر
m1	استاندارد **mbcr1**: یک‌صد هزار کپی در میکرولیتر	۱۰۰ میکرولیتر
m2	استاندارد **mbcr2**: ده هزار کپی در میکرولیتر	۱۰۰ میکرولیتر
m3	استاندارد **mbcr3**: یک هزار کپی در میکرولیتر	۱۰۰ میکرولیتر
m4	استاندارد **mbcr4**: یک صد کپی در میکرولیتر	۱۰۰ میکرولیتر
m5	استاندارد **mbcr5**: ده کپی در میکرولیتر	۱۰۰ میکرولیتر
A1	استاندارد **ABL1**: یک صد هزار کپی در میکرولیتر	۱۰۰ میکرولیتر
A2	استاندارد **ABL2**: ده هزار کپی در میکرولیتر	۱۰۰ میکرولیتر
A3	استاندارد **ABL3**: یک هزار کپی در میکرولیتر	۱۰۰میکرولیتر
A4	استاندارد **ABL4**: یک صد کپی در میکرولیتر	۱۰۰ میکرولیتر
Water	آب مخصوص **PCR**	۱۵۰ 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 این مواد به ویژه میکس **PCR** بیش از سه بار خودداری کنید زیرا باعث کاهش حساسیت و عدم کارایی آن ها می شود.

۴. سایر موارد مورد نیاز

- دستگاه **Real-Time PCR** به همراه تجهیزات جانبی آن
- سانتریفوژ مخصوص میکروتیوب
- ورتکس
- سمپلر متغیر
- کیت استخراج **RNA**
- کیت سنتز **cDNA**
- تیوب یا استریپ مخصوص **Real-Time PCR**
- سر سمپلر بدون نوکلئاز و فیلتر دار
- دستکش لاتکس بدون پودر

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.
- 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 تقسیم مواد داخل 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 داشته باشند به ویژه سمپلر. 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.
- پیش از باز کردن درب لوله های درون کیت، آنها را کاملاً ذوب نموده 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 اسپین (سانتریفوژ) کنید.
- در حین کار، محتویات کیت را همیشه روی یخ خرد شده نگهداری کنید. از استفاده از یخهای 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 **BCR-ABL** با این کیت، خون کامل **(peripheral blood)** می باشد که در لوله استریل حاوی ماده ضد انعقاد جمع آوری شده است. ماده ضد انعقاد میتواند **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 کیت زیر را توصیه می کنیم:

TriPure isolation reagent (Cat# 1667157, Roche Applied Science, Mannheim, Germany)

لازم به یاد آوری است که استفاده از روش های جذبی مبتنی بر ستون های سیلیکاژل به هیچ عنوان توصیه نمی شود.

۸. تهیه cDNA

در حدود یک میکروگرم **total RNA** برای این تست مورد نیاز می باشد که باید با استفاده از **Random Hexamers** به **cDNA** تبدیل شود. کیت های متعددی برای این کار در دسترس می باشند.

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 آنها ذوب شوند. با چند تکان ملایم از مخلوط شدن مواد داخل آنها اطمینان حاصل کرده و برای چند ثانیه آنها را در دور پایین اسپین کنید.

هر نمونه از نظر وجود **mRNA** برای دو ژن **BCR-ABL (p190)** 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 **BCR-ABL** علاوه بر یک لوله برای نمونه هر بیمار، پنج لوله برای استانداردها **(m1-5)** 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، چهار لوله نیز برای استانداردها **(A1-4)** و یک لوله برای شاهد منفی در نظر بگیرید. تعداد مورد نیاز لوله **PCR** یا استریپ در دو سری مجزا از هم روی بلوک آلومینیوم (با دمای صفر تا ۴ درجه سانتیگراد) بگذارید.

به هر لوله سری اول ۲۰ میکرولیتر از mbcr MIX و به هر لوله سری دوم ۲۰ میکرولیتر از ABL MIX اضافه کنید. سپس ۵ میکرولیتر از cDNA نمونه و یا استاندارد و یا کنترل به هر لوله اضافه کنید. درب لوله ها یا استریپ ها را بسته و شماره گذاری کنید. سپس آنها را مطابق شماره ها روی روتور **RotorGene** یا داخل بلوک **StepOne** قرار دهید.

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

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 وصل کرده و آن را به برق وصل کنید تا چراغ آبی جلوی آن روشن شود.

