

Příručka (ELN*) pro sad u *ipsogen*[®] WT1 ProfileQuant[®]



Verze 1

IVD

In vitro diagnostikum pro kvantitativní stanovení

Pro použití s přístroji Rotor-Gene[®] Q, ABI PRISM[®] 7900HT
SDS, Applied Biosystems[®] 7500 Real-Time PCR System a
LightCycler[®]



REF

676923



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

R2

MAT

1072503CS

ELN LeukemiaNet[®]
European



Qiagen Sample and Assay Technologies

QIAGEN je vedoucím poskytovatelem inovativních technologií přípravy vzorků a analýz, které umožňují izolaci a detekci obsahu jakéhokoliv biologického vzorku. Naše pokročilé, vysoce kvalitní produkty a služby Vám zajistí spolehlivý výsledek.

QIAGEN určuje standardy pro:

- v purifikaci DNA, RNA a proteinů
- v analýzách nukleových kyselin a proteinů
- ve výzkumu microRNA a RNAi
- v automatizaci technologií pro přípravu vzorků a jejich analýz.

Naší misí je umožnit Vám dosáhnout vynikajících výsledků a technických úspěchů. Více informací naleznete na www.qiagen.com.

Obsah

Souhrn a vysvětlení	4
Princip metody	5
Dodávané materiály	8
Obsah soupravy	8
Požadované materiály, které nejsou součástí dodávky	9
Varování a bezpečnostní opatření	10
Všeobecné pokyny	10
Uchovávání a nakládání s reagensy	11
Postup	12
Příprava vzorku RNA	12
Protokol: Doporučená standardizovaná zpětná transkripce EAC	12
Protokol: qPCR na přístrojích Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM nebo Rotor-Gene Q 5plex HRM se 72zkumavkovým rotorem	15
Protokol: qPCR na ABI PRISM 7900HT SDS, Applied Biosystems 7500 Real-Time PCR System a přístroj LightCycler 480	19
Protokol: qPCR na přístroji LightCycler 1.2	24
Interpretace výsledků	28
Princip datové analýzy	28
Dopady	29
Řešení problémů	30
Řízení jakosti	34
Omezení	34
Výkonnostní charakteristiky	34
Neklinické studie	34
Klinické studie	36
Odkazy	39
Symboly	40
Kontaktní informace	41
Informace o způsobu objednávání	42

Použití

Sada *ipsogen WT1 ProfileQuant* je určena pro kvantifikaci genových transkripcí Wilmsova tumoru (WT) v celkové RNA izolované od pacientů s akutní myeloidní leukémií (AML). Získané výsledky jsou určeny jako pomůcka při sledování časné odezvy na léčbu a pro minimální zbytkové onemocnění (MRD).

Souhrn a vysvětlení

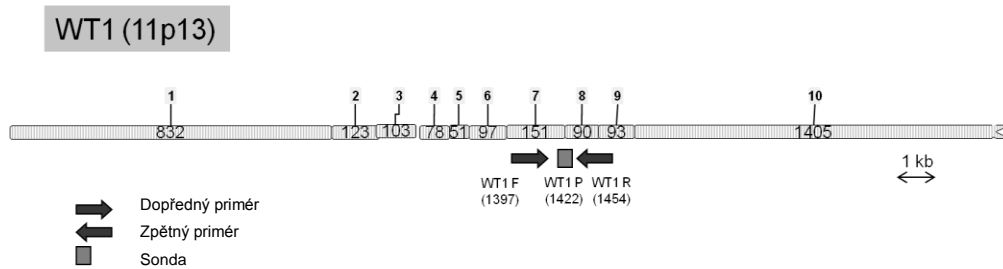
Současné léčebné protokoly akutní myeloidní leukémie (AML) jsou založeny na prognostických faktorech, které přispívají ke stratifikaci terapie (1, 2). Dosud zjištěné klíčové prognostické faktory zahrnutí charakteristiky před léčbou, jako jsou věk a počet bílých krvinek (WBC) společně s karyotypem pacienta a přítomností specifických genomických mutací, jako jsou FLT3 a NPM1 (3, 4). Morfologická odezva na indukční chemoterapii slouží jako další prediktivní faktor, který byl zabudován do schémat stratifikace aktuálního rizika použitého pro informování o rozhodnutích ohledně konsolidační terapie, zejména u alogenního transplantátu (5). Zatímco tyto parametry rozlišují skupiny pacientů podle široce odlišných rizik relapsu, je tu naléhavá potřeba vyladit stratifikaci rizika tak, aby identifikovala spolehlivěji ty pacienty, kteří budou mít z transplantátu prospěch s největší (nejmenší) pravděpodobností. Řada studií zvýraznila potenciál sledování MRD pomocí kvantitativní polymerázové řetězové reakce v reálném čase (qPCR) s cílem detekovat cíle specifické pro leukémii, tj., fúzní genové (FG) transkripce, jako jsou PML_RARA, CBFβ-MY11, AML1-ETO (RUNX1-RUNX1T1) nebo mutace ve specifických genech jako NPM1. Umožňuje to identifikovat pacienty s nejvyšším rizikem relapsu, a proto indikuje kandidáty pro časnou léčebnou intervenci (6).

Přibližně polovina pacientů s AML postrádá vhodný cíl specifický pro leukémii a je tu značný zájem na rozvoji alternativních přístupů, které by umožnily sledování MRD, jež budou platit pro mnohem větší podíl pacientů. Jedna strategie spočívá v použití průtokové cytometrie k identifikaci a monitorování aberantních fenotypů spojených s leukémií, ale zatímco tato strategie má širokou použitelnost, je to technicky náročné (6). Jiný přístup zahrnuje používání qPCR k detekci transkriptů, které jsou vysoce nadměrně exprimovány v AML blastech vzhledem k normální krvi a kostní dřeni s největší pozorností zaměřenou na gen *WT1* (6).

Gen *WT1* je umístěn na chromozomu 11p13, kóduje transkripční faktor zinkových prstů a byl původně ztotožněn s jeho podílem na patogenezi Wilmsova tumoru (7). Ukázalo se, že gen *WT1* bude vysoce exprimován v několika hematopoetických tumorech včetně AML (7, 8). Přestože jsou i mechanismy vedoucí k nadměrné expresi *WT1* i nadále nedostatečně objasněné, tento jev lze využít jako marker, který signalizuje přítomnost, přetrvávání nebo opakovaného výskytu leukémické hematopoézy.

Princip metody

Technika qPCR umožňuje přesnou kvantifikaci výrobků PCR během exponenciální fáze procesu amplifikace PCR. Údaje z PCR lze získat rychle bez zpracování po PCR detekcí fluorescenčních signálů v reálném čase během a/nebo po cyklování PCR, čímž se drasticky snižuje riziko kontaminace výrobku PCR. V současnosti jsou k dispozici 3 hlavní typy technik qPCR: analýza qPCR pomocí barviva SYBR® Green I, analýza qPCR používající hydrolyzační sondy a analýza qPCR pomocí hybridizačních sond.

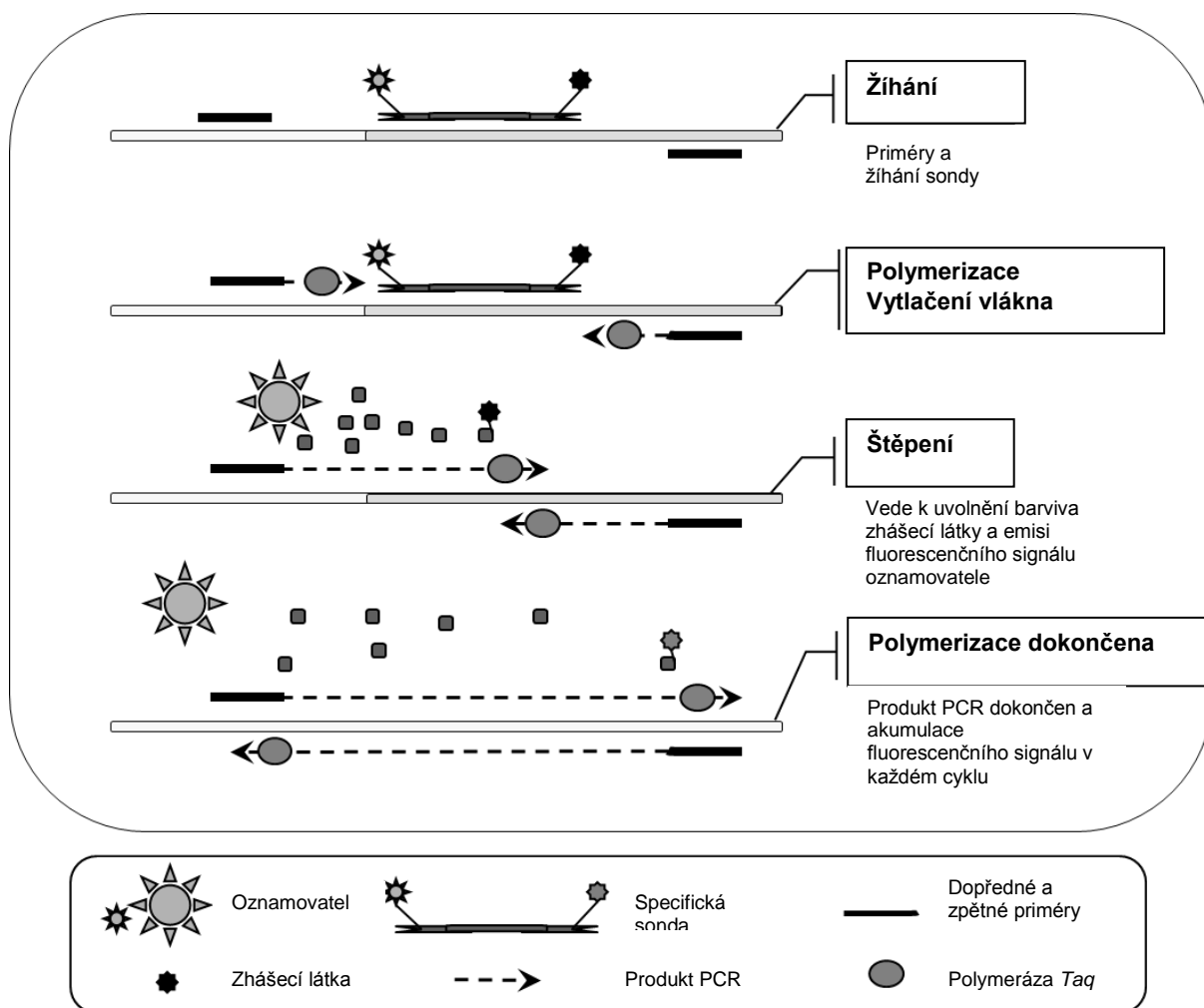


Obrázek 1. Schématický diagram transkriptu WT1 pokrytý priméry ELN qPCR a sestavou sond: WT1-ELN F–WT1-ELN P–WT1-ELN R. Číslo pod priméry a sondou odkazuje na jejich nukleotidovou polohu v normálním genovém transkriptu. Exon 5 může být případně rozštěpen.

