

Nisan 2017

# *ipsogen*<sup>®</sup> CALR RGQ PCR Kiti El Kitabı



24

Sürüm 1

**IVD**

İn vitro tanı amaçlı kullanım için

Rotor-Gene<sup>®</sup> Q MDx 5plex HRM cihazı ile kullanım içindir

**CE**

**REF**

674023



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

R2 **MAT**

1103549TR

# İçindekiler

Kullanım Amacı .....	4
Özet ve Açıklama .....	4
Prosedür Prensipleri .....	9
Sağlanan Malzemeler .....	13
<b>Kit içeriği</b> .....	<b>13</b>
Gerekli Olan Ancak Sağlanmayan Malzemeler .....	14
Uyarılar ve Önlemler.....	16
<b>Önlemler</b> .....	<b>17</b>
Reaktifli Saklama ve Kullanma .....	19
Numune Kullanımı ve Saklanması .....	20
Tam kan .....	20
Genomik DNA örnekleri.....	20
Prosedür.....	21
Genomik DNA ekstraksiyonu ve hazırlanması .....	21
QIAamp DSP DNA Blood Mini Kit ile manuel gDNA ekstraksiyonu .....	21
QIASymphony DSP DNA Mini Kit ile otomatik gDNA ekstraksiyonu .....	25
DNA'nın miktarının saflığının tayini.....	30
Genomik DNA örneği normalizasyonu.....	30
Protokol: Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM cihazı üzerinde qPCR.....	31
Gamma Plug-in kurulumu ve test profilinin içe aktarımı.....	31
Yükleme bloku ve rotorun kurulumu .....	33
Bir çalışma listesi oluşturma .....	36

qPCR kurulumu .....	37
Rotor-Gene MDx'i hazırlama ve qPCR çalışmasını başlatma .....	39
Çıkarın ve qPCR sonuçlarını raporlayın .....	40
Sonuçların Yorumlanması .....	42
Veri analizi.....	42
Tekrar Testleri .....	43
Sonuçlar ekranı .....	45
Sorun giderme kılavuzu.....	53
Kalite Kontrol .....	63
Sınırlamalar .....	63
Performans Özellikleri .....	65
Boş örnek sınırı .....	65
Tespit sınırı .....	65
DNA girdisi .....	66
Tekrarlanabilirlik ve yeniden üretilebilirlik .....	66
Engelleyici maddeler .....	68
Özgüllük .....	68
Klinik doğrulama ve yöntem karşılaştırması .....	69
Referanslar .....	72
Semboller .....	73
Sipariş Bilgileri.....	75

# Kullanım Amacı

*ipsogen* CALR RGQ PCR kiti, miyeloproliferatif tümörlerden (MPN) şüphelenilen hastaların tam kanındaki genomik DNA'da bulunan *CALR* mutasyonlarının tespiti için endikedir. *ipsogen* CALR RGQ PCR Kiti iki önemli *CALR* mutasyonlarının (Tip 1 ve Tip 2) tanımlanmasına da olanak tanır ve QIAGEN Rotor-Gene Q MDx 5Plex HRM Platformu ile kullanım içindir. Ürün, teknisyenler ve hekimler gibi moleküler biyoloji tekniklerinde eğitimli profesyoneller tarafından kullanılmak üzere endikedir.

Ürünler kullanılırken gerekli tüm özen ve dikkat gösterilmelidir.

QIAGEN ürünlerinin tüm kullanıcılarının rekombinant DNA deneyleri için geliştirilmiş National Institutes of Health (Ulusal Sağlık Enstitüleri, NIH) kılavuzlarına veya uygun diğer kılavuzlara bağlı kalmalarını öneririz.

## Özet ve Açıklama

Miyeloproliferatif tümörler, Philadelphia kromozomu pozitif (Ph+) veya negatif (Ph-) olan farklı olgunlaşmış tam kan hücresi tiplerinin kanda kronik birikimiyle karakterize olan ve hematolojik malignitelerin %39'unu temsil eden bir grup hastalıktır.

