Archive of SID

مجله علوم پزشکی مدرس
دوره ۱۰، شماره ۳ و ٤: از ۵۱-۵۷
پاییز و زمستان ۱۳۸٦

واریانت‌های BCR-ABL در بیماران لوسمی میلوئیدی مزمن به روش RT-Multiplex PCR

بهجت غلامی[۱]، مجید صادقی‌زاده[۲*]، حسین نجم‌آبادی[۳]

۱- دانشجوی کارشناسی ارشد، گروه ژنتیک، دانشکده علوم پایه، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران
۲- دانشیار، گروه ژنتیک، دانشکده علوم پایه، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران
۳- دانشیار، گروه ژنتیک، دانشگاه بهزیستی و توانبخشی، تهران، ایران

دریافت مقاله:۸۷/۲/۷ پذیرش مقاله:۸۷/۷/۱۴

چکیده

هدف: لوسمی (سرطان خون) میلوئیدی مزمن یک بیماری کلونال بدخیم سلول‌های پایه خون‌ساز است که نتیجه آن افزایش سلول‌های میلوئیدی، اریتروئیدی و پلاکت‌ها در خون محیطی و هیپرپلازی در مغز استخوان است. تحقیقات انجام شده واریانت‌های متفاوتی از BCR-ABL را در بیماران لوسمی میلوئیدی مزمن نشان داده است. تاکنون در ایران صرفاً ۳ واریانت در برخی از آزمایشگاه‌های تشخیص طبی شناسایی می‌شود که یکی از دلایل آن عدم طراحی و استفاده از آغازگرهایی است که به‌طور همزمان بتواند کلیه واریانت‌ها را شناسایی کند. در این مطالعه با روش RT-Multiplex PCR کلیه واریانت‌ها در بیماران لوسمی میلوئیدی مزمن شناسایی شد.

مواد و روش‌ها: نمونه خون از یکصد فرد تحت درمان یا در مرحله تشخیص بیماری دریافت و سپس با استفاده از کیت تجارتی Roche از ٦۰۰ میکرولیتر کلیه نمونه‌ها RNA استخراج شد. RNA استخراج شده توسط آنزیم نسخه‌برداری معکوس به cDNA تبدیل و با استفاده از ۲ جفت آغازگر نمونه‌ها برای واریانت‌های *BCR-ABL* مورد آزمایش قرار گرفتند. به موازات کلیه نمونه‌ها به روش RT-Multiplex Nested PCR روی ژل آگارز بررسی شد.

نتایج: RT-Multiplex PCR توانست *BCR-ABL* را در تمام نمونه‌هایی که برای این mRNA ژن ادغامی مثبت بوده‌اند نشان دهد. در یکصد نمونه جمع‌آوری شده به روش RT-Multiplex PCR، ٤٦ درصد مثبت و ٥٤ درصد منفی و به روش RT-Multiplex Nested PCR، ٤٤ درصد مثبت و ٥٦ درصد منفی بوده است.

نتیجه‌گیری: ما در این تحقیق با استفاده از یک PCR یک مرحله‌ای توانستیم واریانت‌های بیشتری از *BCR- ABL* را در یک لوله در زمان کوتاه‌تر و هزینه کمتر شناسایی کنیم، ضمن مقایسه معلوم شد این روش از اختصاصیت ۱۰۰ درصد برخوردار است. این پژوهش می‌تواند با استفاده از تعداد نمونه‌های بیشتر برای تشخیص سایر واریانت‌ها و روش Real Time PCR برای بررسی کمی نمونه‌ها کامل‌تر شود.

کلیدواژگان: *BCR-ABL*، mRNA ژن ادغامی، لوسمی میلوئیدی مزمن.