Tato analýza využívá princip hydrolýzy oligonukleotidu dvojitého barviva qPCR. Během PCR dopředné a zpětné priméry hybridizují do specifické sekvence. Ve stejné směsi je obsažen oligonukleotid dvojitého barviva. Tato sonda, která se skládá z oligonukleotidu označeného barvivem 5' oznamovatele a za daným místem barvivem 3' zhášecí látky, hybridizuje do cílové sekvence v rámci výrobku PCR. Analýza qPCR se hydrolyzačními sondami využívá aktivitu exonukleázy 5'→3' polymerázy DNA *Thermus aquaticus* (*Taq*). Když je sonda nedotčená, blízkost paliva oznamovatele u barviva zhášecí látky způsobuje potlačení fluorescence oznamovatele primárně převodem energie Försterova typu.

Pokud je během PCR přítomen zájmový cíl, sonda specificky žihá mezi dopřednými a zpětnými místy priméru. Aktivita exonukleázy 5'→3' polymerázy DNA štěpí sondu mezi oznamovatele a zhášecí látku pouze v případě, když sonda hybridizuje na cíl. Fragmenty sondy jsou poté z cíle vytlačeny a polymerizace vlákna pokračuje. Konec sondy 3' je blokován, aby se zabránilo extenzi sondy během PCR (obrázek 2). Tento proces nastane v každém cyklu a nebude narušen exponenciální akumulací produktu.

Zvýšení fluorescenčního signálu je detekováno pouze v případě, že bude cílová sekvence komplementární se sondou, a tím bude během PCR amplifikována. Kvůli těmto požadavkům se nedetekuje nespécifickou amplifikací. Tak je zvýšení fluorescence přímo úměrné cílové amplifikaci během PCR.

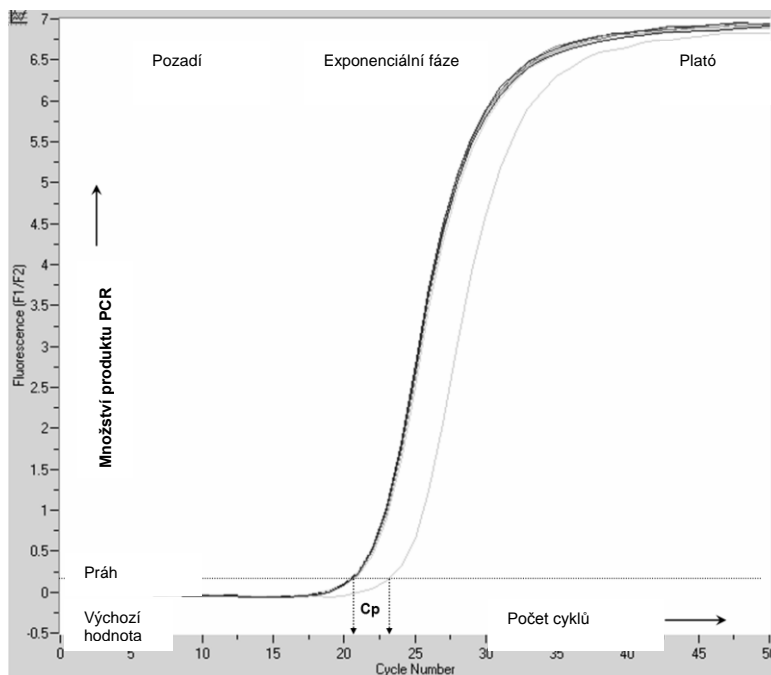


Obrázek 2. Princip reakce. Celková RNA se reverzně transkribuje a vytvořená cDNA je amplifikována pomocí PCR při využití páru specifických primérů a specifické vnitřní sondy s dvojnásobným barvivem (FAM™–TAMRA™). Sonda se váže na amplicon během každého korku žihání PCR. Když se *Taq* rozšíří z primérové vazby k ampliconu, vytlačí 5' konec sondy, který je poté degradován aktivitou 5'→3' exonukleázy polymerázy *Taq* DNA. Štěpení pokračuje, dokud zbývající sonda amplicon neroztaví. Tento proces uvolňuje do roztoku fluorofor a zhášecí látku, prostorově je odděluje a vede ke zvýšení fluorescence způsobené FAM a poklesem fluorescence pocházející z TAMRA.

Když se fluorescence vynese do grafu proti počtu cyklů, na obrázku 3 se zobrazí akumulace produktu PCR. Amplifikační křivka se skládá postupně z časné základní fáze (pod úrovní hladiny detekce přístroje), exponenciální fáze (nebo logaritmické fáze) a plató. Nejpresnější kvantitativní stanovení lze provádět pouze během exponenciální fáze. První cyklus, při němž může přístroj rozlišit fluorescenci generovanou amplifikací jako by byl nad signálem pozadí, se nazývá prahový cyklus (C_T) nebo křížový bod (C_p). Při výběru prahu v rámci logaritmicky lineární fáze je možné vypočítat skutečné množství výchozích startovních molekul, protože intenzita fluorescence je přímo úměrná množství produktu PCR v exponenciální fázi.

Ve fázi plató nedochází k žádnému významnému zvýšení množství produktu PCR. Je to hlavně díky depleci komponent PCR a opakovanému žihání vláken

produktu PCR způsobeného vysokou koncentrací koncových produktů, které brání dalšímu žihání priméru.



Obrázek 3. Snímání fluorescence během cyklování a následných fází amplifikace.

Nejpřímějším a nejpřesnějším přístupem pro analyzování kvantitativních dat je použít standardní křivku, která se připraví z řad ředění kontrolní šablony o známé koncentraci. Ta je známá jako "standardní křivka" nebo "absolutní" kvantifikace. Po amplifikaci řad standardního ředění se standardní křivka vytvoří vynesení logaritmu hodnoty výchozí kopie šablony proti C_p generovanému pro každé ředění. Vynesením těchto bodů vytvoří standardní křivku. Použití rovnice této standardní křivky dovoluje určení hodnoty výchozí kopie vzorků, které se budou kvantifikovat.

Sada WT1 ProfileQuant (ELN) zahrnuje plazmidy a priméry a směsi sond pro WT1 a ABL. Tyto komponenty byly validovány společně v kontextu kolaborativní studie vedené skupinou expertů z konsorcia European Leukemia Net. Analýza již dříve zveřejněná Van Dijkem a spolupracovníky konzistentně překonala jiné analýzy a je méně náchylná k mutacím AML díky své konfiguraci (9). Následně byla vybrána jako analýza ELN WT1. Sada *ipsogen* WT1 ProfileQuant je na této technice založena. V této sadě je endogenní kontrola (transkript ABL) amplifikována ze vzorku a rovněž i z transkriptu WT1. Jsou k dispozici standardní sériová ředění kontrol a WT1 cDNA a vytvořené standardní křivky umožňují přesný výpočet hodnoty kopie transkriptů WT1 a ABL v každém vzorku.

Dodávané materiály

Obsah soupravy

<i>ipsogen</i> WT1 ProfileQuant Kit		(24)
Katalogové č.		676923
Počet reakcí		24
ABL Control Gene Standard Dilution (Standardní ředění kontrolního genu ABL) (10^3 kopií/5 μ l)	C1-ABL	50 μ l
ABL Control Gene Standard Dilution (Standardní ředění kontrolního genu ABL) (10^4 kopií/5 μ l)	C2-ABL	50 μ l
ABL Control Gene Standard Dilution (Standardní ředění kontrolního genu ABL) (10^5 kopií/5 μ l)	C3-ABL	50 μ l
WT1 Profile Gene Standard Dilution (Standardní ředění kontrolního genu WT1) (10^1 kopií/5 μ l)	P1-WT1	50 μ l
WT1 Profile Gene Standard Dilution (Standardní ředění kontrolního genu WT1) (10^2 kopií/5 μ l)	P2-WT1	50 μ l
WT1 Profile Gene Standard Dilution (Standardní ředění kontrolního genu WT1) (10^3 kopií/5 μ l)	P3-WT1	50 μ l
WT1 Profile Gene Standard Dilution (Standardní ředění kontrolního genu WT1) (10^5 kopií/5 μ l)	P4-WT1	50 μ l
WT1 Profile Gene Standard Dilution (Standardní ředění kontrolního genu WT1) (10^6 kopií/5 μ l)	P5-WT1	50 μ l
Primers and Probe Mix ABL* (Priméry a směs sond ABL*)	PPC-ABL 25x	90 μ l
Primers and Probe Mix PPP-WT1 (ELN) [†] (Priméry a směs sond PPP-WT1 (ELN) [†])	PPP-WT1 (ELN) 25x	110 μ l
<i>ipsogen</i> WT1 ProfileQuant Kit Handbook (angličtina)		1

* Směs specifických zpětných a dopředných primérů pro kontrolní gen ABL (CG) plus specifická sonda FAM–TAMRA.

[†] Směs specifických zpětných a dopředných primérů pro gen WT1 (exon 1-2) plus specifická sonda FAM–TAMRA.

Poznámka: Standardní ředění a priméry a směsi sond před použitím krátce odstředíte.

Požadované materiály, které nejsou součástí dodávky

Při práci s chemikáliemi vždy používejte vhodný laboratorní plášť, rukavice na jedno použití a ochranné brýle. Další informace jsou uvedeny v příslušných bezpečnostních listech (BL), které lze získat od dodavatele produktu.

Reagencie

- Voda pro PCR bez nukleázy
- Reagencie pro reverzní transkripci: Validovanou reagencí je reverzní transkriptáza Superscript® II (nebo Superscript), obsahuje 5x pufr prvního vlákna, 100 mM DDT (Life Technologies, katalogové číslo 18064-022)
- Inhibitor RNázy: Validovanou reagencii je RNaseOUT™ (Life Technologies, katalogové číslo 10777-019)
- Sestava dNTP, úroveň pro PCR
- Náhodný hexanukleotidový primer
- MgCl₂
- Pufr a polymeráza DNA Taq: Validovanými reagenciemi jsou TaqMan® Universal PCR Master Mix (Master Mix PCR 2x) (Life Technologies, katalogové číslo 4304437) a LightCycler TaqMan Master (Master Mix PCR 5x) (Roche, katalogové číslo 04535286001)

Spotřební materiál

- Sterilní pipetovací špičky PCR odolné proti aerosolu neobsahující nukleázu s hydrofobními filtry
- 0,5ml nebo 0,2 ml zkumavky PCR neobsahující RNázu a DNázu
- Led

Zařízení

- Mikrolitrová pipeta* vyčleněná pro PCR (1–10 µl; 10–100 µl; 100–1000 µl)
- Stolní centrifuga* s rotorem pro 0,2 ml/0,5 ml reakční zkumavky a maximální otáčky dosáhnout 13.000–14.000 ot/min
- Příklad PCR pracující v reálném čase:* Systém Rotor-Gene Q 5plex HRM® nebo jiný přístroj Rotor-Gene; LightCycler 1.2 nebo 480; ABI PRISM 7900HT SDS; systém Applied Biosystems 7500 Real-Time PCR a s tím spojený specifický materiál
- Tepelný cyklovač nebo vodní lázeň (reverzní transkripční krok)

Poznámka: Ujistěte se, že byl kontrolován a kalibrován tepelný cyklovač a vodní lázeň podle doporučení výrobce.