در لوح فشرده همراه کیت روی فایل **mbcr 0.2 RGQ** (در صورت استفاده از لوله های ۰/۲ میلی لیتری) و یا **mbcr Strip RGQ** (در صورت استفاده از لوله های ۰/۱ میلی لیتری) 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 پس از انتخاب محل مورد نظر برای نگهداری فایل آزمایش در کامپیوتر، دکمه **Save** را بزنید تا دستگاه روشن شود.

در پنجره نمونه ها **(samples)** نام هر نمونه را وارد کنید. دقت کنید که دو صفحه جداگانه با نام های **mbcr** و **ABL** تعریف شده اند و لوله های حاوی **mbcr Mix** فقط در صفحه **mbcr** 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

لوح فشرده همراه کیت را در کامپیوتر مرتبط به دستگاه قرار دهید. نرم افزار دستگاه را باز کنید **(StepOne software 2.*)**. از منوی **Set Up** روی دکمه **Template** کلیک کنید و فایل داخل لوح فشرده 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 **mbcr**، 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 اینکار 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 **(save)** 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	**95C x 10 min**	1
2	**95C x 15 sec**	45
	60C x 60 sec	

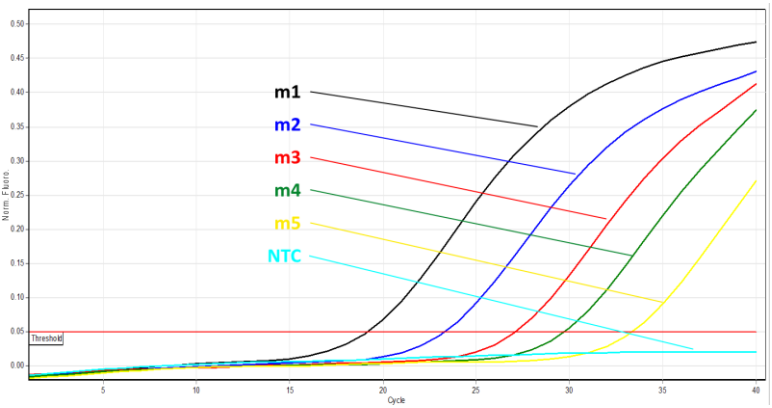
اندازه گیری تابش فلورسانس باید در دمای ۶۰ درجه و برای رنگ های **FAM** و **VIC/HEX** تنظیم شود.

mbcr Mix و **ABL Mix** موجود در کیت حاوی **ROX** می باشند.

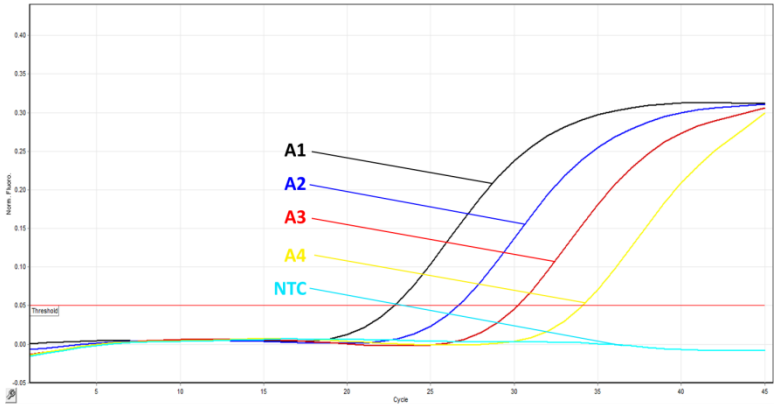
۱۳.آنالیز نتایج RotorGene

برای آنالیز نتایج به راهنمای **RotorGene** مراجعه کنید. به طور خلاصه از منوی **Analysis**، **Quantitation** 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 پس از رسم منحنی استاندارد نتایج در جدول پایین صفحه نشان داده شوند. سپس در منوی **Analysis** مجدداً **Quantitation** و سپس **Yellow** را کلیک کرده و برای آن نیز آستانه را روی ۰/۰۵ قرار دهید.

برای مشاهده نمودار مورد انتظار استانداردها، شاهد منفی و کنترل داخلی، تصاویر یک و دو را ملاحظه فرمایید.