Janus tirozin kinaz 2 (*JAK2*) genini etkileyen tekrarlayan somatik mutasyon V617F, 2005 (1–4) yılında tanımlanarak MPN'nin anlaşılması, sınıflandırılması ve tanısında büyük ilerlemeye öncülük etmiştir. MPN Ph- olan hastaların tamamı arasından *JAK2* V617F mutasyonu polisitemi vera (PV) hastalarının > %95'inde, esansiyel trombositemi (ET) hastalarının %50 ila %60'ında, primer miyelofibroz (PMF) hastalarının %50'sinde saptanmıştır. Ek olarak, ET ve PMF'lerin %5 ila %10'unda trombopoietin reseptör geninde (*MPL*) aktivasyon mutasyonları bulunur. Hastaların kalan %30 ila %45'inde özel hiçbir moleküler markör tanımlanmamıştır.

MPN Ph- olan hastaların kayda değer bir miktarında (kalretikülin proteinini kodlayan) *CALR* geninde somatik olarak edinilmiş mutasyonların keşfi klonal hastalığın (5, 6) yeni bir markörünü sağlayıp moleküler olarak daha önce karakterize edilmemiş bu vakaların hem tanısı hem de prognozunu iletmiştir. *JAK2* mutasyonu olmaksızın MPN Ph- olan hastaların çoğunda *CALR* ekson 9'da somatik eklemeler ve kopukluklar bulunmuştur. *CALR* için başlangıçta eklemeler, kopukluklar, substitüsyonlar veya bunların bir kombinasyonundan oluşan toplam 36 “tip” (Tablo 1) tanımlanmıştır. Bunların çoğunluğu C terminalinde aynı özgün amino asit dizisini paylaşan mutant *CALR* proteinlerinin oluşumuna neden olan aynı alternatif okuma çerçevesinde bir çerçeve kaymasına yol açar. Bu çerçeve kaymasının farklı mutant proteinlerin hücre içi konumunu değiştirdiği ve C terminali bölgelerinin Ca<sup>2+</sup> bağlama işlevini etkilediği önerilmiştir.

Kesin patolojik mekanizmasına henüz tam olarak açıklık getirilmemiştir ancak in vitro çalışmalarda en sık *CALR* delesyonunun (Tip 1 mutasyon, bkz. Tablo 1) aşırı ekspresyonunun sitokin bağımsız hücre çoğalmasına neden olduğu gösterilmiştir (5).

**Tablo 1. Tip 1 ila Tip 36 *CALR* mutasyonları listesi**

Tip	COSMIC ID*	Sıklık (%) <sup>†</sup>	Mutant <i>CALR</i> cDNA notasyonu
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
8	COSM1738153	0,7	c.1104_1137del
9	COSM1738154	0,7	c.1140del
10	COSM1738155	0,7	c.1154delinsTGTGTC
11	NI <sup>‡</sup> ; COSM1738150	0,3	[c.1092G>C;1095_1140del]
12	COSM1738359	0,3	c.1098_1131del

Tip	COSMIC ID*	Sıklık (%) <sup>†</sup>	Mutant <i>CALR</i> cDNA notasyonu
13	COSM1738339	0,3	c.1100_1134delinsA
14	COSM1738368	0,3	c.1101_1134del
15	COSM1738151; NI <sup>‡</sup>	0,3	[c.1102_1135del;1145C>G]
16	COSM1738157	0,3	c.1102_1137delinsCA
17	COSM1738153; NI <sup>‡</sup>	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_1145delinsCGTTTA
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_1152delinsCCTCCTCTTTGTCT
30	COSM1738353	0,3	c.1137_1154delinsCCATCCTTGTC
31	NI <sup>‡</sup> ; COSM1738056	0,3	[c.1151A>G;1154_1155insTTGTC]
32	COSM1738330	0,3	c.1153_1154delinsTGTC
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

\* ID'ler COSMIC v72'den ([cancer.sanger.ac.uk/cosmic/](http://cancer.sanger.ac.uk/cosmic/)).

<sup>†</sup> Sıklıklar Klampfl et al'dan (2013) (5).

<sup>‡</sup> NI: Mutasyon olayı COSMIC'de tanımlanmamıştır.