Varování a bezpečnostní opatření

Pro diagnostické použití in vitro

Při práci s chemikáliemi vždy používejte vhodný laboratorní plášť, rukavice na jedno použití a ochranné brýle. Další informace jsou uvedeny v odpovídajících bezpečnostních listech (BL). Bezpečnostní listy jsou k dispozici online v pohodlném a kompaktním formátu PDF na stránkách www.qiagen.com/safety, kde můžete nalézt, zobrazit a vytisknout BL pro každou sadu QIAGEN a pro každou komponentu těchto sad.

Odpad ze vzorků a rozborů likvidujte podle místních bezpečnostních předpisů.

Všeobecné pokyny

Použití testů qPCR vyžaduje správnou laboratorní praxi včetně údržby zařízení, která jsou vyčleněna pro molekulární biologii, a je ve shodě s platnými předpisy a příslušnými standardy.

Tato sada je určena pro diagnostické použití in vitro. Reagencie a pokyny dodávané s touto sadou byly validovány pro optimální chování. Další ředění reagensů nebo pozměnění inkubačních časů a teplot může vést k chybným nebo rozporným údajům. Reagencie PPC-ABL a PPF-WT1 se mohou změnit, pokud budou vystaveny působení světla. Všechny reagencie byly specificky vytvořeny pro použití s tímto testem. Pro optimální chování testu by se neměly provádět žádné náhrady.

Stanovení úrovně transkripce pomocí qPCR vyžaduje jak reverzní transkripci mRNA, tak amplifikaci vytvořené cDNA pomocí PCR. Proto se musí celý postup rozborů provést za podmínky ne přítomnosti RNázy/DNázy.

Postupujte s maximální opatrností, aby nedošlo k následujícímu:

- Kontaminace RNázou/DNázou, která by mohla způsobit degradaci templátové mRNA a vytvořené cDNA
- Přenosová kontaminace mRNA nebo PCR s následným falešně pozitivním signálem

Proto doporučujeme následující.

- Použijte laboratorní vybavení zbavené nukleázy (např. pipety, pipetovací špičky, reakční lahvičky) a při provádění analýzy mějte nasazené rukavice.

- Použijte čerstvé pipetovací špičky odolné vůči aerosolu pro všechny pipetovací kroky, aby se zabránilo zkřížené kontaminaci vzorků a reagensů.
- Připravte hlavní směs před PCR s vyčleněnými materiály (pipety, špičky atd.) ve vyhrazeném místě, kam nebyly zavlečeny žádné matrice DNA (cDNA, DNA, plazmid). Dejte templát do samostatné zóny (nejlépe do samostatné místnosti) se specifickým materiálem (pipety, špičky atd.).
- Se standardními roztoky (C1–3 a P1–5) v oddělené místnosti.

Uchovávání a nakládání s reagensy

Sady se dodávají na suchém ledu a po doručení se musí uskladnit při teplotách od -30°C do -15°C .

- Minimalizujte expozici primérů a směsí sond (zkumavky PPC a PPP) působení světla.
- Před otevřením zkumavky jemně smíchejte a centrifugujte.
- Uložte všechny součásti sady do původních obalů.

Tyto podmínky uchovávání platí jak pro otevřené, tak neotevřené komponenty. Komponenty uchovávané za jiných podmínek, než jsou uvedeny a štítcích, nemusí řádně fungovat a mohou nepříznivě ovlivnit výsledky rozborů.

Data použitelnosti pro každou reagensii jsou vyznačena na štítcích individuálních komponent. Za správných podmínek uchovávání si produkt uchová vlastnosti až do data použitelnosti vytištěného na štítku.

Neexistují žádné zřejmé příznaky, které by upozorňovaly na nestabilitu tohoto produktu. Pozitivní a negativní kontroly by se u neznámých vzorků měly provádět současně.

Postup

Příprava vzorku RNA

Příprava RNA ze vzorků pacienta (kost nebo kostní dřeň) se musí provést validovaným postupem. Kvalita rozboru do velké míře závisí na kvalitě vstupní RNA. Proto doporučujeme kvalifikovat před analýzou čištěnou RNA elektroforézou agarózového* gelu nebo pomocí Agilent® Bioanalyzer®.

Protokol: Doporučená standardizovaná zpětná transkripce EAC

Věci, které je nutné udělat před zahájením

- Připravte dNTP, každý 10 mM. Uchovávejte v alikvotních množstvích při –20°C.
- Připravte náhodný hexanukleotidový primer, 50 mM. Uchovávejte v alikvotních množstvích při –20°C.
- Připravte MgCl₂, 50 mM. Uchovávejte v alikvotních množstvích při –20°C.

Postup

1. Nechte roztát všechny nezbytné komponenty a umístěte je na led.
2. Inkubujte 1 µg RNA (1–4 µl) po 10 minut při 70°C a okamžitě chlaďte na ledu přibližně 5 minut.
3. Krátce odstřed'ujte (přibližně 10 sekund, 10.000 ot/min) pro shromáždění kapaliny na dně zkumavky). Pak uchovávejte na ledu.
4. Připravte následující směs RT podle počtu zpracovávaných vzorků (tabulka 1).

* Při práci s chemikáliemi vždy používejte vhodný laboratorní plášť, rukavice na jedno použití a ochranné brýle.

Tabulka 1. Příprava směsi RT

Komponenta	Objem na vzorek (μ l)	Konečná koncentrace
Pufr prvního vlákna (dodávaný s reverzní transkriptázou Superscript II), 5x	4,0	1x
MgCl ₂ , 50 mM	2,0	5 mM
dNTP (10 mM každý, nutno připravit dříve a uchovávat při -20°C v alikvotních množstvích)	2,0	1 mM
DTT (100 mM, dodávaný s reverzní transkriptázou Superscript II)	2,0	10 mM
Inhibitor RNase (40 U/ μ l)	0,5	1 U/ μ l
Náhodný hexanukleotidový primer (100 μ M)	5,0	25 μ M
Superscript II (200 U/ μ l)	0,5	5 U/ μ l
Ohřátý vzorek RNA, (bude přidán v kroku 5)	1,0–4,0	50 ng/ μ l
Voda vhodná pro PCR bez nukleázy (bude přidána v kroku 5)	0,0–3,0	–
Konečný objem	20,0	–

5. Do každé zkušavky PCR pipetujte 16 μ l směsi RT. Pak přidejte 1–4 μ l (1 μ g) RNA (z kroku 3) a upravte objem na 20 μ l vodou vhodnou pro PCR bez nukleázy (viz tabulka 2).

Tabulka 2. Příprava reakce reverzní transkriptázy

Komponenta	Objem (μ l)
Směs RT	16,0
Ohříváný vzorek RNA (1 μ g)	1,0–4,0
Voda pro PCR bez nukleázy	0,0–3,0
Konečný objem	20,0

6. Dobře promíchejte a krátce odstředíte (přibližně 10 sekund, 10.000 ot/min) pro shromáždění kapaliny na dně zkumavky.
7. Inkubujte při 20°C 10 minut.
8. Inkubujte při 42°C na tepelném cyklovači po 45 minut, pak neprodleně při 99°C po 3 minuty.
9. Chladíte na ledu (pro zastavení reakce) po 5 minut.
10. Krátce odstředíte (přibližně 10 sekund, 10.000 ot/min) pro shromáždění kapaliny na dně zkumavky). Pak uchovávejte na ledu.
11. Naředíte konečnou cDNA pomocí 30 μ l vody vhodné pro PCR zbavené nukleázy, aby byl konečný objem 50 μ l.
12. Proveďte PCR podle následujících protokolů podle svého přístroje qPCR.

Poznámka: Tento protokol zpětné transkripce byl odvozen ze studií "Europe Against Cancer" (EAC) (Evropa proti rakovině) (10, 11).

Protokol: qPCR na přístrojích Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM nebo Rotor-Gene Q 5plex HRM se 72zkumavkovým rotorem

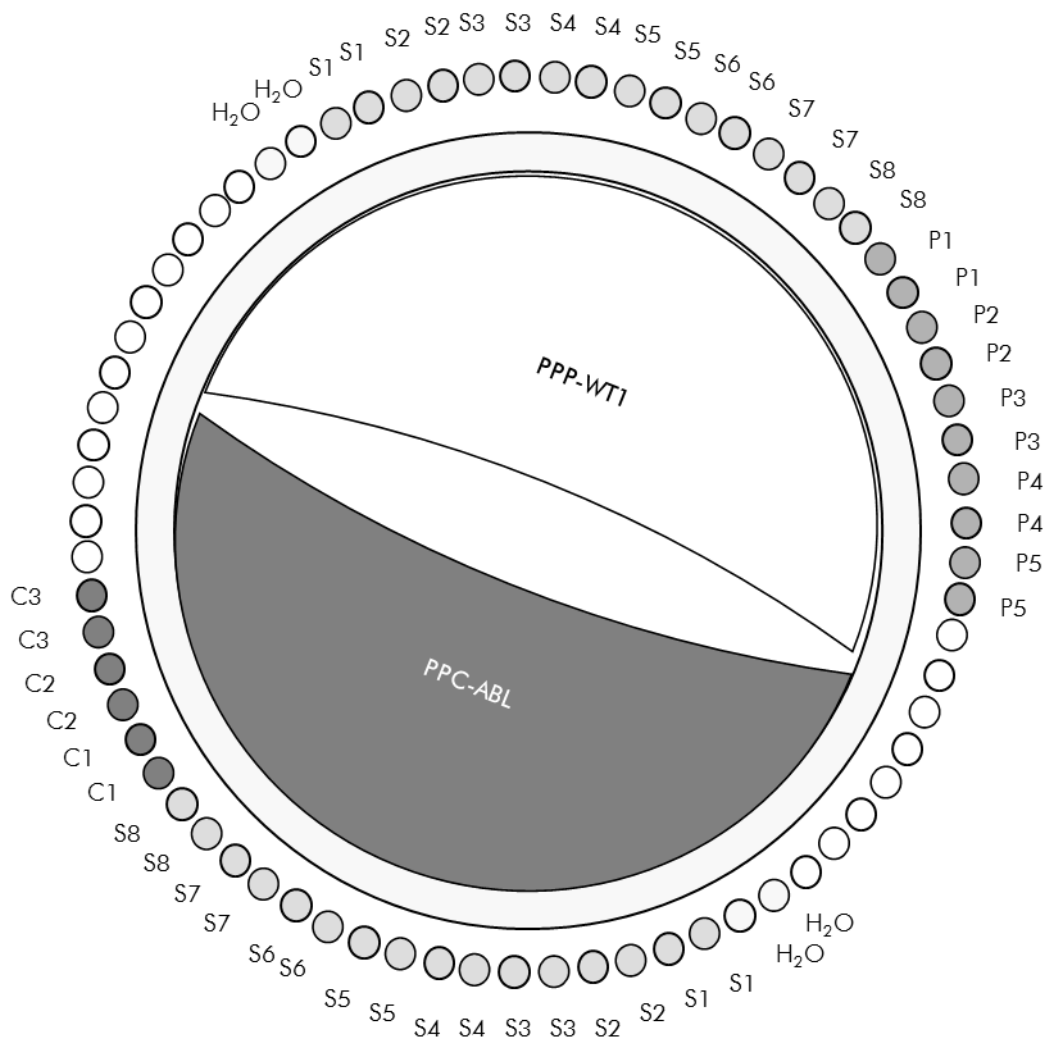
Při použití tohoto přístroje doporučujeme provádět všechna měření dvojmo, jak je uvedeno v tabulce 3.

