

کیت One step RT-PCR کیفی یک مرحله‌ای تشخیص

فیوژن (4;11)/MLL-AF4

Ref: APMLLK1 (4;11)(q21;q23) MLL-AF4
(Investigation use only, IUO)

مقدمه:

ژن های MLL و AF4 در (4;11)(q21;q23) درگیر هستند. لوسمی های MLL-AF4 مثبت در ۷۰-۵۰٪ از نوزادان مبتلا به ALL و تقریباً ۵٪ از بیماری های کودکان و بزرگسالان مبتلا به ALL مشاهده شده است. وجود (4;11)(q21;q23) با فنوتیپ (-CD19, -CD10, -CD24, +CD79a, +CD15, +CD65) و بیان همزمان آنتی ژن های تمایز میلوئیدی (CD15, CD65) مرتبط است.

(4;11)(q21;q23) بخش ۵' MLL به بخش ۳' AF4 فیوژن می کند.

فیوژن های MLL-AF4 تقریباً در همه (4;11) یافت شده است و در تعداد قابل توجهی از موارد (4;11) در روش سنتی سیتوژنتیک تشخیص داده نشده است. در مقابل، رونوشت های AF4-MLL در ۷۰٪ از موارد یافت شدند و به دلیل نقاط شکست در اینترون های مختلف حداقل ۱۰ فیوژن متفاوت رونوشت های AF4-MLL یافت شده است. این کیت استفاده تحقیقاتی (IUO) جهت تشخیص کیفی رونوشت های فیوژن MLL-AF4 در موارد AML تولید شده است.

اصول انجام آزمایش:

شرکت پژوهش و توسعه امیر پیوند، کیت را برای تشخیص دقیق جابجایی بین کروموزوم ۴ و ۱۱ [(4;11)] با رونوشت های فیوژن MLL-AF4 در خون جابجایی یا اسپیره مغز استخوان بیماران مشکوک به AML ارائه داده است.

تمام RNA از نمونه خون یا مغز استخوان بیمار در زمان تشخیص استخراج شده و mRNA ها تبدیل به cDNA شده‌اند و همزمان با واکنش PCR با پروب TaqMan در همان لوله انجام می شود. گزارش دهی نتایج به صورت کیفی و به یکی از حالات ذیل خواهد بود:

- MLL-AF4 mRNA مثبت: تشخیص داده شده است.
- MLL-AF4 mRNA منفی: تشخیص داده نشده است.

محتویات کیت:

شماره	محتویات	مقدار
۱	مستر میکس آماده برای استفاده در RT-PCR تک مرحله ای	۴۵۰ µl
۲	کنترل مثبت (4;11)/MLL-AF4	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 (VIC, HEX).
- کیت استخراج RNA (در این کیت ارائه نشده است)
- مواد پلاستیکی از جمله سرمیلرها، میکروتوب های ۰.۲ میلی لیتری عاری از DNase / RNase

شرایط نگهداری و انتقال کیت:

محتویات کیت را در دمای (۵°C ±۲-) تا تاریخ انقضا درج شده بر روی بسته بندی کیت نگهداری و حمل کنید. از انجماد و ذوب مکرر اجزاء کیت، که می تواند منجر به کاهش کیفیت تشخیصی کیت گردد پرهیز نمایید.

نوع نمونه:

۵ میلی لیتر خون کامل و یا ۳ میلی لیتر اسپیره 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، می بایست نمونه ها ظرف مدت ۲۴ ساعت پس از جمع آوری، استخراج شوند.

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

دمای نگهداری / انتقال: دمای ۲-۸ درجه سانتی گراد (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. تحت تأثیر قرار دهد، به منظور به حداقل رساندن تخریب RNA توسط ریبونوکلاز، توصیه می شود بلافاصله پس از جمع آوری نمونه، استخراج RNA آغاز گردد. هنگام کار با RNA، به منظور پیشگیری از آلودگی ریبونوکلاز از طریق دست، همیشه از دستکش استفاده کنید.
۲. RT-PCR روش بسیار حساسی است. بنابراین، می بایست جهت جلوگیری از دریافت نتایج مثبت کاذب ناشی از آلودگی با RNA، cDNA یا سایر محصولات PCR، اقدامات احتیاطی انجام گیرد. مجموعه ای از میکروبیوتها، سرمیلرها دارای فیلتر آنروسل، دستکش یکبار مصرف و روبوش آزمایشگاهی تمیز باید در آزمایشگاه در دسترس باشد.
۳. تعویض دستکش ها هنگام دست زدن به میکروتوب های حاوی RNA یا cDNA، امری ضروری است. پس از انجام PCR باید میکروتوب 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 ضد عفونی بودن محل انجام تست اطمینان حاصل کنید.
- تمامی نمونه ها را عفونی در نظر بگیرید.
- در تمام مراحل انجام آزمایش، از محافظ چشم و دستکش های یکبار مصرف استفاده کنید.