*تصویر یک: منحنی استانداردهای **mbcr** در کانال سبز دستگاه روتورژن*



*تصویر دو: منحنی استانداردهای **ABL** در کانال زرد دستگاه روتورژن*

نتایج را با توجه به نکات زیر تفسیر کنید:

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

نکته بسیار مهم این که CT تنها در صورت مشاهده منحنی سیگموییدی و دارای فاز لگاریتمی مفهوم داشته و قابل تفسیر می باشد. در غیاب

منحنی سیگموییدی CT غیر قابل اعتماد بوده و منجر به تشخیص اشتباه می شود.

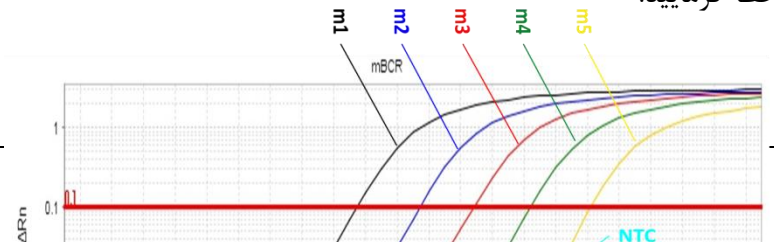
- در صورتی که نمونه در کانال **mbcr/Green** دارای منحنی سیگموییدی و **CT** بین ۲۰ تا ۴۰ باشد، و نیز در کانال **ABL/Yellow** دارای منحنی سیگموییدی و **CT** بین ۲۰ تا ۳۰ باشد، نمونه مثبت می باشد.
- در صورتی که یک نمونه در کانال **mbcr/Green** فاقد منحنی سیگموییدی باشد و در کانال **ABL/Yellow** دارای منحنی سیگموییدی و **CT** بین ۲۰ تا ۲۷ باشد، نمونه منفی در نظر گرفته می شود.
- در صورتی که یک نمونه در کانال **mbcr/Green** فاقد منحنی سیگموییدی باشد و در کانال **ABL/Yellow** نیز فاقد منحنی سیگموییدی و یا دارای منحنی سیگموییدی با **CT** بالاتر از ۲۷ باشد، آزمایش باید تکرار شود.

توجه! تمام نمونه های بیماران در کانال زرد باید 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 (زیر ۱۰۰ 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 می شود.

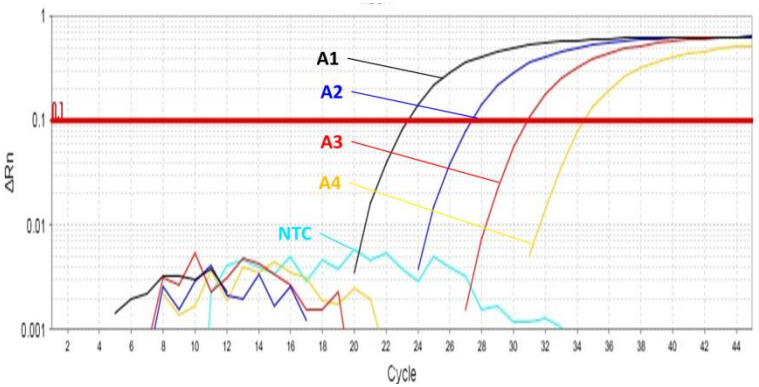
۱۴. آنالیز نتایج StepOne

برای آنالیز نتایج به راهنمای **StepOne** مراجعه کنید. به طور خلاصه دکمه **Analysis** را کلیک کنید. برای **mbcr/FAM** آستانه **(threshold)** را روی ۰/۱ و برای **ABL/VIC** نیز آستانه را روی ۰/۱ قرار دهید.

برای مشاهده گراف مورد انتظار استانداردها و شاهد منفی، تصاویر سه و چهار را ملاحظه فرمایید.



*تصویر سه: منحنی استانداردهای **mbcr** در کانال **FAM** دستگاه **StepOne***



*تصویر چهار: منحنی استانداردهای **ABL** در کانال **VIC** دستگاه **StepOne***

نتایج را با توجه به نکات زیر تفسیر کنید:

توجه داشته باشید که افزایش تابش **FAM** مربوط به **BCR-ABL** و افزایش تابش **VIC** حاصل از **ABL** می باشد.

نکته بسیار مهم این که CT تنها در صورت مشاهده منحنی سیگموییدی و دارای فاز لگاریتمی مفهوم داشته و قابل تفسیر می باشد. در غیاب

منحنی سیگموییدی CT غیر قابل اعتماد بوده و منجر به تشخیص اشتباه می شود.