Geleneksel olarak, MPN'lerin tanısı kliniksel, kemik iliği histolojisi ve sitogenetik kriterlerine göre konulurdu. Hastalığa özgü moleküler markörlerin keşfi hem sürecin basitleşmesine hem de artan tanı doğruluğuna neden oldu. *JAK2* ve *MPL* mutasyonları bulunmayan hastalarda ET ve PMF için moleküler temelin anlaşılması MPN alanında önemli bir amaç olmuştur. Böylece, *CALR* mutasyonlarının keşfi MPN Ph- olan hastaların hem tanısı hem de prognozu amaçlarına yönelik ek bir moleküler markör sağlar. *CALR* mutasyonunun tespiti artık MPN tanısı (Tablo 2) için referans World Health Organization (Dünya Sağlık Örgütü, DSÖ) 2016 kriterlerinin bir parçasıdır ve bu mutasyonun varlığı tanının doğrulanması için önemli bir kriterdir.

**Tablo 2. MPN tanısı için DSÖ kriterleri (referans 7'den uyarlanmıştır)**

#### **Esansiyel trombositemi DSÖ tanı kriterleri**

Majör kriterler:

1. Platelet sayısı  $\geq 450 \times 10^9/l$ .
2. Çoğunlukla çok loplul, büyümüş, olgunlaşmış kemik megakaryosit sayısında artış gösteren megakaryosit soylu proliferasyon gösteren kemik iliği biyopsisi. Nötrofil granülopoezinde veya eritropoezinde hiçbir kayda değer artış veya sola kayma bulunmamış ve çok nadiren retikülin fiberlerinde küçük artış bulunmuştur.
3. *BCR-ABL 1+* CML\*, PV, primer miyelofibroz (PMF), miyelodisplastik sendrom (MDS) veya diğer miyeloid tümörler için DSÖ kriterlerinin karşılanmaması.
4. *JAK2*, *CALR* veya *MPL* mutasyonunun varlığı.

Minör kriter:

Bir klonal markörün varlığı veya reaktif trombositoz bulgusunun olmaması

#### **Primer miyelofibroz DSÖ tanı kriterleri**

Majör kriterler:

1. Retikülin ve/veya kollajen fibrozisle beraber megakaryosit artış ve atipi varlığı.
2. ET, PV, *BCR-ABL 1+* CML, MDS ve diğer miyeloid neoplazmlar için DSÖ kriterlerinin karşılanmaması.
3. *JAK2*, *CALR* veya *MPL* mutasyonlarının varlığı veya bu mutasyonların olmaması durumunda başka klonal markörün varlığı veya reaktif miyelofibroz olmaması.

**Minör kriterler:**

İki ardışık tayinde aşağıdakilerden en az birinin varlığının doğrulanması:

- a) Eşlik eden bir hastalıktan kaynaklanmayan anemi
- b) Lökositoz  $\geq 11 \times 10^9/l$
- c) El muayenesi ile hissedilen Splenomegali
- d) Kurum referans aralığının üst normal sınırının üzerine çıkmış LDH\*
- e) Lökoeitroblastozis

**Polisitemi vera DSÖ kriterleri**

**Majör kriterler:**

1. Erkeklerde Hemoglobin (Hgb) > 16,5 g/dl, kadınlarda Hgb > 16,0 g/dl veya erkeklerde Hematokrit (Hct) > %49, kadınlarda Hct > %48 veya alyuvar hücre kütlelerinde artış.
2. Eritroid, granülosit ve pleomorfik, olgunlaşmış megakaryositler içeren megakaryosit proliferasyon (büyüklük farkları) dahil üç soylu büyümeli (panmiyelozis) yaş için hipersellülarite gösteren kemik iliği biyopsisi.
3. *JAK2* V617F veya *JAK2* ekson 12 mutasyonu

**Minör kriter:**

Serum eritropoetin düzeyinin normalin altında olması

\* CML: kronik miyeloid lösemi; LDH: laktat dehidrojenaz.

