

Huhtikuu 2017

ipsogen[®] CALR RGQ PCR Kit -sarjan käsikirja



24

Versio 1

IVD

In vitro -diagnostiikkaan

Käytettäväksi Rotor-Gene[®] Q MDx 5plex HRM -instrumentin
kanssa

REF

674023



QIAGEN GmbH, QIAGEN Strasse 1, D-40724 Hilden
SAKSA

R2 **MAT**

1103549FI



Sisältö

Käyttötarkoitus.....	4
Tiivistelmä ja kuvaus	4
Menetelmän periaate	9
Toimitetut materiaalit.....	14
Sarjan sisältö	14
Tarvitavat materiaalit jotka eivät kuulu toimitukseen.....	15
Varoitukset ja huomautukset.....	17
Varotoimet.....	18
Reagenssien säilytys ja käsittely.....	20
Näytteen käsittely ja säilytys	21
Kokoveri.....	21
Genomiset DNA-näytteet	21
Toimenpide.....	22
Genomisen DNA:n uutto ja preparointi	22
Manuaalinen gDNA:n uutto QIAamp DSP DNA Blood Mini Kit -sarjalla	22
Automaattinen gDNA:n uutto QIASymphony DSP DNA Blood Mini -sarjalla	26
DNA:n kvantifiointi ja puhtauden määrittäminen	31
Genomisten DNA-näytteiden normalisointi.....	31
Protokolla: qPCR-ajo Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM -instrumentilla.....	32
Gamma Plug-in -lisäosan asennus ja testiprofiilin tuominen	32
Latauslevyn ja roottorin asetukset.....	34
Työluettelon luominen	37

qPCR-ajon asettaminen	38
Rotor-Gene MDx -instrumentin valmistelu ja qPCR-ajoittaminen	40
Vapauta ja raportoi qPCR-tulokset	41
Tulosten tulkinta	43
Tietojen analyysi	43
Uudelleentestaukset	44
Tulosnäyttö	46
Ongelmien ratkaisu	54
Laadunvarmistus	63
Rajoitukset	63
Suoritusarvot	65
LOB (Limit of Blank).....	65
Havaitsemisraja	65
Input-DNA	66
Toistettavuus ja uusittavuus.....	66
Häiritsevät aineet	68
Spesifisyys	68
Kliininen validointi ja menetelmän vertailu	69
Kirjallisuusviitteet	72
Symbolit	73
Tilastiedot	75

Käyttötarkoitus

ipsogen CALR RGQ PCR -sarja on reaaliaikainen in vitro -PCR-testi, joka on tarkoitettu CALR-mutaatioiden havaitsemiseen genomisesta DNA:sta, joka on peräisin epäiltyä myeloproliferatiivista tautia sairastavan henkilön kokoverinäytteestä. *ipsogen* CALR RGQ PCR -sarjalla voidaan myös tunnistaa kaksi CALR-mutaatioiden päätyyppiä (Tyyppi 1 ja Tyyppi 2). Sarja on tarkoitettu käytettäväksi QIAGEN Rotor-Gene Q MDx 5Plex HRM Platform –laitemympäristössä. Tuote on tarkoitettu ammattihenkilöiden, kuten molekyylibiologisen koulutuksen saaneiden teknikoiden ja lääkäreiden käyttöön.

Tuotteiden käsittelyssä on ehdottomasti noudatettava riittävää huolellisuutta ja tarkkaavaisuutta.

Suosittelemme, että kaikki QIAGEN-tuotteiden käyttäjät noudattavat yhdistelmä-DNA-kokeita varten kehitettyjä NIH-ohjeita tai muita sovellettavia ohjeita.

Tiivistelmä ja kuvaus

Myeloproliferatiiviset taudit ovat joukko sairauksia, jotka muodostavat yhteensä 39 % kaikista hematologisista sairauksista. Myeloproliferatiivisille taudeille on luonteenomaista erilaisten kypsien verisolutyypin krooninen kertyminen vereen; nämä ovat Philadelphia-kromosomin suhteen joko positiivisia (Ph+) tai negatiivisia (Ph-).

Janus-tyrosiinikinaasi 2 -geeniin (*JAK2*) vaikuttava toistuva somaattinen mutaatio, V617F, löydettiin vuonna 2005 (1–4), mikä johti merkittävään läpimurtoon myeloproliferatiivisten tautien ymmärtämisessä, luokittelussa ja diagnosoinnissa. Philadelphia-negatiivista myeloproliferatiivista tautia sairastavista potilaista yli 95 %:lla löydetään *JAK2* V617F -mutaatio, kun tautina on polysytemia vera (PV), 50–60 %:lla, kun kyseessä on essentiaalinen trombosytemia (ET) ja 50 %:lla, kun tautina on idiopaattinen myelofibroosi (PMF). Lisäksi 5–10 %:ssa ET-tapauksista ja PMF-tapauksista todetaan aktivoivia mutaatioita trombo-

poietiinireseptorigeenissä (*MPL*). Jäljelle jäävillä 30–45 %:lla potilaista ei löydetä mitään tiettyä molekyyliomerkkiainetta.

Somaattisten mutaatioiden löytyminen *CALR*-geenistä (joka koodaa kalretikuliini-proteiinia) suurella osalla Philadelphia-negatiivista myeloproliferatiivista tautia sairastavista potilaista on osoittanut käyttökelpoiseksi uudeksi merkiksi klonalisesta sairaudesta (5, 6), mikä parantaa sekä diagnosointia että ennustetta näissä aiemmin molekulaarisella tasolla tuntemattomissa tapauksissa. Suurimmalla osalla Philadelphia-negatiivista myeloproliferatiivista tautia sairastavista potilaista, joilla ei ollut *JAK2*-mutaatiota, löydettiin somaattisia insertioita tai deleetioita *CALR*-geenin eksonissa 9. *CALR*-geenistä tunnistettiin alun perin yhteensä 36 ”tyyppiä” (Taulukko 1), jotka koostuvat insertioista, deleetioista, substituutioista tai näiden yhdistelmistä. Useimmat niistä johtavat lukualueen siirtymään samassa vaihtoehtoisessa lukualueessa, minkä seurauksena mutatoituneissa *CALR*-proteiineissa on sama uusi aminohapposekvenssi C-terminaalissa. Tämän lukualueen siirtymän on ehdotettu muuttavan mutatoituneiden proteiinien lokalisaatiota solussa ja vaikuttavan näiden proteiinien C-terminaalisen domeenin Ca^{2+} -sidonnan toimintaan.

Tarkkaa patologista mekanismia ei ole vielä täysin selvitetty, mutta *in vitro* -tutkimuksin on osoitettu, että tavallisimman *CALR*-deleetio (Tyyppin 1 mutaatio, ks. Taulukko 1) yliekspressio aiheutti sytokiinin riippumatonta solujen kasvua (5).

Taulukko 1. Luettelo *CALR*-mutaatioista, Tyytit 1–36

Tyyppi	COSMIC-tunniste*	Frekvenssi (%) [†]	Mutantti <i>CALR</i> :n cDNA-merkintä
1	COSM1738055	53	c.1092_1143del
2	COSM1738056	31,7	c.1154_1155insTTGTC
3	COSM1738150	1,7	c.1095_1140del
4	COSM1738151	1	c.1102_1135del
5	COSM1738057	0,7	c.1091_1142del
6	COSM1738152	0,7	c.1094_1139del
7	COSM1738343	0,7	c.1102_1153del

Tyyppi	COSMIC-tunniste*	Frekvenssi (%) [†]	Mutantin CALR:n cDNA-merkintä
8	COSM1738153	0,7	c.1104_1137del
9	COSM1738154	0,7	c.1140del
10	COSM1738155	0,7	c.1154delinsTGTGTC
11	NI; [‡] COSM1738150	0,3	[c.1092G>C;1095_1140del]
12	COSM1738359	0,3	c.1098_1131del
13	COSM1738339	0,3	c.1100_1134delinsA
14	COSM1738368	0,3	c.1101_1134del
15	COSM1738151; NI [‡]	0,3	[c.1102_1135del;1145C>G]
16	COSM1738157	0,3	c.1102_1137delinsCA
17	COSM1738153; NI [‡]	0,3	[c.1104_1137del;1148A>T]
18	COSM1738158	0,3	c.1104_1155del
19	COSM1738349	0,3	c.1110_1140del
20	COSM1738159	0,3	c.1118_1136del
21	COSM1738160	0,3	c.1118_1145delinsCGTTA
22	COSM1738328	0,3	c.1120_1123del
23	COSM1738344	0,3	c.1120_1131delinsTGCGT
24	COSM1738345	0,3	c.1120_1138del
25	COSM1738346	0,3	c.1122_1141delinsA
26	COSM1738350	0,3	c.1122del
27	COSM1738351	0,3	c.1123_1125delinsTGTTT
28	COSM1738329	0,3	c.1131_1152del
29	COSM1738352	0,3	c.1135_1152delins CCTCCTCTTGTCT
30	COSM1738353	0,3	c.1137_1154delins CCATCCTTGTC
31	NI; [‡] COSM1738056	0,3	[c.1151A>G;1154_1155insTTGTC]
32	COSM1738330	0,3	c.1153_1154delinsTGTC

Tyyppi	COSMIC-tunniste*	Frekvenssi (%)†	Mutantti <i>CALR</i> :n cDNA-merkintä
33	COSM1738355	0,3	c.1154_1155insATGTC
34	COSM1738331	0,3	c.1154_delinsCTTGTC
35	COSM1738356	0,3	c.1154delinsTTTGTC
36	COSM1738332	0,3	c.1155_1156insTGTCG

* Tunnisteiden lähde on COSMIC v72 (cancer.sanger.ac.uk/cosmic/).

† Frekvenssien lähde on Klampfl et al (2013) (5).

‡ NI: Mutaatiotapahumaa ei ole ilmoitettu COSMICissa.

Myeloproliferatiivisten tautien diagnosointi on perinteisesti perustunut kliinisiin, luuydinhistologisiin ja sytogeneettisiin kriteereihin. Sairaudelle spesifin molekyyliimerkkiaineen löytyminen yksinkertaisti diagnoosiprosessia ja paransi sen tarkkuutta. Yksi myeloproliferatiivisten tautien tutkimuksen päätavoitteita on ollut ET:n ja PMF:n molekulaarisen perustan ymmärtäminen niillä potilailla, joilla ei ole *JAK2*- ja *MPL*-mutaatioita. Siksi *CALR*-mutaatioiden löytäminen on mahdollistanut uuden molekyyliimerkkiaineen käytön Philadelphia-negatiivista myeloproliferatiivista tautia sairastavien potilaiden diagnosointiin ja ennusteen laatimiseen. *CALR*-mutaation havaitseminen on nyt osa Maailman terveysjärjestö WHO:n myeloproliferatiivisten tautien diagnosikriteerejä 2016 (Taulukko 2), ja tämän mutaation läsnäolo on tärkeä kriteeri diagnoosin vahvistamiselle.

Taulukko 2. WHO:n kriteerit myeloproliferatiivisten tautien diagnoosille (sovitettu viitteen 7 mukaisesti)

WHO:n kriteerit essentiaalisen trombosytämian diagnoosille

Pääkriteerit:

1. Verihiutaleiden määrä $\geq 450 \times 10^9/l$.
2. Luuydinbiopsia, jossa näkyy pääasiassa megakaryosyyttien linjojen proliferaatiota, joka koostuu kasvaneesta määrästä suurentuneita, kypsiä megakaryosyyttejä, joiden tuma on hyperlohkoinen. Ei merkittävää lisäystä tai vasemmalle siirtymistä neutrofiilien granulopoiesissa tai erytropoiesissa ja erittäin harvoin lievää lisääntymistä retikuliinisäikeissä.
3. Ei täyty WHO:n kriteereitä seuraaville: *BCR-ABL1*+ CML*, PV, PMF, myelodysplastiset oireyhtymät (MDS) tai muut myeloidiset kasvaimet.
4. *JAK2*-, *CALR*- tai *MPL*-mutaatio.

Sivukriteeri:

Klonaalisen merkkiaineen läsnäolo tai ei näyttöä reaktiivisesta trombosytoosista

WHO:n kriteerit idopaattisen myelofibroosin diagnoosille

Pääkriteerit:

1. Megakaryoottista proliferaatiota ja atypiaa sekä joko retikuliini- ja/tai kollageenifibroosia.
2. Ei täyty WHO:n kriteereitä seuraaville: ET, PV, *BCR-ABL1*+ CML, MDS tai muut myeloidiset kasvaimet.
3. *JAK2*-, *CALR*- tai *MPL*-mutaatio, tai mikäli näitä mutaatioita ei ole, jonkin toisen klonaalisen merkkiaineen läsnäolo tai reaktiivisen myelofibroosin poissaolo.

Sivukriteerit:

Ainakin yksi seuraavista, vahvistettu kahdella peräkkäisellä määrittelyllä:

- a) Anemia, joka ei liity mihinkään komorbidiin tilaan
- b) Leukosytoosi $\geq 11 \times 10^9/l$
- c) Palpoituva suurentunut perna
- d) LDH* laitoksessa käytettävän viitealueen normaalirajan yläpuolella
- e) Leukoerytroblastoosi

WHO:n kriteerit polysytemia veran osalta

Pääkriteerit:

1. Hemoglobiini (Hgb) > 16,5 g/dl miehillä, Hgb > 16,0 g/dl naisilla; tai hematokriitti (Hct) > 49 % miehillä, Hct > 48 % naisilla; tai suurentunut punasolujen massa.
2. Luuydinbiopsia, jossa näkyy ikään nähden hypersellulaarisuutta ja kolmen solulinjan kasvua (panmyeloosi), mukaan lukien merkittävää erytroidista, granulosityttistä ja megakaryoottista proliferaatiota ja pleomorfisia kypsiä megakaryosyyttejä (ko'oissa eroja).
3. *JAK2* V617F- tai *JAK2*:n eksoni 12:n mutaatio

Sivukriteeri:

Normaalialhaisempi seerumin erytropoietiinitaso

* CML: krooninen myeloinen leukemia; LDH: laktatidehydrogenaasi.

CALR-mutaatioiden tunnistus gDNA:sta, joka on uutettu perifeerisen veren soluista on nykyään diagnostinen työkalu samoin kuin *JAK2*-mutaatioiden tunnistus. Nämä menetelmät ovat yksinkertaistaneet myeloproliferatiivisten tautien diagnosoimista ja parantaneet diagnoosien tarkkuutta. *CALR*- ja *JAK2*-testit (*ipsogen CALR* RGQ PCR Kit- ja *ipsogen JAK2* RGQ PCR -sarja) on validoitu samoilla gDNA-uttomenetelmillä, joten saman näytteen voi testata näillä kahdella eri qPCR-sarjalla.

Menetelmän periaate

ipsogen CALR RGQ PCR -sarja on reaaliaikainen PCR-testi. Sarja käyttää kvantitatiivista reaaliaikaista PCR-tekniikkaa (qPCR) *CALR*-geenin (GenBank® Accession Number CR457070) (5, 6) eksonin 9 alueessa c.1091_1162 (cDNA-merkintätapa) olevien somaattisten mutaatioiden kvalitatiiviseen havaitsemiseen. Sarjalla voidaan myös tunnistaa kaksi *CALR*-mutaatioiden päätyyppiä (Tyyppi 1 ja Tyyppi 2).

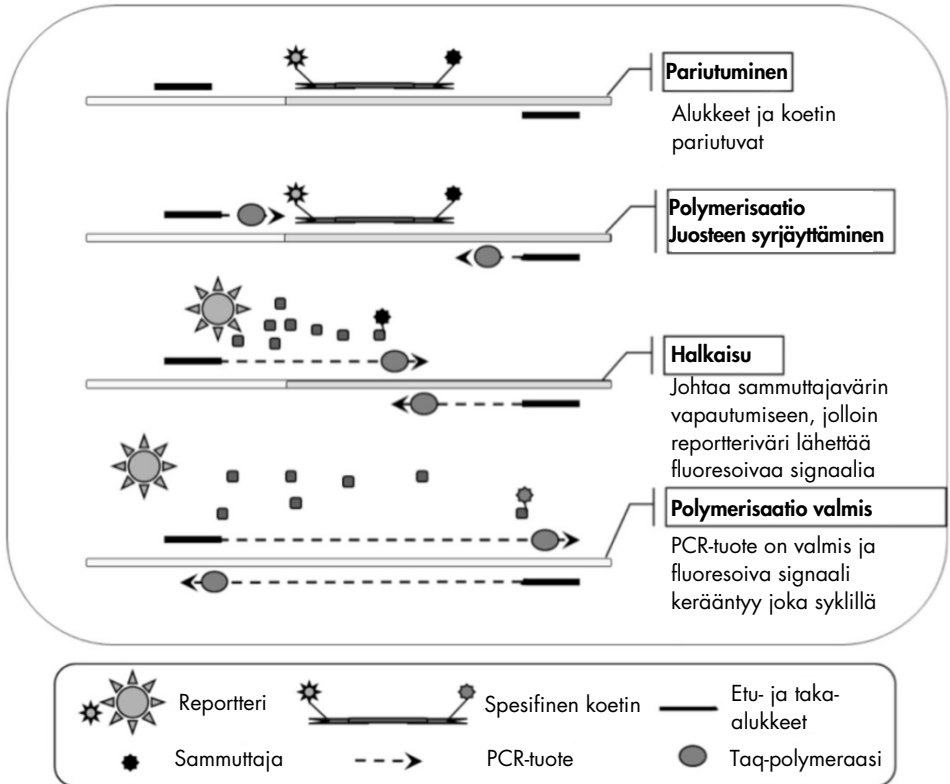
Sarjassa on reagenssit seitsemän erillisen PCR-monistumisreaktion tekemiseen samassa testausajossa. Sarjalla voidaan tunnistaa kaksi CALR-päämutaatiota (Tyyppi 1 ja Tyyppi 2) sekä havaita lisäksi vähäisempiä variantteja (lueteltu kohdassa Suoritusarvot/Spesifisyys, sivu 68) genomisesta DNA:sta, joka on uutettu ihmisen perifeerisestä kokoverestä. Kaikkien tehtävien yhteenlaskettu suoritus aika, gDNA:n uuttamisesta (automaattisesti tai manuaalisesti) datan analyysiin on lyhempi kuin yksi työpäivä.

Reaaliaikaisen PCR:n käyttäminen mahdollistaa kohteena olevan DNA-sekvenssin tarkan havaitsemisen monistumisprosessin eksponentiaalisessa vaiheessa. Reaaliaikaiset PCR-tiedot saadaan nopeasti, eikä PCR:n jälkeistä prosessointia tarvita, koska fluoresoivat signaalit havaitaan reaaliaikaisesti PCR-syklin aikana. Tällä hetkellä qPCR-tekniikoissa on kolme päätyyppiä: qPCR-analyysi SYBR® Green I Dye -väriä käyttäen, qPCR-analyysi hydrolyysikoettimia käyttäen ja qPCR-analyysi hybridisaatiokoettimia käyttäen.