Tabulka 3. Počet reakcí pro přístroje Rotor-Gene Q se 72zkumavkovým- rotorem

Vzorky	Reakce
S priméry ABL a směsí sond (PPC-ABL)	
n vzorků cDNA	n x 2 reakcí
Standard ABL	2 x 3 reakce (3 ředění každý jednotlivě testován dvojmo)
Kontrola vody	2 reakce
S priméry WT1 a směsí sond (PPC-WT1)	
n vzorků cDNA	n x 2 reakcí
Standard WT1	2 x 5 reakce (5 ředění každý jednotlivě testován dvojmo)
Kontrola vody	2 reakce

Zpracování vzorku na přístrojích Rotor-Gene Q se 72zkumavkovým rotorem

Doporučujeme testování 8 vzorků cDNA ve stejném experimentu s cílem optimalizovat použití standardů a primérů a směsí sond.



Obrázek 4. Navrhované nastavení rotoru pro každý experiment se sadou *ipsogen* WT1 ProfileQuant. P1–5: Standardy WT1; C1–3: Standardy ABL; S: vzorek cDNA; H₂O: kontrola vody.

Poznámka: Dbejte vždy na to, abyste testovaný vzorek umístili na rotoru do polohy 1. Jinak během kalibračního kroku přístroj kalibraci neprovede a budou pořízena nesprávná fluorescenční data.

Všechny ostatní pozice zaplňte prázdnými zkumavkami.

Přístroje Rotor-Gene Q se 72zkumavkovým rotorem

Poznámka: Všechny úkony provádějte na ledu.

Postup

1. Nechte roztát všechny nezbytné komponenty a umístěte je na led.
2. Připravte následující směs qPCR podle počtu zpracovávaných vzorků.
Všechny koncentrace platí pro konečný objem reakce.

Tabulka 4 popisuje pipetovací schéma pro přípravu jedné směsi reagensů vypočítané pro dosažení konečného reakčního objemu 25 μ l. Premix lze připravit podle počtu reakcí pomocí stejných primérů a směsi sond (buď PPC-ABL, nebo PPF-WT1). Zahrnuty jsou objemy navíc pro kompenzaci chyby při pipetování.

Tabulka 4. Příprava směsi qPCR

Komponenta	1 reakce (μ l)	ABL: 24 + 1 reakce (μ l)	WT1: 28+1 reakce (μ l)	Konečná koncentrace
Master mix TaqMan Universal PCR, 2x	12,5	312,5	362,5	1x
Priméry a směs sond, 25x	1,0	25,0	29,0	1x
Voda pro PCR bez nukleázy	6,5	162,5	188,5	–
Vzorek (bude přidán v kroku 4)	5,0	5 každý	5 každý	–
Celkový objem	25,0	25 každý	25 každý	–

3. Dávkujte 20 μ l premixu qPCR na zkumavku.
4. Přidejte 5 μ l produktu RT (cDNA, ekvivalent 100 ng RNA) získaného v rámci reverzní transkripce (viz "Protokol: Doporučená standardizovaná zpětná transkripce EAC", strana 12) v odpovídající zkumavce (celkový objem 25 μ l).
5. Jemně promíchejte pipetováním nahoru a dolů.
6. Zkumavky vložte do tepelného cyklovače podle doporučení výrobce.
7. Naprogramujte přístroj Rotor-Gene Q pomocí programu tepelných cyklů, jak jsou uvedeny v tabulce 5.

Tabulka 5. Teplotní profil

Režim analýzy	Kvantifikace
Výdrž	Teplota: 50 stupňů Doba trvání: 2 minut
Držet 2	Teplota: 95 stupňů Doba trvání: 10 minut
Cyklování	50krát 95 stupňů po 15 sekund 62 stupňů po 1 minut se snímáním fluorescence FAM v kanálu Zelená: Jednotlivý

8. U přístrojů Rotor-Gene Q vyberte pro analýzu "Správný sklon".
Doporučujeme nastavit prahovou hodnotu na 0,03. Spust'ete program tepelného cyklování, jak je uvedeno v tabulce 5.

Protokol: qPCR na ABI PRISM 7900HT SDS, Applied Biosystems 7500 Real-Time PCR System a přístroj LightCycler 480

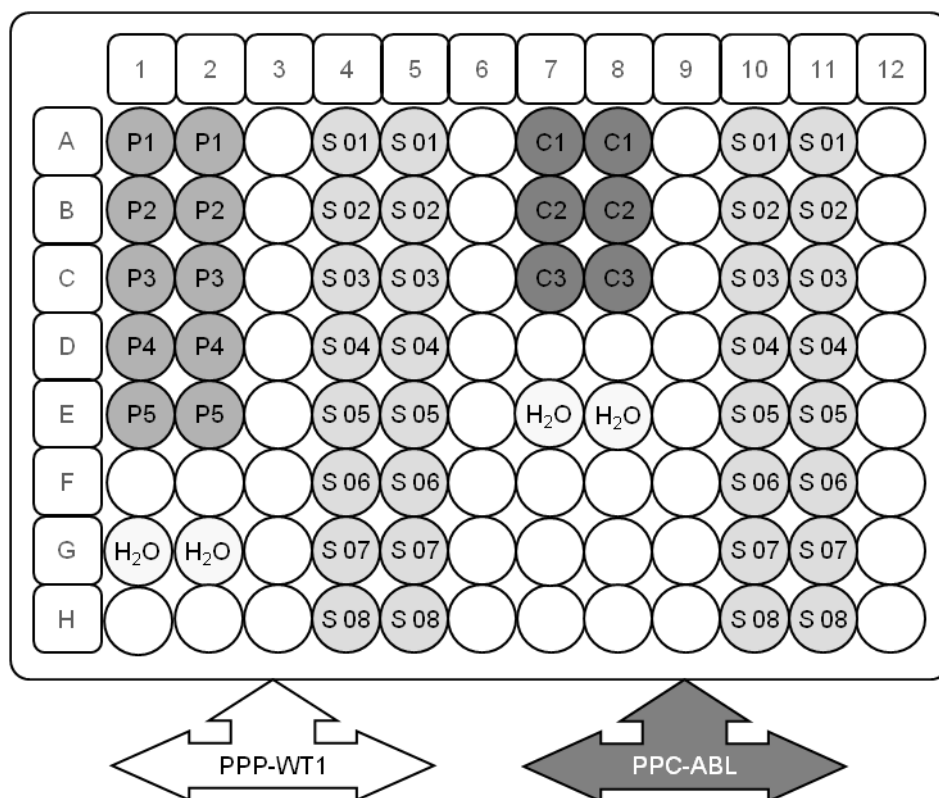
Při použití zařízení qPCR s deskou o 96 jamkách doporučujeme provádět všechna měření dvojnásobně, jak je uvedeno v tabulce 6.

Tabulka 6. Počet reakcí při využití zařízení qPCR s deskou o 96 jamkách

Vzorky	Reakce
S priméry ABL a směsí sond (PPC-ABL)	
n vzorků cDNA	n x 2 reakcí
Standard ABL	2 x 3 reakce (3 ředění každý jednotlivě testován dvojnásobně)
Kontrola vody	2 reakce
S priméry WT1 a směsí sond (PPC-WT1)	
n vzorků cDNA	n x 2 reakcí
Standard WT1	2 x 5 reakce (5 ředění každý jednotlivě testován dvojnásobně)
Kontrola vody	2 reakce

Zpracování vzorku na qPCR na ABI PRISM 7900HT SDS, Applied Biosystems 7500 Real-Time PCR System a přístrojích LightCycler 480

Doporučujeme testování nejméně 8 vzorků cDNA ve stejném experimentu s cílem optimalizovat použití standardů a primérů a směsí sond. Schéma rotoru na obrázku 5 ukazuje příklad takového experimentu.



Obrázek 5. Navrhované nastavení desky pro jeden experiment. S: vzorek cDNA; P1–5: Standardy WT1; C1–3: Vzorek ABL; H₂O: kontrola vody.

qPCR na ABI PRISM 7900HT SDS, Applied Biosystems 7500 Real-Time PCR System a přístroje LightCycler 480

Poznámka: Všechny úkony provádějte na ledu.

Postup

1. Nechte roztát všechny nezbytné komponenty a umístěte je na led.
2. Připravte následující směs qPCR podle počtu zpracovávaných vzorků.
Všechny koncentrace platí pro konečný objem reakce.

Tabulka 7 popisuje pipetovací schéma pro přípravu jedné směsi reagentů vypočítané pro dosažení konečného reakčního objemu 25 μ l. Premix lze připravit podle počtu reakcí pomocí stejných primérů a směsi sond (buď PPC-ABL, nebo PPF-WT1). Zahrnutý jsou objemy navíc pro kompenzaci chyby při pipetování.

Tabulka 7. Příprava směsi qPCR

Komponenta	1 reakce (μ l)	ABL: 24 + 1 reakcí (μ l)	WT1: 28 + 1 reakcí (μ l)	Konečná koncentrace
Master mix TaqMan Universal PCR, 2x	12,5	312,5	362,5	1x
Priméry a směs sond, 25x	1,0	25,0	29,0	1x
Voda pro PCR bez nukleázy	6,5	162,5	188,5	–
Vzorek (bude přidán v kroku 4)	5,0	5 každý	5 každý	–
Celkový objem	25,0	25 každý	25 každý	–

3. Dávkujte 20 μ l premixu qPCR na jamku.
4. Přidejte 5 μ l produktu RT (cDNA, ekvivalent 100 ng RNA) získaného v rámci reverzní transkripce (viz "Protokol: Doporučená standardizovaná zpětná transkripce EAC", strana 12) v odpovídající jamce (celkový objem 25 μ l).
5. Jemně promíchejte pipetováním nahoru a dolů.
6. Uzavřete desku a krátce odstřed'ujte (300 x g, přibližně 10 sekund).
7. Desku vložte do tepelného cyklovače podle doporučení výrobce. Naprogramujte tepelný cyklovač pomocí programu tepelného cyklování, jak je to uvedeno v tabulce 8 pro přístroje ABI PRISM 7900HT SDS nebo Applied Biosystems 7500 Real-Time PCR System nebo v tabulce 9 pro přístroj LightCycler 480.