*CALR* mutasyonlarının periferik kan hücrelerin ekstrakte edilen gDNA'da saptanması artık *JAK2* mutasyonlarının saptanmasında kullanılan ve MPN olan hastaların teşhis doğruluğunu basitleştirmiş ve geliştirmiş olan yolla bir teşhis aracı olarak kullanılmaktadır. *CALR* ve *JAK2* testleri (*ipsogen CALR* RGQ PCR Kit ve *ipsogen JAK2* RGQ PCR Kit) aynı gDNA ekstraksiyon yöntemleriyle doğrulanmıştır, böylece aynı örnek iki farklı qPCR kitiyle test edilebilir.



# Prosedür Prensibi

*ipsogen* CALR RGQ PCR Kiti gerçek zamanlı bir PCR testidir. Kit, *CALR* geninin (GenBank® Erişim Numarası CR457070) (5, 6) ekson 9'unun c.1091\_1162 (cDNA notu) bölgesindeki somatik mutasyonların kalitatif tespiti için sayısal gerçek zamanlı PCR (qPCR) testi kullanır ve ayrıca iki önemli *CALR* mutasyonunun tanımlamasına olanak tanır (Tip 1 ve Tip 2).

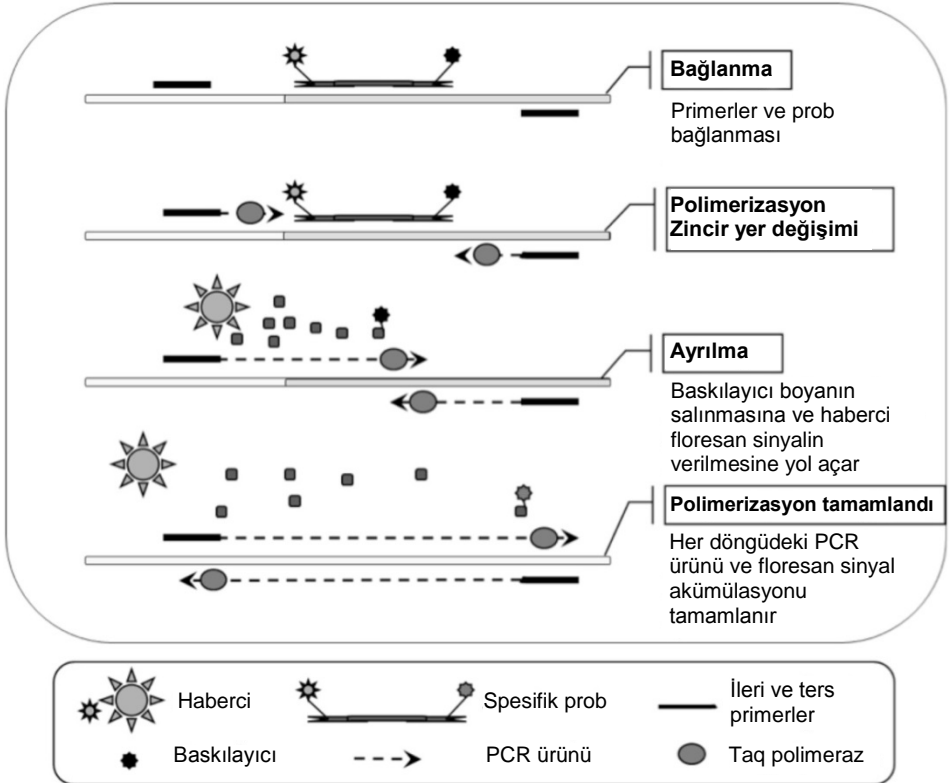
Kit, insan periferik tam kanından ekstrakte edilmiş genomik DNA'daki *CALR* Tip 1 ve Tip 2 mutasyonlarının tanımlanması ve ek minör varyantların saptanması ("Performans Özellikleri/Özgüllük", sayfa 68'de listelenmiştir) için aynı çalışmada yedi ayrı PCR amplifikasyon reaksiyonu gerçekleştirecek reaktifleri sağlar. gDNA ekstraksiyonundan (manuel veya otomatik ekstraksiyon kullanarak) veri analizine kadar tüm görevleri gerçekleştirme süresi bir iş gününden kısadır.