- در صورتی که نمونه در کانال **mbcr/FAM** دارای منحنی سیگموییدی و **CT** بین ۲۰ تا ۴۰ باشد، و نیز در کانال **ABL/VIC** دارای منحنی سیگموییدی و **CT** بین ۲۰ تا ۳۰ باشد، نمونه مثبت می باشد.
- در صورتی که یک نمونه در کانال **mbcr/FAM** فاقد منحنی سیگموییدی باشد و در کانال **ABL/VIC** دارای منحنی سیگموییدی و **CT** بین ۲۰ تا ۲۷ باشد، نمونه منفی در نظر گرفته می شود.
- در صورتی که یک نمونه در کانال **mbcr/FAM** فاقد منحنی سیگموییدی باشد و در کانال **ABL/VIC** نیز فاقد منحنی سیگموییدی و یا دارای منحنی سیگموییدی با **CT** بالاتر از ۲۷ باشد، آزمایش باید تکرار شود.

توجه! تمام نمونه های بیماران در کانال زرد باید 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 (زیر 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 می شود.

۱۵. 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 تیتر **BCR-ABL** را به تیتر **ABL** تقسیم کرده و در ۱۰۰٪ ضرب کنید.

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 the RotorGene 7
11. Programming of StepOne 7
12. Programming other machines 8
13. Data Analysis: RotorGene 8
14. Data Analysis: StepOne 11
15. BCR-ABL% calculation 12

mbcr 190 RQ kit is intended for the detection of BCR-ABL (p190) transcripts in peripheral blood and BCR-ABL% calculation in patients undergoing therapy. This kit is designed for use with Rotor Gene 6000/Q or StepOne/StepOnePlus instrument. This kit is for research use only!

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

1. Introduction

Philadelphia chromosome is an abnormality resulted from 9;22 translocation. Consequently ABL proto-oncogene on chromosome 9 is fused with BCR gene on chromosome 22. This fusion produces BCR-ABL protein, mostly 210kDa (b2a2 or b3a2) or 190kDa (e1a2), with constitutively active tyrosine kinase activity promoting cell proliferation and inhibition of apoptosis. The fusion gene transcript is detectable in about 95% of CML patients and some cases of ALL. Also, serial monitoring of patients for identifying and measuring BCR-ABL transcripts provides more precise assessment of response to specific therapies and prediction of those in higher risk of disease progression.

This kit provides reagents for both detection of BCR-ABL transcripts (e1-a2 or p190) as well as BCR-ABL% calculation after therapy.

Currently Real-Time PCR provides the highest sensitivity and widest dynamic range among other methods for detection of BCR-ABL transcripts. In this method application of fluorescent dye labeled 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.
mbcr 190 RQ kit provides a ready-to-use Real-Time PCR system for detection of BCR-ABL (p190) transcripts with RotorGene 6000/Q (Qiagen) or StepOne/StepOnePlus (Applied Biosystems).

2. Kit Contents

The kit contains a manual, a CD with RotorGene and StepOne templates and following reagents:

Label	Content	Quantity
mbcr Mix*	Master mix for BCR-ABL	500 µl
ABL Mix*	Master mix for ABL	500 µl
m1	mbcr Standard 1: 100,000 copy/µl	100 µl
m2	mbcr Standard 2: 10,000 copy/µl	100 µl
m3	mbcr Standard 3: 1,000 copy/µl	100 µl
m4	mbcr Standard 4: 100 copy/µl	100 µl
m5	mbcr Standard 5: 10 copy/µl	100 µl
A1	ABL Standard 1: 100,000 copy/µl	100 µl
A2	ABL Standard 2: 10,000 copy/µl	100 µl
A3	ABL Standard 3: 1,000 copy/µl	100 µl
A4	ABL Standard 3: 100 copy/µl	100 µl
Water	PCR Grade Water	150 µl

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

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.
- 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 completely, mix by flickering followed by a quick spin and store on crushed ice after.
- Keep PCR Mix tube at -20°C at all times. Take it out just before use and return it to freezer immediately after.
- Do not place 0.2ml PCR tubes on crushed ice. Use cooling blocks instead.