۱- مقدمه

در بیماران لوسمی میلوئیدی مزمن (Chronic Myeloid Leukemia :CML) کروموزوم فیلادلفیا (Philadelphia Chromosome) طی جابه‌جایی دوطرفه بین بازوهای بلند دو کروموزوم ۹ و ۲۲ ایجاد می‌شود [۲،۱]. طی این جابه‌جایی قطعه ′۳ از ژن *ABL* در

* **نشانی مکاتبه:** تهران، دانشگاه تربیت مدرس، دانشکده علوم پایه، گروه ژنتیک، صندوق پستی: ۱۷۵-۱٤۱۱۵
Email: sadeghma@modares.ac.ir

www.SID.ir

Archive of SID

کروموزوم 9q34 به بخش ′۵ از ژن *BCR* در کروموزوم 22q11 منتقل می‌شود و یک ژن ادغامی *BCR-ABL* ایجاد می‌شود که طی نسخه‌برداری ایجاد یک mRNA می‌نماید [۳]. mRNA حاصل به یک پروتئین BCR-ABL ترجمه می‌شود که نقش اساسی در بیماری‌زایی ژنتیکی بیماران CML دارد. از علایم رایج شروع این بیماری کاهش وزن و بی‌اشتهایی است ولی ٤٠ درصد بیماران بدون علامت بوده و در این دسته از بیماران صرفاً شمارش غیرطبیعی سلول‌های خون در تشخیص مؤثر است. در این بیماران میزان گلبول‌های سفید خون به بیش از ۲۵۰۰۰ در هر میلی‌متر مکعب افزایش می‌یابد و در اسمیر خون محیطی آن‌ها تمامی رده‌های تمایز گرانولوسیتی دیده می‌شود. افزایش پلاکت در ۳۰ تا ۵۰ درصد این بیماران مشاهده می‌شود. هنگام معاینات فیزیکی اسپلانومگالی (Splenomegaly) ناهنجاری شایع در این بیماران بوده و در نیمی از بیماران قابل مشاهده است [٤].

بیماری CML ۱۵ درصد لوسمی بزرگسالان را به خود اختصاص داده است و وقوع این بیماری سالانه ۱-۲ نفر در هر ۱۰۰۰۰۰ نفر است. سن درگیری بیماران ٤۵-۵۵ سال است، اما این بیماری در تمام گروه‌های سنی حتی کودکان هم دیده می‌شود [۵]. در تشخیص این بیماران از روش‌های سیتوژنتیک استاندارد مانند FISH (Fluorescent In Situ Hybridization)، ساترن بلات و وسترن بلات نیز استفاده می‌شود که هر یک از آن‌ها از مشکلات خاصی در تشخیص این بیماری برخوردار است [٦-١٤].

هدف اصلی در تحقیق حاضر انجام یک آزمون RT-Multiplex PCR معمولی و مقرون به‌صرفه بوده است که به‌وسیله آن بتوان واریانت‌های مختلف BCR-ABL را در نمونه‌های خون محیطی بیماران CML در صورت حضور واریانت ارزیابی کرد و ارتباط هماهنگ میان نتایج حاصل را با نتایج مربوط به RT-Multiplex Nested PCR که در برخی از آزمایشگاه‌های تشخیصی کشور استفاده می‌شود، بررسی نمود.

۲- مواد و روش‌ها

به‌منظور مطالعه واریانت‌های مختلف BCR-ABL در بیماران CML از روش RT-Multiplex PCR استفاده شد. نمونه‌گیری از یکصد بیمار تحت درمان یا در مرحله تشخیص (افراد مشکوک به بیماری) در آزمایشگاه صورت گرفت و میزان ۲۰ میلی‌لیتر خون محیطی از آن‌ها دریافت و به لوله آزمایش حاوی ضد انعقاد EDTA (Ethylene Dinitro Tetra acetic Acid)، ۰/۵ مولار با pH=۸ انتقال داده شد. سپس از ٦۰۰ میکرولیتر آن با استفاده از کیت تجارتی Roche نمونه RNA استخراج شد. پس از آن با استفاده از روش UV اسپکتروفتومتری و الکتروفورز ژل آگارز کیفیت و کمیت RNA استخراج شده ارزیابی شد.