Tämä testi hyödyntää qPCR-oligonukleotidien hydrolyysiä. PCR:n aikana etu- ja taka-alkukeet hybridisoituvat tiettyyn sekvenssiin. Samassa seoksessa on toinen väriaineeseen linkitetty alue. Tämä koetin koostuu oligonukleotidista, joka on leimattu 5'-reportterivärillä (F) ja alavirtaan sijaitsevalla 3' väriaineettomalla sammuttajalla (Q). Koetin hybridisoituu kohde-sekvenssiin PCR-tuotteessa. qPCR-analyysi hydrolyysikoettimin hyödyntää *Thermus aquaticus* (Taq) -DNA-polymeraasin 5'→3'-eksonukleasiaktiivisuutta. Koettimen ollessa ehjä reportteriväriin läheisyys sammuttajaan tukahduttaa reportterin fluoresenssin pääasiassa Förster-tyyppisellä energiansiirrolla.

Jos kohdesekvenssi on PCR-ajossa läsnä, sekä etu- että taka-alkukeet pariutuvat pariutuneen koettimen molemmin puolin. Koettimen 3'-pää on estetty, jotta koetin ei pitenisi PCR:n aikana (Kuva 1). Polymerisointivaiheessa DNA-polymeraasin 5'→3'-eksonukleasiaktiivisuus halkaisee koettimen, jolloin sammuttajaväri irtoaa ja reportteriväri pääsee lähettämään fluoresenssignaalia. Sen jälkeen koettimen palaset irtoavat kohteesta ja juosteen polymerisaatio jatkuu. Tämä prosessi tapahtuu jokaisessa syklistä eikä se häiritse tuotteen eksponentiaalista kertymistä (katso kuva 1).

Fluoresenssisignaalin voimistuminen havaitaan vain, jos kohdesekvenssi on komplementaarinen alukkeisiin ja koettimeen nähden ja täten monistuu PCR-ajon aikana.

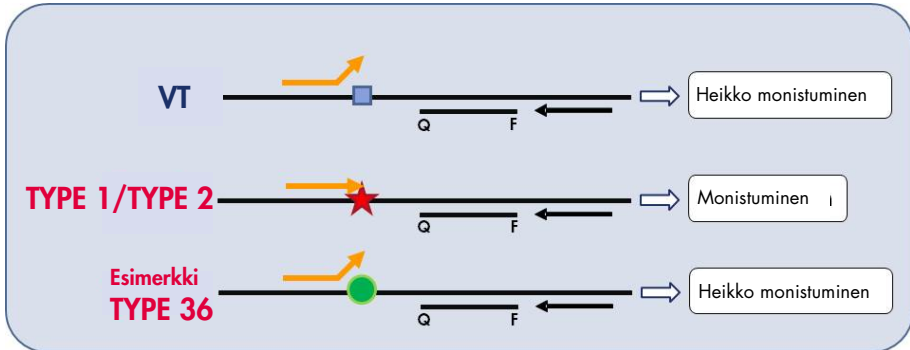


Kuva 1. Reaaliaikaisten PCR-reaktioiden periaate.

Kahden CALR-päämutaation tunnistaminen

Tyyppin 1 ja Tyyppin 2 CALR-mutaatioiden tunnistaminen tapahtuu käyttämällä alleelispesifistä monistustekniikkaa (ARMS, Allele Refractory Mutation System), jossa alukset hybridisoidaan komplementaariseen sekvenssiin ja jossa hyödynnetään DNA-polymeraasin kykyä erottaa vastaavuudet ja epävastaavuudet PCR-alukkeen 3'-päässä.

Kun PCR-alue on täysi vastaava, monistuminen etenee täydellä teholla. Kun 3'-emäs ei ole vastaava, tapahtuu vain heikkoa taustamonistumista (Kuva 2).

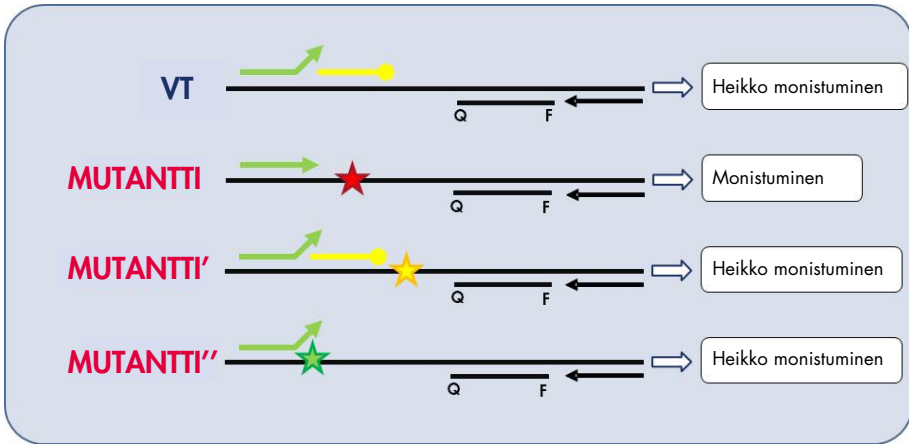


Kuva 2. Tyypin 1 ja Tyypin 2 CALR-mutaatioiden tunnistaminen ARMS PCR -tekniikalla.

VT: villityyppi; Q–F: BHQ®–FAM™ -kaksivärikoetin; ↗ etualuke (oranssi) ja taka-alue (musta).

CALR-mutaatioiden vähäisempien varianttien havaitseminen

CALR-mutaatioiden vähäisempien varianttien havaitsemiseksi alukkeet ja koettimet on reaktioseoksissa yhdistetty lisäoligonukleotidiin, joka on 3'-estetty lisätyllä fosfaattiryhmällä (ns. CLAMP-oligonukleotidi). CLAMP-oligonukleotidi on spesifi villityypiselle kohdesekvenssille ja pariuduttuaan estää PCR-tuotteen pidentymisen (PCR-puristus). Jos PCR-mallissa on villityypin sekvenssi, CLAMP hybridisoi ennen PCR-aluketta ja DNA-polymeraasin tekemää pidentymistä ei esiinny lainkaan tai vain hyvin vähän. Jos läsnä on mutatoitunutta kohdesekvenssiä, CLAMP ei hybridisoidu tai hybridisoi heikosti, PCR-alue sitoutuu ja monistuminen etenee (Kuva 3).



Kuva 3. CALR:n vähäisten mutaatioiden havaitseminen. VT: villityyppi; Q—F: BHQ—FAM -kaksivärikoetin; \rightarrow etualuke (vihreä) ja taka-aluke (musta); $\text{---}\square$: 3'-fosfaattioligonukleotidi (CLAMP oligonukleotidi; keltainen).

Sisäinen monistumiskontrolli (IAC) kaikissa reaktioseoksissa

Jotta qPCR-reaktio voitaisiin validoida ja kontrolloida ihmisen genomisen DNA-mallin (gDNA) läsnä ollessa, jokaisessa CALR-reaktioseoksessa on alukkeet ja koetin ihmisen *ABL1*-geenin endogeenisen sekvenssin tunnistamiseksi. Tämä kontrollisekvenssi monistuu kaikkien CALR:n mutanttien ja villityypin DNA:n monimonistus-PCR-reaktiossa ja se leimataan heksakloorifluoreseiinilla (HEXTM), jotta se erottuisi fluoreseiiniamiidilla (FAM) leimatusta ampliconeista mutaatioreaktioissa. Kummankin koettimen sammuttaja on Black Hole Quencher[®] (BHQ-1).

Toimitetut materiaalit

Sarjan sisältö

<i>ipsogen</i> CALR RGQ PCR Kit		(24)
Luettelonumero		674023
Reaktioiden määrä		24
Väri	Nimi	Määrä
Keltainen	CALR Reaction Mix Type 1 (CALR-reaktioseos, Tyyppi 1)	850 µl
Keltainen	CALR Reaction Mix Type 2 (CALR-reaktioseos, Tyyppi 2)	850 µl
Purppura	CALR Reaction Mix CLAMP 1 (CALR-reaktioseos CLAMP 1)	850 µl
Purppura	CALR Reaction Mix CLAMP 2 (CALR-reaktioseos CLAMP 1)	850 µl
Purppura	CALR Reaction Mix CLAMP 3 (CALR-reaktioseos CLAMP 1)	850 µl
Purppura	CALR Reaction Mix CLAMP 4 (CALR-reaktioseos CLAMP 1)	850 µl
Purppura	CALR Reaction Mix CLAMP 5 (CALR-reaktioseos CLAMP 1)	850 µl
Vihreä	CALR Wild-Type Control (CALR-villityypin kontrolli)	145 µl
Punainen	CALR Mutant Control (CALR-mutanttikontrolli)	145 µl
Mintunvihreä	Taq DNA Polymerase (Taq DNA-polymeraasi)	85 µl
Valkoinen	TE Buffer (TE-puskuri)	1,9 ml

Tarvittavat materiaalit jotka eivät kuulu toimitukseen

Työskenneltäessä kemikaalien kanssa on aina käytettävä asianmukaista laboratoriotakkia, kertakäyttökäsineitä ja suojalaseja. Lisätietoja saa tuotekohtaisista käyttöturvallisuustiedotteista, jotka ovat saatavana tuotteen toimittajalta.

Varmista, että välineet on tarkastettu ja kalibroitu valmistajan ohjeiden mukaan.

- Tarkoitukseen sopivia pipettejä (säädettäviä) (1–10 µl; 10–100 µl; 100–1000 µl)
On suositeltavaa varata vähintään kaksi pipettisarjaa: yksi PCR-reaktioseoksien preparaointiin ja jakeluun ja toinen DNA:n käsittelyyn, mukaan lukien PCR-mallin lataaminen.
- Nukleasittomia, aerosolisuojattuja, steriilejä PCR-pipettikärkiä, joissa on hydrofobinen suodatin
- 1,5 ml:n tai 2,0 ml:n nukleasittomia PCR-putkia
- Kertakäyttökäsineitä
- Vortex-sekoitin
- Spektrofotometri

DNA:n manuaaliseen uuttoon tarvittavat lisälaitteet ja materiaalit

- QIAamp® DSP DNA Blood Mini Kit -sarja (luettelonro. 61104)
- Etanolia (96–100 %).

Huomautus: Älä käytä denaturoitua alkoholia, koska se sisältää muita aineita, kuten metanolia tai metyylietyyliketonia.

- Lämpölevy näytteiden 56 °C:ssa tapahtuvaa lyysyä varten
- Pöytämallinen sentrifugi, jossa on roottori 0,5 ml/1,5 ml/2,0 ml:n reaktioputkia varten (ja joka kykenee saavuttamaan nopeuden 13 000–14 000 rpm)

DNA:n automaattiseen uuttoon tarvittavat lisälaitteet ja materiaalit

- QIASymphony® SP -instrumentti (luettelonro. 9001297), ohjelmistoversio 4.0 tai suurempi, sekä instrumentin mukana toimitetut tarvikkeet, mukaan lukien Blood_200_V7_DSP -protokolla
- Tube Insert 3b (luettelonro. 9242083)
- QIASymphony DSP DNA Mini Kit -sarja (luettelonro. 937236)
- Näytteen preparointikasetteja, 8-kuoppaa (luettelonro. 997002)
- 8-sauvaisia kansia (luettelonro. 997004)
- Suodatinkärkiä, 1 500 µl (luettelonro. 997024)
- Suodatinkärkiä, 200 µl (luettelonro. 990332)
- CL-eluutiomikroputkia (luettelonro. 19588)
- Hävityspusseja kärjille (luettelonro. 9013395)
- Mikroputkia 2,0 ml, Tyyppi H (Sarstedt®, luettelonro. 72.694)

Lisälaitteet ja materiaalit PCR-ajoihin Rotor Gene Q MDx -laitteella

- Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM -laite (luettelonro. 9002032) ja sen mukana toimitetut tarvikkeet
- Rotor-Gene AssayManager®, ohjelmistoversio 2.1.x (jossa x = 0 tai suurempi)
- Rotor-Gene AssayManager v2.1 Gamma Plug-in, versio 1.0.x (jossa x = 0 tai suurempi)
- CALR Assay Profile ipsogen_CALR_blood_CE, versio 1.0.x (jossa x = 2 tai suurempi)
- Latauslevy 72 x 0,1 ml:n putkille (luettelonro. 9018901)
- 72-kuoppainen roottori (luettelonro. 9018903)
- Sovittimen lukitusrengas 72-kuoppaiselle roottorille, (luettelonro. 9018904)
- Roottorin pidike (luettelonro. 9018908)
- Liuskaputkia ja korkeja, 0,1 ml, Rotor-Gene Q MDx -laitetta varten (luettelonro. 981103 tai 981106)
- Jäätä (tai jäähdytyslevy).

Varoitukset ja huomautukset

In vitro -diagnostiikkaan

Työskenneltäessä kemikaalien kanssa on aina käytettävä asianmukaista laboratoriotakkia, kertakäyttökäsineitä ja suojalaseja. Lisätietoa saa tuotekohtaisista käyttöturvatiedoista. Ne ovat saatavilla PDF-muotoisina verkossa sivulla www.qiagen.com/safety, jossa voit tarkastella ja tulostaa kaikkien QIAGEN-sarjan ja sarjakomponentin käyttöturvallisuustiedoita.

Katso QIAamp DSP DNA Blood Mini Kit -uuttosarjan (luettelonro. 61104) ja QIASymphony DSP DNA Mini Kit -uuttosarjan (luettelonro. 937236) turvallisuuteen liittyvät tiedot vastaavan sarjan käsikirjasta. Katso instrumenttien turvallisuuteen liittyvät tiedot vastaavan sarjan käyttöoppaasta.

VAROITUS

Vammojen vaara



Älä lisää valkaisuainetta tai happamia liuoksia näytteen preparointijätteeseen.

QIASymphony DSP DNA Mini Kit -sarjan reagenssikasetissa olevat puskurit sisältävät guanidiinisuoloja, jotka voivat muodostaa erittäin reaktiivisia yhdisteitä valkaisuaineiden kanssa. Jos näitä puskuireita sisältäviä nesteitä pääsee roiskumaan, puhdista roiskeet sopivalla laboratoriopuhdistusaineella ja vedellä. Jos roiskuneessa nesteessä on mahdollisesti tartunnanaiheuttajia, puhdista roiskeiden alue ensin laboratoriopuhdistusaineella ja vedellä ja sen jälkeen 1 %:sella (til.) natriumhypokloriitilla.

Varotoimet

qPCR-testien käyttäminen vaatii hyvien laboratoriokäytäntöjen noudattamista, mukaan lukien jäljitettävyyden ja molekyylibiologiaan käytettävien laitteiden ylläpito sovellettavien säädösten ja standardien mukaisesti.

Tämä sarja on tarkoitettu käytettäväksi in vitro -diagnostiikassa. Tämän sarjan mukana toimitetut reagenssit ja ohjeet on testattu suorituskyvyltään optimaaliseksi.

- Kaikki kemikaalit ja biologiset aineet ovat mahdollisesti vaarallisia. Näytteet ovat mahdollisesti tartuntavaarallisia ja niitä on kohdeltava biovaarallisina materiaaleina.
- Hävitä näytteet ja testijäte paikallisten turvallisuuskäytäntöjen mukaisesti.
- *ipsogen* CALR RGQ PCR -sarjan reagenssit on laimennettu optimaalisesti. Älä laimenna reagensseja enempää, koska seurauksena saattaa olla suorituskyvyn heikkeneminen.
- Älä käytä alle 25 µl:n reaktiotilavuuksia (reaktioseos + näyte).
- QIAGEN-yhtiön laaduntarkkailumenettelyihin kuuluu julkaistun sarjan toiminnallinen testaus jokaisesta yksittäisestä sarjan valmistuserästä. Älä sekoita eri valmistuseristä peräisin olevia reagensseja keskenään, koska se voi vaikuttaa suorituskykyyn.
- Varmista, että testin profiilitiedostot ja Rotor-Gene AssayManager v2.1 -lisäosa on asennettu.
- Katso lisätietoja varoituksista, varotoimista ja menettelytavoista julkaisusta *Rotor-Gene Q MDx User Manual* (Rotor-Gene Q MDX -käyttöopas) ja *Rotor-Gene AssayManager v2.1 Core Application User Manual* (Rotor-Gene AssayManager -ydinohjelmiston version 2.1 käyttöopas).
- Inkubaatioajan ja -lämpötilan muuttaminen voi tuottaa virheellisiä tai ristiriitaisia tietoja.
- Preparoi kaikki reaktiot (reaktioseos + näyte) jäähähteessä tai jäähdytyslevyllä.
- Älä käytä vanhentuneita tai virheellisesti säilytettyjä komponentteja.
- Reaktioseoksissa saattaa tapahtua muutoksia, jos ne altistuvat valolle.
- Noudata äärimmäistä varovaisuutta, jotta seokset eivät sekoittuisi CALR-mutanttikontrolli- ja CALR-villityypin kontrolli -reagensseissa olevien materiaalien kanssa.

- Noudata äärimmäistä varovaisuutta, jotta DNA tai PCR-tuote ei aiheuttaisi kulkeutumiskontaminaatiota ja siitä seuraavaa väärää positiivista signaalia.
- Noudata äärimmäistä varovaisuutta, jotta ei tapahtuisi DNAasi-kontaminaatiota, joka saattaisi hajottaa malli-DNA:n.
- Käytä reaktioseosten valmistuksessa ja mallien lisäämisessä tarkoitukseen sopivia, erillisiä pipettejä.
- Älä avaa Rotor-Gene Q MDx -instrumenttia, ennen kuin ajo on päättynyt.
- Älä avaa Rotor-Gene Q MDx -putkia, ennen kuin ajo on päättynyt. Hävitä putket paikallisten turvallisuuskäytäntöjen mukaisesti.
- Varmista, että testaat oikean näytteen. Varo väärän näytteen käyttämistä, latausvirhettä ja pipetointivirheitä.
- Varmista näytteiden oikea tunnistus käsittelemällä näytteitä järjestelmällisesti.

Siksi on suositeltavaa noudattaa seuraavia ohjeita:

- Käytä nukleasittomia laboratoriovälineitä (esimerkiksi pipettejä, pipettien kärkiä, reaktiopulloja) ja käytä käsineitä testiä tehdessäsi.
- Käytä kaikissa pipetointivaiheissa uusia aerosolisuojuja pipetikärkiä näytteiden ja reagenssien ristikontaminaation välttämiseksi.
- Preparoi esi-PCR-päaseos vain tarkoitukseen varatuilla materiaaleilla (pipetit, kärjet, jne.) erillisellä alueella, jonne ei tuoda DNA-matriiseja (DNA:ta, plasmideja tai PCR-tuotteita). Lisää tällä samalla alueella TE-puskuri NTC-putkiin ja sulje ne. Lisää testattavat näytteet, CALR-mutanttikontrolli- ja CALR-villityypin kontrolli -reagenssit erillisessä huoneessa käyttäen vain tarkoitukseen varattuja materiaaleja (pipettejä, kärkiä, jne.).