Gerçek zamanlı PCR'ın kullanımı hedef bir DNA sıralamasının amplifikasyon işleminin üstel fazı sırasında doğru tespitine izin verir. Gerçek zamanlı PCR verisi, PCR döngüleme sırasında floresan sinyallerin gerçek zamanlı tespiti ile PCR sonrası işleme olmaksızın hızla elde edilebilir. An itibarıyla üç temel qPCR tekniği mevcuttur: SYBR® Yeşil I Boya kullanan qPCR analizi, hidroliz problemleri kullanan qPCR analizi ve hibridizasyon problemleri kullanan qPCR analizi.

Bu test qPCR oligonükleotid hidroliz prensibini kullanmaktadır. PCR esnasında, ileri ve ters primerler belirli bir sırada hibridize olur. Bu karışıma başka bir boya bağlantılı oligonükleotid dahil edilir. 5' raporcu boya (F) ve aşağı yönlü 3' boyasız baskılayıcı (Q) ile etiketlenmiş bir oligonükleotid içeren bu prob PCR ürünü içinde bir hedef sıralamasını hibridleştirir. qPCR'ın hidroliz problemleriyle analizi *Thermus aquaticus* (*Taq*) DNA polimerazın 5'→3' eksonükleaz aktivitesini kullanır. Bu prob intakt durumda iken, haberci boyanın baskılayıcıya olan yakınlığı, haberci boyanın birincil olarak Förster tipi enerji transferi tarafından baskılanmasına yol açar.

PCR sırasında ilgilenilen hedef mevcutsa hem ileri hem de geri primerler spesifik olarak bağlanır ve bağlanmış proba yanaşır. PCR esnasında probun uzamasını önlemek için probun 3' ucu bloke edilir (Şekil 1). Polimerizasyon fazı sırasında, DNA polimerazın 5'→3' ekzonükleaz aktivitesi haberci boya ile baskılayıcı boya arasındaki probu ayırır. Ardından prob parçaları hedeften ayrılır ve zincirin polimerizasyonu devam eder. Süreç her yeni döngüde tekrarlanır ve ürünün katalitik akümülyasyonuna engel olmaz (bkz. Şekil 1).

Floresan sinyaldeki artış, yalnızca hedef sıralamanın primerleri ve probu tamamlayıcı nitelikte olması ve bu sayede PCR esnasında amplifiye edilmesi durumunda algılanır.

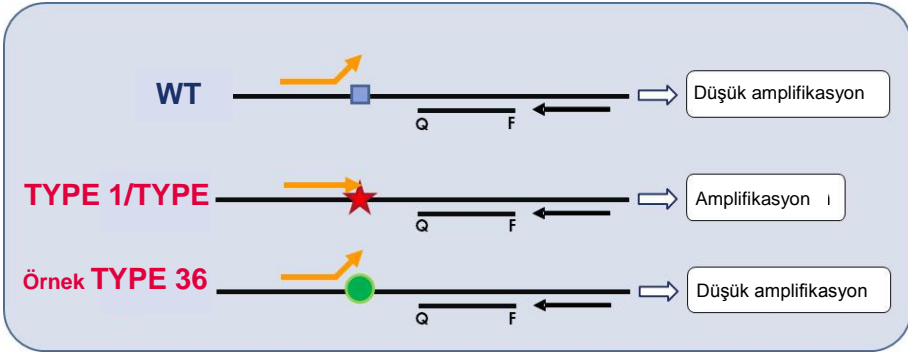


**Şekil 1. Gerçek zamanlı PCR reaksiyonlarının prensibi.**

## İki önemli *CALR* mutasyonunun tanımlanması

Tip 1 ve Tip 2 *CALR* mutasyonlarını ayırt etmek için primerlerin tamamlayıcı bir sıralamaya özgü hibridizasyonunu ve DNA polimerazın bir PCR primerinin 3' ucundaki eşleşmeyi veya eşleşmemeyi ayırt etme yeteneğini kullanan ARMS (Allele Refractory Mutation System) teknolojisi ile allele özel bir amplifikasyon elde edilir.

PCR primeri tam olarak eşleştiğinde, amplifikasyon tam verimlilikle ilerler. 3' baz eşleşmesi olmadığında, yalnızca düşük seviyeli yapı amplifikasyonu oluşur (Şekil 2).