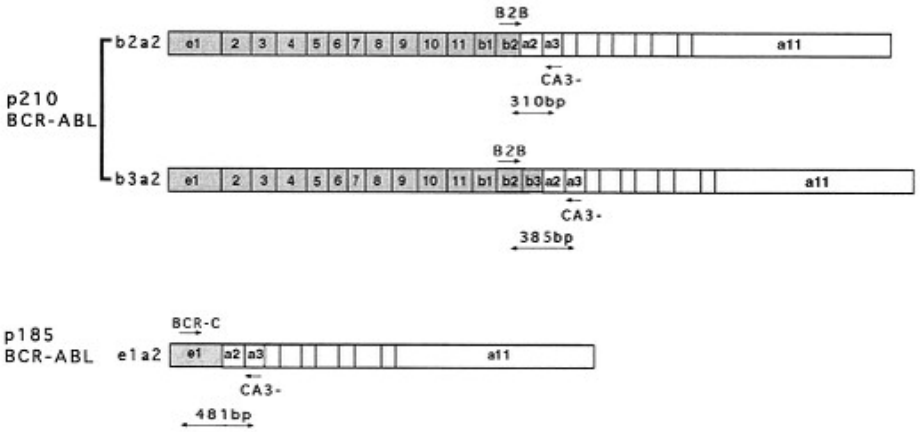
میزان ۵ میکروگرم از RNA استخراج شده از خون محیطی هر بیمار با استفاده از آغازگر(Primer) راندوم هگزامر (Random Hexamer) به میزان ۰/۷ میکروگرم و آنزیم نسخه‌برداری معکوس M-MuLV به میزان ۲۰۰ واحد به ٤۰ میکرولیتر cDNA تبدیل شد. برای انجام آزمایش زنجیره پلیمراز مواد و محلول‌های لازم از شرکت Fermentas خریداری شد [۱۵]. آغازگرهای مصرفی در این تحقیق از مقاله، سفارش داده شده است [۱٦]، با وجود سفارش آغازگرها از مقاله توالی نوکلئوتیدی آنها در سایت NCBI (National Center for Biotechnology Information) در قسمت کاوش (Blast) بررسی شد. آغازگرها از طریق شرکت فرآیند دانش آرین به شرکت آلمانی MWG Oligo Synthesis سفارش داده شد. توالی آغازگرها و مشخصات آن‌ها در جدول شماره ۱ آمده است.

جدول ۱ توالی آغازگرها و مشخصات آن‌ها

آغازگرها	توالی (′۵ ⟵ ′۳)	Tm (درجه سانتی گراد)
a3 (R)	TGT TGA CTG GCG TGA TGT AGT TGC TTG G	٦٦/٦
b5 (R)	ATA CTC TCC TTT GCA ACC GGG TCT GAA	٦۵/۰
b1 (F)	ACC GCA TGT TCC GGG ACA AAA G	٦۲/۱
b2 (F)	ACA GCA TTC CGC TGA CCA TCA ATA AG	٦۳/۲

www.SID.ir

Archive of SID



شکل ۱ سایز قطعات تکثیر شده توسط آغازگرها

آغازگرها به گونه‌ای طراحی شدند که قادر به شناسایی ۱۲ رونوشت (Transcript) ادغامی در بیماران CML باشند [۱۳].

آغازگرهای b2 و a3 قطعه‌ای به‌طول ۳۱۰ باز برای رونوشت b2a2 و ۳۸۵ باز برای رونوشت b3a2 و آغازگرهای b1 و a3 قطعه‌ای به‌طول ٤٨١ باز برای رونوشت e1a2 (شکل ۱) و آغازگرهای b2 و b5 قطعه‌ای به‌طول ۸۰۸ باز را برای BCR طبیعی تکثیر می‌کنند [١٦].

بعد از بهینه‌سازی شرایط، واکنش PCR برای هر نمونه به‌صورت زیر انجام شد:

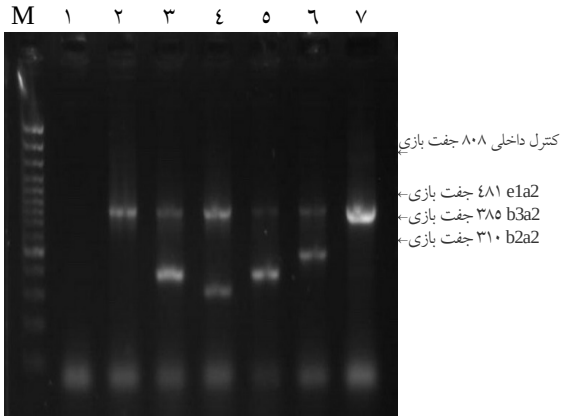
بافر PCR x ۱۰، $MgCl_2$ ۱/۵ میلی‌مولار، dNTP ۰/۲ میلی‌مولار، ۵ پیکومول از هرکدام از آغازگرها، ۱/۵ واحد آنزیم، ٤ میکرولیتر cDNA، حجم نهایی با آب مقطر استریل به ۲۵ میکرولیتر رسانده شد. سپس نمونه هر بیمار به همراه کنترل مثبت و منفی با شرایط زیر در دستگاه قرار داده شد:

۱	دمای ابتدایی جدا شدن (Denaturation) دو رشته	۹۵ درجه سانتی‌گراد	۵ دقیقه
۲	دمای جدا شدن دو رشته	۹٦ درجه سانتی‌گراد	۱ دقیقه
۳	دمای دورگه شدن (Annealing)	٦٤ درجه سانتی‌گراد	۵۰ ثانیه
٤	دمای پیشروی (Extension)	۷۲ درجه سانتی‌گراد	۱ دقیقه
برنامه دو تا چهار، ۳۵ چرخه تکرار شد.			
۵	دمای پیشروی نهایی	۷۲ درجه سانتی‌گراد	۱۰ دقیقه

نتایج حاصل روی ژل آگارز ۲ درصد در کنار اندازه‌نما (Marker) ۱۰۰ تا ۱۰۰۰ جفت بازی بررسی شد.

۳- نتایج

پس از انجام واکنش PCR برای هر نمونه، ضمن آنالیز نمونه‌ها روی ژل آگارز واریانت‌های مختلفی که در این پژوهش شناسایی شد عبارت بودند از e1a2، b2a2 و b3a2 که در شکل ۲ نشان داده شده است.



شکل ۲ ستون M اندازه‌نما ۱۰۰ تا ۱۰۰۰ جفت بازی، **ستون۱** کنترل منفی (لوله فاقد DNA الگو)؛ **ستون ۲**: نمونه طبیعی؛ **ستون ۳**: کنترل مثبت؛ **ستون‌های ٤، ۵ و ٦**: به‌ترتیب مربوط به بیماران CML با واریانت‌های b2a2 (۳۱۰جفت باز) و b3a2 (۳۸۵ جفت باز) و e1a2 (٤٨١ جفت باز)؛ **ستون ۷**: مربوط به نمونه طبیعی است که BCR (۸۰۸ جفت باز) در آن تکثیر شده است.

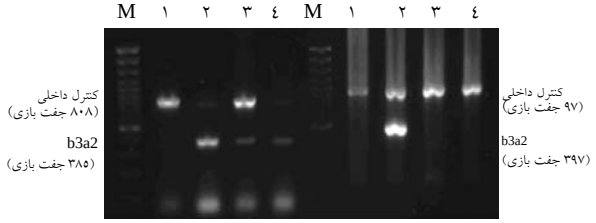
www.SID.ir

Archive of SID

RT-Multiplex PCR توانست BCR-ABL را در تمام نمونه‌هایی که برای این mRNA ژن ادغامی (Fusion Gene mRNA) مثبت بوده‌اند نشان دهد و در دو نمونه که به‌روش RT-Multiplex Nested PCR منفی گزارش شده بودند به‌روش RT-Multiplex PCR مثبت و mRNA ژن ادغامی BCR-ABL در آن‌ها شناسایی شد. برای اطمینان از نتایج آزمون مجدداً آزمایش در هر دو مورد تکرار شد و نتایج به‌دست آمده در مرحله ۲ کاملاً مشابه با مرحله اول بود به عبارت دیگر بازدهی PCR در تشخیص mRNA ژن ادغامی BCR-ABL در یکصد نمونه جمع‌آوری شده به‌روش RT- Multiplex PCR، ٤٦ درصد مثبت و ٥٤ درصد منفی و به‌روش RT-Multiplex Nested PCR، ٤٤ درصد مثبت و ٥٦ درصد منفی بوده است (شکل ۳).

برای اطمینان از وجود باند اختصاصی در روش یک مرحله‌ای و عدم وجود آن در Nested، نمونه‌ها به علت حساسیت بیشتر ژل آکریل‌آمید روی این ژل بررسی شدند.

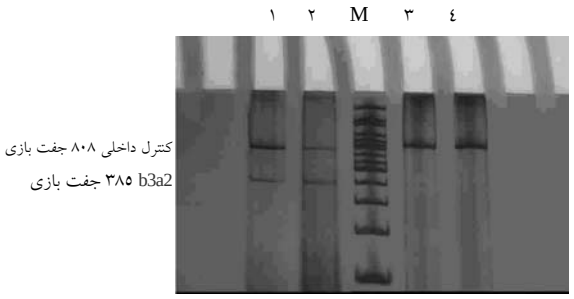
همان‌طور که در شکل ٤ دیده می‌شود نتایج روی ژل آکریل‌آمید نیز تأیید شدند.