Reagenssien säilytys ja käsittely

ipsogen CALR RGQ PCR -sarja toimitetaan kuivajään päällä. Jos *ipsogen* CALR RGQ PCR -sarja ei ole vastaanottohetkellä jäässä tai jos ulkopakkaus on avattu kuljetuksen aikana tai jos toimituspakkaus ei sisällä lähetysluetteloa tai reagensseja, ota yhteyttä QIAGENin tekniseen palveluun tai paikalliseen jälleenmyyjään (katso lisätietoja osoitteesta www.qiagen.com).

ipsogen CALR RGQ PCR -sarja on varastoitava välittömästi vastaanoton jälkeen tasaisessa -30...-15 °C:n lämpötilassa olevaan pakastimeen valolta suojattuna. Kyseisissä olosuhteissa säilytetty *ipsogen* CALR RGQ PCR -sarja on stabiili mainittuun vanhenemispäivään asti.

Avatut reagenssit voidaan säilyttää alkuperäispakkauksissaan -30...-15 °C:n lämpötilassa pakkauksessa olevaan vanhenemispäivään asti. Sarjan toistuvaa sulattamista ja pakastamista on vältettävä. Pakastamis- ja sulattamisjaksoja saa olla enintään viisi.

Katso QIAamp DSP DNA Blood Mini Kit -uuttosarjan (luettelonro. 61104) tai QIASymphony DSP DNA Mini Kit -uuttosarjan (luettelonro. 937236) säilytykseen ja käsittelyyn liittyvät tiedot vastaavan sarjan käsikirjasta.

Kaikki kaikkien komponenttien pakkauksiin ja etiketteihin painetut viimeistä käyttöpäivää ja säilytystä koskevat ohjeet on huomioitava. Älä käytä vanhentuneita tai virheellisesti säilytettyjä komponentteja.

Näytteen käsittely ja säilytys

Kokoveri

ipsogen CALR RGQ PCR -sarja on tarkoitettu käytettäväksi genomisten DNA-näytteiden kanssa, jotka on saatu 2K-EDTA:lla antikoaguloituista kokoverinäytteistä. Kokoverta voidaan säilyttää seuraavasti:

- 2–8 °C:ssa enintään 96 tuntia
- 15–25 °C:ssa enintään 96 tuntia
- Pakastettuna -30...-15 °C:ssa enintään 1 kuukausi

Genomiset DNA-näytteet

Genomista DNA:ta voidaan säilyttää 2–8 °C:ssa enintään 1 viikon ajan uuton jälkeen tai -30...-15 °C:ssa enintään 24 kuukautta, joko heti uuton jälkeen tai TE-puskurilla laimennuksen jälkeen.

Toimenpide

Genomisen DNA:n uutto ja preparointi

ipsogen CALR RGQ PCR -sarja on validoitu yhdessä QIAamp DSP DNA Blood Mini Kit -sarjan kanssa (luettelonro. 61104) manuaalisen uuton osalta tai QIASymphony SP -instrumentin ja sen kanssa yhdessä käytetyn QIASymphony DSP DNA Mini Kit -sarjan (luettelonro. 937236) automaattisen uuton osalta.

Varmista, että gDNA-reagenssit eivät ole vanhentuneet ja että ne on kuljetettu ja säilytetty asianmukaisissa olosuhteissa.

Manuaalinen gDNA:n uutto QIAamp DSP DNA Blood Mini Kit -sarjalla

Manuaalinen gDNA:n uutto tehdään QIAamp DSP DNA Blood Mini Kit -sarjalla (luettelonro 61104) julkaisun *QIAamp DSP DNA Blood Mini Kit Handbook* (QIAamp DSP DNA Blood Mini Kit -sarjan käsikirja) ohjeiden mukaan.

Ennen aloittamista suoritettava valmistelut

- Anna verinäytteiden tasaantua huoneenlämpöön (15–25 °C) ja varmista, että näytteet ovat homogenoituneet hyvin.
- Valmistele lyysipuskuri
Jos lyysipuskuriin (AL) on muodostunut saostumaa, liuota se inkuboimalla 56 °C:ssa.
- Valmistele QIAGEN-proteaasi
Lisää 1,2 ml proteaasiliuotinta (PS) lyofilisoituun QIAGEN-proteaasi (QP) -pulloon ja sekoita huolellisesti. Vaahtoamisen välttämiseksi tee sekoitus kääntämällä pulloa ylösalaisin useita kertoja. Varmista, että QP on täysin liuennut.

Huomautus: Kun QP on liuotettu PS-liuottimeen, se on stabiili enintään 2 kuukauden ajan, kun säilytyslämpötila on 2–8 °C. Proteaasin säilyvyyden pidentämiseksi on suositeltavaa säilyttää sitä –20 °C:ssa, mutta toistuvaa jäädytystä ja sulatusta on vältettävä. Tästä syystä on suositeltavaa säilyttää QP:tä alikvooteiksi jaettuna.

- Valmistelevä pesupuskuri 1

Lisää 25 ml etanolia (96–100 %) mittasyinteriä käyttäen pulloon, joka sisältää 19 ml pesupuskuritiivistettä 1 (AW1). Säilytä rekonstruoitu AW1-liuos huoneenlämpötilassa (15–25 °C).

Huomautus: Sekoita rekonstruoitu AW1 aina kääntämällä pulloa ylösalaisin useita kertoja ennen toimenpiteen aloittamista.

- Valmistelevä pesupuskuri 2

Lisää 30 ml etanolia (96–100 %) mittasyinteriä käyttäen pulloon, joka sisältää 13 ml pesupuskuritiivistettä 2 (AW2). Säilytä rekonstruoitu AW2-liuos huoneenlämpötilassa (15–25 °C).

Huomautus: Sekoita rekonstruoitu AW2 aina kääntämällä pulloa ylösalaisin useita kertoja ennen toimenpiteen aloittamista.

- Valmistelevä eluutiopuskuri

Sarjan mukana toimitetaan yksi pullo eluutiopuskuriliuosta (AE). AE:n kontaminoitumisen estämiseksi on erittäin suositeltavaa käyttää aerosolin syntymisen estäviä pipettikärkiä, kun AE:tä pipetoidaan pullosta. Lisäksi pullon korkki on asetettava takaisin paikalleen heti.

Anna AE-puskuriliuoksen tasaantua huoneenlämpöön (15–25 °C).

- Aseta lämpölevy 56 °C:seen; lämpölevyä käytetään vaiheessa 4.

Toimenpide

1. Pipetoi 20 µl proteaasi-QP:tä lyysiputkeen (LT).

Huomautus: Tarkista rekonstruoitujen proteaasin vanhentumispäivämäärä ennen käyttöä.

2. Lisää lyysiputkeen 200 µl verinäytettä.

3. Lisää lyysisputkeen 200 µl lyysispuskuria (AL), sulje korkki ja sekoita pulssivorteksilla 15 sekunnin ajan ja sentrifugoi lyhyesti.

Huomautus: Tehokkaan lyysin takaamiseksi on tärkeää, että näyte ja AL ovat sekoittuneet läpikotaisin ja että liuos on homogeeninen.

Huomautus: Koska AL-puskurin viskositeetti on suuri, varmista, että lisäät oikean määrän AL-puskuria pipetoimalla huolellisesti oikeanlaisella pipetillä.

Tärkeää: Älä lisää QP:tä suoraan AL-puskuriin.

4. Inkuboi 56 °C:ssa (± 1 °C) 10 minuutin ajan (± 1 minuuttia).
5. Sentrifugoi lyysisputkea noin 5 sekunnin ajan täydellä nopeudella, jotta pisarat poistuisivat korkin sisäpuolelta.
6. Lisää lyysisputkeen 200 µl etanolia (96–100 %), sulje korkki ja sekoita läpikotaisesti pulssivorteksilla ≥ 15 sekunnin ajan.
7. Sentrifugoi lyysisputkea noin ≥ 5 sekuntia täydellä nopeudella, jotta mahdolliset pisarat poistuisivat korkin sisäpuolelta.
8. Lisää varovasti kaikki vaiheesta 7 saatu lysaatti QIAamp Mini spin column -putkeen kastelematta sen reunaa. Älä kosketa QIAamp Mini spin column -putken kalvoa pipetin kärjellä.

Huomautus: Jos käsittelet useita näytteitä, avaa vain yksi lyysisputki kerrallaan.

9. Sulje QIAamp Mini spin column -putken korkki ja sentrifugoi nopeudella n. 6 000 × g (8 000 rpm) 1 minuutin ajan.
10. Aseta QIAamp Mini spin column -putki puhtaaseen pesuputkeen (WT) ja hylkää suodosta sisältävä putki.

Huomautus: Jos lysaatti ei ole läpäissyt kalvoa täysin nopeudella 6 000 × g (8 000 rpm) sentrifugoinnin jälkeen, sentrifugoi uudelleen täydellä nopeudella (enintään 20 800 × g) 1 minuutin ajan.

Huomautus: Jos lysaatti ei vielääkään läpäise kalvoa sentrifugoinnin aikana, hylkää näyte ja toista eristys ja puhdistus uudella näytemateriaalilla.

11. Avaa QIAamp Mini spin column -putki varovasti ja lisää 500 µl Buffer AW1 -liuosta. Varo kastelemasta putken reunaa. Älä kosketa QIAamp Mini spin column -putken kalvoa pipetin kärjellä.
12. Sulje QIAamp Mini spin column -putken korkki ja sentrifugoi nopeudella n. 6 000 × g (8 000 rpm) 1 minuutin ajan.
13. Aseta QIAamp Mini spin column -putki puhtaaseen pesuputkeen ja hylkää suodosta sisältävä putki.
14. Avaa QIAamp Mini spin column -putki varovasti ja lisää 500 µl AW2-puskuria. Varo kastelemasta putken reunaa. Älä kosketa QIAamp Mini spin column -putken kalvoa pipetin kärjellä.
15. Sulje QIAamp Mini spin column -putken korkki ja sentrifugoi täydellä nopeudella (n. 20 000 × g tai 14 000 rpm) 1 minuutin ajan.
16. Aseta QIAamp Mini spin column -putki puhtaaseen pesuputkeen ja hylkää suodosta sisältävä putki.
17. Sentrifugoi täydellä nopeudella (n. 20 000 × g tai 14 000 rpm) kolmen minuutin ajan, jotta kalvo kuivuisi täysin.
18. Aseta QIAamp Mini spin column -putki puhtaaseen eluutioputkeen (ET) ja hylkää suodosta sisältävä pesuputki.
19. Avaa QIAamp Mini spin column -putken korkki varovasti ja lisää 50–200 µl AE-puskuria kalvon keskelle.
Huomautus: Pienemmät eluutiotilavuudet lisäävät DNA:n pitoisuutta eluaatissa merkittävästi, mutta vähentävät DNA:n kokonaissaantoa hieman.
20. Sulje korkki ja inkuboi huoneenlämpötilassa (15–25 °C) 1 minuutin ajan.
21. Sentrifugoi nopeudella 6 000 × g tai 8 000 rpm) 1 minuutin ajan DNA:n eluoimiseksi.
22. Säilytä gDNA-näytettä asianmukaisissa olosuhteissa.
23. Hävitä käytetyt näyteputket, levyt ja jäte paikallisten turvallisuussäädösten mukaan.

Automaattinen gDNA:n uutto QIASymphony DSP DNA Blood Mini -sarjalla

Automaattinen gDNA:n uutto tehdään käyttämällä QIASymphony SP -instrumenttia ja QIASymphony DSP DNA Mini Kit -sarjaa (luettelonro. 937236). Noudata julkaisussa *QIASymphony DSP DNA Kit Handbook* (QIASymphony DSP DNA -sarjan käsikirja) olevia ohjeita. Valitse QIASymphony-instrumentista **Blood_200_V7_DSP**-protokolla.

Huomautus: Seuraavat protokollan ominaisuudet ovat spesifejä gDNA:n uutolle kokoverestä *ipsogen* CALR RGQ PCR -sarjalla analysointia varten:

- Siirrä 300 µl kokoverta mikroputkeen (2,0 ml Tyyppi H, Sarstedt, luettelonro. 72.694).
- Eluutiotilavuus ja ulostulosijainti on kokoveriprotokollassa **100** µl.

Tärkeitä huomioita ennen kuin aloitat

- Uutettava kokoveren kokonaistilavuus on 200 µl (sekä 100 µl kuollutta tilavuutta).
- Varmista, että tiedät, miten QIASymphony SP -instrumenttia käytetään. Katso käyttöohjeet instrumentin mukana toimitetuista QIASymphony SP käyttöoppaista.
- Valinnainen ylläpito ei ole välttämätöntä instrumentin toiminnan kannalta, mutta se on erittäin suositeltavaa kontaminaatoriskin vähentämiseksi.
- Ennen kuin käytät reagenssikasettia ensimmäistä kertaa, tarkista, että puskuureissa QSL1 ja QSB1 ei ole saostumaa.
Tarvittaessa poista puskuria QSL1 ja QSB1 sisältävät urat reagenssikasetista ja inkuboi 30 minuutin ajan 37 °C:ssa välillä ravistaen, jotta saostuma liukenisi. Varmista, että asetat urat takaisin oikeaan paikkaan.
Jos reagenssikasetti on jo puhkaistu, varmista, että urat on tiivistetty Reuse Seal Strips -liuskoilla, ja inkuboi koko reagenssikasettia 30 minuutin ajan 37 °C:ssa välillä ravistaen vesihauteessa.
- Vältä reagenssikasetin (RC) voimakasta ravistamista, koska se voi aiheuttaa vaahtoamista, mikä taas aiheuttaa ongelmia nestepinnan tason havaitsemisessa.

Ennen aloittamista suoritettava valmistelut

- Varmista ennen toimenpiteen aloittamista, että magneettiset hiukkaset ovat suspendoituneet täysin.
Vorteksoi magneettisia hiukkasia sisältävää uraa voimakkaasti vähintään 3 minuutin ajan ennen ensimmäistä käyttökertaa.
- Varmista, että reagenssikasetin päälle on asetettu puhkaisukansi, ja että magneettipartikkelien uran kansi on poistettu, tai, jos reagenssikasetti on osittain käytetty, varmista, että Reuse Seal Strips -liuskat on poistettu.
- Muista avata entsyymiputket.
- Jos näytteet on viivakoodattu, suuntaa näytteet putkikuljettimessa siten, että viivakoodit ovat kohti QIASymphony SP -laitteen vasemmalla puolella olevaa viivakoodinlukijaa.

Toimenpide

1. Sulje kaikki vetolaatikat ja kuomu.
2. Käynnistä QIASymphony SP; odota, kunnes **Sample Preparation** (Näytteen valmistelu) -näyttö tulee näkyviin ja alustusprosessi on päättynyt.
Virtakytkin on QIASymphony SP -laitteen vasemmassa alakulmassa.
3. Kirjautu sisään instrumenttiin.
4. Valitse ajettava protokolla.
Valitse **Select All** (Valitse kaikki) -painike ja valitse **DNA Blood** (DNA, veri) ja sitten **Blood_200_V7_DSP** kokoverinäytteitä varten.
5. Varmista, että "Jäte"-vetolaatikko on valmisteltu oikein. Tutki "Jäte"-vetolaatikon sisältö, mukaan lukien kärkikouru ja nestemäisen jätteen säiliö. Vaihda kärkien jätepuski tarvittaessa.
6. Lataa tarvittava eluutioline "Eluaatti"-vetolaatikkoon.
Älä lataa 96-kuoppalevyä aukkoon "Eluutioaukko 4".
Käytä vain aukkoa "Eluutioaukko 1" ja vastaavaa jäähdytyssovitinta.

Kun käytät 96-kuoppaista levyä, varmista, että levyn suunta on oikea, koska virheellinen suunta voi aiheuttaa näytteiden sekaantumista alavirran analyysissä.

7. Lataa vaadittavat reagenssikasetit ja kulutustarvikkeet ”Reagenssit ja kulutustarvikkeet” -vetolaatikkoon.

Huomautus: Varmista, että pipetointikärjet on kiinnitetty laatikkoon kunnolla.

8. Tutki ”Reagenssit ja kulutustarvikkeet” -laatikon sisältö.

9. Siirrä 300 µl uutettavaa kokoverinäytettä mikroputkeen (2,0 ml Tyyppi H) ja aseta se putkinäytekuljettimen 3B 2 ml:n sovittimeen.

Lataa näyteputket ”Näyte”-vetolaatikkoon.

10. Käytä kosketusnäyttöä ja kirjoita tarvittavat tiedot jokaisesta käsiteltävästä näyte-erästä:

- Näytetiedot: Vaihda oletusarvoinen putken muoto valitsemalla **Select All** (Valitse kaikki) ja valitsemalla sitten **Sarstedt reference 72.694** (Sarstedt-viite 72.694) **Tube Insert** (Putkien syöttö) -taulukosta.
- Vahvista valittu protokolla: **Blood_200_V7_DSP**.
- Eluutiotilavuus ja ulostulosijainti: Valitse kokoveriprotokollalle vaihtoehto **100 µl**.

Huomautus: Kun erän tiedot on syötetty, tila **LOADED** (LADATTU) muuttuu tilaksi **QUEUED** (JONOSSA). Heti kun jokin erä on jonossa, **Run** (Aja) -painike tulee näkyviin.

11. Aloita ajo painamalla **Run** (Aja) -painiketta.

12. Lue ja vahvista näyttöön tuleva viesti.

Huomautus: On suositeltavaa odottaa instrumentin luona, kunnes se on tunnistanut sisäisten kontrolliputkien nestetason ja QIA Symphony SP -laitteen kuljettimen tilaksi muuttuu **RUNNING** (AJO MENEILLÄÄN).

Huomautus: Älä keskeytä tai lopeta ajoa käsittelyn aikana (paitsi hätätilanteessa), koska tällöin näytteet saavat merkinnän ”unclear” (epäselvä).

Huomautus: Näytteitä voi ladata jatkuvasti ja lisätä niitä tähän ajoon (siihen asti kunnes reagenssit on ladattu). Aloita puhdistusprosessi painamalla **Run** (Aja) -painiketta.

13. Protokolla-ajon lopuksi erän tila **RUNNING** (AJO MENEILLÄÄN) muuttuu tilaksi **COMPLETED** (VALMIS). Ota puhdistetut nukleiinihapot sisältävä eluutioline "Eluaatti"-vetolaatikosta.
- On suositeltavaa poistaa eluaattilevy "Eluaatti"-vetolaatikosta heti ajon päättymisen jälkeen. Jos eluutiol Levyt jätetään QIASymphony SP -laitteeseen ajon päätyttyä, niihin saattaa tiivistyä kosteutta tai niistä saattaa haihtua kosteutta.
14. Vie QIASymphony SP -tulostiedosto: tämä raportti luodaan jokaiselle eluutiollevylle.
- 14a. Aseta USB-muistitikku johonkin QIASymphony SP -laitteen etuosassa olevaan USB-porttiin.
- 14b. Napsauta **Tools** (Työkalut) -painiketta.
- 14c. Valitse **File Transfer** (Tiedostojen siirto).
- 14d. Valitse **In-/Output Files** (Syöte-/tulostiedostot) -välilehdestä **Results Files** (Tulostiedostot) ja napsauta **Transfer** (Siirrä).
- Pida viedyn tiedoston nimi seuraavassa muodossa:
vvv-kk-pp hh:mm:ss_Eluutiolineen_tunniste.
15. Tarkista QIASymphony SP -tulostiedostosta **Validity of result** (Tuloksen kelvollisuus) -sarake jokaisen näytteen osalta.
- Kevollinen ja epäselvä tila: jatka DNA:n kvalifointiin ja kvantifointiin
 - Virheellinen tila: näyte on hylätty. Käsittele uuttovaihe uudelleen
16. Jos reagenssikasetti on käytetty vain osittain, tiivistä se Reuse Seal Strips -liuskoilla ja sulje proteinaasi K:ta sisältävät putket kierrekorkeilla heti protokollan päätyttyä, jotta niistä ei haihtuisi nestettä.
17. Hävitä käytetyt näyteputket, levyt ja jäte paikallisten turvallisuussäädösten mukaan.
18. Puhdista QIASymphony SP -instrumentti.
- Noudata QIASymphony SP -instrumentin mukana toimitettujen käyttöoppaiden huolto-ohjeita. Muista puhdistaa kärkien suojuukset säännöllisesti ristikontaminaation välttämiseksi.