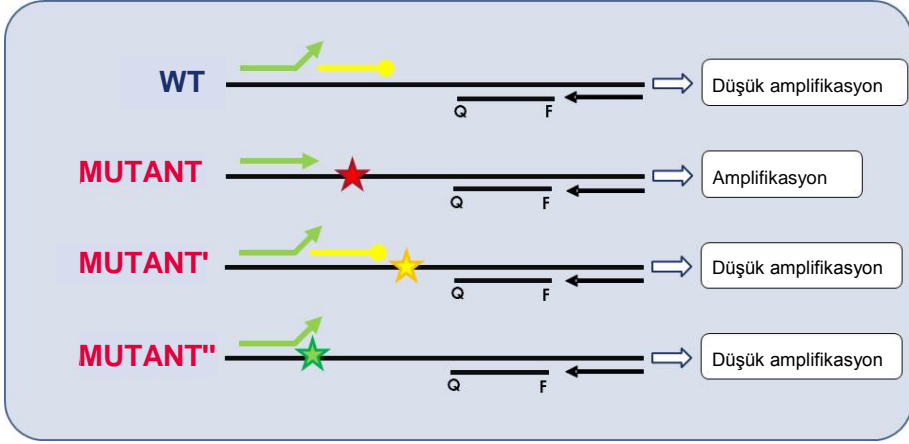
**Şekil 2. Tip 1 ve Tip 2 *CALR* mutasyonlarının ARMS PCR ile tanımlanması.**

WT: yabani tip; Q – F: BHQ<sup>®</sup> – FAM<sup>™</sup> çift boyalı prob; → ileri primer (turuncu) ve geri primer (siyah).

## *CALR* mutasyonlarının küçük varyantlarının saptanması

*CALR* mutasyonlarının küçük varyantlarının saptanması için primerler ve problar reaksiyon karışımlarında 3' bloklanmış ek bir fosfat grubu olan ek bir oligonükleotid (diğer adıyla CLAMP oligonükleotidi) ile birleştirilir. CLAMP oligonükleotidi yabani tip hedeflenmiş bir sıralamaya özgüdür ve bağlandığında PCR ürünün uzamasını engeller (PCR klempleme). PCR şablonu yabani tip sıralama içerdiğinde CLAMP PCR primerinden önce hibridleşir ve DNA polimeraz tarafından hiç uzama olmaz ya da az olur. Mutasyona uğramış bir hedef

sıralamasının varlığında CLAMP hibridleşmez veya zayıf hibridleşir, PCR primeri bağlanır ve amplifikasyon devam eder (Şekil 3).



**Şekil 3. CALR minör mutasyonlarının tespiti.** WT: yabani tip; Q – F: BHQ – FAM çift-boyalı prob; ⇌ ileri primer (yeşil) ve geri primer (siyah); —○: 3'-fosfat oligonükleotid (CLAMP oligonükleotid; sarı).

### Tüm reaksiyon karışımlarında dahili amplifikasyon kontrolü (IAC)

İnsan genomik DNA (gDNA) şablonunu varlığında qPCR reaksiyonunu doğrulamak ve kontrol etmek için her CALR reaksiyon karışımı *ABL1* insan geninin endojen sekansını saptamak üzere primerler ve prob içerir. Bu kontrol sıralaması tüm CALR mutant ve yabani tip DNA'nın çok katmanlı bir PCR reaksiyonunda yükseltilir ve mutasyon reaksiyonlarındaki florescein amidite (FAM) etiketli ampliconlardan ayırt etmek için heksaklorofloresein (HEX™) ile etiketlenir. Her iki prob için baskılayıcı Black Hole Quencher®'dir (BHQ-1).