Tabulka 8. Teplotní profil pro ABI PRISM 7900HT SDS nebo systém Applied Biosystems 7500 Real-Time PCR

Režim analýzy	Standardní křivka — absolutní kvantifikace
Výdrž	Teplota: 50°C Doba trvání: 2 minut
Držet 2	Teplota: 95°C Doba trvání: 10 minut
Cyklování	50krát 95°C po 15 sekund 60°C po 1 minutu se snímáním fluorescence FAM; zhasací látka: TAMRA

Tabulka 9. Teplotní profil pro přístroj LightCycler 480

Režim analýzy	Absolutní kvantifikace ("Abs Quant")
Detekční formáty	Vyberte "Samostatná sonda" v okně Detekční formáty
Výdrž	Teplota: 50°C Doba trvání: 2 minut
Držet 2	Teplota: 95°C Doba trvání: 10 minut
Cyklování	50krát 95°C po 15 sekund 60°C po 1 minutu se snímáním fluorescence FAM odpovídající (483–533 nm) pro LC verzi 01 a (465–510 nm) pro LC verzi 02

8. U systému ABI PRISM 7900HT SDS a Applied Biosystems 7500 Real-Time PCR System postupujte podle kroku 8a. U přístroje LightCycler 480 postupujte podle kroku 8b.
- 8a. ABI PRISM 7900HT SDS a systém Applied Biosystems 7500 Real-Time PCR: Doporučujeme nastavit práh na 0,1, jak je popsán v protokolu EAC v kroku analýzy a ve výchozím nastavení mezi cykly 3 a 15. Spust'te program cyklování, jak je uvedeno v tabulce 8.

8b. LightCycler 480: Doporučujeme režim analýzy Bod vhodnosti s pozadím na 2,0 a prahovou hodnotou 2,0. Spust'te program tepelného cyklování, jak je uvedeno v tabulce 9.

Protokol: qPCR na přístroji LightCycler 1.2

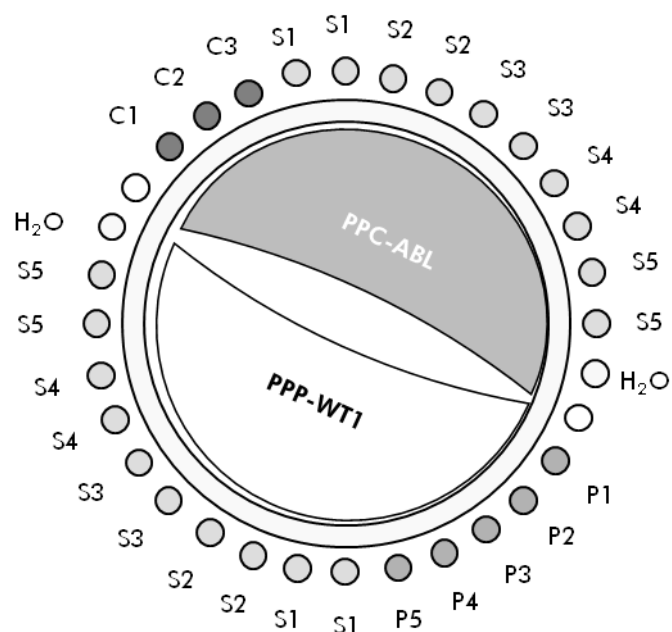
Při použití kapilárních přístrojů doporučujeme měřit vzorky dvojmo a kontroly pouze jednou, jak je uvedeno v tabulce 10.

Tabulka 10. Počet reakcí pro přístroj LightCycler 1.2

Vzorky	Reakce
S priméry ABL a směsí sond (PPC-ABL)	
n vzorků cDNA	n x 2 reakcí
Standard ABL	1 x 3 reakce (3 standardní ředění, každé jednotlivě testováno dvojmo)
Kontrola vody	1 reakce
S priméry WT1 a směsí sond (PPC-WT1)	
n vzorků cDNA	n x 2 reakcí
Standard WT1	1 x 5 reakce (5 standardní ředění, každé jednotlivě testováno dvojmo)
Kontrola vody	1 reakce

Zpracování vzorku na přístroji LightCycler 1.2

Doporučujeme testování 5 vzorků cDNA ve stejném experimentu s cílem optimalizovat použití standardů a primérů a směsí sond. Kapilární schéma na obrázku 6 ukazuje příklad experimentu.



Obrázek 6. Navrhované nastavení rotoru pro každý experiment se sadou *ipsogen* WT1 ProfileQuant. P1–5: Standardy WT1 C1–3: Standardy ABL; S: neznámý vzorek DNA, který se má analyzovat; H₂O: kontrola vody.

qPCR na přístroji LightCycler 1.2

Poznámka: Kvůli konkrétním technologickým požadavkům se musí experimenty s přístrojem LightCycler provádět při použití specifických reagensů. Doporučujeme používat LightCycler TaqMan Master a dodržovat pokyny výrobce pro přípravu Master Mix 5x.

Poznámka: Všechny úkony provádějte na ledu.

Postup

1. Nechte roztát všechny nezbytné komponenty a umístěte je na led.
2. Připravte následující směs qPCR podle počtu zpracovávaných vzorků.
Všechny koncentrace platí pro konečný objem reakce.

Tabulka 11 popisuje pipetovací schéma pro přípravu jedné směsi reagensů vypočítané pro dosažení konečného reakčního objemu 20 μ l. Premix lze připravit podle počtu reakcí pomocí stejných primérů a směsi sond (buď PPC-ABL, nebo PPF-WT1). Zahrnutý jsou objemy navíc pro kompenzaci chyby při pipetování.

Tabulka 11. Příprava směsi qPCR

Komponenta	1 reakce (μ l)	ABL: 14 + 1 reakcí (μ l)	WT1: 16 + 1 reakcí (μ l)	Konečná koncentrace
Čerstvě připravená Master Mix LightCycler TaqMan, 5x	4,0	60,0	68,0	1x
Priméry a směs sond, 25x	0,8	12,0	13,6	1x
Voda pro PCR bez nukleázy	10,2	153,0	173,4	–
Vzorek (bude přidán v kroku 4)	5,0	5 každý	5 každý	–
Celkový objem	20,0	20 každý	20 každý	–

3. Dávkujte 15 μ l premixu qPCR na kapiláru.
4. Přidejte 5 μ l produktu RT (cDNA, ekvivalent 100 ng RNA) získaného v rámci reverzní transkripce (viz "Protokol: Doporučená standardizovaná zpětná transkripce EAC", strana 12) v odpovídající zkumavce (celkový objem 20 μ l).
5. Jemně promíchejte pipetováním nahoru a dolů.
6. Umístěte kapiláry do adaptérů dodávaných s přístrojem, krátce odstřed'ujte (700 x g, přibližně 10 sekund).
7. Kapiláry vložte do tepelného cyklovače podle doporučení výrobce.
8. Naprogramujte přístroj LightCycler 1.2 pomocí programu tepelných cyklů, jak jsou uvedeny v tabulce 12.

Tabulka 12. Teplotní profil

Režim analýzy	Kvantifikace
Výdrž	Teplota: 95°C Doba trvání: 10 minut Nárůst: 20
Cyklování	50krát 95°C po 10 sekund; nárůst: 20 60°C po 1 minutu; nárůst: 20; se snímáním fluorescence FAM: Jednotlivý
Držet 2	45°C po 1 minutu; nárůst: 20

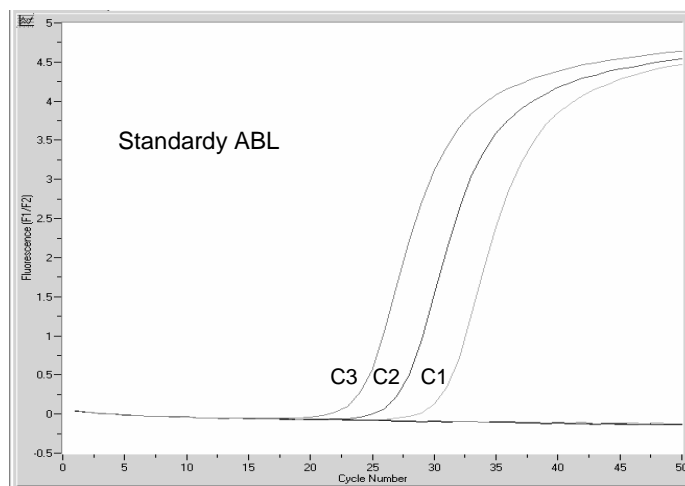
9. Pro přístroj LightCycler 1.2 se doporučuje F1/F2 a režim "analýzy založené na 2. derivaci". Spustěte program tepelného cyklování, jak je uvedeno v tabulce 12.

Interpretace výsledků

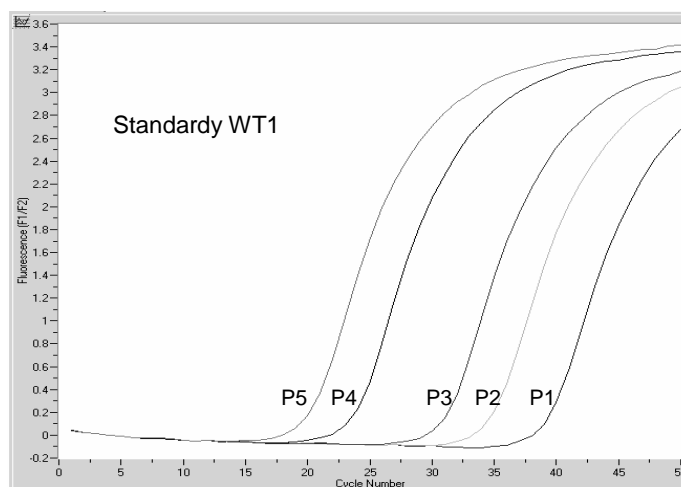
Princip datové analýzy

Při použití technologie TaqMan se počet cyklů PCR nezbytný pro detekci signálu na prahovou hodnotou nazývá prahový cyklus (CT) a je přímo úměrný množství přítomné cílové látky na počátku reakce.

Pomocí standardů se známým počtem molekul můžete vytvořit standardní křivku a stanovit přesné množství cílové látky přítomné v testovacím vzorku. Standardní křivky *ipsogenu* jsou založeny na plazmidech a používají 3 plasmidová standardní ředění pro kontrolní gen ABL (CG) a 5 standardních ředění pro gen WT1, aby byly zajištěny přesné standardní křivky. Obrázky 7 a 8 ukazují příklad amplifikačních křivek TaqMan získaných pomocí sady *ipsogen* WT1 ProfileQuant.



Obrázek 7. Detekce standardů ABL (C1, C2, C3). 10^3 , 10^4 , a 10^5 kopií/ $5 \mu\text{l}$.