19. Sulje instrumentin vetolaatikot ja katkaise QIASymphony SP:stä virta.

Magneettiset hiukkaset eivät yleensä kulkeudu eluaatteihin. Jos jossakin eluaatissa näkyy mustia magneettisia hiukkasia, voit poistaa ne seuraavasti:

- Aseta DNA:ta sisältävä putki sopivaan magneettiseen erottimeen (esimerkiksi QIAGEN 12-Tube Magnet, luettelonro. 36912), kunnes magneettiset hiukkaset on eroteltu.
- Jos DNA on kuoppalevyillä, aseta kuoppalevy sopivaan magneettiseen erottimeen (esimerkiksi QIAGEN 96-Well Magnet Type A, luettelonro. 36915), kunnes magneettiset hiukkaset on eroteltu.
- Jos mitään sopivaa magneettista erotinta ei ole käytettävissä, sentrifugoi DNA:ta sisältävää putkea mikrosentrifugissa 1 minuutin ajan täydellä nopeudella, jotta magneettisista hiukkasista muodostuisi pelletti.

DNA:n kvantifiointi ja puhtauden määrittäminen

gDNA-uuttosarjoissa käytetyt eluutiopuskurit sisältävät säilytysaineena natriumatsidia. Natriumatsidi absorboi sähkömagneettista säteilyä aallonpituudella 260 nm, ja siksi spektrofotometri on kalibroitava tekemällä tyhjä mitta. Eluutiopuskuria on käytettävä blankona, jos uuttoprotokolla niin edellyttää.

- A_{260}/A_{280} -suhteen on oltava $\geq 1,7$. Pienempi arvo on yleensä merkki proteiini-kontaminaatiosta tai orgaanisista kemikaaleista, jotka häiritsevät PCR-vaihetta.
- DNA:n pitoisuus määritetään mittaamalla absorbanssi aallonpituudella 260 nm. Absorbanssilukemien aallonpituudella 260 nm on oltava välillä 0,1–1,0, jotta ne olisivat tarkkoja.
Yhden yksikön absorbanssi aallonpituudella 260 nm vastaa 50 µg:aa DNA:ta millilitrassa ($A_{260} = 1 = 50 \mu\text{g/ml}$).
Puhdistetun DNA:n kokonaismäärä (ng) = DNA:n pitoisuus (ng/µl) × näytteen tilavuus (µl).
- Jos A_{260}/A_{280} -suhde on pienempi kuin 1,7, ja/tai jos gDNA:n pitoisuus on alle 10 ng/µl, näytettä ei saa käsitellä enempää.

Genomisten DNA-näytteiden normalisointi

Laimenna DNA:n pitoisuudeksi 10 ng/µl TE-puskurissa, joka on toimitettu *ipsogen* CALR RGQ PCR -sarjan mukana.

Rotor-Gene Q MDx -instrumentin PCR-reaktio on optimoitu 50 ng:lle puhdistettua gDNA:ta, jonka lopullinen laimennettu näytilavuus on 5 µl.

Protokolla: qPCR-ajo Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM -instrumentilla *

ipsogen CALR RGQ PCR -sarja on ajettava Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM -instrumentilla ja tulokset on tulkittava automaattisesti Rotor-Gene AssayManager v2.1 -ohjelmistolla. Sykli-parametrit ovat lukittuina ajon aikana.

Tutustu huolellisesti Rotor-Gene Q MDx -laitteeseen ja Rotor-Gene AssayManager v2.1 -ohjelmiston käyttöön ennen protokollan aloittamista. Katso lisätietoja instrumentin, Rotor-Gene AssayManager v2.1 -ohjelmiston ja Gamma Plug-in -lisäosan käyttöoppaista.

Gamma Plug-in -lisäosan asennus ja testiprofiilin tuominen

Rotor-Gene Q MDx -instrumenttiin liitetyssä tietokoneessa on oltava asennettuna Rotor-Gene AssayManager v2.1 -ohjelmisto. Ohjelmiston voi ladata Rotor-Gene AssayManager v2.1 -tuotesivulta osoitteessa www.qiagen.com/Products/Rotor-GeneAssayManager_v2.1.aspx. Siirry sivulla **Product Resources** (Tuoteresurssit) -välilehteen ja siinä kohtaan **Operating Software** (Käyttöohjelmisto).

Lisätietoja Rotor-Gene AssayManager v2.1 -ydinohjelmistosta on julkaisussa *Rotor-Gene AssayManager v2.1 Core Application User Manual* (Rotor-Gene AssayManager -ydinohjelmiston version 2.1 käyttöopas). Lisätietoja instrumenttiin liitetyssä tietokoneessa olevista muista ohjelmistoista on julkaisussa *Rotor-Gene AssayManager v2.1 Quick-Start Guide*.

Tulosten automaattinen tulkinta käytettäessä *ipsogen* CALR RGQ PCR -sarjaa ja Rotor-Gene AssayManager v2.1 -ohjelmistoa edellyttää, että Rotor-Gene AssayManager v2.1 -ohjelmistoon on asennettu Gamma Plug-in -lisäosan viimeisin versio. Lisäosan viimeisin versio on saatavana Rotor-Gene AssayManager v2.1 -tuotesivulla osoitteessa

* Mikäli mahdollista, voidaan käyttää Rotor-Gene Q 5plex HRM -instrumenttia, jonka valmistuspäivä on tammikuussa 2010 tai myöhemmin. Valmistuspäivä on nähtävissä laitteen taustapuolella olevasta sarjanumerosta. Sarjanumero on muodossa "kkvnnn", jossa "kk" on valmistuskuukausi, "vv" on valmistusvuoden kaksi viimeistä numeroa ja "nnn" on laitteen tunnistenumero.

www.qiagen.com/Products/Rotor-GeneAssayManager_v2_1.aspx, kohdassa **Product Resources** (Tuoteresurssit).

Tietoja lisäosan asennuksesta on julkaisun *Rotor-Gene AssayManager v2.1 Core Application User Manual* (Rotor-Gene AssayManager -ydinohjelmiston version 2.1 käyttöopas) osassa "Installing Plug-ins" (Lisäosien asentaminen).

ipsogen CALR RGQ PCR -sarja tarvitsee myös testiprofiilin. Testiprofiili sisältää kaikki parametrit, joita tarvitaan qPCR-testiin sykleihin ja analyysiin. CALR-testiprofiili (*ipsogen_CALR_blood_CE*) vastaa .iap-tiedostoa, jonka voi ladata *ipsogen* CALR RGQ PCR -sarjan tuotesivulta **Product Resources** (Tuoteresurssit) -välilehden **Protocol Files** (Protokollatiedostot) -kohdasta. Testiprofiili on tuotava Rotor-Gene AssayManager v2.1 -ohjelmistoon.

Lisätietoja Gamma plug-in -lisäosasta ja testiprofiileista on julkaisussa *Rotor-Gene AssayManager v2.1 Core Application User Manual* (Rotor-Gene AssayManager -ydinohjelmiston version 2.1 käyttöopas) ja *Rotor-Gene AssayManager v2.1 Gamma Plug-in User Manual* (Rotor-Gene AssayManager version 2.1 Gamma Plug-in lisäosan käyttöopas).

1. Lataa sekä Gamma Plug-in ja CALR-testiprofiilin viimeisin versio osoitteesta www.qiagen.com.
2. Aloita asennus kaksoisnapsauttamalla **RGAM_V2_1_Gamma_Plug-in.Installation.V1_0_0.msi**-tiedostoa. Noudata näkyviin tulevia asennusohjeita. Yksityiskohtaisia tietoja on julkaisun *Rotor-Gene AssayManager v2.1 Core Application User Manual* (Rotor-Gene AssayManager -ydinohjelmiston version 2.1 käyttöopas) osassa "Installing Plug-ins" (Lisäosien asentaminen).

Huomautus: Järjestelmänlaajuisen prosessiturvallisuuden vuoksi seuraavat pakolliset asetelmääritykset on asetettava suljetun tilan mukaisiksi:

- Valitse **Configuration** (Kokoonpano) -ympäristön **Settings** (Asetukset) -välilehti.

- Valitse **Closed mode** (Suljettu tila) -kohdan **Work list** (Työluettelo) -ruudusta seuraavat valintaruudut: **Material number required** (Materiaalinumero on pakollinen tieto), **Valid expiry date required** (Kelvollinen vanhenemispäivä on pakollinen tieto) ja **Lot number required** (Eränumero on pakollinen tieto).

Tämän voi tehdä vain käyttäjä, jolla on "Administrator" (Hallinnoija) -tason oikeudet.

3. Kun Gamma Plug-in -lisäosa on asennettu, tuo CALR-testiprofiili (.iap-tiedosto). Kirjaudu Rotor-Gene AssayManager v2.1 -ohjelmistoon käyttäjänä, jolla on "Administrator" (Hallinnoija) -tason oikeudet Rotor-Gene AssayManager v2.1 -ohjelmistoon.
4. Valitse **Configuration** (Kokoonpano) -ympäristö.
5. Valitse **Assay Profiles** (Testiprofiilit) -välilehti.
6. Napsauta **Import** (Tuo) -painiketta.
7. Valitse tiedoston avausikkunassa CALR-testiprofiili, tiedosto ipsogen_CALR_blood_CE.
8. Valitse **Open** (Avaa). Testiprofiili ladataan ja lisätään käytettävissä olevien testiprofiilien luetteloon ja sitä voidaan käyttää **Setup** (Asetukset) -ympäristössä.

Huomautus: Testiprofiilin samaa versiota ei voi tuoda kahdesti.

Latauslevyn ja roottorin asetukset

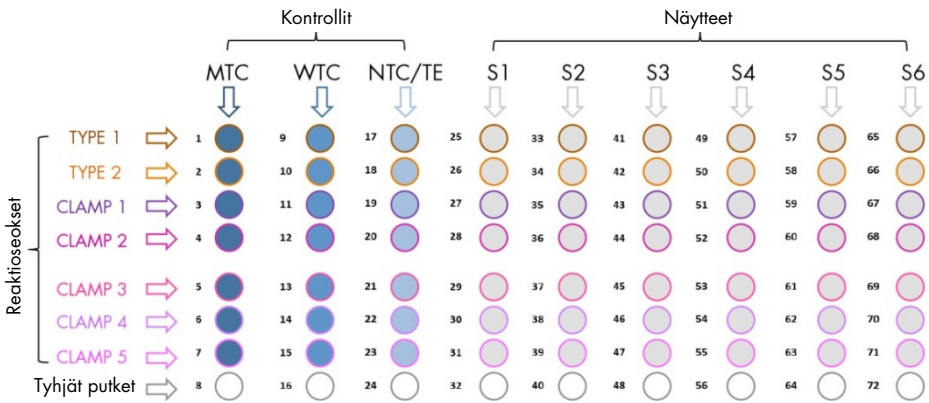
On suositeltavaa testata 6 gDNA-näytettä samassa kokeessa jotta kontrollien ja reaktioseosten käyttö olisi optimaalista.

Kutakin reaktioseosta (CALR TYPE 1, CALR TYPE 2, CALR CLAMP 1, CALR CLAMP 2, CALR CLAMP 3, CALR CLAMP 4 ja CALR CLAMP 5) käytetään 9 reaktiossa: 6 gDNA-näytettä ja 3 ulkoista kontrollia [1 CALR-mutanttikontrolli (MTC), 1 CALR-villityypin kontrolli (WTC) ja 1 Ei mallia -kontrolli (NTC = TE-puskuri, joka on toimitettu *ipsogen* CALR RGQ PCR -sarjan mukana)].

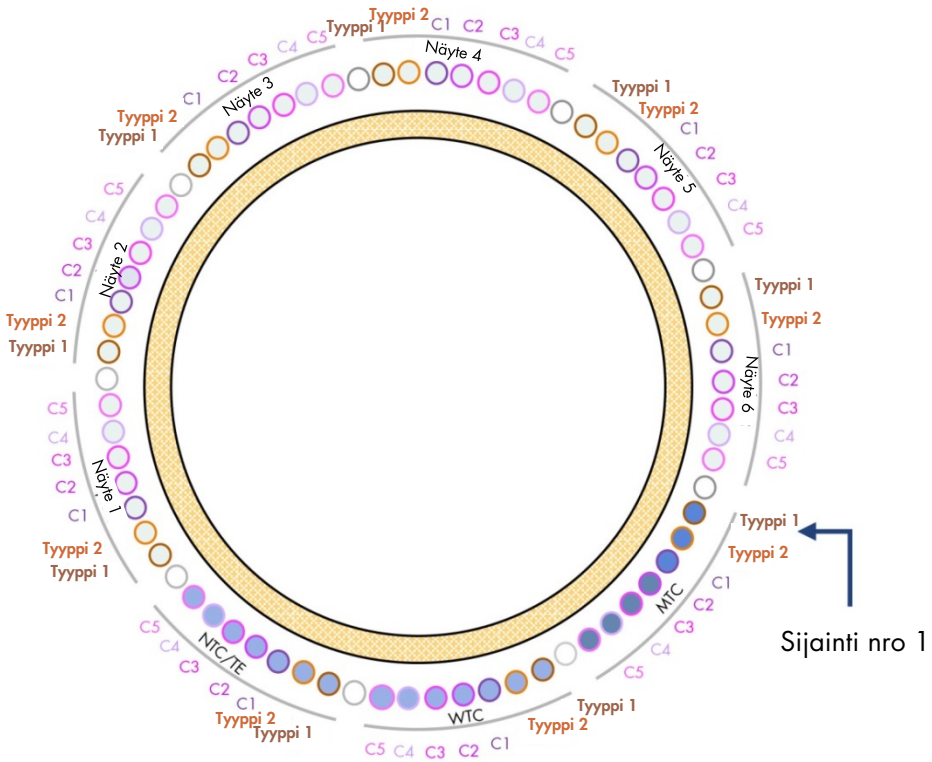
Kuva 4 ja Kuva 5 esittävät latauslevyn ja roottorin asetuksia optimoidussa kokeessa *ipsogen* CALR RGQ PCR -sarjalla.

CALR-reaktioseosten ja kontrollien sijainti on määritetty CALR-testiprofilissa, eikä sitä voi muuttaa. Jos reaktioseoksia/kontroleja ei aseteta alla kerrotulla tavalla, tuloksia ei voi analysoida automaattisesti.

Kuvassa 4 olevat numerot ilmaisevat sijainnit latauslohkossa sekä roottorin loppuasennon.



Kuva 4. Latauslohkon asetukset tehtäessä testiä *ipsogen* CALR RGQ PCR -sarjalla. TYPE 1: CALR-reaktioseos TYPE 1; TYPE 2: CALR-reaktioseos TYPE 2; CLAMP 1: CALR-reaktioseos CLAMP 1; CLAMP 2: CALR-reaktioseos CLAMP 2; CLAMP 3: CALR-reaktioseos CLAMP 3; CLAMP 4: CALR-reaktioseos CLAMP 4; CLAMP 5: CALR-reaktioseos CLAMP 5; MTC: CALR-mutanttikontrolli; WTC: CALR-villityypin kontrolli; NTC/TE: Ei mallia -kontrolli (TE); S1–S6: gDNA-näytteet.



Kuva 5. Roottorin asetukset tehtäessä testiä *ipsogen* CALR RGQ PCR -sarjalla.

Sijainnista 1 MTC: CALR-mutanttikontrolli; WTC: CALR-villityypin kontrolli; NTC/TE: Ei mallia-kontrolli (TE); Tyyppi 1: CALR-reaktioseos TYPE 1; TYPE 2: CALR-reaktioseos, TYPE 2; C1: CALR-reaktioseos CLAMP 1; C2: CALR-reaktioseos CLAMP 2; C3: CALR-reaktioseos CLAMP 3; C4: CALR-reaktioseos CLAMP 4; C5: CALR-reaktioseos CLAMP 5; Näyte 1–6: gDNA-näytteet. **Huomautus:** Kaikki jäljellä olevat sijainnit ○ on täytettävä tyhjiillä putkilla.

Työluettelon luominen

Setup (Asetukset) -ympäristön ja työluettelon luonnin ja muokkauksen yleiset toiminnot on kuvattu julkaisussa *Rotor-Gene AssayManager v2.1 Core Application User Manual* (Rotor-Gene AssayManager -ydinohjelmiston version 2.1 käyttöopas).

Huomautus: Työluettelon voi tallentaa. Työluettelon voi luoda ennen näytteiden lataamista instrumenttiin tai kun testi on valmisteltu instrumentissa.

1. Käynnistä Rotor-Gene Q MDx -instrumentti.
2. Avaa Rotor-Gene AssayManager v2.1 -ohjelmisto ja kirjaudu käyttäjänä "Operator" (Käyttäjä) -roolissa suljetussa tilassa.
3. Valitse **Setup** (Asetukset) -ympäristö.
4. Napsauta työluettelon hallinnan **New manual work list** (Uusi manuaalinen työluettelo) -painiketta.
5. Valitse CALR-testiprofiili käytettävissä olevien testiprofiilien luettelosta.
6. Napsauta **Move** (Siirrä), jolloin valittu testiprofiili siirtyy **Selected assay profiles** (Valitut testiprofiilit) -luetteloon. Testiprofiilin pitäisi nyt näkyä **Selected assay profiles** (Valitut testiprofiilit) -luettelossa.
7. Kirjoita näytteiden lukumäärä (enintään 6) vastaavaan kenttään.
8. Valitse **Kit Information** (Sarjan tiedot). Käytä sarjan viivakoodia tai kirjoita seuraavat *ipsogen* CALR RGQ PCR -sarjan laatikon kanssa olevat tiedot manuaalisesti:
 - Materiaalinumero 1100703
 - Kelvollinen vanhenemispäivä
 - Eränumero
9. Valitse **Samples** (Näytteet) -vaihe. Näkyviin tulee luettelo näytteen tiedoista. Luettelo edustaa roottorin odotettua asettelua.