# Sağlanan Malzemeler

## Kit içeriği

<b><i>ipsogen</i> CALR RGQ PCR Kit</b>		<b>(24)</b>
<b>Katalog numarası</b>		<b>674023</b>
<b>Reaksiyon sayısı</b>		<b>24</b>
<b>Renk</b>	<b>Tanım</b>	<b>Hacim</b>
Sarı	CALR Reaction Mix Type 1 (CALR Reaksiyon Karışımı Tip 1)	850 µl
Sarı	CALR Reaction Mix Type 2 (CALR Reaksiyon Karışımı Tip 2)	850 µl
Mor	CALR Reaction Mix CLAMP 1 (CALR Reaksiyon Karışımı CLAMP 1)	850 µl
Mor	CALR Reaction Mix CLAMP 2 (CALR Reaksiyon Karışımı CLAMP 2)	850 µl
Mor	CALR Reaction Mix CLAMP 3 (CALR Reaksiyon Karışımı CLAMP 3)	850 µl
Mor	CALR Reaction Mix CLAMP 4 (CALR Reaksiyon Karışımı CLAMP 4)	850 µl
Mor	CALR Reaction Mix CLAMP 5 (CALR Reaksiyon Karışımı CLAMP 5)	850 µl
Yeşil	CALR Wild-Type Control (CALR Yabani Tip Kontrol)	145 µl
Kırmızı	CALR Mutant Control (CALR Mutant Kontrol)	145 µl
Nane Yeşili	Taq DNA Polymerase (Taq DNA Polimeraz)	85 µl
Beyaz	TE Buffer (TE Tamponu)	1,9 ml

# Gerekli Olan Ancak Sağlanmayan Malzemeler

Kimyasallar ile çalışırken, her zaman uygun laboratuvar önlüğü, tek kullanımlık eldiven ve koruyucu gözlük kullanın. Daha fazla bilgi için, ürün sağlayıcısından edinebileceğiniz, uygun güvenlik veri sayfalarına (SDS'ler) başvurun.

Cihazların üreticinin önerilerine göre kontrol ve kalibre edilmiş olduğundan emin olun.

- Özel pipetler (ayarlanabilir) (1–10 µl; 10–100 µl; 100–1000 µl)  
En az iki set pipet önerilir: biri PCR reaksiyon karışımlarının hazırlanması ve dağıtılması, diğer ise PCR şablonu yükleme dahil DNA kullanımı için.
- Nükleaz içermeyen aerosole dirençli steril hidrofobik filtreli PCR pipeti uçları
- 1,5 ml veya 2,0 ml nükleaz içermeyen PCR tüpü
- Tek kullanımlık eldiven
- Vorteks karıştırıcı
- Spektrofotometre

## Manuel DNA ekstraksiyonu için ek ekipman ve malzemeler

- QIAamp® DSP DNA Blood Mini Kit (kat. no. 61104)
- Etanol (%96 ila 100)  
**Not:** Denatüre alkol kullanmayın çünkü bu metanol veya metiletilketon gibi diğer kimyasal maddeleri içerir.
- Örneklerin 56°C'de parçalanması için ısıtma bloku
- 0,5 ml/1,5 ml/2,0 ml'lik reaksiyon tüpleri için rotora sahip masaüstü santrifüj (13.000 ila 14.000 rpm'ye ulaşma özelliğinde)

## **Otomatik DNA ekstraksiyonu için ek ekipman ve malzemeler**

- QIASymphony® SP cihazı (kat. no. 9001297), yazılımı sürümü 4.0 veya daha üstü ve Blood\_200\_V7\_DSP protokolü dahil tedarik edilen aksesuarlar
- Tube Insert 3b (kat. no. 9242083)
- QIASymphony DSP DNA Mini Kit (kat. no. 937236)
- Sample Prep Cartridges, 8-well (kat. no. 997002)
- 8-Rod Covers (kat. no. 997004)
- Filter-Tips, 1500 µl (kat. no. 997024)
- Filter-Tips, 200 µl (kat. no. 990332)
- Elution Microtubes CL (kat. no. 19588)
- Tip disposal bags (kat. no. 9013395)
- Microtubes 2.0 ml Type H (Sarstedt®, kat. no. 72.694)