شکل ۳ ستون M اندازه‌نما۱۰۰ تا ۱۰۰۰ جفت بازی؛ **ستون ۱**: نمونه منفی؛ **ستون ۲**: نمونه مثبت؛ **ستون‌های ۳ و ٤**: (سمت راست): به‌روش RT-Multiplex Nested PCR منفی گزارش شدند؛ **ستون‌های ۳ و ٤**: (سمت چپ): در روش RT-Multiplex PCR برای b3a2 مثبت بودند.

در مرحله بعد برای تأیید یا رد این مورد که ناحیه تکثیر شده همان mRNA ژن ادغامی *BCR-ABL* است، نمونه‌ها برای تعیین توالی از طریق شرکت ژن فن‌آوران به شرکت Micro Gene در کره ارسال شد.

سپس نتایج تعیین توالی توسط نرم‌افزار Chromas بررسی و در سایت NCBI (http://www.ncbi.nlm.nih.gov) با استفاده از برنامه کاوش در قسمت Nucleotide by Nucleotide Blast توالی آنالیز شد و ضمن بررسی مشخص شد که ناحیه تعیین توالی شده همان ژن ادغامی *BCR-ABL* (b3a2) است.



شکل ٤ ستون M: اندازه‌نما ۱۰۰ تا ۱۰۰۰ جفت بازی؛ **ستون‌های ۱ و ۲**: نمونه‌های روش Multiplex؛ **ستون‌های ۳ و ٤**: نمونه‌های روش Nested Multiplex.

٤- بحث

از آنجایی که شناسایی واریانت‌های BCR-ABL نقش مهمی در تشخیص و درمان بیماران CML دارد و با توجه به این‌که نتیجه تشخیص در درمان بیماری و پیگیری بیماری پس از درمان بالاخص پیوند مغز استخوان حایز اهمیت است، بنابراین استفاده از روشی که بتواند واریانت‌های مختلف BCR-ABL را در این بیماران تشخیص دهد از اهمیت ویژه‌ای برخوردار است.

در حال حاضر در بعضی از آزمایشگاه‌های تشخیصی ایران روش RT-Multiplex Nested PCR استفاده می‌شود و در تحقیق حاضر با استفاده از یک PCR یک مرحله‌ای واریانت‌های بیشتری از BCR-ABL در یک لوله در زمان کوتاه‌تری شناسایی شد، حال آن‌که روش Nested، نیاز به تعداد بیشتری آغازگر (۱۰ عدد) داشته و مدت زمان انجام آزمون نیز طولانی‌تر است، در این روش مواد مورد نیاز برای انجام آزمایش در دو مرحله استفاده می‌شود و هزینه بیشتری نسبت به روش یک مرحله‌ای دارد. علاوه بر این در روش Nested به علت دو مرحله‌ای بودن آزمون، امکان آلودگی نسبت به روشی که در این پروژه انجام شده است و آزمون در یک لوله قابل انجام است، بیشتر است و ضمناً در روش Nested آغازگرها به‌گونه‌ای طراحی شده‌اند که صرفاً قادر به شناسایی ۳ واریانت mRNA ژن ادغامی *BCR-ABL* هستند [۱۷].

در روش استفاده شده در این مطالعه می‌توان در یک مرحله

www.SID.ir

Archive of SID

و با تعداد کمتری آغازگر نسبت به روش‌های مشابه کلیه واریانت‌های مختلف BCR-ABL را در بیماران CML شناسایی کرد.

تعداد نمونه‌های مورد استفاده در این طرح یکصد نمونه مربوط به بیماران تحت درمان یا در مرحله تشخیص بیماری CML بود و ضمناً در این تحقیق، هدف مقایسه دو روش نیز بوده است، با توجه به این‌که تمامی نمونه‌ها با هر دو روش مورد آزمون قرار گرفتند، بنابراین تعداد کافی نمونه بررسی شده است.