10. Kirjoita tähän luetteloon näytteen tunnistenumero(t) sekä mahdolliset muut valinnaiset näytetiedot kommenttina jokaisen näytteen kohdalle.
11. Valitse **Properties** (Ominaisuudet) ja kirjoita työluettelon nimi.
12. Valitse **Worklist is complete (can be applied)** (Työluettelo on valmis [voidaan ottaa käyttöön]) -valintaruutu.
13. Tallenna työluettelo **Save** (Tallenna) -vaihtoehdolla.
14. Tulosta työluettelo **Print work list** (Tulosta työluettelo) -vaihtoehdolla.
Työluettelon tulostaminen voi auttaa qPCR:n valmistelussa ja asettamisessa. Näytteen tiedot ovat osa työluetteloa.

qPCR-ajon asettaminen

Ennen aloittamista suoritettava valmistelut

- Sulata kaikki tarvittavat komponentit paitsi Taq-DNA-polymeraasi; kyseistä entsyymiä on säilytettävä pakastimessa, kun sitä ei käytetä. Aseta putket, joissa sulatettavat komponentit ovat, jäähauteeseen tai jäähdytyslevylle.
- Tyhjennä työpöydän alue, jossa PCR-seos preparoidaan, jotta malli- tai nukleasi-kontaminaation riski pienenesi.
- Ennen kuin käytät standardeja, kontroleja ja reaktioseoksia sisältäviä putkia, vorteksoi niitä (10–12 sekuntia) ja sentrifugoi ne sitten lyhyesti.

1. Valmistele qPCR-päaseokset jokaiselle reaktioseokselle (CALR TYPE 1, CALR TYPE 2, CALR CLAMP 1, CALR CLAMP 2, CALR CLAMP 3, CALR CLAMP 4 ja CALR CLAMP 5) **jäähauteessa** (tai käyttämällä jäähdytyslevyä) käsiteltävien näytteiden lukumäärän mukaisesti.

Jäljempänä olevassa taulukossa on kerrottu pipetointitapa, jolla kaikkien CALR-reagenssien pääseosten lopulliseksi reaktiivilavuudeksi tulee 25 µl sen jälkeen, kun niihin on lisätty 5 µl gDNA:ta tai kontrolliliuosta. Mukaan on sisällytetty lisätilavuutta

pipetointivirheen kompensoimiseksi ja jotta reaktion pääseosta voitaisiin valmistaa riittävä määrä 6 näytteelle ja 3 ulkoiselle kontrollille.

Komponentti	1 reaktio (µl)	9 + 1 reaktiota (µl)
CALR-reaktioseos	19,83	198,3
Taq DNA -polymeraasi	0,17	1,7
qPCR-pääseoksen kokonaistilavuus (µl)	20	200
qPCR-pääseoksen jakaminen	20 µl/putki	
Näytteen jakaminen	5 µl/putki	
qPCR-reaktion kokonaistilavuus	25 µl	

* Mukaan on sisällytetty lisätilavuutta pipetointivirheen kompensoimiseksi.

Huomautus: Alle 1 µl:n tilavuuksia ei ole suositeltavaa pipetoida.

- Vorteksoi kaikki qPCR-pääseokset ja sentrifugoi ne lyhyesti.
- Aseta qPCR-liuskaputket jäähdytetylle Loading Block 72 x 0.1 ml Tubes -latauslohkolle ja jakele 20 µl tarvittavaa CALR qPCR -pääseosta kuhunkin liuskaputkeen kohdassa Kuva 4 olevan latauslohkon asetuskaavion mukaisesti.
- Vorteksoi ja sentrifugoi lyhyesti gDNA-näytteet, CALR-villityypin kontrolli (WTC), CALR-mutanttikontrolli (MTC) ja TE-puskuri (NTC). Lisää sen jälkeen 5 µl näytettä tai kontrollimateriaalia vastaavaan putkeen kohdan Kuva 4 mukaisesti, jolloin kokonaistilavuudeksi tulee 25 µl. Sekoita varovasti pipetoimalla ylös ja alas.

Huomautus: Muista vaihtaa pipetin kärki jokaisen putken kohdalla. Näin vältät väärät positiiviset tulokset, jotka ovat seurausta ei-spesifin mallin tai reaktioseoksen aiheuttamasta kontaminaatiosta. Sulje kaikki putket ja tarkista, ettei putkien pohjalla ole kuplia.

- Palauta kaikki *ipsogen* CALR RGQ PCR -sarjan komponentit asianmukaisesti säilytysolosuhteisiin, jotta materiaali ei hajoaisi.

Rotor-Gene MDx -instrumentin valmistelu ja qPCR-ajoittaminen

1. Aseta 72-kuoppainen roottori Rotor-Gene Q MDx -roottoripitimeen.
2. Aseta liuskaputket roottoriin oikeisiin sijainteihinsa; aloita sijainnista 1 kuvan Kuva 5 esittämällä tavalla. Aseta kaikkiin käyttämättömiin sijainteihin tyhjä, korkilla suljettu putki.
Huomautus: Varmista, että ensimmäinen putki on asetettu sijaintiin 1, ja että liuskaputket on asetettu oikeisiin suuntiin ja sijainteihin kohdan Kuva 4 ja Kuva 5 esittämällä tavalla.
Huomautus: Pidä TYPE 1 -reaktioseos ja kolme kontrollia (MTC, WTC, NTC) sijainnissa 1, 9 ja 17, jotta poiminnan optimointi (joka tehdään putken sijainnissa 1) tehdään aina samassa monistuksessa (katso Kuva 4 ja Kuva 5).
3. Kiinnitä lukitusrengas.
4. Lataa roottori ja lukitusrengas Rotor-Gene Q MDx -instrumenttiin. Sulje instrumentin kansi.
5. Valitse Rotor-Gene AssayManager v2.1 -ohjelmistosta vastaava työluettelo ja valitse **Apply** (Käytä).
Jos työluettelo on vielä avoinna, voit myös napsauttaa **Apply** (Käytä) -painiketta.
Huomautus: Jos testiin liittyvää työluetteloa ei ole luotu, kirjaudu Rotor-Gene AssayManager v2.1 -ohjelmistoon ja tee kohdassa "Työluettelon luominen" sivulla 37 kuvatut toimet ennen jatkoa.
6. Kirjoita testin nimi.
7. Valitse käytettävä sykleri **Cycler Selection** (Syklerin valinta) -kohdasta. Käytettävän syklerin on oltava Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM.
8. Tarkista, että lukitusrengas on kiinnitetty oikein ja vahvista näytössä, että lukitusrengas on kiinnitetty.
9. Napsauta **Start run** (Aloita ajo).
qPCR-ajon pitäisi käynnistyä.
10. Kun ajo on päättynyt, valitse **Finish run** (Lopeta ajo).
Huomautus: Testi tallentuu sisäiseen tietokantaan vasta kun tämä vaihe on valmis.

Vapauta ja raportoi qPCR-tulokset

Approval (Hyväksyntä) -ympäristön yleinen toiminnallisuus on kuvattu julkaisussa *Rotor-Gene AssayManager v2.1 Gamma Plug-in User Manual* (Rotor-Gene AssayManager v2.1 Gamma Plug-in -lisäosan käyttöopas).

Kun ajo on päättynyt ja sykleri on vapautettu, testi tallentuu sisäiseen tietokantaan. Kerätyt tiedot analysoidaan automaattisesti testiprofiilia vastaavan lisäosan mukaisesti sekä testi-profiilissa määritettyjen sääntöjen ja parametrien mukaan.

Huomautus: Ajon hyväksyminen edellyttää käyttäjäroolia "Approver" (Hyväksyjä).

Hyväksyntämenettelyn ensimmäinen askel on hyväksyttävän testin suodatus. Tämä tehdään käyttämällä **Approval** (Hyväksyntä) -ympäristön suodatusehtojen.

1. Vapauta ja hyväksy ajo.

"Approver" (Hyväksyjä) -roolilla kirjautuneiden käyttäjien on valittava **Release and go to approval** (Vapauta ja siirry hyväksyntään) -vaihtoehto.

"Operator" (Operaattori) -roolilla kirjautuneiden käyttäjien on valittava **Release** (Vapauta) -vaihtoehto.

Release and go to approval (Vapauta ja siirry hyväksyntään) -vaihtoehdon valinta näyttää testin tulokset **Approval** (Hyväksyntä) -ympäristössä.

Jos "Operator" (Operaattori) -roolissa oleva käyttäjä napsauttaa **Release** (Vapauta) -vaihtoehtoa, jonkin toisen käyttäjän on kirjauduttava sisään "Approver" (Hyväksyjä) -roolissa ja valittava **Approval** (Hyväksyntä) -ympäristö.

2. Valitse hyväksyttävät testin suodatinasetukset ja valitse **Apply** (Käytä).

3. Tarkista tulokset ja napsauta **Release/Report data** (Vapauta/raportoi tiedot) -painiketta.

4. Valitse **OK**.

Järjestelmä luo raportin .pdf-muodossa ja tallentaa sen automaattisesti ennalta määritettyyn kansioon.

Oletusarvoinen kansiopolku on **QIAGEN > Rotor-Gene AssayManager > Export > Reports**.

Huomautus: Tätä polkua ja kansiota voi muuttaa **Configuration** (Kokoonpano) -ympäristössä.

5. Poista Rotor-Gene Q MDx -instrumenttiin ladatut materiaalit ja hävitä liuskaputket paikallisten turvallisuussäädösten mukaan.

Huomautus: Jos tarvitaan QIAGENin teknisen tuen tekemää vianmäärittystä, sen avuksi on tuotettava ajosta peräisin oleva tukipaketti. Tukipaketteja voidaan tuottaa **Approval** (Hyväksyntä)- tai **Archive** (Arkisto) -ympäristössä. Lisätietoja on julkaisun *Rotor-Gene AssayManager v2.1 Core Application User Manual* (Rotor-Gene AssayManager -ydinohjelmiston version 2.1 käyttöopas) kohdassa "Creating a support package" (Tukipaketin luominen).

Tukipaketin lisäksi hyödyllinen on myös auditointiloki ajalta ± 1 vuorokautta. Auditointilokin voi noutaa **Service** (Huolto) -ympäristöstä. Lisätietoja on julkaisussa *Rotor-Gene AssayManager v2.1 Core Application User Manual* (Rotor-Gene AssayManager -ydinohjelmiston version 2.1 käyttöopas).

Tulosten tulkinta

Tietojen analyysi

Jokaisen testin ja näytteen qPCR-tulokset analysoidaan täysin automaattisesti. Rotor-Gene AssayManager v2.1 -ohjelmisto analysoi monistumiskäyriä ja voi merkitä epäyhteensopivat käyrät virheellisiksi niiden muodon ja kohina-amplitudin mukaan. Tällaiset käyrät on merkitty erityisellä merkinnällä. Ohjelmisto voi merkitä myös anomalia, jotka eivät sinällään tee käyrästä virheellistä.

Testin kelvollisuuden määrittämiseksi Rotor-Gene AssayManager v2.1 -ohjelmisto analysoi myös ajon kontrollit, eli CALR-villityypin kontrollin (WTC), CALR-mutanttikontrollin (MTC) ja TE-puskurin NTC) vihreässä (FAM) ja keltaisessa (HEX) kanavassa *ipsogen* CALR RGQ PCR -sarjan reaktioseoksille (CALR TYPE 1, CALR TYPE 2, CALR CLAMP 1, CALR CLAMP 2, CALR CLAMP 3, CALR CLAMP 4 ja CALR CLAMP 5). Jokaisen kontrollin kelvollisuus perustuu complianssiarvoihin C_T , jolla on ennalta määritetyt tavoitearvot.

Huomautus: Jos jonkin putken sisäinen monistumiskontrolli on virheellinen (keltainen kanava), saman putken CALR-spesifinen kohde (vihreä kanava) merkitään virheelliseksi.

Huomautus: Jos ainakin yksi jonkin CALR-testin (esim. CLAMP 1 -testi) ulkoisista kontrolleista on virheellinen, järjestelmä määrittää virheellisiksi kaikki kyseisellä reaktioseoksella testinäytteistä saadut tulokset. Tässä tapauksessa vain annettu CALR-testi on viallinen, ei koko qPCR-ajo.

Rotor-Gene AssayManager v2.1 -ohjelmisto analysoi myös tuntemattomat näytteet tarkistamalla sisäisen ABL1-kontrollin kelvollisuuden.

Lopuksi järjestelmä määrittää tuntemattomille näytteille CALR-tilan. Ensimmäisessä tapauksessa ohjelmisto tutkii TYPE 1 ja TYPE 2 -testeissä saadut tulokset. Jos näytteessä on todettu on joko

Tyyppin 1 tai Tyyppin 2 positiivinen mutaatio, järjestelmä määrittää CALR-tilan. CLAMP-testeistä saadut tulokset näytetään sen jälkeen tiedottamistarkoituksessa.

Jos näytteessä ei havaita Tyyppin 1 eikä Tyyppin 2 mutaatiota, analyysi jatkuu CLAMP-testeistä saaduilla tiedoilla, kunnes CALR-tila (eli onko mutaatiota havaittu vai ei) on määritetty.

Näytteen päättelemisen positiiviseksi edellyttää, että vähintään yhdessä seitsemästä CALR-testistä ilmenee positiivinen havainto. Kaikkien kyseeseen tulevien testien ja kontrollin sekä testinäytteen kontrollin on oltava kelvollisia, eli sisäiset kontrollit MTC, WTC, NTC ja ABL1.

Näytteen päättelemisen negatiiviseksi edellyttää, että näytteen kaikki testit ja kontrollit (MTC, WTC ja NTC) ovat negatiivisia kaikissa seitsemässä CALR-testissä, ja lisäksi näytteen sisäisen ABL1-kontrollin on oltava kelvollinen.

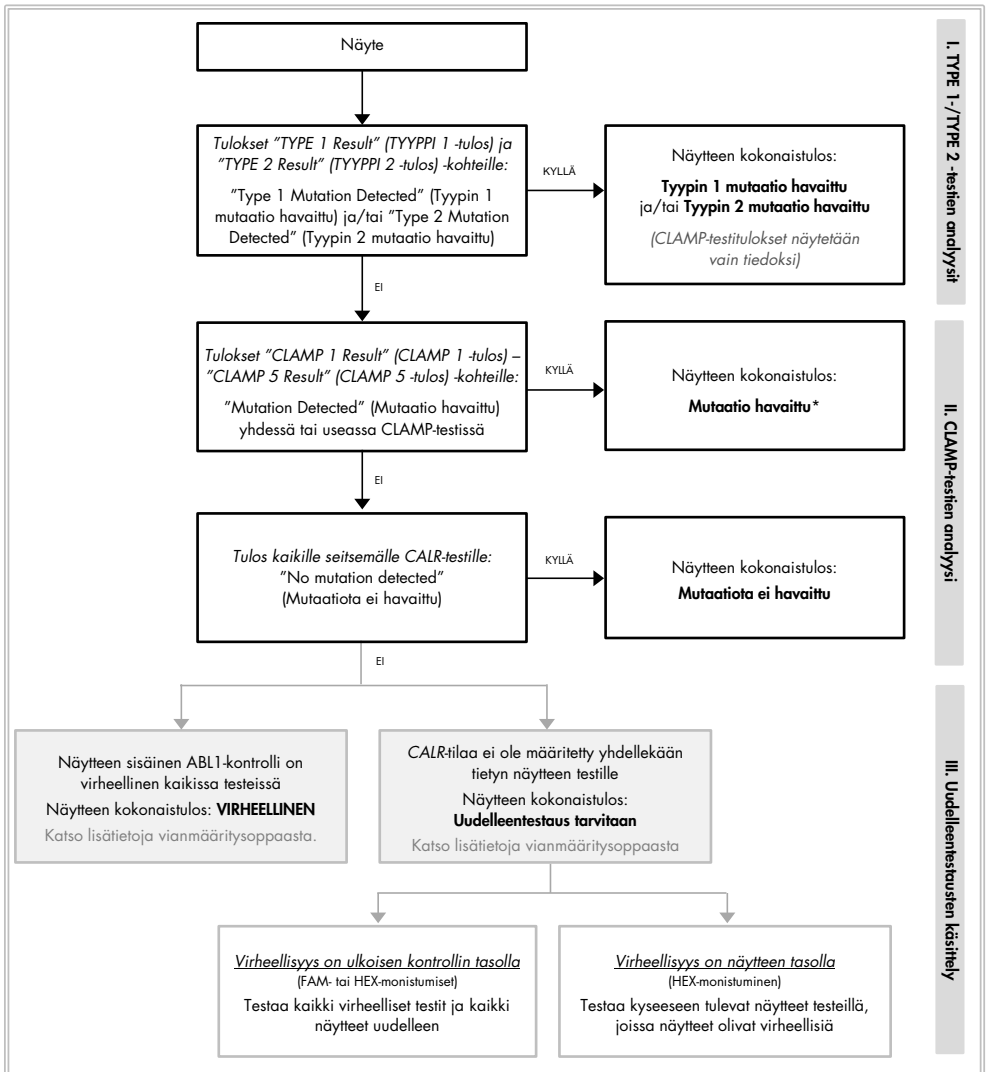
“Approver” (Hyväksyjä) -roolilla varustetun käyttäjän on hyväksyttävä ja julkaistava Rotor-Gene AssayManager v2.1 -ohjelmiston automaattisesti analysoimat ja määrittämät testitulokset. Hyväksyttävissä näytetuloksissa on kolme hyväksyntäpainiketta vastaavan rivin perässä. Näillä painikkeilla voidaan hyväksyä tai hylätä näytetulokset. Lisätietoja on julkaisussa *Rotor-Gene AssayManager v2.1 Gamma Plug-in User Manual* (Rotor-Gene AssayManager v2.1 Gamma Plug-in -lisäosan käyttöopas).

Jos tulokset ovat virheellisiä katso vianmääritysohjeet kohdasta “Ongelmien ratkaisu”, sivu 54.

Uudelleentestaukset

Jos tulokset ovat virheellisiä, määritä uudelleentestauksen tarpeellisuus käyttämällä Kuvassa 6 esitettyä päätöksentekokaaviota.

Uudelleentestaus ei ole tarpeen, jos kyseisten näytteiden CALR-tila voitiin määrittää jollakin seitsemästä CALR-testistä.



* Tapauksissa, joissa Tyypin 1/Tyypin 2 tunnistus on pakollinen ja TYPE 1- ja/tai TYPE 2 -testi on virheellinen, saatetaan tarvita uudelleentestaus – positiivisesta CLAMP-testistä huolimatta – ratkaisevan tuloksen saamiseksi TYPE 1- ja/tai TYPE 2 -testistä.

Kuva 6. Päätöksentekokaavio testinäytteiden CALR-mutaation tilan määrittämiseksi.

Huomautus: Tapauksissa, joissa Tyypin 1/Tyypin 2 tunnistus on pakollinen ja TYPE 1- ja/tai TYPE 2 -testi on virheellinen, saatetaan tarvita uudelleentestaus – positiivisesta CLAMP-testistä huolimatta – ratkaisevan tuloksen saamiseksi TYPE 1- ja/tai TYPE 2 -testistä.

Muissa tapauksissa saatetaan tarvita uudelleentestauksia. Kun teet uudelleentestausta, pidä TYPE 1 -reaktioseos ja kolme kontrollia (MTC, WTC, NTC) sijainnissa 1, 9 ja 17, jotta poiminnan optimointi (joka tehdään putken sijainnissa 1) tehdään aina samassa monistuksessa. Varmista, että asetat jokaisen uudelleentestatun testin sille kuuluvaan paikkaan (Kuva 4) vaikka levyllä ei olisikaan asetettu kaikkia testejä.