5. Additionally Required Materials

- Real-Time PCR machine and accessory computer
- Refrigerated table top microtube centrifuge (for RNA extraction)

- Vortex mixer
- Adjustable pipetters
- RNA extraction kit
- cDNA synthesis kit
- Nuclease free filtered tips
- Tubes or strips and strip caps
- Disposable powder-free gloves

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, Mannheim, Germany). We also recommend avoiding silica gel or column based kits for total RNA extraction.

8. cDNA synthesis

1ug of total RNA is required and should be reverse transcribed to cDNA using random hexamers. Different kits are available in the market for this purpose.
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 BCR-ABL fusion (p190) gene and for ABL control gene in two separate set of reactions. In BCR-ABL set consider 1 tube for each sample as well as 6 tubes for the 5 standards (m1 to m5) and "no template control" (NTC). In ABL set consider 1 tube for each sample and 5 tubes for the 4 standards (A1 to A4) and NTC.
Place required number of tubes on pre-cooled (0-4°C) cooling block or loading block.
Pipette 20µl of mbcr 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/Strips and visually inspect to make sure all are caped securely. Place tubes in the machine. If using StepOne/StepOnePlus instrument, spin tubes/strips briefly before loading tubes on the block. 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 M-BCR 0.2 (if 0.2ml tubes are used) or on M-BCR Strip (if 0.1ml tubes are used) to open the program. 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 mbcr and ABL pages. Remember that tubes containing mbcr mix should only be named in mbcr 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 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 mbcr, 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 on desired location. 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	95C x 10 min	1
2	95C x 15 sec	45
	60C x 60 sec	

Fluorescence should be collected at 60C for FAM and VIC/HEX dyes.
Both of mbcr Mix and ABL Mix contain ROX.

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 data according to manufacturer recommendations. Perform quantitative analysis for both **mbcr (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 on 0.05.
Figures 1 and 2 represent typical graphs for RotorGene machine.

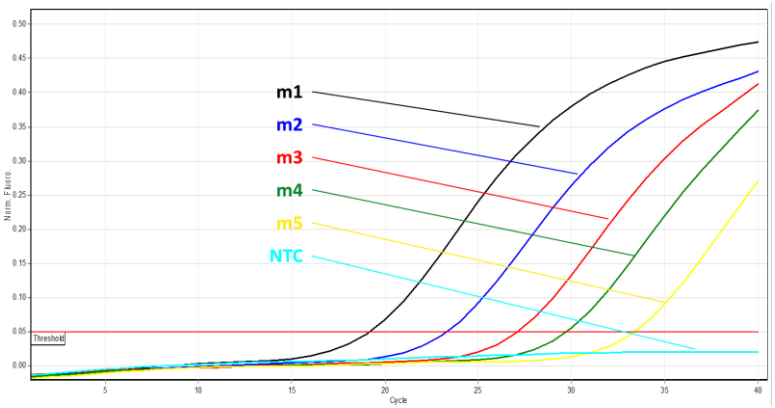


Figure 1. Typical mbcr Graph in Green Channel for RotorGene

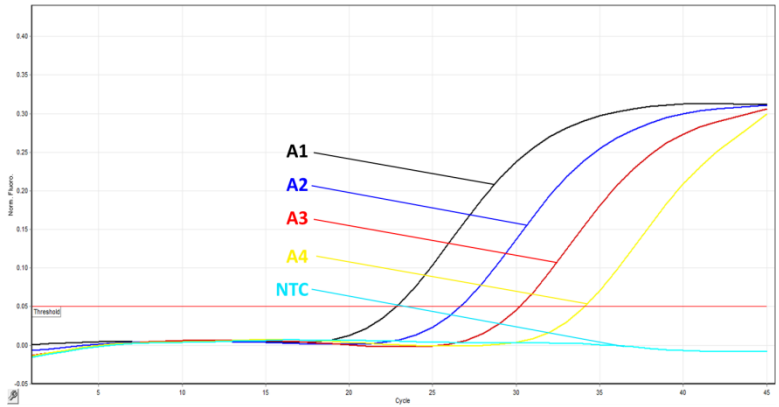


Figure 2. Typical ABL Graph in Yellow Channel for RotorGene

Consider following points when analyzing:

Note that calculated CT is reliable only when there is a sigmoid graph with clear logarithmic phase. In the absence of sigmoid graph, CT must be ignored to prevent false results.