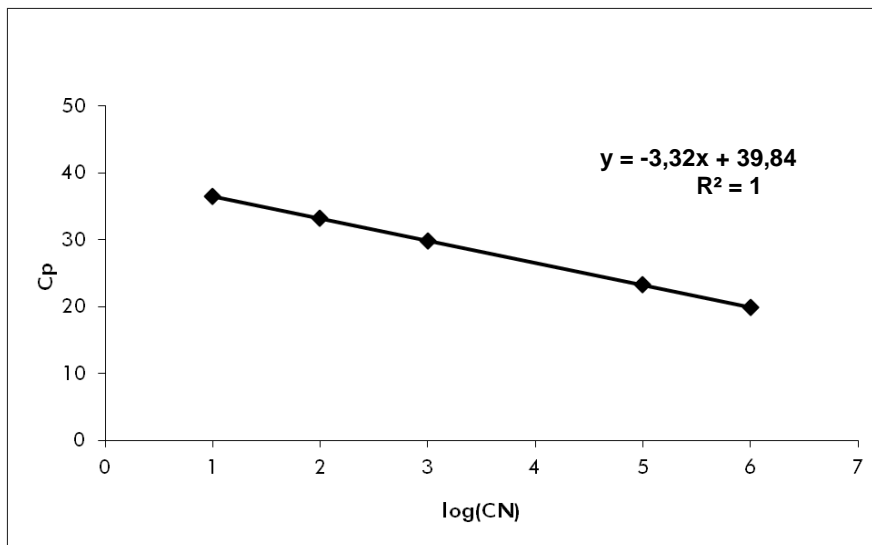
Obrázek 8. Detekce standardů WT1 (P1–P5). 10^1 , 10^2 , 10^3 , 10^5 , 10^6 kopií/ $5 \mu\text{l}$.

Dopady

Standardní křivka a kritéria kvality

Surová data lze pro účely analýzy vložit do souboru Excel®.

Pro každý gen (ABL a WT1) se surové hodnoty C_p / C_T získané z naředění plazmidových standardů vynášejí podle logaritmu počtu kopií (3, 4, a 5 pro C1, C2 a C3; 1, 2, 3, 5 a 6 pro P1, P2, P3, P4 a P5). Obrázek 9 ukazuje příklad teoretické standardní křivky vypočítané ze 5 standardních ředění.



Obrázek 9. Teoretická křivka vypočítaná z 5 standardních ředění. Vypočítá se přímka lineární regrese ($y = ax + b$) pro každý gen (ABL a WT1), kde a je sklon přímky a b je průsečík s osou y , což je souřadnice y bodu, kdy přímka protíná osu y . Její rovnice a koeficient stanovení (R^2) se vytiskne do grafu.

Jako standardy slouží 10násobná ředění, teoretický sklon křivky je $-3,32$. Sklon od $-3,0$ do $-3,9$ je přijatelný, pokud je $R^2 > 0,95$ (12). Ovšem hodnota $R^2 > 0,98$ je žádoucí pro přesné výsledky (13).

Normalizovaný počet kopií (NCN)

Standardní rovnice křivky ABL by se měla použít pro transformaci surových hodnot C_p (získaných pomocí PPC-ABL) pro neznámé vzorky do počtu kopií ABL (ABL_{CN}).

$$\text{Log}_{10} ABL_{CN} \text{ vzorku} = \frac{\text{průměrný } ABL C_p - \text{průsečík standardní křivky ABL}}{\text{Směrnice standardní křivky ABL}}$$

Standardní rovnice křivky WT1 by se měla použít pro transformaci surových hodnot C_p (získaných pomocí PPC-WT1) pro neznámé vzorky do počtu kopií WT1 ($WT1_{CN}$).

$$\text{Log}_{10} \text{WT1}_{\text{CN}} \text{ vzorku} = \frac{\text{průměrný WT1 } C_p - \text{průsečík standardní křivky WT1}}{\text{Směrnice standardní křivky WT1}}$$

Poměr těchto hodnot CN dává normalizovaný počet kopií (NCN) na 10 000 kopií ABL:

$$\text{NCN} = \frac{\text{WT1}_{\text{CN}}}{\text{ABL}_{\text{CN}}} \times 10\,000$$

Kontrola kvality u hodnot ABL

Špatná kvalita RNA nebo problémy během kroků qPCR má za následek nízký počet ABL_{CN} . Doporučujeme odmítnout výsledky ze vzorků s $\text{ABL}_{\text{CN}} < 4246$.

Reprodukovatelnost mezi replikáty

Variace hodnot C_p mezi replikáty by měla být < 2 , což odpovídá čtyřnásobné změně hodnot počtu kopií.

Variace hodnot C_p mezi replikáty je obecně $< 1,5$, pokud bude hodnota C_p replikátů < 36 (12).

Poznámka: Každý uživatel by měl měřit vlastní reprodukovatelnost ve své laboratoři.

Kontroly vody

Negativní kontroly by měly dávat nulovou CN jak pro ABL, tak WT1.

Pozitivní kontrola vody je výsledkem zkřížená kontaminace. Viz "Řešení problémů" níže, kde naleznete řešení.

Řešení problémů

V této kapitole naleznete užitečné informace, které Vám mohou pomoci při řešení případných problémů. Více informací lze získat také na internetové stránce naší technické podpory: www.qiagen.com/FAQ/FAQList.aspx. Vědci z technické podpory QIAGEN vždy rádi zodpoví Vaše otázky ohledně informací a protokolu v tomto manuálu nebo přípravy vzorků a jejich technologií rozborů (možnosti navázání kontaktu viz "Kontaktní informace", strana 41).

Komentáře a návrhy

Negativní výsledek pro kontrolní gen (ABL) a WT1 ve všech vzorcích — standard je v pořádku

- | | |
|-------------------------------------|---|
| a) Nízká kvalita RNA | Před zahájením vždy zkontrolujte kvalitu a koncentraci RNA.

Souběžně spusťte pozitivní kontrolu RNA buněčné linie. |
| b) Selhání kroku zpětné transkripce | Před zahájením vždy zkontrolujte kvalitu a koncentraci RNA.

Souběžně spusťte pozitivní kontrolu RNA buněčné linie. |

Negativní výsledek pro kontrolní gen (ABL) ve vzorcích — standard je v pořádku

- | | |
|-------------------------------------|---|
| a) Nízká kvalita RNA | Před zahájením vždy zkontrolujte kvalitu a koncentraci RNA.

Souběžně spusťte pozitivní kontrolu RNA buněčné linie. |
| b) Selhání kroku zpětné transkripce | Před zahájením vždy zkontrolujte kvalitu a koncentraci RNA.

Souběžně spusťte pozitivní kontrolu RNA buněčné linie. |

Standardní signál negativní

- | | |
|---------------------------------------|---|
| a) Chyba pipetování | Zkontrolujte schéma pipetování a nastavení reakce.

Opakujte chod PCR. |
| b) Nevhodné uchovávání komponent sady | Uchovávejte sadu <i>ipsogen</i> WT1 <i>ProfileQuant</i> při teplotě od -15 do -30°C a chraňte priméry a směsi sond (PPC a PPP) před světlem. Viz "Uchovávání a nakládání s reagensy", strana 11.

Chraňte před opakovaným zmražením nebo roztavením.

Alikvotní reagenty pro uchovávání |

Komentáře a návrhy

Negativní kontroly jsou pozitivní

- Křížové kontaminace Vyměňte všechny kritické reagensie.
Zopakujte experiment s novým alikvotními množstvími všech reagensií.
Vždy nakládejte se vzorky, komponenty sady a spotřební materiály ve shodě s běžně přijatou praxí, aby se zabránilo kontaminaci přenosem.

Nulový signál i u standardních kontrol

- a) Chyba pipetování nebo vynechané reagensie. Zkontrolujte schéma pipetování a nastavení reakce.
Opakujte chod PCR.
- b) Inhibiční účinky materiálu vzorku způsobené nedostatečným čištěním Zopakujte přípravu RNA
- c) LightCycler: Vybrán nesprávný detekční kanál Zadejte nastavení kanálu na F1/F2 nebo 530 nm/640 nm.
- d) LightCycler: Snímání dat nebylo naprogramováno Zkontrolujte programy cyklu.
Zkontrolujte režim snímání "jednotlivý" na konci každého segmentu snímání programu PCR.

Nepřítomný nebo nízký signál u vzorků, ale standardní kontroly jsou v pořádku.

- a) Nízká kvalita RNA nebo nízká koncentrace Před zahájením vždy zkontrolujte kvalitu a koncentraci RNA.
Souběžně spusťte pozitivní kontrolu RNA buněčné linie.
- b) Selhání kroku zpětné transkripce Před zahájením vždy zkontrolujte kvalitu a koncentraci RNA.
Souběžně spusťte pozitivní kontrolu RNA buněčné linie.

Komentáře a návrhy

Intenzita fluorescence je příliš nízká

- a) Nevhodné uchování komponent sady Uchovávejte sadu *ipsogen* WT1 ProfileQuant při teplotě od -15 do -30°C a chraňte priméry a směsi sond (PPC a PPP) před světlem. Viz "Uchování a nakládání s reagensy", strana 11.
Chraňte před opakovaným zmražením nebo roztavením.
Alikvotní reagensie pro uchování
- b) Velmi nízké výchozí množství cílové RNA Zvětšete množství RNA vzorku
Poznámka: V závislosti na zvolené metodě přípravy RNA se mohou vyskytnout inhibiční účinky.

LightCycler: Intenzita fluorescence se mění

- a) Chyba pipetování Proměnlivost způsobená tzv. "chybou pipetování" lze snížit analýzou dat v režimu F1/F2 nebo 530 nm/640 nm.
- b) Nedostatečná centrifugace kapilár Připravená směs PCR může být stále přítomna v horní části kapiláry nebo může dojít k zachycení vzduchové bubliny v hrotu kapiláry.
Vždy centrifugujte kapiláry na plněné reakční směsi, jak je to popsáno v konkrétní provozní příručce přístroje.
- c) Vnější povrch hrotu kapiláry je znečištěn Při manipulaci s kapilárami vždy noste rukavice.

LightCycler: Chyba standardní křivky

- Chyba pipetování Proměnlivost způsobená tzv. "chybou pipetování" lze snížit analýzou dat v režimu F1/F2 nebo 530 nm/640 nm.

Řízení jakosti

Na přístroji LightCycler 480 proveďte řízení jakosti úplné sady. Tato sada se vyrábí podle normy ISO 13485:2003. Certifikáty o analýze jsou k dispozici na požádání na adrese www.qiagen.com/support/.

Omezení

Uživatelé musí být školeni a obeznámeni s touto technologií před použitím tohoto zařízení. Tato sada by se měla použít podle následujících pokynů uvedených v této příručce v kombinaci s validovanými přístroji "Požadované materiály, které nejsou součástí dodávky", strana 9.

Jakékoliv získané diagnostické výsledky se musí interpretovat v kontextu ostatních klinických nebo laboratorních nálezů. Uživatel odpovídá za validaci chování systému v souvislosti s jakýmkoliv postupy použitými v jeho laboratoři, které nejsou zahrnuty do studií chování QIAGEN.