Huomautus: Jos jotkin seitsemästä CALR-testistä puuttuvat näytteiden uudelleentestauksen aikana, ohjelmisto täyttää yleensä kaikkien tyhjien sijaintien kohdalle vastauksen "INVALID" (VIRHEELLINEN). Paremman jäljitettävyyden vuoksi tyhjät sijainnit ja niihin liittyvän vastauksen oletettu tyyppi on dokumentoitava raportin kommenttiosiossa.

Tulosnäyttö

Kohteet

ipsogen CALR RGQ PCR -sarjan kunkin testin tulokset näkyvät seuraavan nimisten kohteiden alla:

- "ABL_AssayName" (ABL-testin nimi, esim., ABL_TYPE_1) – sisäinen ABL1-monistumiskontrolli (keltaisen kanavan tulokset)
- "AssayName" (Testin nimi) – CALR-reaktioseos (esim. TYPE 1, kun kyseessä on CALR-reaktioseos TYPE 1) (vihreän kanavan tulokset)
- "AssayName Result" (Testin nimen tulos, esim. TYPE 1 -tulos). Nämä kohteet ovat yhdistelmäkohteita; vastaava tulos ottaa huomioon kontrollien kelvollisuuden (MTC, WTC, NTC ja ABL1).

Tulokset

Edellä mainittujen kohteiden tulokset näkyvät raportin **Result** (Tulos) -sarakkeessa.

Taulukko 3. Kustakin kohteesta näytettävät tulokset

Kohde	Näytteet	Näytettävät tulokset
ABL_AssayName (ABL-testin nimi) (esim. ABL_TYPE_1)	MTC, WTC, NTC, testinäytteet	Internal Control Valid (Sisäinen kontrolli kelvollinen), INVALID (VIRHEELLINEN)
AssayName (Testin nimi) (esim. TYPE 1)	MTC, WTC, NTC	Signal (Signaali), No Signal (Ei signaalia), INVALID (VIRHEELLINEN)
AssayName (Testin nimi) (esim. TYPE 1)	Testinäytteet	Significant Amplification Detected (Merkittävää monistumista havaittu), No Significant Amplification Detected (Merkittävää monistumista ei havaittu), No Amplification Detected (Monistumista ei havaittu), INVALID (VIRHEELLINEN)
TYPE 1 Result (TYYPPI 1 -tulos)	Testinäytteet	Type 1 Mutation Detected (Tyypin 1 mutaatio havaittu) No Mutation Detected (Mutaatiota ei havaittu), INVALID (VIRHEELLINEN)
TYPE 2 Result (TYYPPI 2 -tulos)	Testinäytteet	Type 2 Mutation Detected (Tyypin 2 mutaatio havaittu) No Mutation Detected (Mutaatiota ei havaittu), INVALID (VIRHEELLINEN)
CLAMP X Result (CLAMP X -tulos) (esim. CLAMP 1 -tulos)	Testinäytteet	Mutation Detected (Mutaatio havaittu) No Mutation Detected (Mutaatiota ei havaittu), INVALID (VIRHEELLINEN)

Jos jokin annettuun näytteeseen liittyvä kontrolli (MTC, WTC, NTC) on testissä virheellinen tai jos sisäinen kontrolli ABL1 on virheellinen, yhdistetyn kohdetuloksen tuloksena näytetään tulos "INVALID" (VIRHEELLINEN).

Lopputulos kunkin näytteen analyysistä näkyy raportin sarakkeessa **Overall Sample Result** (Näytteen kokonaistulos).

Taulukko 4. Näytteen kokonaistulokset

Näytteet tulos	Kuvaus
Type 1 Mutation Detected (Tyypin 1 mutaatio havaittu)	Testatussa näytteessä on Tyypin 1 <i>CALR</i> -mutaatio.
Type 2 Mutation Detected (Tyypin 2 mutaatio havaittu)	Testatussa näytteessä on Tyypin 2 <i>CALR</i> -mutaatio.
”Type 1 and Type 2 Mutation Detected” (Tyypin 1 ja tyypin 2 mutaatio havaittu)	Testatussa näytteessä on Tyypin 1 ja Tyypin 2 <i>CALR</i> -mutaatiot. Tämä on harvinaista, mutta se on havaittu kerran <i>ipsogen CALR RGQ PCR</i> -sarjan klinisen validoinnin yhteydessä.
Mutation Detected (Mutaatio havaittu)	Testatussa näytteessä on <i>CALR</i> -mutaatio, jonka tyyppi on jokin muu kuin Tyypin 1 tai Tyypin 2.
No Mutation Detected (Mutaatiota ei havaittu)	Testatussa näytteessä ei havaittu <i>CALR</i> -mutaatiota.
Retest Needed (Uudelleentestaus tarvitaan)	<p>Tulos on epäselvä, koska ainakin yhden <i>CALR</i>-reaktioosoksen ainakin yksi kontrolli on virheellinen. Ratkaisevan vastauksen saamiseksi tarvitaan uudelleentestaus (katso Kuva 6).</p> <p>Esimerkki: Näyte on positiivinen (eli ”Significant Amplification Detected”, Merkittävää monistumista havaittu) vain <i>CLAMP 1</i> -testissä, mutta <i>CLAMP 1</i> -testin NTC-kontrolli on virheellinen, koska sen kuoppa on kontaminoitunut. <i>CLAMP 1</i> -testin tulosta ei voida huomioida, joten <i>CLAMP 1</i> -testin tuloksena näkyy INVALID (VIRHEELLINEN). Näytteen positiivisen tuloksen vahvistaminen edellyttää, että <i>CLAMP 1</i> -testi tehdään uudelleen (MTC, WTC, NTC ja kyseinen näyte).</p>

Näytteet tulos	Kuvaus
VIRHEELLINEN	Testatun näytteen sisäinen ABL1-monistumiskontrolli on virheellinen kaikissa seitsemässä CALR-reaktiooskessa, mutta kaikki ulkoiset kontrollit (MTC, WTC, NTC) ovat kelpollisia. Tämä johtuu todennäköisimmin näytteen laadusta tai näytteen virheellisestä normalisoinnista. Katso lisätietoja kohdasta "Ongelmien ratkaisu" sivulla 54.

Merkinnät

Tuloksissa näkyvät merkinnät antavat lisätietoja tuloksista, varsinkin virheellisistä tuloksista. Ongelmattomat anomaliat on ilmaistu varoitusmerkinnällä, joka ei johda virheelliseen tulokseen. Gamma Plug-in -lisäosaan sisältyviä yleisistä merkinnöistä on tietoja julkaisussa *Rotor-Gene AssayManager v2.1 Gamma Plug-in User Manual* (Rotor-Gene AssayManager v2.1 Gamma Plug-in -lisäosan käyttöopas).

Automaattinen testaus *ipsogen* CALR RGQ PCR -sarjalla voi tuottaa seuraavat testikohtaiset ja yleiset merkinnät:

Merkintä	Kuvaus
Testikohtaiset merkinnät	
CONSECUTIVE_FAULT	Tämän kohteen laskennassa käytetty kohde on virheellinen.
IC_INVALID	Sisäinen kontrolli on virheellinen. Kohde ja sisäinen kontrolli ovat samassa putkessa.
INVALID_SIGNAL	NTC-kontrolliin liittyvä merkintä. Sisäisen kontrollin tai CALR-spesifin monistumisen C_T -arvo on liian pieni.

Merkintä	Kuvaus
MC_HIGH_CT (CLAMP X)	Mutanttikontrollin C_T -arvo on liian suuri.
MC_HIGH_CT (TYPE X)	Mutanttikontrollin C_T -arvo on liian suuri.
MC_IC_HIGH_CT (CLAMP X)	Sisäisen kontrollin C_T -arvo on odotettua suurempi putkessa, joka sisältää mutanttikontrollin.
MC_IC_HIGH_CT (TYPE X)	Sisäisen kontrollin C_T -arvo on odotettua suurempi putkessa, joka sisältää mutanttikontrollin.
MC_IC_LOW_CT (CLAMP X)	Sisäisen kontrollin C_T -arvo on odotettua pienempi putkessa, joka sisältää mutanttikontrollin.
MC_IC_LOW_CT (TYPE X)	Sisäisen kontrollin C_T -arvo on odotettua pienempi putkessa, joka sisältää mutanttikontrollin.
MC_LOW_CT (CLAMP X)	Mutanttikontrollin C_T -arvo on liian pieni.
MC_LOW_CT (TYPE X)	Mutanttikontrollin C_T -arvo on liian pieni.
MC_NO_CT (CLAMP X)	Mutanttikontrollille ei havaittu C_T -arvoa CLAMP X -reaktioseoksessa.
MC_NO_CT (TYPE X)	Mutanttikontrollille ei havaittu C_T -arvoa TYPE X -reaktioseoksessa.
NO_SIGNAL_IC_INVALID	Sisäisen kontrollin signaalia ei havaittu. Kohde ja sisäinen kontrolli ovat samassa putkessa.
NTC_IC_LOW_CT (CLAMP X)	Sisäisen kontrollin C_T -arvo on liian pieni putkessa, joka sisältää Ei mallia -kontrollin.

Merkintä	Kuvaus
NTC_IC_LOW_CT (TYPE X)	Sisäisen kontrollin C_T -arvo on liian pieni putkessa, joka sisältää Ei mallia -kontrollin.
NTC_LOW_CT (CLAMP X)	Ei mallia -kontrollin C_T -arvo on liian pieni.
NTC_LOW_CT (TYPE X)	Ei mallia -kontrollin C_T -arvo on liian pieni.
SAMPLE_CLAMP X_IC_HIGH_CT	Sisäisen kontrollin C_T -arvo on odotettua suurempi putkessa, joka sisältää näytteen.
SAMPLE_CLAMP X_IC_LOW_CT	Sisäisen kontrollin C_T -arvo on odotettua pienempi putkessa, joka sisältää näytteen.
SAMPLE_TYPE X_IC_HIGH_CT	Sisäisen kontrollin C_T -arvo on odotettua suurempi putkessa, joka sisältää näytteen.
SAMPLE_TYPE X_IC_LOW_CT	Sisäisen kontrollin C_T -arvo on odotettua pienempi putkessa, joka sisältää näytteen.
WTC_IC_HIGH_CT (CLAMP X)	Sisäisen kontrollin C_T -arvo on odotettua suurempi putkessa, joka sisältää villityypikontrollin.
WTC_IC_HIGH_CT (TYPE X)	Sisäisen kontrollin C_T -arvo on odotettua suurempi putkessa, joka sisältää villityypikontrollin.
WTC_IC_LOW_CT (CLAMP X)	Sisäisen kontrollin C_T -arvo on odotettua pienempi putkessa, joka sisältää villityypikontrollin.
WTC_IC_LOW_CT (TYPE X)	Sisäisen kontrollin C_T -arvo on odotettua pienempi putkessa, joka sisältää villityypikontrollin.

Merkintä	Kuvaus
WTC_LOW_CT (CLAMP X)	Villityyppikontrollin C _T -arvo on liian pieni.
WTC_LOW_CT (TYPE X)	Villityyppikontrollin C _T -arvo on liian pieni.
Muut merkinnät	
ANALYSIS_FAILED	Testi on määritetty virheelliseksi, koska analyysi epäonnistui eri syistä. Ota yhteys QIAGENin tekniseen palveluun.
CURVE_SHAPE_ANOMALY	Raakadatan monistumiskäyrän muoto poikkeaa tämän testin tyypillisestä käyttäytymistavasta. Virheellisten tulosten tai tulosten virheellisen tulkinnan todennäköisyys on suuri.
FLAT_BUMP	Raakadatan monistumiskäyrän muoto on litteä töyssy, mikä poikkeaa tämän testin tyypillisestä käyttäytymistavasta. Virheellisten tulosten tai tulosten virheellisen tulkinnan todennäköisyys on suuri (esimerkiksi C _T -arvon määrittäminen on virheellinen).
LOW_FLUORESCENCE_CHANGE (Varoitus)	Tämän näytteen fluoresenssin muutos suhteessa putkeen, jossa tapahtui suurin fluoresenssin muutos, on pienempi kuin määritetty alaraja.
NO_BASELINE	Lähtötasoa ei löydy. Jatkoanalyysiä ei voi tehdä.
RUN_FAILED	Testi määritettiin virheelliseksi, koska syklerissä tai sen liitännässä ilmeni ongelma.
RUN_STOPPED	Testi määritettiin virheelliseksi, koska ajo lopetettiin manuaalisesti.

Merkintä	Kuvaus
SATURATION	Fluoresenssin raakadata saturoituu voimakkaasti ennen monistumiskäyrän taipumispistettä.
SPIKE	Monistumiskäyrässä havaittiin fluoresenssin raakadatassa piikki, mutta se on C _T -määritysalueen ulkopuolelle.
SPIKE_CLOSE_TO_CT	Monistumiskäyrässä havaittiin piikki lähellä C _T -arvoa.
STEEP_BASELINE	Monistumiskäyrässä havaittiin fluoresenssin raakadatassa jyrkästi nouseva perustaso.
STRONG_BASELINE_DIP	Monistumiskäyrässä havaittiin fluoresenssin raakadatassa voimakas pudotus perustasossa.
STRONG_NOISE	Monistumiskäyrän kasvuvaiheen ulkopuolella havaittiin voimakasta kohinaa.
STRONG_NOISE_IN_GROWTH_PHASE	Monistumiskäyrän kasvuvaiheessa (eksponentiaalisessa vaiheessa) havaittiin voimakasta kohinaa.
WAVY_BASE_FLUORESCENCE	Monistumiskäyrässä havaittiin fluoresenssin raakadatassa aaltoileva perustaso.

Ongelmien ratkaisu

Tästä vianmääritysoppaasta voi olla apua ongelmissa, joita ilmenee määritettäessä *CALR*-mutaation tilaa *ipsogen CALR RGQ PCR* -sarjalla. Yhteystiedot ovat takakannessa ja osoitteessa www.qiagen.com.

Katso QIAamp DSP DNA Blood Mini Kit -sarjan (luettelonro. 61104) ja QIASymphony DSP DNA Mini Kit -sarjan (luettelonro. 937236) vianmääritykseen liittyvät tiedot vastaavan sarjan käsikirjasta.

Vianmääritystietoja Rotor-Gene Q MDx -instrumentista ja Rotor-Gene AssayManager v2.1 -ohjelmistosta on niiden käyttöoppaassa.

Kommentteja ja ehdotuksia

Näyte todetaan positiiviseksi useissa testeissä

Jokin mutaatio voi tulla havaituksi useissa testeissä

On esimerkiksi tavallista, että Tyypin 1 mutaation sisältävä näyte monistuu CLAMP 1- ja CLAMP 2 -testeissä TYPE 1 -testin lisäksi. Tyypin 2 mutaation sisältävä näyte monistuu tavallisesti sekä CLAMP 5 -testissä että TYPE 2 -testissä.

Sisäinen monistumisen kontrolli ei monistu lainkaan tai monistuu vain vähän ulkoisissa kontrolleissa ja/tai näytteissä

a) Reaktioseosta ja/tai *Taq*-DNA-polymeraasia ja/tai mallia ei ole lisätty

Tarkista pipetointijärjestys ja reaktion järjestely. Tarkista, että kaikki malli-DNA- ja kaikki qPCR-pääseoksen osat on lisätty. Suorita PCR-ajo uudelleen.

Kommenteja ja ehdotuksia

- b) Reaktioseos on hajonnut Säilytä sarjan sisältö -30...-15 °C:ssa ja suoja reaktioseokset valolta.
Tarkista säilytysolosuhteet ja reagenssien viimeinen käyttöpäivä (katso etiketti) ja toista PCR-ajo tarvittaessa uudella sarjalla.
- c) Pipetointitilavuus voi olla väärä Tarkista pipetointijärjestys ja reaktion järjestely.
Tarkista, että olet lisännyt 5 µl kontrollia/näytettä ja 20 µl qPCR-päaseosta. Tarkista kaikki pipetoidut tilavuudet silmämääräisesti.
Tarkista pipetit ja kalibroi ne tarvittaessa uudelleen ennen qPCR-vaiheen toistamista.
- d) DNA:n pitoisuus on liian pieni Tarkista näytteen DNA:n pitoisuus. *ipsogen* CALR RGQ PCR -sarja on optimoitu toimimaan DNA-pitoisuudella 10 ng/µl. Jos DNA-pitoisuus on vähemmän kuin 10 ng/µl, konsentroi DNA tai uuta se kokoverestä uudelleen pienemmällä eluutiotilavuudella ennen qPCR-vaiheen toistamista.
- e) DNA:n proteiini-kontaminaatio tai orgaanisia kemikaaleja läsnä Tarkista A_{260}/A_{280} -suhde. A_{260}/A_{280} -suhteen on oltava $\geq 1,7$. Jos suhde on $< 1,7$ uuta DNA uudelleen ja toista PCR-ajo.

Kommentteja ja ehdotuksia

Sisäinen monistumisen kontrolli monistuu liian aikaisin ulkoisissa kontrolleissa ja/tai näytteissä

- a) DNA:n pitoisuus on liian suuri
- Tarkista näytteen DNA:n pitoisuus. *ipsogen* CALR RGQ PCR -sarja on optimoitu toimimaan DNA-pitoisuudella 10 ng/μl. Jos DNA-pitoisuus on suurempi kuin 10 ng/μl, laimenna DNA TE-puskurissa ja toista PCR-ajo.
- b) Pipetointitilavuus voi olla väärä
- Tarkista pipetointijärjestys ja reaktion järjestely. Tarkista, että olet lisännyt 5 μl kontrollia/näytettä ja 20 μl qPCR-päaseosta. Tarkista kaikki pipetoidut tilavuudet silmämääräisesti. Tarkista pipetit ja kalibroi ne tarvittaessa uudelleen ennen qPCR-vaiheen toistamista.
- c) Monistumiskäyrä voi olla virheellinen.
- Tarkista, onko vastaavassa monistumisessa poikkeavia käyriä. Suorita PCR-ajo uudelleen.

Näytteiden sisäisessä monistumiskontrollissa ei ole signaaleja tai ne ovat matalia, mutta ulkoiset kontrollit ovat kelvollisia

- a) DNA:n pitoisuus on liian pieni
- Tarkista näytteen DNA:n pitoisuus. *ipsogen* CALR RGQ PCR -sarja on optimoitu toimimaan DNA-pitoisuudella 10 ng/μl. Jos DNA-pitoisuus on vähemmän kuin 10 ng/μl, konsentroi DNA tai uuta se kokoverestä uudelleen pienemmällä eluutiotilavuudella ennen qPCR-vaiheen toistamista.

Kommenteja ja ehdotuksia

- b) DNA:n proteiini-kontaminaatio tai orgaanisia kemikaaleja läsnä
- Tarkista A_{260}/A_{280} -suhde. A_{260}/A_{280} -suhteen on oltava $\geq 1,7$. Jos suhde on $< 1,7$ uuta DNA uudelleen ja toista PCR-ajo.
- c) Pipetointitilavuus voi olla väärä
- Tarkista pipetointijärjestys ja reaktion järjestely. Tarkista, että olet lisännyt 5 μ l kontrollia/näytettä ja 20 μ l qPCR-pääseosta. Tarkista kaikki pipetoidut tilavuudet silmämääräisesti. Tarkista pipetit ja kalibroi ne tarvittaessa uudelleen ennen qPCR-vaiheen toistamista.