- A sample is **Positive** if generates a sigmoid graph in mbcr (Green) channel with CT of 20-40 and also a

sigmoid graph in ABL (Yellow) channel with CT of 20-30.

- A sample is **Negative** if does not generate sigmoid graph for mbcr (Green) channel while generates a sigmoid graph for ABL (Yellow) channel with CT of 20-27.
- Results are **Inconclusive** and the test should be repeated if a sample generates a sigmoid graph in ABL (Yellow) channel with a CT higher than 27 but fails to produce a sigmoid graph in mbcr/Green channel.

Note: All patient samples should generate a sigmoid graph with a CT of 27 or less in ABL/Yellow channel (with threshold of 0.05). A CT greater than 27 usually happens if not enough cells have been extracted or less than 100ug RNA has been used. ABL/VIC CT higher than 27 reduces the sensitivity of the test.

14. Data Analysis: StepOne

Analyze data according to manufacturer recommendations. Briefly, click on Analyze and set the threshold for both **mbcr/FAM** and **ABL/VIC** on 0.1.

Figures 3 and 4 represent typical graphs for StepOne machine.

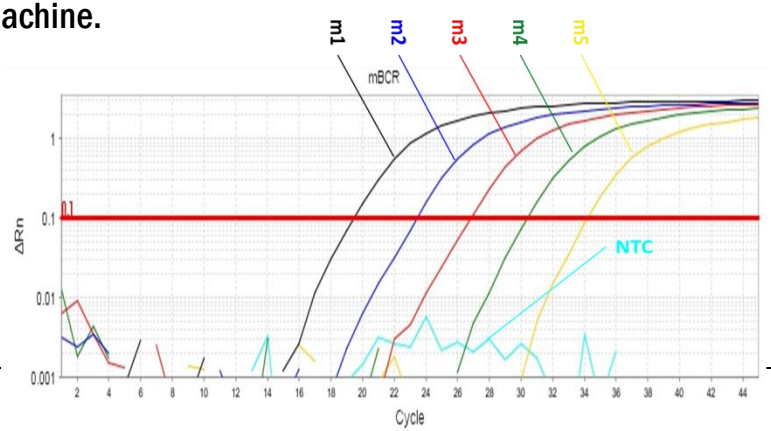


Figure 3. Typical mbcr Graph in FAM Channel in StepOne

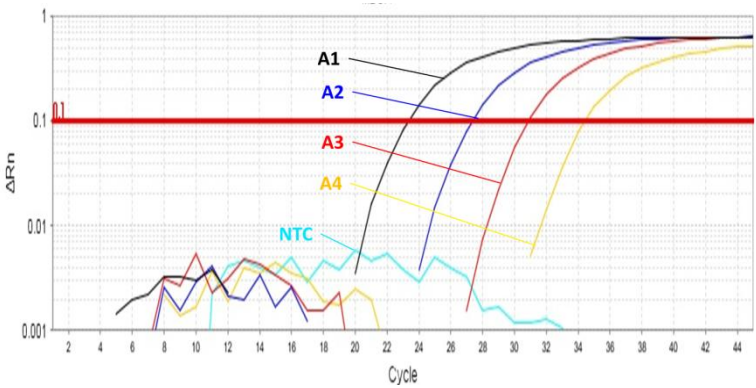


Fig 4. Typical ABL Graph in VIC Channel in StepOne.

Consider following points when analyzing:

Note that calculated CT is reliable only when there is a sigmoid graph with clear logarithmic phase. In the absence of sigmoid graph, CT must be ignored to prevent false results.

- A sample is **Positive** if generates a sigmoid graph in mbcr/FAM channel with CT of 20-40 and also a sigmoid graph in ABL/VIC channel with CT of 20-30.
- A sample is **Negative** if does not generate a sigmoid graph for mbcr/FAM channel while generates a sigmoid graph for ABL/VIC channel with CT of 20-27.
- Results are **Inconclusive** and the test should be repeated if a sample generates a sigmoid graph in ABL/VIC channel with a CT higher than 27 but fails to

produce a sigmoid graph in mbcr/FAM channel. ABL/VIC CT higher than 27 reduce the sensitivity of the test.
Note: All patient samples should generate a CT of 27 or less in ABL/VIC channel (with threshold of 0.05). A CT greater than 27 usually happens if not enough cells have been extracted or less than 100ug RNA has been used.

15. BCR-ABL% calculation

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