طی مقایسه معلوم شد که روش یک مرحله‌ای از اختصاصیت (Specificity) ۱۰۰ درصد برخوردار بوده است و کلیه نمونه‌های مثبت توسط روش Nested با روش یک‌مرحله‌ای شناسایی شدند. این مطلب بیانگر این است که نواحی انتخاب شده برای اتصال آغازگرها به گونه‌ای بودند که قادر به شناسایی رونوشت‌های BCR-ABL است. علاوه بر این حساسیت (Sensitivity) روش یک‌مرحله‌ای بیشتر از ۱۰۰ درصد نسبت به Nested بود، در واقع به‌جز دو مورد، سایر نتایج یکدیگر را تأیید کرد، ضمن بررسی توالی آغازگری در هر دو روش دیده شد که یکی از آغازگرهای روش Nested در مرحله اول دارای مقدار GC برابر ۳۹/۱ درصد است بنابراین انتظار می‌رود تعدادی از آغازگرهای اتصال یافته در دمای دورگه شدن در دمای پیشروی جدا شوند و با توجه به تکثیر ۲۵ مرحله‌ای ناحیه مورد نظر تکثیر نشود.

رونوشت b2a2 و b3a2 در ٤٤ درصد و e1a2 در ۲ درصد از بیماران مراجعه‌کننده به مرکز ژنتیک و آسیب‌شناسی دکتر کریمی‌نژاد- دکتر نجم‌آبادی (Kariminejad-Najmabadi) مشاهده شد که ٤٦ درصد بیماران این مرکز برای CML مثبت بودند. در ۹۵/٦۵ درصد بیماران رونوشت b2a2 یا b3a2 بود و در ٤/۳٤ درصد بیماران رونوشت e1a2 مشاهده شد.

علت این‌که از بین یکصد نمونه، ۳ واریانت BCR-ABL مشاهده شد این است که در بیماران CML رونوشت غالب b2a2 یا b3a2 است و سایر واریانت‌ها بسیار نادر است [۱۷-۲۰].

روش مورد استفاده در این پژوهش می‌تواند با استفاده از نمونه‌های بیشتر در جهت تشخیص سایر واریانت‌های CML و نیز بررسی کمی واریانت‌ها با استفاده از روش Real Time PCR کامل‌تر شود [۲۱-۲۳].

۵- تشکر و قدردانی

از دفتر فنّاوری‌های ریاست جمهوری به خاطر تأمین هزینه بخشی از طرح تشکر می‌شود.

٦- منابع

[1] Nowell PC, Hungerford DA. A minute chromosome in human chronic granulocytic leukemia. Science 1960; 142: 1497.

[2] Rowley JD. Letter: A new consistent chromosomal abnormality in chronic myelogenous leukaemia identified by quinacrine fluorescence and Giemsa staining. Nature 1973; 243(5405): 290-3.

[3] Kurzrock R, Gutterman JU, Talpaz M. The molecular genetics of Philadelphia chromosome-positive leukemias. N Engl J Med 1988; 319(15): 990-8.

[4] Charles L Sawyers MD. Chonic Myeloid Leukemia: Medical Progress. N Engl J Med 1999; 340: 1330-40.

[5] Faderl S, Talpaz M, Estrov Z, O'Brien S, Kurzrock R, Kantarjian HM. The biology of Chronic Myeloid Leukemia. N Engl J Med 1999; 341(3); 164-72.

[6] Spurbeck JL, Adams SA, Stupca PJ, Dewald GW. Primer on medical genomics. Part XI: visualizing human chromosomes. Mayo Clin Proc 2004; 79(1): 58-75.

[7] Jha CB, Kucheria K, Choudhary VP. Diagnostic role of conventional cytogenetics and fluorescence in situ hybridization (FISH) in chronic myeloid leukemia patients. Kathmandu Univ Med J (KUMJ) 2006; 4(2): 171-5.

www.SID.ir

Archive of SID

[8] Tefferi A, Dewald GW, Litzow ML, Cortes J, Mauro MJ, Talpaz M, Kantarjian HM. Chronic myeloid leukemia: current Application of Cytogenetics and molecular testing for diagnosis and treatment. Mayo Clin Proc 2005; 80(3): 390-402.

[9] Kantarjian HM, Deisseroth A, Kurzrock R, Estrov Z, Talpaz M. Chronic myelogenous leukemia: a concise update. Blood 1993; 82(3): 691-703.

[10] Dewald GW, Wyatt WA, Juneau AL, Carlson RD, Zinsmeister AR, Jalal SM, Spurbeck JL, Silver RT. Highly sensitive fluorescence in situ hybridization method to detect double BCR/ABL fusion and monitor response to therapy in chronic myeloid leukemia. Blood. 1998; 91(9): 3357-65.