Dbejte na konec doby použitelnosti uvedený na balení a na štítcích jednotlivých komponent. Nepoužívejte reagentie s prošlou trvanlivostí.

Poznámka: Sada byla navržena podle studií "European Leukemia Net" (ELN) (10, 11). Měla by se použít podle pokynů uvedených v této příručce v kombinaci s validovanými reagentii a přístroji. Jakékoliv použití tohoto výrobku mimo schválené indikace a/nebo úprava komponent zneplatní závazky QIAGEN.

Výkonnostní charakteristiky

Neklinické studie

Materiály a metody

Studie linearity byly provedeny u 14 vzorků, každý byl získán z různé směsi RNA extrahované z buněčné linie s vysokou expresí a ze vzorků zdravých dárců, kteří měli nízkou úroveň exprese genu WT1. Každý vzorek byl testován třikrát. Pro NCN se hodnoty pohybovaly od 2,20 do 3838,11 NCN a tato studie ukázala, že sada *ipsogen* WT1 *ProfileQuant* dává lineární výsledky v celém tomto rozsahu hodnot.

Správnost

Studie přesnosti byla provedena na 4 vzorcích, každý byl získán z odlišné směsi RNA extrahované z buněčných linií s vysokou a nízkou expresí WT1. Tyto analýzy byly pro každý vzorek opakovány až 16krát. Analytická data jsou shrnuta do následujících tabulek.

Tabulka 13. Analytická data ze studie přesnosti — plazmidy

	Ředění	Průměrný C_T	σ	n	CV (%)
Plazmidy WT1	P1: 10^1 kopií/5 μ l	36,13	0,87	15	2,42
	P2: 10^2 kopií/5 μ l	32,70	0,40	16	1,21
	P3: 10^3 kopií/5 μ l	29,39	0,43	16	1,45
	P4: 10^5 kopií/5 μ l	22,62	0,41	16	1,80
	P5: 10^6 kopií/5 μ l	19,25	0,38	16	1,98
Plazmidy ABL	C1: 10^3 kopií/5 μ l	29,59	0,35	16	1,20
	C2: 10^4 kopií/5 μ l	26,11	0,40	15	1,52
	C3: 10^5 kopií/5 μ l	22,77	0,28	16	1,22

Tabulka 14. Analytická data ze studie přesnosti — buněčné linie

	Ředění	Průměrný NCN	σ	n	CV (%)
Ředění buněčné linie RNA	10 %	10 472	5598,76	16	53
	1,5 %	1880	747,01	16	40
	0,05 %	86	37,79	16	44
	0,0025 %	3	1,90	16	57

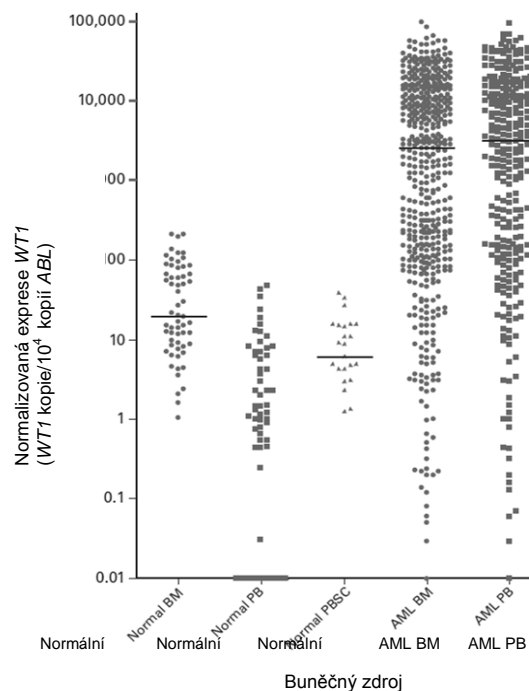
Mez slepého pokusu a mez detekce

Design studie byl založen na doporučeních popsanych v dokumentu NCCLS EP17-A, Protokoly pro stanovení mezí detekce a mezí kvantifikace; schválená směrnice. Byla stanovena úroveň pozadí nebo mez slepého pokusu (LOB) u normálních vzorků krve od zdravých dárců (4 vzorky, 73 měření). Bylo zjištěno, že se rovná 3,66 WT1 NCN.

Mez detekce (LOD), která udává analytickou citlivost, byla stanovena u vzorků se známou nízkou expresí WT1, které byly získány od zdravých dárců a zesíleny buněčnými liniemi s vysokou expresí WT1. Tím se zajistilo, že očekávaná hodnota NCN představoval 4násobek LOB. U celkem 4 vzorků bylo provedeno 72 měření a zjistilo se, že LOD je rovna 13,08 WT1 NCN.

Klinické studie

Protože k expresi WT1 dochází v normálních hematopoetických buňkách, je zásadně důležité zjistit úroveň exprese pozorovanou v normálních kontrolních vzorcích, aby bylo možné definovat prahovou hodnotu, která rozlišuje mezi reziduální leukémií a amplifikací na pozadí. Analýza 204 kontrolních vzorků odebraných zdravým dobrovolníkům pomocí analýzy ELN použité v sadě *ipsogen* WT1 ProfileQuant potvrdila, že velmi nízká exprese WT1 je zjištěna ve vzorcích periferní krve, kostní dřeně a kmenových buněk periferní krve. Střední hodnoty byly 19,8 WT1 kopií/10⁴ kopií ABL (rozsah 0–213) v kostní dřeni, 0,01 (rozsah 0,01–47,6) v periferní krvi a 6,1 (rozsah 0–39) v periferních krevních kmenových buňkách (viz obrázek 10). Exprese WT1 v periferní krvi byla významně nižší než v kostní dřeni ($p < 0,0001$). Na základě těchto výsledků byla definována horní mez normálu jako 250 NCN pro kostní dřeň a 50 NCN pro periferní krev.



Obrázek 10. Exprese WT1 ve vzorcích od zdravých dárců. Akutní myeloidní leukémie (AML), kostní dřeň (BM); periferní krev (PB); kmenové buňky periferní krve (PBSC). (15)

Přetištěno se svolením Cilloni D et al: Real-time quantitative polymerase chain reaction detection of minimal residual disease by standardized WT1 assay to enhance risk stratification in acute myeloid leukemia: A European LeukemiaNet Study: *J Clin Oncol* 27(31):5195-201. Epub 2009 Sep 1. © 2009, American Society of Clinical Oncology, Všechna práva vyhrazena.

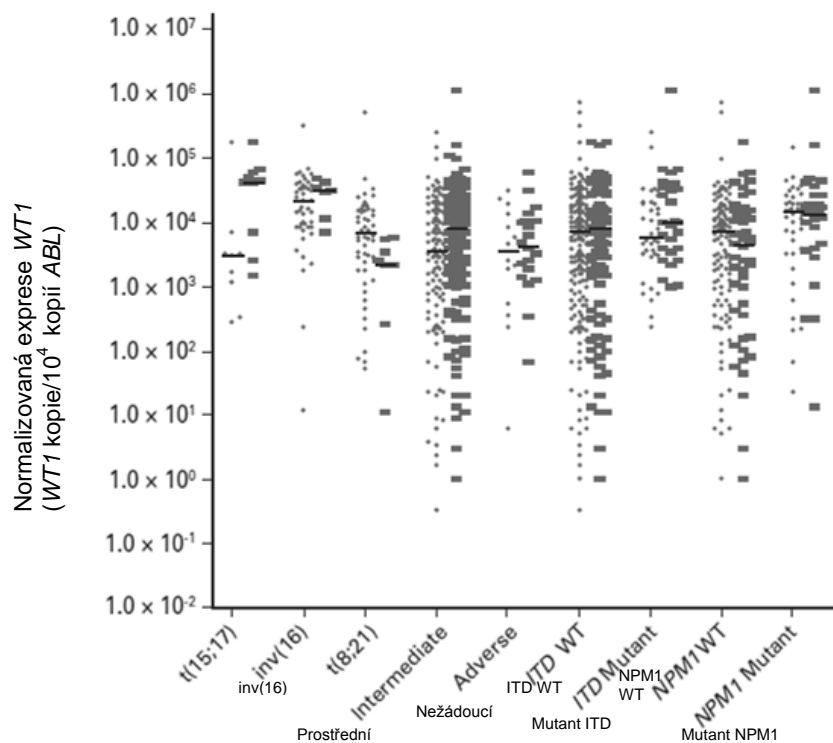
Definování exprese WT1 pomocí standardizované analýzy ELN qPCR ve vzorcích AML před léčbou

Pro hodnocení použitelnosti analýzy ELN využití v sadě *ipsogen* WT1 ProfileQuant k detekci MRD bylo analyzováno 620 vzorků před léčbou (238 z periferní krve a 382 z kostní dřeně) od 504 pacientů.

Došlo k nadměrné expresi WT1 nad úroveň pozadí (definované jako >250 a >50 kopií WT1/ 10^4 kopií ABL v kostní dřeni a periferní krvi v první a druhém případě) u 86 % a 91 % diagnostických vzorků AML kostní dřeně a periferní krve (také zachyceno na obrázku 10).

Střední hodnota kopií WT1/ 10^4 kopií ABL byla 2505 (rozsah $0-7,5 \times 10^5$) v kostní dřeni ($p < 0,0001$ versus normální kostní dřeň) a 3107 (rozsah $0-1,13 \times 10^6$) v periferní krvi ($p < 0,0001$ versus normální periferní krev). V expresi mezi periferní krví a kostní dření nedošlo k významnému rozdílu v expresi napříč celou kohortou, jak to potvrdily výsledky získané u pacientů s párovými diagnostickými vzorky periferní krve a kostní dřeně, viz Cilloni D et al., J Clin Oncol, obrázek A3 v příloze (15).

Variace normalizované úrovně exprese WT1 byly pozorovány podle cytogenetiky (obrázek 11, $p < 0,001$) se zvláště vysokými úrovněmi v případech s $inv(16)(p13q22)/t(16;16)(p13;q22)$ (medián $2,31 \times 10^4$, rozsah $12-3,14 \times 10^5$). Významně vyšší úrovně WT1 byly rovněž detekovány u AML s mutacemi NPM1 (mutant NPM1: medián $1,44 \times 10^4$, rozsah $0-1,13 \times 10^6$; divoký typ NPM1: medián 6566, rozsah $0-7,5 \times 10^5$, $p = 0,005$).



Obrázek 11. Variace exprese WT1 podle cytogenetiky (15).

Přetištěno se svolením Cilloni D et al: Real-time quantitative polymerase chain reaction detection of minimal residual disease by standardized WT1 assay to enhance risk stratification in acute myeloid leukemia: A European LeukemiaNet Study: J Clin Oncol 27(31):5195-201. Epub 2009 Sep 1. © 2009, American Society of Clinical Oncology, Všechna práva vyhrazena.