شناسه های فنی:

توالی هدف: رونوشت فیوژن MLL-AF4 حاصل از جابجایی بین کروموزوم ۱۱ و ۴. **اختصاصیت:** این کیت منحصراً قادر به شناسایی انواع متداول رونوشت های فیوژن MLL-AF4 در AML است. دو مورد AML با استفاده از کیت RT-PCR کیفی تشخیص فیوژن MLL-AF4 در مقایسه با Conventional RT-PCR آزمایش شدند و تطبیق ۱۰۰٪ نتایج حاصل شد. پنج نمونه طبیعی و پنج نمونه ALL با (4;11) یا جابجایی های دیگر با استفاده از این روش مورد بررسی قرار گرفت و هیچ واکنش مثبت کاذبی مشاهده نشد.

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:

(4;11)/MLL-AF4 Fusion Transcripts detected

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

(4;11)/MLL-AF4 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.

نکات مورد توجه:

می‌بایست به تمام یافته‌های بالینی، داده‌های آزمایشگاهی، پارامترهای هماتولوژی نظیر CBC و آنسپیره مغز استخوان و مورفولوژی در تفسیر و اتخاذ تصمیم توجه شود.

تداخل:

هیچ گونه تداخلی با سایر ترانسلوکیشن‌ها 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 نمونه‌ها از اقدامات احتیاطی عمومی استفاده کنید.

علامت و توضیحات	
	سری ساخت
	شماره رفرنس
	تاریخ تولید
	تاریخ انقضا
	مطالعه بروشور
	استفاده در موارد تشخیصی و بالینی
	استفاده در موارد تحقیقاتی
	شرایط نگهداری
	آدرس شرکت

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

حساسیت: آزمایش رقت پلاسמיד های کنترل مثبت با فیوژن *MLL-AF4* تا میزان 2×10^4 copy/ μ l تشخیص داده شد که این امر، نشان‌دهنده حساسیت خوب کیت است حتی در بیماران با اندک رونوشت فیوژن RNA که این حالت به خصوص در بیمارانی که تحت درمان قرار دارند، غیر معمول نیست.

کنترل کیفیت: در این آزمایش، RNA از آزمایش، باقی کت و گروبولوسیت‌ها را میتوان مورد استفاده عنوان یک کنترل داخلی از ژن *housekeeping* در همان لوله تکثیر می شود که به جز NTC باید در همه لوله‌ها در کانال زرد افزایش یابد.

تخلیص نوکلئیک اسید:

RNA را می توان به طور مستقیم از نمونه خون محیطی جمع‌آوری شده در لوله حاوی ضد انعقاد EDTA و یا اسپیره مغز استخوان به وسیله کیت‌های استخراج RNA معتبر و یا روش های دستی استخراج کرد. باقی کت و گروبولوسیت‌ها 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 بر روش RT-PCR کیفی:

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

۱. 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 برجسب گذاری کنید.

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

- تمام میکرو تیوب ها را با برروی رک سرد قرار دهید.
- ۱۸ μ l مسترمیکس به تمامی میکروتیوب های نام گذاری شده اضافه کنید.
- ۲ μ l آب مقطر استریل به میکروتیوب NTC اضافه کنید.
- ۲ μ l کنترل منفی به لوله دارای برجسب کنترل منفی، اضافه کنید.
- ۲ μ l از RNA بیمار را به دو میکروتیوبی که نام بیمار بر روی آن نوشته شده است اضافه کنید.
- ۲ μ l کنترل مثبت به میکروتیوب دارای برجسب کنترل مثبت، اضافه کنید.
- مواد را با یکدیگر مخلوط کرده و برای مدت زمان کوتاهی اسپین کنید.
- سپس آن را در دستگاه Real Time PCR قرار دهید و برنامه را همانگونه که در برنامه واکنش حرارتی ذکر شده است اجرا کنید.

پرو فایل واکنش حرارتی:

چرخه	زمان	دما
۱	۱۰ دقیقه	۵۰°C
۱	۳ دقیقه	۹۵°C
۴۵	۱۰ ثانیه	۹۵°C
	۳۰* ثانیه	۶۰°C

*FAM برای (4;11)/MLL-AF4، JOE برای NAGK (کنترل داخلی) تنظیم شود.

Run Settings	
Name	Gain
Green	۴
Yellow	۱۰

تجزیه و تحلیل داده ها و گزارش: