

تشخیص کمی رونویس‌های ژن *bcr-abl* اصلی در مبتلایان به لوسمی میلوئید مزمن از طریق *Competitive RT-PCR*

علی ناظمی^{۱*}، مهرداد هاشمی^۲، شهرآشوب شریفی^۳

۱. استادیار ژنتیک مولکولی، گروه زیست‌شناسی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد تنکابن

۲. استادیار ژنتیک مولکولی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد پزشکی تهران

۳. لیسانس زیست‌شناسی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد تنکابن

محل انجام تحقیق: تهران، دانشگاه تربیت مدرس، و دانشگاه آزاد اسلامی واحد تنکابن

* آدرس مسئول مکاتبات: تنکابن، مجتمع دانشگاهی دانشگاه آزاد اسلامی، صندوق پستی ۴۶۸۱۵/۵۸۶،

پست الکترونیکی: hashemi_mehrdad@yahoo.com

تاریخ پذیرش: ۸۸/۳/۳

تاریخ دریافت: ۸۸/۲/۱۰

چکیده

لوسمی میلوئیدی مزمن (CML) حاصل یک جابه‌جایی کروموزومی و الحاق ژن‌های *bcr* و *abl* است. هدف از این پژوهش راه‌اندازی یک روش ساده و ارزان برای تشخیص کمی رونویس‌های الحاقی *bcr-abl* در بیماران مبتلا به CML بود. در این مطالعه برای تعیین کمی رونویس‌های *bcr-abl* از تکنیک *RT-PCR* رقابتی استفاده شده است. قطعه DNA کنترل داخلی از منشا غیرانسانی با اندازه کمتر از DNA هدف اما با انتهای یکسان با قطعه هدف اصلی، طراحی و سنتز گردید. پس از تکثیر و خالص‌سازی، تعداد نسخه‌های آن‌ها از نظر کمی تعیین گردید. به‌منظور بهینه‌سازی شرایط واکنش PCR رقابتی ابتدا روی DNA هدف با تعداد نسخه‌های معین همراه با تعداد نسخه‌های معینی از کنترل داخلی هر یک به‌طور مجزا انجام شد و محصول واکنش تمامی غلظت‌ها روی ژل آگاروز الکتروفورز گردید. نتایج واکنش همزمان RNA هدف همراه با نسخه‌های مختلف معین کنترل‌های داخلی نشان داد که از طریق ایجاد رقابت میان آن دو می‌توان به تعداد نسخه‌های RNA هدف در نمونه به‌واسطه مقایسه شدت رنگ منتشر شده از نوارهای DNA روی ژل پی برد. این مطالعه نشان می‌دهد که تکنیک *RT-PCR* رقابتی یک روش نسبتاً کارآمد و ارزان برای تشخیص کمی رونویس‌های *bcr-abl* در مقایسه با سایر روش‌ها همچون *Real-time* است.

واژه‌های کلیدی: *competitive RT-PCR*، کنترل داخلی، رونویس‌های *bcr-abl*

مقدمه

نتیجه جابه‌جایی متقابل t(9;22)(q34;q11) است که سبب الحاق ناحیه 3' پروتوانکوژن *c-abl* (9q34) با ناحیه 5' ژن *bcr* روی کروموزوم 22q11 می‌شود. پروتئین‌های الحاقی BCR-ABL متنوعی بر اساس نقطه شکستگی درون ژن BCR ایجاد می‌شود. تاکنون سه ناحیه شکستگی عمده درون ژن BCR شامل Major-BCR (M-BCR) ، BCR ، minor-BCR (m-BCR) و micro-BCR (μ-BCR) شناسایی شده است (۱،۲).

لوسمی میلوئید مزمن (CML) یک بدخیمی کلونال سلول‌های بنیادی هماتوپوئیتیک (Hematopoietic stem cells) است، که منجر به افزایش رده‌های سلولی میلوئید، اریتروئید و مگاکاریوسیت در خون محیطی و هیپرپلازی میلوئید در مغز استخوان می‌شود. CML با یک ناهنجاری سیتوژنتیکی به نام کروموزوم فیلادلفیا (Ph) همراه است. این کروموزوم یک کروموزوم 22 کوتاه‌شده در

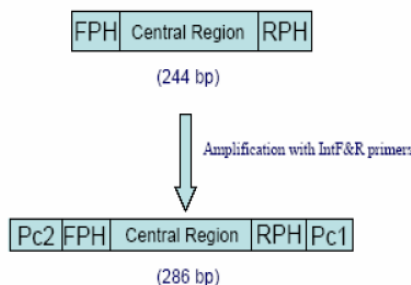
بیش از ۹۵ درصد از بیماران CML دارای ناحیه شکستگی در M-BCR هستند. در این ناحیه دو شکستگی رخ می‌دهد: یکی پس از اگزون 13 (e13) که منجر به ایجاد الحاق e13a2 (b2a2) و دیگری پس از اگزون 14 (e14) که منجر به الحاق e14a2 (b3a2) می‌شود. هر دو این mRNAهای الحاقی به یک پروتئین ۲۱۰ کیلودالتونی ($p210^{BCR-ABL}$) ترجمه می‌شوند (۳،۴). این نوع پروتئین الحاقی در ۳۰ درصد از بیماران مبتلا به لوسمی لنفوبلاستیک حاد (ALL) نیز یافت می‌شود. موارد نادر شکستگی در بیماران CML شامل ناحیه شکستگی m-BCR و μ -BCR است. در مورد ناحیه شکستگی m-BCR، شکستگی پس از اگزون 1 منجر به ایجاد الحاق e1a2 می‌شود که این mRNA الحاقی به یک پروتئین ۱۹۰ کیلودالتونی ($p190^{BCR-ABL}$) ترجمه می‌شود. این پروتئین ۱۹۰ کیلودالتونی در ۵۰ تا ۷۰ درصد از بیماران مبتلا به لوسمی لنفوبلاستیک حاد (ALL) نیز یافت می‌شود. شکستگی نادر دیگر (μ -BCR) در نتیجه شکستگی در اگزون 19 (e19) منجر به ایجاد یک الحاق e19a2 می‌گردد که این mRNA الحاقی به یک پروتئین ۲۳۰ کیلودالتونی ترجمه می‌گردد. این نوع شکستگی بیشتر در لوسمی نوتروفیلیک مزمن (CNL) رخ می‌دهد. در مقابل، مقر شکستگی در ژن *abl* نسبتاً ثابت بوده و معمولاً پیش از اگزون ۲ (a2) قرار دارد. در این الحاق‌ها، فعالیت تیروزین کینازی ژن *bcr* افزایش می‌یابد و با فسفوریلاسیون پروتئین‌های سیتوپلاسمی منجر به تکثیر سلولی، کاهش وابستگی به فاکتور رشد، مهار آپوپتوزیس و تغییر چسبندگی و اثرات دیگر، می‌شود. در حال حاضر از روش‌های سیتوژنتیکی و مولکولی برای شناسایی (9;22)t در بیماران، چه در نقطه شروع و چه در دوره درمان یا عود بیماری، استفاده می‌شود. در روش سیتوژنتیکی، آنالیز نوارگذاری کروموزوم‌ها به دلیل اختصاصیت زیاد و توانایی تشخیص نقایص کروموزومی اضافی در بررسی وضعیت پیشرفت بیماری از اهمیت زیادی برخوردار است. با این وجود، آنالیز سیتوژنتیکی به سلول‌های

مغز استخوان زنده با بیش از ۱۰ درصد بلاست‌های خون محیطی نیاز دارد. در این روش، تعداد سلول‌های قابل بررسی حساسیت کاربوتیپینگ را تعیین می‌نماید و عواملی همانند فیبروزیس که در تهیه مغز استخوان از طریق آسپریشن اختلال ایجاد می‌نمایند، سبب کاهش تعداد سلول‌ها و کاهش حساسیت این تکنیک می‌شوند. به هر حال در ۵ درصد از موارد CML وقوع t (9;22) از طریق آنالیز سیتوژنتیکی قابل مشاهده نبوده و منجر به تفسیر کاربوتیپینگ منفی کاذب می‌شود (۳،۴،۵،۶). با توجه به مقاومت سلول‌های سرطانی به داروهای مورد استفاده در شیمی‌درمانی و همچنین عود بیماری پس از پیوند مغز استخوان، بررسی حداقل بیماری باقی‌مانده (MRD) پس از درمان دارویی و یا پیوند، بسیار حائز اهمیت است.

پاسخ به درمان را می‌توان با استفاده از سه روش هماتولوژیکی، سیتوژنتیکی و مولکولی، اندازه‌گیری نمود. بهبود هماتولوژیکی، با شمارش گلبول‌های خونی و برگشت اندازه طحال به حد نرمال و پاسخ سیتوژنتیکی، به وسیله درصد سلول‌های Ph^+ باقی‌مانده تعیین می‌شود. شناسایی بهبود بیماری از طریق روش‌های مولکولی نیز قابل اجرا می‌باشد. یکی از روش‌های مولکولی که برای تعیین کمی رونویس‌ها در دوره درمان یا عود بیماری مورد استفاده قرار می‌گیرد، competitive RT-PCR است (۷،۸،۹). در این روش علاوه بر حضور DNA هدف، کنترل داخلی نیز وجود دارد. کنترل داخلی، یک توالی DNA غیر هدف است که از طریق تکنیک ترکیب پرایمر (Composite primer) توالی پرایمری مشترک با DNA هدف در دو طرف کنترل داخلی قرار می‌گیرد و این امکان را فراهم می‌نماید که هر دو قطعه DNA تحت شرایط یکسان در یک مخلوط واکنش تکثیر یابند. در این روش، همواره رقابتی بین قطعه هدف و کنترل داخلی ایجاد می‌شود و زمانی که تعداد نسخه‌های این دو قطعه برابر باشند، تقریباً تکثیر یکسانی هم خواهند داشت. این ویژگی در حقیقت اساس روش نیمه کمی competitive RT-PCR در

200 mmol/L از هر یک از نوکلئوتیدها ، 10 pmol از پرایمرهای pc1 و pc2، ۱.۵ یونیت Taq DNA polymerase در برنامه ۹۵°C به مدت ۳ دقیقه سپس ۴۰ دور ۹۵°C به مدت ۳۰ ثانیه، ۶۱°C به مدت ۳۰ ثانیه، ۷۲°C به مدت ۵ دقیقه اجرا شد. در پایان محصول ۴۱۶ جفت بازی روی ژل آگاروز ۲ درصد الکتروفورز شد.

به منظور تعیین استاندارد برای ارزیابی کمی، یک قطعه DNA به طول ۲۴۴ جفت بازی از منشا غیرانسانی (ویروس هیپاتیت C) تهیه و توالی‌های انتهایی قطعه هدف به واسطه PCR از طریق تکنیک ترکیب پرایمر در دو طرف آن قرار داده شد (تصویر ۱).



تصویر ۱- نمایی از فرآیند تهیه کنترل داخلی.

ساخت قطعه کنترل داخلی

پرایمرهای مورد استفاده به گونه‌ای طراحی گردید که توالی سمت 3' آنها با دو طرف قطعه DNA کنترل مکمل بوده و در سمت 5' آن توالی‌های دو طرف قطعه DNA هدف قرار داشت. پس از تکثیر یک قطعه DNA کنترل به طول ۲۸۶ جفت باز تهیه گردید.

خالص‌سازی و تعیین تعداد نسخه‌های قطعه کنترل داخلی

پس از تکثیر قطعه کنترل از طریق واکنش PCR، محصول روی ژل آگاروز، الکتروفورز و نوار DNA موردنظر، از ژل جدا گردید. مرحله استخراج DNA از ژل به وسیله کیت کیاژن (KIA 190) (IRAN) انجام گرفت. سپس غلظت DNA از طریق میزان جذب در طول موج ۲۶۰ نانومتر

اندازه‌گیری تعداد نسخه‌هاست. کنترل داخلی پس از تکثیر و خالص‌سازی از ژل به واسطه اسپکتروفوتومتر تعداد نسخه‌های آن تعیین می‌شود و در یک واکنش رقابتی تعداد نسخه‌های مشخصی از کنترل داخلی با نمونه هدف مجهول تحت شرایط یکسان تکثیر می‌شوند (۱۰).

مواد و روش‌ها

سلول‌های لوسمی میلوئیدی مزمن

سلول‌های لوسمی میلوئیدی مزمن، از کشت رده سلولی K562 (سلول حاوی کروموزوم فیلادلفیا با نقطه شکستگی M-BCR) در حدود 10^5 cells/ml از بخش بانک سلولی انستیتو پاستور ایران به دست آمد.

استخراج RNA

RNA کامل از ۵۰ میکرولیتر سوسپانسیون سلولی تغلیظ شده به وسیله محلول استخراج RNA RNX شرکت سیناژن ایران از خون کامل طبق دستورالعمل شرکت سازنده استخراج گردید.

تکثیر رونویس‌های الحاقی CML بوسیله RT-PCR

واکنش RT-PCR طبق روش Martinelli.G و همکارانش (۹) با برخی اصلاحات به صورت دو مرحله‌ای روی ۵ میکرولیتر RNA ($0.1 \mu\text{g}/\mu\text{l}$) استخراجی انجام شد. واکنش مرحله اول در حجم ۲۰ میکرولیتر حاوی RNA $1 \mu\text{g}$ ، 90 mmol/L Tris HCl، ۱۰۰ mmol/L KCl (pH8.3)، 1.5 mmol/L MgCl₂، ۱۰ pmol RNasin، ۱۲U dNTP، ۱۰۰ یونیت M-Mulv، ۱۰ DMSO در دمای ۴۲°C به مدت یک ساعت انجام شد. واکنش PCR با استفاده از پرایمرهای pc1 و pc2 در حجم ۲۵ میکرولیتر شامل ۲ میکرولیتر محصول واکنش رونویسی معکوس، 90 mmol/L Tris، ۱۰۰ HCl (pH8.3)، 1.5 mmol/L MgCl₂،

انجام گرفت و غلظت آن به مولاریته تبدیل و تعداد نسخه آن (با استفاده از فرمول‌های زیر) تعیین شد:

نام پرایمر	توالی پرایمر
<i>pc1</i>	5'-TTTGGTTTGGGCTTCACACCATTCC-3'
<i>Pc2</i>	5'-GTTTCAGAAGCTTCTCCCTG-3'
IntR-Primer	5'-TTTGGTTTGGGCTTCACACCATTCC <u>GCAAGCACCTATCAGGCAGT</u> -3' توالی مکمل با قطعه کنترل (RPH) توالی پرایمری Pc1
IntF-Primer	5'-GTTTCAGAAGCTTCTCCCTG <u>GAAAGCGTCTAGCCATGGCGT</u> -3' توالی مکمل با قطعه کنترل (FPH) توالی پرایمری Pc2

$$\text{غلظت DNA بر حسب میکروگرم} \times \frac{1515}{\text{تعداد جفت باز}} = \text{یک پیکومول از مولکول DNA}$$

هر مول از هر مولکولی معادل عدد آواگادرو است که تقریباً معادل $10^{23} \times 6/02$ است.

جدول ۱- پرایمرها و توالی نوکلئوتیدی آنها.

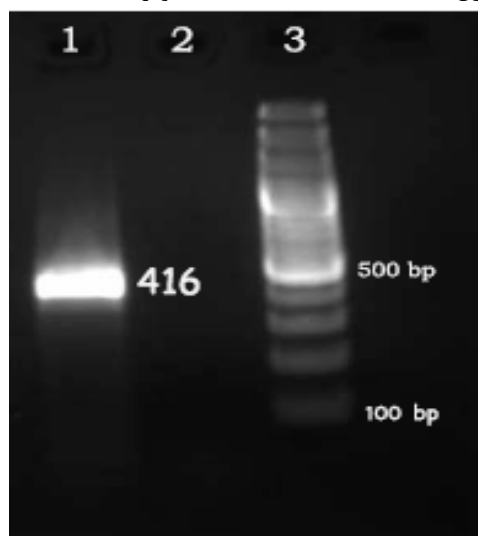
نتایج

بررسی اختصاصیت تشخیص رونویس‌های RT-PCR الحاقی از طریق RT-PCR با استفاده از پرایمرهای *pc1* و *pc2* روی RNA استخراج شده از سلول‌های K562 به دست آمد (تصویر ۲).

قطعه ۴۱۶ جفت بازی با استفاده از پرایمر *pc2* توسط شرکت TAG دانمارک تعیین توالی شد. اختصاصیت توالی تکثیر شده به وسیله نرم‌افزار DNAMan با توالی کامل b3a2 RNA مقایسه و صحت آن تایید گردید (تصویر ۳).

بررسی تعیین کمی از طریق Competitive RT-PCR

در این مطالعه به منظور بررسی حساسیت و کارایی Competitive RT-PCR در تعیین تعداد نسخه، RNA هدف به دلیل ناپایداری و همچنین عدم تعیین کمی نسخه‌های آن به DNA تبدیل و پس از تعیین کمی، تعداد نسخه $10^5 \times 3$ از آن با تعداد نسخه‌های معینی از رقابتگرها از $10^2 \times 1$ تا $10^7 \times 1$ در تعدادی از واکنش رقابتی تکثیر گردید. پس از الکتروفورز محصول واکنش‌ها روی ژل آگاروز، شدت رنگ تولیدی نوار رقابتگر با نوار DNA هدف به وسیله نرم‌افزار UVtec بررسی گردید. نتیجه

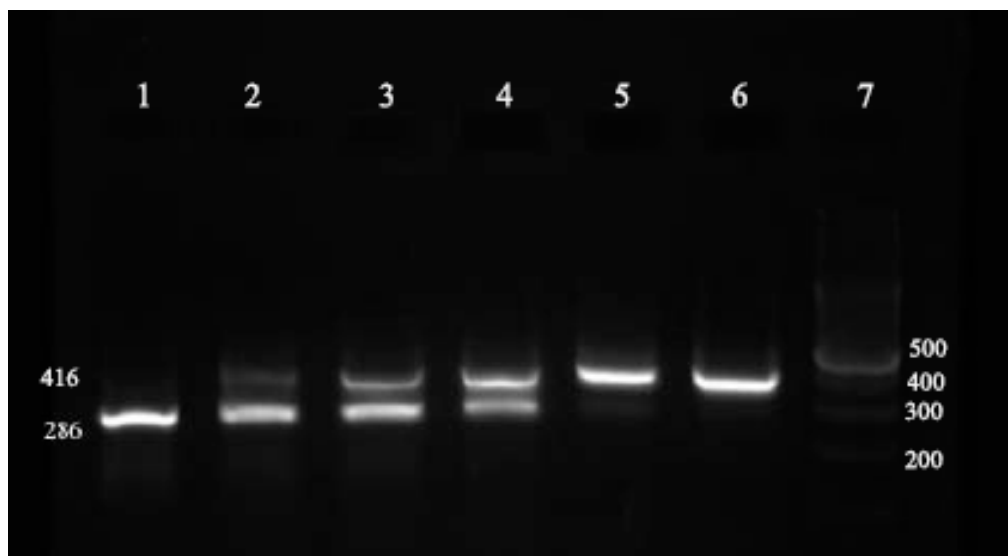


تصویر ۲- ردیف ۱: محصول واکنش RT-PCR با طول ۴۲۰ جفت باز، ردیف ۲: کنترل منفی، ردیف ۳: سایز مارکر ۱۰۰ جفت بازی (Fermentas).

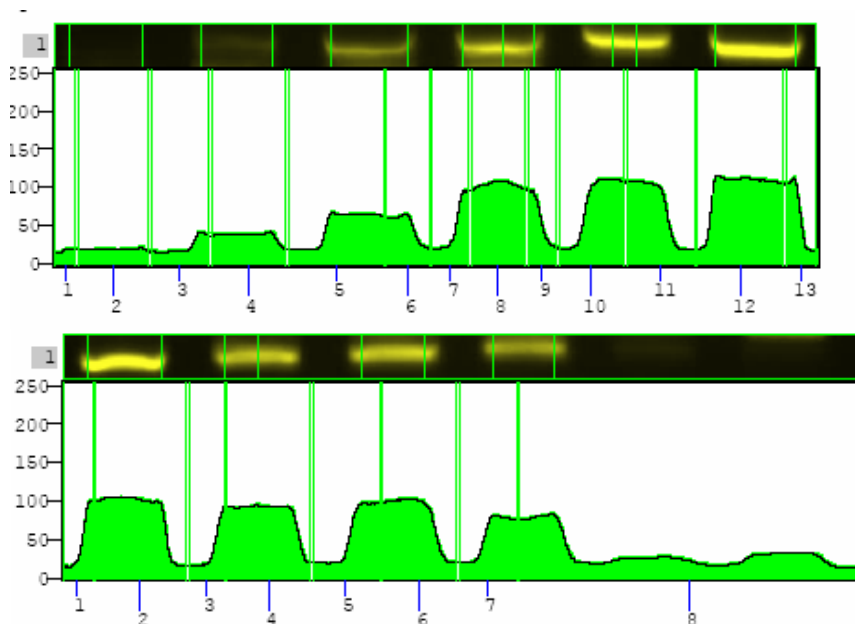
واکنش در تصویر ۴ و نمودار ۱ نمایش داده شده است.

NCBI_SEQUENCE_BC	TG CAG AT GCT GAC C A C T C G T G T G T G A A A C T C C A G A C T G T	280
SAMPLE-FORWARD_P	T A C N C G A G C T G A C . . A C T C G T G T G T G A A . C T C C A G A C T G T	40
Consensus	t c g c t g a c a c t c g t g t g t g a a c t c c a g a c t g t	
NCBI_SEQUENCE_BC	CCACAGCATTCCGCTGACCATCAATAAGGAAGATGATGAG	320
SAMPLE-FORWARD_P	CCACAGCATTCCGCTGACCATCAATAAGGAAGATGATGAG	80
Consensus	ccacagcattccgctgaccatcaataaggaagatgatgag	
NCBI_SEQUENCE_BC	TCTCCGGGGCTCTATGGGTTTCTGAATGTCATCGTCCACT	360
SAMPLE-FORWARD_P	TCTCCGGGGCTCTATGGGTTTCTGAATGTCATCGTCCACT	120
Consensus	tctccggggctctatgggtttctgaatgtcatcgctccact	
NCBI_SEQUENCE_BC	CAGCCACTGGATTTAAGCAGAGTTCAAAAAGCCCTTCAGCG	400
SAMPLE-FORWARD_P	CAGCCACTGGATTTAAGCAGAGTTCAAAAAGCCCTTCAGCG	160
Consensus	cagccactggatttaagcagagttcaaaaagcccttcagcg	
NCBI_SEQUENCE_BC	GCCAGTAGCATCTGACTTTGAGCCTCAGGGTCTGAGTGAA	440
SAMPLE-FORWARD_P	GCCAGTAGCATCTGACTTTGAGCCTCAGGGTCTGAGTGAA	200
Consensus	gccagtagcatctgactttgagcctcagggctctgagtga	
NCBI_SEQUENCE_BC	GCCGCTCGTTGGA A C T C C A A G G A A A A C C T T C T C G C T G G A C	480
SAMPLE-FORWARD_P	GCCGCTCGTTGGA T C T C C C T A T A G T G A G T C G T A T T A C A A T	240
Consensus	gccgctcgttgga ctcc a t t g a	

تصویر ۳- مقایسه توالی محصول RT-PCR با توالی کامل mRNA رونویس bcr-abl. ردیف اول از بالا توالی رونویس bcr-abl، ردیف دوم از بالا توالی سکانس شده محصول RT-PCR و ردیف سوم از بالا نوکلئوتیدی یکسان بین آن‌ها را نشان می‌دهد.



تصویر ۴- نتیجه واکنش رقابتی ما بین قطعه هدف و کنترل روی ژل آگاروز. تعداد نسخه قطعه هدف در تمامی واکنش‌ها یکسان و $10^5 \times 3$ بود. تعداد نسخه قطعه کنترل از ردیف ۱ تا ردیف ۶ در جدول ۱ ذکر شده است.



نمودار ۱- بررسی شدت رنگ هر نوار بوسیله نرم افزار UVtec. نمودار بالا مربوط به قطعه هدف و نمودار پایین مربوط به قطعه کنترل است.

که در جدول ۲ نمایش داده شده است. در این روش برای نمونه‌های مجهول می‌توان برای هر واکنش با رسم نمودار خطی از شدت رنگ قطعه کنترل و قرار دادن شدت رنگ قطعه هدف روی این خط غلظت رونویس‌ها در نمونه را تعیین نمود.

شدت رنگ به‌دست آمده از طریق نرم‌افزار UVtec در ردیف ۴ برای نوار قطعه هدف ۱/۵ برابر نوار کنترل داخلی بوده است. با توجه به سه‌برابر بودن غلظت قطعه هدف نسبت به کنترل، گوناگونی مشاهده شده حدود ۱/۲ درصد است. شدت رنگ برای این دو قطعه در سایر ردیف‌ها نیز به‌دست آمده

جدول ۲- مقایسه تعداد نسخه و میزان رنگ تولیدی نوار DNA هدف و کنترل داخلی.

ردیف	تعداد نسخه قطعه هدف	تعداد نسخه قطعه کنترل داخلی	نسبت مشاهده شده رنگ نوار قطعه هدف به نوار کنترل	نسبت قطعه هدف به کنترل	میزان گوناگونی تکثیر (%)
۱	3×10^5	1×10^8	$1/688$	۰/۰۰۳	۳/۸
۲	3×10^5	1×10^7	$46/487$	۰/۰۳	۳/۱
۳	3×10^5	1×10^6	$228/388$	۰/۳	۲/۴
۴	3×10^5	1×10^5	$250/100$	۳	۱/۲
۵	3×10^5	1×10^4	$313/2$	۳۰	۵/۲
۶	3×10^5	1×10^3	$673/2$	۳۰۰	۱/۱

می‌کند. ارزیابی تعداد نسخه‌های این رونویس‌ها در تعیین شدت بیماری، بررسی پاسخ به درمان دارویی و برگشت بیماری، از اهمیت زیادی برخوردار است. در این مطالعه، تشخیص رونویس‌های الحاقی بر پایه RT-PCR طبق روش Martinelli.G و

بحث

الحاق ژن‌های BCR و ABL در اثر جابه‌جایی DNA منجر به ایجاد رونویس‌ها و در نهایت پروتئین جدید می‌شود که تکثیر سلولی را القا

وجود دارد. یکی از مزیت‌های این روش، ارزش عددی بالاتر تعداد نسخه‌های *bcr-abl* تعیین شده به وسیله روش رقابتی نسبت به روش Real-time PCR است و زمانی که تعداد رونویس‌ها به وسیله روش Real-time PCR پایین یا منفی است، استفاده از آن پیشنهاد می‌گردد (۱۲). نتایج حاصل از بررسی این روش روی کنترل داخلی و DNA هدف با تعداد نسخه‌های مشخص، یک گوناگونی کمتر از ۵ درصد را نشان داد که این گوناگونی در رابطه با ارزیابی کمی، قابل چشم‌پوشی است. هر چند روش بررسی کمی بر اساس میزان رنگ تولیدی روی ژل است که این روش از ارزش عددی اندکی برخوردار است، با این وجود گوناگونی ناچیزی مشاهده شده است. بنابراین، از این روش ارزان می‌توان برای بررسی اولیه تعداد نسخه‌های رونویس‌های الحاقی ژن BCR-ABL استفاده نمود.

همکارانش اجرا گردید (۹). در این مطالعه ما تنها از پرایمرهایی استفاده نمودیم که قادر به تکثیر شکستگی اصلی ژن *bcr* بوده است. اختصاصیت این روش تشخیصی ۱۰۰ درصد و حساسیت آن ۴ سلول لوسمی یا حدوداً ۳۰۰ رونویس الحاقی در نمونه تعیین گردید (۱۱). در این مطالعه یک روش PCR رقابتی نیز برای ارزیابی رونویس‌های این ژن ارائه نمودیم. در این طراحی به دلیل ناپایداری مولکول RNA فرآیند رقابت به جای مرحله RT در مرحله واکنش PCR انجام می‌گیرد و رقابتگر به طور کلی یک مولکول DNA است که یا از طریق کلون‌سازی و یا واکنش پلی‌مرازی تکثیر شده و پس از خالص‌سازی از روی ژل تعداد نسخه‌های آن تعیین گردیده است. بنابراین، عدم کارایی واکنش RT می‌تواند بر ارزیابی صحیح تعداد نسخه‌ها تاثیر بگذارد. البته این ضعف در تمامی سیستم‌های اندازه‌گیری کمی از جمله Real-time PCR نیز