Yksikään mallikontrolli (NTC/TE-puskuri) ei ole positiivinen (FAM ja/tai HEX)

- a) Reagensseissa on tapahtunut risti-kontaminaatiota tai muuta kontaminaatiota
- Vaihda kaikki kriittiset reagenssit ja toista PCR-ajo. Käsittele näytteitä, sarjan osia ja kulutusosia suositeltujen menettelytapojen mukaisesti, jotta kulkeutumiskontaminaatiota ei tapahtuisi. Varmista, että kärjet vaihdetaan eri reagenssien pipetoinnin välillä tai ladattaessa eri putkia. Preparoi esi-PCR-pääseos tarkoitukseen varatuilla materiaaleilla (pipettejä, kärkiä, jne.). Preparoi esi-PCR-pääseos ja NTC-reaktio erillisellä alueella, jonne ei tuoda DNA-matriiseja (DNA:ta, plasmideja tai PCR-tuotteita). Jos mahdollista, sulje PCR-putket heti testattavan näytteen lisäämisen jälkeen.

Kommentteja ja ehdotuksia

- b) Liuskaputket ja/tai näytetunnukset ovat vaihtuneet keskenään
Tarkista pipetointijärjestys ja reaktion järjestely.
Suorita PCR-ajo uudelleen.
- c) Reaktioseos tai koetin on hajonnut
Säilytä sarjan sisältö -30...-15 °C:ssa ja suojaa reaktioseokset valolta.
Tarkista säilytysolosuhteet ja reagenssien viimeinen käyttöpäivä (katso etiketti) ja toista PCR-ajo tarvittaessa uudella sarjalla.
- d) Monistumiskäyrä voi olla virheellinen
Tarkista, onko vastaavassa monistumisessa poikkeavia käyriä.
Suorita PCR-ajo uudelleen.

Mutanttikontrolli (MTC) ei monistu tai monistuu vain vähän (FAM-monistuminen)

- a) Reaktioseosta ja/tai *Taq*-DNA-polymeraasia ei ole lisätty
Tarkista pipetointijärjestys ja reaktion järjestely.
Tarkista, että kaikki qPCR-päaseoksen osat on lisätty.
Suorita PCR-ajo uudelleen.
- b) Reaktioseos on hajonnut
Säilytä sarjan sisältö -30...-15 °C:ssa ja suojaa reaktioseokset valolta.
Tarkista säilytysolosuhteet ja reagenssien viimeinen käyttöpäivä (katso etiketti) ja toista PCR-ajo tarvittaessa uudella sarjalla.
- c) Liuskaputket ja/tai näytetunnukset ovat vaihtuneet keskenään
Tarkista pipetointijärjestys ja reaktion järjestely.
Suorita PCR-ajo uudelleen.

Kommentteja ja ehdotuksia

- d) Pipetointitilavuus voi olla väärä
- Tarkista pipetointijärjestys ja reaktion järjestely.
Tarkista, että olet lisännyt 5 µl kontrollia/näytettä ja 20 µl qPCR-pääseosta. Tarkista kaikki pipetoidut tilavuudet silmämääräisesti.
Tarkista pipetit ja kalibroi ne tarvittaessa uudelleen ennen qPCR-vaiheen toistamista.

Mutanttikontrolli (MTC) monistuu liian aikaisin (FAM-monistuminen)

- a) Pipetointitilavuus voi olla väärä
- Tarkista pipetointijärjestys ja reaktion järjestely.
Tarkista, että olet lisännyt 5 µl kontrollia/näytettä ja 20 µl qPCR-pääseosta. Tarkista kaikki pipetoidut tilavuudet silmämääräisesti.
Tarkista pipetit ja kalibroi ne tarvittaessa uudelleen ennen qPCR-vaiheen toistamista.
- b) Monistumiskäyrä voi olla virheellinen
- Tarkista, onko vastaavassa monistumisessa poikkeavia käyriä. Suorita PCR-ajo uudelleen.
- c) Liuskaputket ja/tai näytetunnukset ovat vaihtuneet keskenään
- Tarkista pipetointijärjestys ja reaktion järjestely.
Suorita PCR-ajo uudelleen.

Kommentteja ja ehdotuksia

Villityypin kontrolli (WTC) monistuu liian aikaisin (FAM-monistuminen)

- a) Reaktioseos on hajonnut Säilytä sarjan sisältö -30...-15 °C:ssa ja suojaa reaktioseokset valolta.
Tarkista säilytysolosuhteet ja reagenssien viimeinen käyttöpäivä (katso etiketti) ja toista PCR-ajo tarvittaessa uudella sarjalla.
- b) Pipetointitilavuus voi olla väärä Tarkista pipetointijärjestys ja reaktion järjestely.
Tarkista, että olet lisännyt 5 µl kontrollia/näytettä ja 20 µl qPCR-pääseosta. Tarkista kaikki pipetoidut tilavuudet silmämääräisesti.
Tarkista pipetit ja kalibroi ne tarvittaessa uudelleen ennen qPCR-vaiheen toistamista.
- c) Liuskaputket ja/tai näytetunnukset ovat vaihtuneet keskenään Tarkista pipetointijärjestys ja reaktion järjestely.
Suorita PCR-ajo uudelleen.
- d) Monistumiskäyrä voi olla virheellinen Tarkista, onko vastaavassa monistumisessa poikkeavia käyriä.
Suorita PCR-ajo uudelleen.

Kommentteja ja ehdotuksia

- e) Kulkeutumiskontaminaatio Vaihda kaikki kriittisen tärkeät reagenssit.
Toista koe käyttäen kaikista reagensseista uusia alikvootteja.
Käsittele näytteitä, sarjan osia ja kulutusosia suositeltujen menettelytapojen mukaisesti, jotta kulkeutumiskontaminaatiota ei tapahtuisi.
Varmista, että kärjet vaihdetaan eri reagenssien pipetoinnin välillä.

Villityypin kontrolli (WTC) monistuu liian aikaisin (FAM-monistuminen) ja mutanttikontrolli (MTC) ei monistu lainkaan tai monistuu vain vähän (FAM-monistuminen)

- a) Ristikontaminaatio Tarkista pipetointijärjestys ja reaktion järjestely.
Toista PCR-ajo.
- b) Reaktioseokset putkissa tai esiseoksessa ovat vaihtuneet keskenään Tarkista pipetointijärjestys ja reaktion järjestely.
Toista PCR-ajo.
- c) Liuskaputket ja/tai näytetunnukset ovat vaihtuneet keskenään Tarkista pipetointijärjestys ja reaktion järjestely.
Suorita PCR-ajo uudelleen.

Kommentteja ja ehdotuksia

Villityypin kontrollit (WTC) epäonnistuvat usein, koska taustamonistumista tapahtuu paljon testin validiustavoitteen alapuolella (C_T)

Vika Rotor-Gene Q MDx -instrumentissa	Tarkista instrumentin ylläpitolokit. Esimerkiksi virheellisesti kohdistettu linssi voi saada aikaan suuremman taustan. Jos linssin kohdistus ei kuulu ylläpitosuunnitelmaan, pyydä lisäohjeita ja apua QIAGENin teknisistä palveluista.
---------------------------------------	---

Ajo epäonnistui, koska fluoresenssisignaali kontrolleissa ja/tai näytteissä ei ollut johdonmukainen (vaikuttaa kaikkiin putkiin)

Vika Rotor-Gene Q MDx -instrumentin lisävarusteissa	Tarkista instrumentin ylläpitolokit. 72-kuoppainen roottori on ehkä viallinen.
---	--

Jos ongelman syyksi ei voida määrittää mitään "Ongelmien ratkaisu" -kohdassa mainittua syytä, tai jos ongelma ei ratkea ehdotetuilla korjaavilla toimilla, kysy neuvoja QIAGENin teknisestä palvelusta.

Laadunvarmistus

QIAGENin ISO-sertifioidun laadunvarmistusjärjestelmän mukaisesti jokainen *ipsogen* CALR RGQ PCR -sarjan erä testataan määrättyjen vaatimusten mukaisesti tuotteiden yhdenmukaisen laadun takaamiseksi.

Valmiin sarjan laadunvarmistus on tehty Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM -instrumentilla. Tämä sarja on valmistettu ISO 13485 -standardin mukaisesti. Analyysin sertifikaatit ovat saatavana pyydetessä osoitteessa **www.qiagen.com/support**.

Rajoitukset

Tämä sarja on tarkoitettu ammattikäyttöön.

Tuotetta saavat käyttää vain asianmukaisesti opastetut, molekyylibiologian tekniikoihin koulutetut ja tämän nimenomaisen tekniikan tuntevat henkilöt.

Tätä sarjaa on käytettävä tämän käyttöoppaan ohjeiden mukaisesti yhdessä validoidun instrumentin kanssa, joka on kuvattu kohdassa "Tarvittavat materiaalit jotka eivät kuulu toimitukseen" sivulla 15.

Kaikki *ipsogen* CALR RGQ PCR -sarjan mukana toimitetut reagenssit on tarkoitettu käytettäväksi ainoastaan muiden samaan sarjaan sisältyvien reagenssien kanssa. Tämä saattaa vaikuttaa suorituskykyyn.

Ota huomioon pakkauksen etiketissä ilmoitetut vanhenemispäivämäärät. Älä käytä vanhentuneita komponentteja.

ipsogen CALR RGQ PCR -sarja on validoitu vain kokoverelle, joka on antikoaguloitu 2K EDTA:lla.

ipsogen CALR RGQ PCR -sarja on validoitu vain QIASymphony DSP DNA Mini Kit -sarjan (luettelonro. 937236) tai QIAamp DSP DNA Blood Mini Kit -sarjan (luettelonro. 61104) kanssa käytettäväksi.

Vain Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM (PCR-ajoa varten) ja QIASymphony SP (näytteen valmistelua varten) on validoitu.

Tämän tuotteen off label -käyttö ja/tai komponenttien muokkaaminen mitätöi QIAGENin vastuun.

Saatu diagnostinen tulos on tulkittava yhdessä muiden kliinisten löydösten tai laboratoriolöydösten kanssa. Jos näytteen *CALR*-tila on "No Mutation Detected" (Mutaatiota ei havaittu), se merkitsee, että vain yhtä tässä käyttöoppaassa kuvattua 36 mutaatiosta ei havaittu (katso Taulukko 1) – sarjan herkkyuden asettamissa rajoissa – tai että mutaatioita Tyyppi 23 ja Tyyppi 27 ei havaittu (katso "Suoritusarvot/Spesifisyys" sivulla 68). Tämä ei estä muiden *CALR*-mutaatioiden läsnäoloa.

Käyttäjän vastuulla on validoida järjestelmän suorituskyky kaikissa niissä laboratoriossa käytetyissä menetelmissä, joita QIAGENin tekemät suorituskykytutkimukset eivät kata.

Suoritusarvot

LOB (Limit of Blank)

LOB-arvo määritettiin CLSI/NCCLS EP-17-A2 -standardin (8) mukaisesti terveiltä luovuttajilta otetuista kokoverinäytteistä, joiden CALR-tila oli villityypinen (5 näytettä, 60 mittaus-/reagenssieriä, käytettyjä *ipsogen* CALR RGQ PCR -sarjaeria oli 2). LOB määritettiin jokaisen testin osalta pienimpänä saatuna LOB-arvona.

LOB-tulosten yhteenveto on Taulukossa 5.

Taulukko 5. *ipsogen* CALR RGQ PCR -sarjan LOB-tulosten yhteenveto

CALR-testi	LOB (Limit of Blank) (C_T FAM -arvot)
TYPE 1	35,24
TYPE 2	45,00
CLAMP 1	40,01
CLAMP 2	45,00
CLAMP 3	45,00
CLAMP 4	45,00
CLAMP 5	38,90

Havaitsemisraja

Havaitsemisraja (LOD) määritettiin "Probit approach" -menetelmällä, joka on kuvattu standardissa CLSI/NCCLS EP-17-A2 (8). Tässä tutkimuksessa analysoitiin viisi alhaista mutaatiotasoa kolmesta itsenäisestä näytteestä (CALR-mutaatioposiitivisesta potilaasta uutettu gDNA, johon sekoitettiin villityypin DNA:ta). TYPE 1 ja TYPE 2 -testeillä tehtiin yhteensä

20 replikaattia laimennosta ja positiivista näytettä kohden, käyttäen 2 erää *ipsogen* CALR RGQ PCR -sarjaa.

Testin LOD-rajaksi määritettiin korkein LOD-arvo, joka saatiin kahdesta käytetystä olleesta erästä. Tuloksista käy ilmi, että analyttinen herkkyys Tyyppin 1 *CALR*-mutaation osalta on 0,60 % ja analyttinen herkkyys Tyyppin 2 *CALR*-mutaation osalta on 0,08 % (Taulukko 6).

Taulukko 6. *ipsogen* CALR RGQ PCR -sarjan havaitsemistulosten yhteenveto

CALR-testi	Havaitsemisraja
TYPE 1	0,60 %
TYPE 2	0,08 %

Input-DNA

ipsogen CALR RGQ PCR -sarjan kanssa käytettävä optimaalinen input-gDNA arvioitiin käyttäen yhtä sarjaerää ja kolmea *CALR*-positiivista näytettä (plasmideja, jotka on sekoitettu villityypin gDNA:n kanssa) ja yhtä *CALR*-negatiivista näytettä viidellä eri input-gDNA:lla. Tässä tutkimuksessa tehtiin 3 replikaattia per input-näyte ja per CALR-testi. Tulokset osoittivat, että optimoitu input käyttöä varten on 50 ng (10 ng/ μ l).

Toistettavuus ja uusittavuus

Tarkkuustutkimus tehtiin standardin CLSI/NCCLS EP5-A2 (9) mukaisesti. Kunkin CALR-testin tarkkuuden arviointiin käytettiin tiettyä *CALR*-mutaatiota: Tyyppi 1 testeissä TYPE 1, CLAMP 1 ja CLAMP 2; Tyyppi 2 testeissä TYPE 2 ja CLAMP 5; ja Tyyppi 28 testeissä CLAMP 3 ja CLAMP 4. Testaus tehtiin 3 mutaatiotasolla: 5 %, 25 % ja 50 % (plasmideita, jotka on sekoitettu villityypin gDNA:n kanssa). Kukin taso testattiin kaksi kertaa 49 ajolla, jotka tehtiin 20 päivän aikana, vähintään 73 mittauksella per mutaatiotaso ja per testi. Näissä kolmessa näytteessä kokonaistarkkuuden vaihtelukerroin (CV_{kokonais}) oli useimmissa testeissä alle 5 % (Taulukko 7).

Huomautus: CLAMP-testeissä kokonaistarkkuus voi vaihdella CALR-mutanttien välillä.

Taulukko 7. *ipsogen* CALR RGQ PCR -sarjan toistettavuus- ja uusittavuustulokset

CALR-testi	Mutaatiotaso	Mittausten lukumäärä	Sr*	Srr [†]	Yhteensä [‡]	CV _{yhteensä} [§]
TYPE 1	50 %	88	0,10	0,07	0,21	0,80
	25 %	88	0,10	0,07	0,20	0,76
	5 %	88	0,15	0,05	0,30	1,04
TYPE 2	50 %	80	0,11	0,08	0,21	0,85
	25 %	80	0,11	0,00	0,19	0,73
	5 %	80	0,12	0,08	0,27	0,95
CLAMP 1	50 %	106	0,14	0,13	0,27	1,05
	25 %	105	0,13	0,28	0,50	1,90
	5 %	106	0,20	0,37	0,55	1,92
CLAMP 2	50 %	84	0,13	0,31	0,59	2,24
	25 %	85	0,19	0,36	0,90	3,28
	5 %	82	0,37	0,59	1,27	4,16
CLAMP 3	50 %	84	0,49	0,52	2,33	8,04
	25 %	84	0,73	0,70	3,54	11,26
	5 %	84	1,28	3,18	5,70	15,03
CLAMP 4	50 %	73	0,22	0,33	1,32	4,46
	25 %	76	0,24	0,33	1,37	4,46
	5 %	73	0,26	0,37	1,59	4,66
CLAMP 5	50 %	100	0,17	0,17	0,66	2,52
	25 %	100	0,21	0,05	0,75	2,73
	5 %	104	0,39	0,55	0,94	3,04

* Sr: Toistettavuus keskihajontana ilmaistuna.

† Srr: Ajojen välinen uusittavuus keskihajontana ilmaistuna.

‡ Kokonaistarkkuus (instrumenttien välinen, käyttäjien välinen ja erien välinen, keskihajontana ilmaistuna).

§ Kokonaistarkkuuden vaihtelukeroin.

Häiritsevät aineet

Tutkimusjärjestely perustui NCCLS-standardissa EP07-A2 kuvattuihin suosituksiin (10). Seuraavat 17 verinäytteissä mahdollisesti olevaa ainetta valittiin niiden PCR-vaikutuksen tutkimiseksi: busulfaani, sitalopraamihydrobromidi, paroksetiinihydrokloridihemihydraatti, sertraliinihydrokloridi, fluoksetiinihydrokloridi, asetaminofeeni [parasetamoli], konjugoitumaton bilirubiini, kalium-EDTA, hemoglobiini [ihmisen], triglyseridit, lisinopriilidehydraatti, hydroksiurea, asetyyilisalisyylihappo, salisyylihappo, tiotepa, anagrelidi, alfa-2b-interferoni. Lisäksi arvioitiin yhden gDNA-uutto-prosessissa käytettävän aineen (proteiinaasi K) mahdollinen vaikutus.

Tulokset osoittivat, ettei millään näistä aineista ole häiritsevää vaikutusta.

Spesifisyys

ipsogen CALR RGQ PCR -sarjan spesifisyys arvioitiin testaamalla sarjan kykyä tunnistaa Tyypin 1 ja Tyypin 2 mutaatiot oikein sekä havaita kohdassa Taulukko 1 kuvatut mutaatiot.

Tyypin 1 ja Tyypin 2 mutaatioiden osalta tutkimus tehtiin gDNA-näytteillä, jotka uutettiin Philadelphia-negatiivista myeloproliferatiivista tautia sairastavien potilaiden kokoverestä pitoisuuksilla $\geq 16\%$, kun kyseessä on Tyypin 1 mutaatio ja $\geq 9\%$, kun kyseessä on Tyypin 2 mutaatio. Spesifisyys Tyypille 1 ja Tyypille 2 vahvistettiin: kaikki näytteet havaittiin ja tunnistettiin oikein.

Spesifisyys mutaatioille Tyyppeä 3–36 testattiin käyttämällä gDNA-näytteillä, jotka uutettiin Philadelphia-negatiivista myeloproliferatiivista tautia sairastavien potilaiden kokoverestä, kun sopiva potilas oli saatavilla (eli Tyyppeä 3, 4, 5, 24, 25, 27, 29). Niiden harvinaisten mutaatioiden osalta, joista ei saatu potilasnäytettä, spesifisyys arvioitiin käyttäen synteettistä materiaalia, joka koostui villityypin ihmis-gDNA:sta, johon sekoitettiin plasmidi-DNA:ta, jossa oli tunnettu CALR-mutaatio. Tämä tehtiin kliinisesti merkittävänä pitoisuuksina: $> 10\%$ mutaatioita (keskimääräinen pitoisuus on noin 30% mutaatiota).