[11] Kobzev Y, Domracheva E, Zakharova A, Khoroshko N, Turkina A, Dewald G. Fluorescence in situ hybridization studies of interphase nuclei for assessing response to therapy in patients with chronic myeloid leukemia. Cancer Genet Cytogenet 1998;106(2): 128-34.

[12] De Klein A, Hagemeijer A, Bartram CR, Houwen R, Hoefsloot L, Carbonell F, Chan L, Barnett M, Greaves M, Kleihauer E, Heisterkamp N, Groffen J, Grosveld G. bcr rearrangement and translocation of the c-abl oncogene in Philadelphia positive acute lymphoblastic leukemia. Blood 1986; 68(6): 1369-75.

[13] Hochhaus A, Reiter A, Skladny H, Melo JV, Sick C, Berger U, Guo JO, Arlinghaus RB, Hehlmann R, Goldman JM, Cross NC. A Novel BCR-ABL fusion Gene (e6a2) in a patient with Philadelphia Chromosome-negative chronic myeloid leukemia. Blood 1996; 88(6): 2236-40.

[14] Guo JQ, Lian JY, Xian YM, Lee MS, Deisseroth AB, Stass SA, Champlin RE, Talpaz M, Wang JY, Arlinghaus RB. BCR-ABL protein expression in peripheral blood cells of chronic myelogenous leukemia patients undergoing therapy. Blood 1994; 83(12): 3629-37.

[15] Mcpherson M, MollerSG. The basic PCR. Oxford, BIOS sceintific publishers Ltd., 2000; p: 1-83.

[16] Cross NC, Melo JV, Feng L, Goldman JM. An optimized multiplex polymerase chain reaction (PCR) for detection of BCR-ABL fusion mRNA in haematological Disorders. Leukemia 1994; 8(1): 186-9.

[17] Otazu IB, Zalcberg I , Tabak DG, Dobbin J, Seuanez HN. Detection of BCR-ABL transcripts by multiplex and nested PCR in different haematological disorders. Leuk Lymphoma 2000; 37(1-2): 205-11.

[18] Otazu IB, Zalcberg I , Tabak DG, Seuanez HN. Detection of BCR-ABL transcripts in chronic myeloid leukemia by nested PCR. Leuk Res 1999; 23(2):185-90.

[19] Arana-Trejo RM, Ruiz Sanchez E, Ignacio-Ibarra G, Baez de la Fuente E, Garces O, Gomez Morales E, Castro Granados M, Ovilla Martinez R, Rubio-Borja ME, Solis Anaya L, Herrera P, Delgado Llamas J, Kofman S. BCR/ABL p210, p190 and p230 fusion genes in 250 Mexican patients with chronic myeloid leukemia (CML). Clin Lab Haematol 2002; 24(3): 145-50.

[20] Goh HG, Hwang JY, Kim SH, Lee YH, Kim YL, Kim DW. Comprehensive analysis of BCR-ABL transcript types in Korean CML patients using a newly developed multiplex

www.SID.ir

Archive of SID

RT-PCR. Transl Res 2006; 148(5): 249-56.

[21] Gabert J, Beillard E, van der Velden VH, Bi W, Grimwade D, Pallisgaard N, Barbany G, Cazzaniga G, Cayuela JM, Cavé H, Pane F, Aerts JL, De Micheli D, Thirion X, Pradel V, González M, Viehmann S, Malec M, Saglio G, van Dongen JJ. Standardization and quality control studies of 'real-time' quantitative reverse transcriptase polymerase chain reaction of fusion gene transcripts for residual disease detection in leukemia- a Europe Against Cancer Program. Leukemia 2003; 17(12): 2318-57.

[22] Mocellin S, Rossi CR, Pilati P, Nitti D, Marincola FM. Quantitative real-time PCR: a powerful ally in cancer research. Trends Mol Med 2003; 9(5): 189-95.

[23] van der Velden VH, Hochhaus A, Cazzaniga G, Szczepanski T, Gabert J, van Dongen JJ. Detection of minimal residual disease in hematologic malignancies by real-time quantitative PCR: principles, approaches, and laboratory aspects. Leukemia 2003; 17(6): 1013-34.

www.SID.ir