Úroveň exprese WT1, jak ji definuje analýza ELN v 15 případech poskytujících útočiště mutacím v exonech 7 a 9 genu WT1, byla porovnatelná s mutacemi divokého typu WT1 ($p=0,2$). Ovšem sekvenční analýza řady 32 případů, kdy analýza ELN navrhovala nízkou úroveň exprese transkriptu WT1 (<250 kopií/ 10^4 kopií ABL) signalizovala, že ve 3 případech (9,4 %) tato nízká hladina exprese byla spojena s mutacemi, které narušovaly vazebné místo dopředného priméru, viz Cilloni D et al., J Clin Oncol, obrázek A4 v příloze (15).

Odkazy

QIAGEN udržuje rozsáhlou aktuální online databázi vědeckých publikací, které hodnotí produkty QIAGEN. Podrobné volby hledání umožňují nalezení potřebných článků, buďto jednoduchým zadáním klíčových slov nebo upřesněním druhu aplikace, oboru výzkumu, názvu, atd.

Úplný seznam literatury naleznete v databance "QIAGEN Reference Database" na stránce www.qiagen.com/RefDB/search.asp nebo kontaktujte technický servis QIAGEN nebo Vašeho místního distributora.











Citovaná literatura

1. Cheson, B.D. et al. (2003) Revised recommendations of the international working group for diagnosis, standardization of response criteria, treatment outcomes, and reporting standards for therapeutic trials in acute myeloid leukemia. *J. Clin. Oncol.* **21**, 4642.
2. Estey, E. and Döhner, H. (2006) Acute myeloid leukemia. *Lancet* **368**, 1894.
3. Grimwade D. (2001) The clinical significance of cytogenetic abnormalities in acute myeloid leukaemia. *Best. Pract. Res. Clin. Haematol.* **14**, 497.
4. Schlenk, R.F. et al (2008) Mutations and treatment outcome in cytogenetically normal acute myeloid leukemia. *N. Engl. J. Med.* **358**, 1909.
5. Wheatley, K. et al. (1999) A simple, robust, validated and highly predictive index for the determination of risk-directed therapy in acute myeloid leukaemia derived from the MRC AML 10 trial. United Kingdom Medical Research Council's Adult and Childhood Leukaemia Working Parties. *Br. J. Haematol.* **107**, 69.
6. Freeman, S.D., Jovanovic, J.V., and Grimwade D. (2008) Development of minimal residual disease-directed therapy in acute myeloid leukemia. *Semin. Oncol.* **4**, 388.
7. Sugiyama, H. (2001) Wilms' tumor gene WT1: its oncogenic function and clinical application. *Int. J. Hematol.* **73**, 177.
8. Liu-Yin, J. et al. (2008) Predictive value of minimal residual disease (MRD) monitoring by RQ-PCR in WT1 positive patients entered in the UK MRC AML-15 Trial. *Blood* **112**, 259.
9. Van Dijk J.P. et al. (2003) Abnormal WT1 expression in the CD34-negative compartment in myelodysplastic bone marrow. *Br. J. Haematol.* **118**, 1027.
10. Gabert, J. et al. (2003) Standardization and quality control studies of 'real-time' quantitative reverse transcriptase polymerase chain reaction of fusion gene transcripts for residual disease detection in leukemia — a Europe Against Cancer program. *Leukemia* **17**, 2318.
11. Beillard, E. et al. (2003) Evaluation of candidate control genes for diagnosis and residual disease detection in leukemic patients using 'real-time' quantitative reverse-transcriptase polymerase chain reaction (RQ-PCR) - a Europe against cancer program. *Leukemia* **17**, 2474.

12. van der Velden, V.H. et al. (2003) Detection of minimal residual disease in hematologic malignancies by real-time quantitative PCR: principles, approaches, and laboratory aspects. *Leukemia* **17**, 1013.
13. Branford, S. et al. (2006) Rationale for the recommendations for harmonizing current methodology for detecting BCR-ABL transcripts in patients with chronic myeloid leukaemia. *Leukemia* **20**, 1925.
14. Cilloni, D. et al., American Society of Hematology (ASH) Annual Meeting, 2007.
15. Cilloni D. et al., Real-time quantitative polymerase chain reaction detection of minimal residual disease by standardized *WT1* assay to enhance risk stratification in acute myeloid leukemia: a European LeukemiaNet Study. *J Clin Oncol* **27**, 5195.

Symboly

Na obalech a štítcích se mohou objevit následující symboly:

	Obsahuje reagentie pro <N> reakcí
	Použijte do
	Prostředky zdravotnické techniky pro in vitro diagnostiku
	Katalogové číslo
	Číslo šarže
	Číslo materiálu
	Mezinárodní číslo obchodní položky GTIN
	Teplovní rozmezí
	Výrobce
	Další informace viz návod k použití

Kontaktní informace

Pro technickou podporu a více informací navštivte centrum technické podpory na adrese www.qiagen.com/Support, volejte 00800-22-44-6000, kontaktujte jedno z technických servisních oddělení QIAGEN nebo naše místní distributory (viz poslední stránka obalu nebo navštivte www.qiagen.com).

Informace o způsobu objednávání

Produkt	Obsah	Kat. č.
<i>ipsogen</i> WT1 ProfileQuant (24)	Pro 24 reakcí: standardy genové kontroly ABL, genové standardy WT1 (exon1-2), priméry a směsi sond ABL, priméry a směsi sond PPP-WT1	676923
Rotor-Gene Q MDx — pro analýzu PCR v reálném čase validované IVD v klinických aplikacích		
Platforma Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM	Cyklovač PCR v reálném čase a analyzátor taveniny s vysokým rozlišením s 5 kanály (zelený, žlutý, oranžový, červený, nachový) plus kanál HRM, laptop, software, příslušenství, 1letá záruka na díly a práci, instalace a školení není zahrnuto	9002032
Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM System	Real-time PCR cyklér a analyzátor křivek tání s vysokým rozlišením (High Resolution Melt - HRM) s 5 kanály (zelený, žlutý, oranžový, červený, purpurový) plus HRM kanál, notebook počítač, software, příslušenství, roční záruka na součásti a servis včetně instalace a školení	9002033

Aktuální licenční informace a odmítnutí odpovědnosti specifická pro výrobek jsou uvedeny v příručce pro sadu QIAGEN nebo příručce uživatele. Manuály k produktům QIAGEN jsou dostupné na www.qiagen.com nebo na požádání u technického servisu QIAGEN nebo lokálního distributora.

Tato stránka byla úmyslně ponechána prázdná

Tento produkt je určen pro diagnostické použití in vitro. Produkty *ipsogen* se nesmí dále prodávat, upravovat pro další prodej nebo používat k výrobě komerčních produktů bez písemného souhlasu společnosti QIAGEN.

Informace v tomto dokumentu se mohou změnit bez předchozího oznámení. QIAGEN nepřebírá žádnou odpovědnost za žádné chyby, které se mohou v tomto dokumentu objevit. Má se za to, že tento dokument je v době zveřejnění úplný a přesný. V žádném případě nebude QIAGEN odpovídat za náhodné, zvláštní, násobné nebo následné škody související s používáním tohoto dokumentu nebo z něho vyplývajících.

Produkty *ipsogen* mají záruku na dodržení pro ně stanovených technických parametrů. Výlučný závazek QIAGEN a výlučný opravný prostředek zákazníka se omezuje na náhradu výrobků zdarma v případě, že se výrobky nebudou chovat podle záruky.

Ochranné známky: QIAGEN[®], *ipsogen*[®], *ProfileQuant*[®], Rotor-Gene[®] (QIAGEN Group); ABI PRISM[®], Applied Biosystems[®], FAM[™], RNaseOUT[™], SuperScript[®], SYBR[®], TAMRA[™] (Life Technologies Corporation); Agilent[®], Bioanalyzer[®] (Agilent Technologies, Inc); Excel[®] (Microsoft Corporation); LightCycler[®], TaqMan[®] (Roche Group).

Omezená licenční smlouva

Použitím produktu vyjadřuje kupující nebo uživatel sady *ipsogen* WT1 *ProfileQuant* souhlas s následujícími podmínkami:

1. Sada *ipsogen* WT1 *ProfileQuant* smí být používána výhradně v souladu s *Příručkou* sady *ipsogen* WT1 *ProfileQuant* a pouze s komponentami obsaženými v sadě. QIAGEN neposkytuje žádnou licenci v rámci kteréhokoliv svého duševního vlastnictví k použití nebo k začlenění příložených komponent sady s komponenty, které nejsou zahrnuty v této soupravě, s výjimkou případů uvedených v *Příručce* sady *ipsogen* WT1 *ProfileQuant* a dodatečných protokolech dostupných na www.qiagen.com.
2. QIAGEN neposkytuje žádnou jinou záruku než výslovně stanovené licence v tom smyslu, že tato sada a/nebo její použití nenarušuje práva třetích stran.
3. Tato sada a její díly jsou licencovány k jednorázovému použití a nesmí se používat opakovaně, přepřelována ani opakovaně prodávat.
4. QIAGEN specificky odmítá jakékoliv další výslovné nebo nepřímé licence s výjimkou těch, které jsou uvedeny výslovně.
5. Kupující a uživatel této sady souhlasí s tím, že neposkytne a nepovolí nikomu jinému provádět žádné kroky, které by mohly vést nebo by usnadnily jakékoliv shora zakázané činnosti. QIAGEN může zákazy tohoto Omezeného licenčního ujednání prosadit u každého soudu a vyžadovat úhradu všech vyšetřovacích a soudních poplatků, včetně poplatků za advokáta, v rámci jakéhokoliv postupu k prosazení tohoto Omezeného licenčního ujednání nebo jakýchkoliv jiných práv duševního vlastnictví vztahujících se na tuto soupravu a/nebo její komponenty.

Pro aktualizovaná licenční ustanovení viz www.qiagen.com.

HB-1355-002© 2013-2015 QIAGEN, všechna práva vyhrazena.

www.qiagen.com

Australia ■ techservice-au@qiagen.com

Austria ■ techservice-at@qiagen.com

Belgium ■ techservice-bnl@qiagen.com

Brazil ■ suportetecnico.brasil@qiagen.com

Canada ■ techservice-ca@qiagen.com

China ■ techservice-cn@qiagen.com

Denmark ■ techservice-nordic@qiagen.com

Finland ■ techservice-nordic@qiagen.com

France ■ techservice-fr@qiagen.com

Germany ■ techservice-de@qiagen.com

Hong Kong ■ techservice-hk@qiagen.com

India ■ techservice-india@qiagen.com

Ireland ■ techservice-uk@qiagen.com

Italy ■ techservice-it@qiagen.com

Japan ■ techservice-jp@qiagen.com

Korea (South) ■ techservice-kr@qiagen.com

Luxembourg ■ techservice-bnl@qiagen.com

Mexico ■ techservice-mx@qiagen.com

The Netherlands ■ techservice-bnl@qiagen.com

Norway ■ techservice-nordic@qiagen.com

Singapore ■ techservice-sg@qiagen.com

Sweden ■ techservice-nordic@qiagen.com

Switzerland ■ techservice-ch@qiagen.com

UK ■ techservice-uk@qiagen.com

USA ■ techservice-us@qiagen.com