Tulokset ilmentävät, että kaikki *CALR*-mutaatiot Tyyppeä 3–10 (jotka ovat yleisimmin tavattavia) tunnistuvat ainakin yhdessä *ipsogen CALR RGQ PCR* -sarjan testissä. Useimmat *CALR*-mutaatiot Tyyppeä 11–36 (esiintyvyys 0,3 %) tunnistuvat ainakin yhdessä *ipsogen CALR RGQ PCR* -sarjan testissä. Vain Tyypit 23 ja 27 jäävät sarjalta havaitsematta, ja Tyypit 22, 25, 26, 29 ja 30 tunnistuvat vain näytteissä, joissa on suuri *CALR*-alleelitaakka.

Tärkeä ilmoitus: Spesifisyystutkimus osoitti, että TYPE 1 -testi havaitsee Tyypin 5 ja Tyypin 17 mutaatiot. TYPE 2 -testi mahdollistaa Tyypin 10-, Tyypin 31- ja Tyypin 33–36 -mutaatioiden monistumisen. Tämä oli odotettavissa, mikä johtuu näiden *CALR*-mutaatiotyyppien sekvenssien suuresta samankaltaisuudesta (katso Taulukko 1), poikkeuksena Tyypin 17 -mutaatio. Siksi *ipsogen CALR RGQ PCR* -sarja ei kykene tunnistamaan eroa Tyypin 1 ja Tyypin 5/17 -mutaatioiden välillä, tunnistamaan eroa Tyypin 2 ja Tyypin 10/31/33–36 -mutaatioiden välillä. Tällä hetkellä jokaisen *CALR*-mutaation erottaminen ei ole tarpeen diagnoosin tai hoidon vuoksi, sillä suurin osa *CALR*-mutaatioista johtaa samankaltaisten mutatoituneiden *CALR*-proteiinien syntyyn.

Kliininen validointi ja menetelmän vertailu

Tämän tutkimuksen tarkoitus oli *ipsogen CALR RGQ PCR* -sarjan validointi normaaleissa käyttötilanteissa. Tutkimus arvioi sarjan kykyä tunnistaa Tyypin 1 ja Tyypin 2 *CALR*-mutaatiot näytekohortissa, joka koostui potilaista, joiden epäiltiin sairastavan myeloproliferatiivista tautia. Tämä validointitutkimus tehtiin gDNA-näytteillä, jotka uutettiin 227 potilaasta, joiden potilaista, joiden epäiltiin sairastavan myeloproliferatiivista tautia (mukaan lukien *CALR*-positiiviset ja *CALR*-negatiiviset näytteet).

ipsogen CALR RGQ PCR -sarjalla saatua gDNA-näytteiden *CALR*-tilaa vertailtiin erillisellä mutaationtunnistusmenetelmällä saatua *CALR*-tilaan. Kyseinen erillinen mutaationtunnistusmenetelmä perustui fragmenttikokojen analyysiin yhdistyneenä Sangerin kaksisuuntaiseen sekvensointimenetelmään. Jos tulokset olivat keskenään ristiriidassa, käytettiin kolmatta mutaationtunnistusmenetelmää, NGS-sekvensointia.

Taulukossa 8 on lueteltu kaikkien tässä tutkimuksessa käytettyjen näytteiden CALR-tila siten kuin se on saatu referenssimenetelmillä. Näytekohortissa on 54,6 % positiivisia näytteitä ja 45,4 % negatiivisia näytteitä. Positiivisista näytteistä määritettiin referenssimetodeilla 42,7 % Tyyppi 1 ja 33,1 % Tyyppi 2. Nämä suhteet vastaavat suhteita, jotka on kuvattu julkaisussa Klampfl et al. (5), eli 53 % Tyyppiä 1 ja 31,7 % Tyyppiä 2 (katso Taulukko 1).

Taulukko 8. Koko kohortin CALR-mutaatiotila referenssimenetelmillä määritettynä: fragmenttikoon analyysi, Sangerin kaksisuuntainen sekvensointi ja NGS-analyysi

CALR-tila	Numero
Tyyppi 1 mutaatio	53
Tyyppi 2 mutaatio	41
Tyyppi 1 ja Tyyppi 2	1
Muut CALR-mutaatiot	29
CALR-mutaatiopositiivinen	124 (54,6 %)
CALR-mutaationegatiivinen	103 (45,4 %)
Näytteitä yhteensä	227

Kaikki kohortin näytteet, joille määritettiin CALR-mutaatiotilaksi Tyyppi 1 ja/tai Tyyppi 2 tunnistuivat oikein *ipsogen* CALR RGQ PCR -sarjalla. *ipsogen* CALR RGQ PCR -sarja määrittä kahteen näytteeseen virheellisesti Tyyppi 1 mutaation: toisessa näytteessä oli referenssimenetelmillä määritetty Tyyppi 5 mutaatio, toisessa näytteessä oli määritetty mutaatio, jota ei ole kuvattu julkaisussa Klampfl et al. (5). Sarja määrittä myös Tyyppi 2 mutaation virheellisesti yhteen näytteeseen, jonka oli referenssimenetelmillä määritetty sisältävän mutaation, jota ei ole kuvattu julkaisussa Klampfl et al. (5). *In silico* -analyysi osoitti, että nämä ristiriitaiset näytteet johtuvat todennäköisesti sekvenssien suuresta samankaltaisuudesta näiden mutaatioiden ja Tyyppi 1 tai Tyyppi 2 mutaatioiden välillä.

Täten kokonaiskonkordanssi Tyypin 1 ja Tyypin 2 mutaatioiden tuloksista *ipsogen* CALR RGQ PCR -sarjalla yhdistettynä fragmenttikokoanalyysillä/Sangerin sekvensoinnilla/NGS-sekvensoinnilla saatuihin tuloksiin on 98,7 % (luottamusväli [96,2 %; 99,5 %]). *ipsogen* CALR RGQ PCR -sarjan sensitiivisyys ja spesifisyys Tyypin 1 ja Tyypin 2 CALR-mutaatioille yhdessä ovat 100 % (luottamusväli [96,2 %; 100 %] ja 97,7 % [93,5 %; 99,5 %]) (Taulukko 9).

Taulukko 9. Yhteenveto suorituskytuloksista Tyypin 1 ja Tyypin 2 CALR-mutaatiot yhdistettynä

Muuttuja	Arvio	95 %:n luottamusväli
Kokonaiskonkordanssi	98,7 %	[96,2 % ; 99,7 %]
Herkkyys	100 %	[96,2 % ; 100 %]
Spesifisyys	97,7 %	[93,5 % ; 99,5 %]

Kirjallisuusviitteet

1. James, C., et al. (2005) A unique clonal JAK2 mutation leading to constitutive signalling causes polycythaemia vera. *Nature* **434**, 1144.
2. Levine, R.L., et al. (2005) Activating mutation in the tyrosine kinase JAK2 in polycythemia vera, essential thrombocythemia, and myeloid metaplasia with myelofibrosis. *Cancer Cell* **7**, 387.
3. Kralovics, R., et al. (2005) A gain of function mutation of JAK2 in myeloproliferative disorders. *N. Engl. J. Med.* **352**, 1779.
4. Baxter, E.J., et al. (2005) Acquired mutation of the tyrosine kinase JAK2 in human myeloproliferative disorders. *Lancet* **36**, 1054.
5. Klampfl, T., et al. (2013) Somatic mutations of calreticulin in myeloproliferative neoplasms. *N. Engl. J. Med.* **369**, 2379.
6. Nangalia, J., et al. (2013) Somatic CALR mutations in myeloproliferative neoplasms with nonmutated JAK2. *N. Engl. J. Med.* **369**, 2391.
7. Arber, D.A., et al. (2016) The 2016 revision to the World Health Organization (WHO) classification of myeloid neoplasms and acute leukemia. *Blood* **127**, 2391.
8. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) (2012). *Evaluation of Detection Capability for Clinical Laboratory Measurement Procedures: Approved Guideline*, 2nd ed. CLSI Document EP17-A2. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute (formerly NCCLS).

9. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) (2004). *Evaluation of Precision Performance of Quantitative Measurement Methods: Approved Guideline*, 2nd ed. CLSI Document EP5-A2. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute (formerly NCCLS).
10. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) (2005). *Interference Testing in Clinical Chemistry: Approved Guideline*, 2nd ed. CLSI Document EP07-A2. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute (formerly NCCLS).

Symbolit

Pakkauksessa ja etiketeissä saattaa näkyä seuraavia symboleita:

Symboli

Symbolin määritelmä



Luettelonumero



Valmistaja



Materiaalinumero

R_n

R tarkoittaa käsikirjan versiota ja n on versionumero



Eränumero



GTIN-numero



Diagnostinen in vitro -lääkintälaite

Symboli**Symbolin määritelmä**



Eurooppalaista vaatimustenmukaisuutta ilmaiseva CE-merkki



Viimeinen käyttöpäivä



<N>

Sisältää reagensseja, jotka riittävät N reaktioon



Lämpötilarajoitus



Katso käyttöohjeet



Säilytettävä auringonvalolta suojattuna

Tilaustiedot

Tuote	Sisältö	Kataloginumero
<i>ipsogen</i> CALR RGQ PCR Kit (24)	24 reaktiolle: CALR-villityypin kontrolli, CALR-mutanttikontrolli, CALR TYPE 1 -reaktioseos, CALR TYPE 2 -reaktioseos, CALR CLAMP 1 -reaktioseos, CALR CLAMP 2 -reaktioseos, CALR CLAMP 3 -reaktioseos, CALR CLAMP 4 -reaktioseos, CALR CLAMP 5 -reaktioseos, Taq DNA -polymeraasi, TE-puskuri laimentamista ja NTC:tä varten	674023
Rotor-Gene Q MDx ja lisävarusteet		
Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM Platform	Reaaliaikainen PCR-sykleri ja HRM-analysaattori, jossa on 5 kanavaa (vihreä, keltainen, oranssi, punainen ja viininpunainen) sekä HRM-kanava, kannettava tietokone, ohjelmisto ja varusteet: sisältää 1 vuoden takuun osien rikkoutumisen ja valmistusvirheiden varalta, ei sisällä asennusta ja koulutusta	9002032

Tuote	Sisältö	Kataloginumero
Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM System	Reaaliaikainen PCR-sykleri ja HRM-analysaattori, jossa on 5 kanavaa (vihreä, keltainen, oranssi, punainen ja viininpunainen) sekä HRM-kanava, kannettava tietokone, ohjelmisto ja varusteet: sisältää 1 vuoden takuun osien rikkoutumisen ja valmistusvirheiden varalta, asennus ja koulutus	9002033
Loading Block 72 x 0.1 ml Tubes	Alumiinilaatta manuaalisen reaktion suorittamiseksi sekä yksikanavainen pipetti; 72 x 0,1 ml:n putkea	9018901
72-Well Rotor	Strip Tubes and Caps 0.1 ml -liuskaputkien ja korkkien säilytystä varten; vaatii Locking Ring 72-Well Rotor -roottorin	9018903
Locking Ring 72-Well Rotor	Strip Tubes and Caps 0.1 ml -liuskaputkien ja korkkien lukitsemiseksi 72-Well Rotor -roottoriin	9018904
Rotor Holder	Metalliton vapaasti seisova pidike putkien ja Rotor-Disc®-levyjen kokoamiseksi roottoreihin	9018908
Strip Tubes and Caps, 0.1 ml (250)	250 liuskaa 4 putkessa ja korkit 1 000 reaktiota varten	981103
Strip Tubes and Caps, 0.1 ml (2500)	10 x 250 neliputkista liuskaa sekä korkit 10 000 reaktiota varten	981106

Tuote	Sisältö	Kataloginumero
QIASymphony SP ja lisävarusteet		
QIASymphony SP System	QIASymphony-näytteenpreparointi-moduuli: sisältää asennuksen ja koulutuksen sekä 1 vuoden takuun osien rikkoutumisen ja valmistusvirheiden varalle	9001751
QIASymphony SP	QIASymphony-näytteenpreparointi-moduuli: sisältää 1 vuoden takuun osien rikkoutumisen ja valmistusvirheiden varalle	9001297
Sample Prep Cartridges, 8-well (336)	8-kuoppaiset näytteenpreparointi-kasetit QIASymphony SP:n kanssa käytettäväksi	997002
8-Rod Covers (144)	8-sauvaiset kannet QIASymphony SP:n kanssa käytettäväksi	997004
Filter-Tips, 200 µl, Qsym SP (1024)	Kertakäyttöiset suodatinkärjet, telineessä; (8 × 128). Käytettäväksi QIAcube®- ja QIASymphony SP/AS -instrumenttien kanssa	990332
Filter-Tips, 1500 µl, Qsym SP (1024)	Kertakäyttöiset suodatinkärjet, telineessä; (8 × 128). Käytettäväksi QIASymphony SP/AS -instrumenttien kanssa	997024
Tube Insert 3b, 2 ml, v2, sample carrier, Qsym	Toisioputkisovitin (2 ml:n kierrekorkkiputkille) käytettäväksi QIASymphony-putkikuljettimessa	9242083

Tuote	Sisältö	Kataloginnumero
Elution Microtubes CL (24 × 96)	Ei-steriilit polypropyleeniputket (enimmäiskapasiteetti 0,85 ml, säilytyskapasiteetti vähemmän kuin 0,7 ml, eluutiokapasiteetti 0,4 ml); 2 304 kpl 96 kpl:een telineissä; sisältää korkkiliuskat	19588
Liittyvät tuotteet		
QIAamp DSP DNA Blood Mini Kit (50)	50 preparaatiota varten: QIAamp Mini Spin Columns -putket, puskurit, reagenssit, putket, VacConnector-liittimet	61104
QIASymphony DSP DNA Mini Kit (192)	192 preparaatiota, kukin 200 µl: Sisältää 2 reagenssikasettia ja entsyymitelinettä tarvikkeineen.	937236
RNase A (17,500 U)	2,5 ml (100 mg/ml; 7 000 yksikköä/ml, liuos)	19101

Voimassa olevat lisenssitiedot ja tuotekohtaiset vastuuvapauslausekkeet ovat saatavilla tuotekohtaisista QIAGEN-sarjojen käyttöoppaista tai käsikirjoista. QIAGEN-sarjojen käsikirjat ja käyttöoppaat löytyvät osoitteesta www.qiagen.com, tai niitä voi tiedustella QIAGENin teknisestä huollosta tai paikalliselta jälleenmyyjältä.

Tämä tuote on tarkoitettu käytettäväksi in vitro -diagnoosituotteissa. QIAGEN-tuotteiden jälleenmyynti, muokkaus jälleenmyyntiä varten tai käyttö kaupallisten tuotteiden valmistukseen on kielletty ilman QIAGENin kirjallista lupaa.

Tässä asiakirjassa olevia tietoja saatetaan muuttaa ilman erillistä ilmoitusta. QIAGEN ei ole vastuussa mistään tässä asiakirjassa mahdollisesti olevista virheistä. Tämän asiakirjan uskotaan olevan julkaisuohjeiden kattava ja tarkka. QIAGEN ei missään tapauksessa ole vastuussa satunnaisista, erityisistä, monenkertaisista tai seurannaisvahingoista, jotka liittyvät tämän asiakirjan käyttöön tai ovat seurausta sen käytöstä.

QIAGEN-tuotteille on myönnetty takuu siitä, että ne ovat ilmoitettujen ominaisuuksiensa mukaisia. QIAGENin ainoa velvollisuus ja asiakkaan saama ainoa korvaus rajoittuu tuotteiden vaihtamiseen veloituksetta tuotevirhetapauksissa tai jos tuote ei toimi takuun kertomalla tavalla.

CALR-mutaatio ja sen käyttö on suojattu patenttioikeuksilla, mukaan lukien eurooppalainen patentti EP2808338 ja sen ulkomaiset vastineet. Tämän tuotteen ostaminen ei anna oikeutta sen käyttöön CALR-kohtaisten lääkkeiden kliinisissä lääketutkimuksissa. QIAGEN kehittää nimenomaisia lisenssiohjelmia tällaisia tarkoituksia varten. Ota yhteys QIAGEN Corporate Business Development -osastoon osoitteessa bd@qiagen.com.

Tavaramerkit: QIAGEN[®], Sample to Insight[®], QIAamp[®], QIAcube[®], QIAasymphony[®], ipsogen[®], Rotor-Gene[®], Rotor-Gene AssayManager[®] (QIAGEN-ryhmä); BHQ[®], Black Hole Quencher[®] (LGC Biosearch); FAM[™], HEX[™], SYBR[®] (Life Technologies, Inc.); GenBank[®] (National Center for Biotechnology Information); Sarstedt[®] (Sarstedt AG and Co.).

ipsogen CALR RGQ PCR -sarjaa koskeva rajoitettu lisenssisopimus

Tämän tuotteen käyttö tarkoittaa ostajan tai käyttäjän suostumusta noudattaa seuraavia ehtoja:

1. Tuotetta saa käyttää ainoastaan tämän Käyttöohjeen (Käsikirja) ohjeiden mukaan ja tuotteen kanssa saa käyttää vain sarjan sisältämiä komponentteja. QIAGEN ei myönnä lisenssiä mihinkään aineettomaan omaisuuteensa, eikä tämän sarjan oheisia komponentteja saa käyttää tai liittää muihin komponentteihin, jotka eivät sisälly tähän sarjaan, ellei tässä Käyttöohjeessa (Käsikirjassa) ja osoitteessa www.qiagen.com olevissa lisäprotokollissa ole toisin mainittu.
2. QIAGEN ei takaa kuin nimenomaisissa lisensseissään, että tämä sarja ja/tai sen käyttäjä(t) eivät loukkaa kolmannen tahon oikeuksia.
3. Tämä sarja ja sen komponentit on lisensoitu kertakäyttöön, eikä niitä saa käyttää uudelleen, kunnostaa tai myydä eteenpäin.
4. QIAGEN sanoutuu irti muista suorista ja epäsuorista lisensseistä.
5. Sarjan ostaja ja käyttäjä suostuvat siihen, että he eivät ryhdy tai anna kenellekään toiselle lupaa ryhtyä toimenpiteisiin, jotka saattavat aiheuttaa tai edistää mitään yllä kiellettyä toimintaa. QIAGEN voi kääntyä minkä tahansa tuomioistuimen puoleen pannakseen täytäntöön tämän rajoitetun lisenssisopimuksen kiellot ja saada hyvityksen kaikista valmistelu- ja oikeuskuluista (asianajopalkkiot mukaan lukien), kun tarkoituksena on tämän rajoitetun lisenssisopimuksen tai ipsogen CALR RGQ PCR -sarjaan ja/tai sen komponentteihin liittyvien immateriaalioikeuksien täytäntöönpano.

Päivitetty lisenssiehdot saa osoitteesta www.qiagen.com.

HB-2198-002 1103549 157025473 04-2017

© 2016-2017 QIAGEN, kaikki oikeudet pidätetään.