منابع مورد استفاده

- Inukai, T., Sugita, K., Suzuki, T., 1993. A novel 203 kD aberrant *bcr-abl* product in a girl with Philadelphia chromosome positive acute lymphoblastic leukaemia. *Br J Haematol* 85: 823-825.
- Sawyers, C. L., Timson, L., Kawasaki, E. S., 1990. Molecular relapse in chronic myelogenous leukemia patients after bone marrow transplantation detected by polymerase chain reaction. *Proc Natl Acad Sci USA* 87: 563-567.
- Zhang, J. G., Goldman, J. M., Cross, N. C. P., 1995. Characterization of genomic BCR-ABL breakpoints in chronic myeloid leukemia by PCR. *Br J Haematol* 90: 138-146.
- Gutierrez, M., Timson, G., Siraj, A. K., Barbhaya, S., Banavali, S., Bhatia, K., 2005. Single monochrome real-time RT-PCR assay for identification, quantification and breakpoint cluster region determination of t(9;22) transcripts. *Journal of Molecular Diagnostics* 1: 40-47.
- Bagg, A., 2002. Chronic myeloid leukemia: A minimalistic view of post-therapeutic monitoring. *Journal of Molecular Diagnostics* 1: 1-9.
- Chasseriau, J., Rivet, J., Bilan, F., Chomel, J. C., Guilhot, F., Bourmeyster, N., Kitzis, A., 2004. Characterization of the different BCR-ABL transcripts with a single Multiplex RT-PCR. *Journal of Molecular Diagnostics* 64: 343-347.
- Campanini, F., Santucci, M. A., Pattacini, L., Brusa, G., Piccioli, M., Barbieri, E., Babini, L., Tura, S., 2001. Competitive polymerase chain reaction as a method to detect the amplification of *bcr-abl* gene of chronic myeloid leukemia. *Haematologica* 86: 167-173.
- Amabile, M., Giannini, B., Testoni, N., Montefusco, V., Rosti, G., Zardini, C., Terragna, C., Buonamici, S., Ottaviani, E., 2001. Real-time quantification of different types of *bcr-abl* transcript in chronic myeloid leukemia. *Haematologica* 86: 252-259.
- Martinelli, G., Testoni, N., Montefusco, V., Amabile, M., Saglio, G., Ottaviani, E., Terragna, C., 1998. Detection of *bcr-abl* transcript in chronic myelogenous leukemia patients by reverse-transcription-polymerase chain reaction and capillary electrophoresis. *Haematologica* 83: 593-601.
- Hoorfar, J., Malorny, B., Abdulmawjood, A., Cook, N., Wagner,

- M., Fach, P., 2004. Practical considerations in design of internal amplification controls for diagnostic PCR assays. *Journal of Clinical Microbiology* 5: 1863-1868.
11. Nazemi, A., Sadeghizadeh, M., Forouzandeh Moghaddam, M., Javadi, G. H., Hashemi, M., 2008. Quantitative comparison of NASBA-ELISA and RT-PCR-ELISA sensitivities for measurement of the BCR-ABL genes fusion transcript in CML patients. *Medical Sciences Journal of Islamic Azad University Tehran Medical Branch* 18: 67-74.
12. Guo, J. Q., Lin, H., Kantarjian, H., Talpaz, M., Champlin, R., Andreeff, M., Glassman, A., Arlinghaus, R. B., 2002. Comparison of competitive-nested PCR and real-time PCR in detecting BCR-ABL fusion transcripts in chronic myeloid leukemia patients. *Leukemia* 16: 2447-2453.