## **Rotor-Gene Q MDx'de PCR için ek ekipman ve malzemeler**

- Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM\* (kat. no. 9002032) ve tedarik edilen aksesuarlar
- Rotor-Gene AssayManager® yazılım sürümü 2.1.x (x = 0 veya daha yüksek)
- Rotor-Gene AssayManager v2.1 Gamma Plug-in sürüm 1.0.x (x = 0 veya daha yüksek)
- CALR Assay Profile ipsogen\_CALR\_blood\_CE sürüm 1.0.x (x = 2 veya daha yüksek)
- Loading Block for 72 x 0.1 ml Tubes (kat. no. 9018901)
- 72-Well Rotor (kat. no. 9018903)
- Adaptor Locking Ring 72-Well Rotor (kat. no. 9018904)
- Rotor Holder (kat. no. 9018908)
- Strip Tubes and Caps, 0.1 ml, for the Rotor-Gene Q MDx (kat. no. 981103 veya 981106)
- Buz (veya soğutma bloku)

# Uyarılar ve Önlemler

İn vitro tanı amaçlı kullanım için

Kimyasallar ile çalışırken, her zaman uygun laboratuvar önlüğü, tek kullanımlık eldiven ve koruyucu gözlük kullanın. Daha fazla bilgi için lütfen ürün sağlayıcısından edinebileceğiniz, uygun güvenlik veri sayfalarına (SDS'ler) başvurun. Bu belgeler, her bir QIAGEN kiti ve kit bileşenlerine ait SDS'yi bulabileceğiniz, görüntüleyebileceğiniz ve yazdırabileceğiniz [www.qiagen.com/safety](http://www.qiagen.com/safety) adresinde çevrimiçi olarak PDF biçiminde mevcuttur.

QIAamp DSP DNA Blood Mini Kit (kat. no. 61104) ve QIASymphony DSP DNA Mini Kit (kat. no. 937236) ekstraksiyon kitleri ile ilgili güvenlik bilgileri için lütfen ilgili el kitaplarına bakın. Cihazlar ile ilgili güvenlik bilgisi için ilgili cihaz kullanım kılavuzuna bakın.

## UYARI

### Bedensel yaralanma riski



Örnek hazırlama atıklarına ağartıcı veya asidik çözeltiler eklemeyin.

QIASymphony DSP DNA Mini Kitinin reaktif kartuşundaki tamponlar ağartıcı ile birleştirildiğinde yüksek derecede reaktif bileşikler oluşturabilen guanidin tuzları içerir. Bu tamponları içeren sıvılar dökülürse uygun laboratuvar deterjanı ve suyla temizleyin. Dökülen sıvı potansiyel olarak enfeksiyöz madde içeriyorsa, önce etkilenen alanı laboratuvar deterjanı ve suyla, ardından %1 (v/v) sodyum hipoklorit ile temizleyin.



## Önlemler

qPCR testlerinin kullanımı izlenebilirlik, moleküler biyolojiye özel ekipmanların bakımı ve yürürlükteki yönetmeliklere ve ilgili standartlara uyumluluk dahil olmak üzere iyi laboratuvar uygulamaları gerektirir.

Bu kit in vitro tanı amaçlı kullanım içindir. Bu kit içinde sağlanan reaktifler ve talimatlar en iyi performans için test edilmiştir.

- Tüm kimyasallar ve biyolojik materyaller potansiyel olarak tehlikeli maddedir. Numuneler ve örnekler potansiyel olarak bulaşıcıdır ve bunlara biyotehlikeli madde olarak davranılmalıdır.
- Örnekleri ve test atıklarını, yerel güvenlik prosedürlerinize uygun olarak imha edin.
- *ipsogen* CALR RGQ PCR Kitinde kullanılan reaktifler, en uygun biçimde seyreltilmiştir. Performans kaybı yaşanabileceği için, reaktifleri daha fazla seyreltmeyin.
- 25 µl'den daha az reaksiyon hacmi (reaksiyon karışımı ve örnek) ile işlem yapmayın.
- QIAGEN'deki kalite kontrol prosedürleri ayrı her kit partisi için işlevsel kit piyasaya sürüm testi barındırır. Bu nedenle, farklı partiler ait reaktifleri karıştırmayın, çünkü bu performansı etkileyebilir.
- Test profili dosyalarının ve gerekli Rotor-Gene AssayManager v2.1 eklentisinin kurulu olduğundan emin olun.
- Ek uyarılar, önlemler ve prosedürler için bkz. *Rotor-Gene Q MDx User Manual* (Rotor-Gene Q MDx Kullanım Kılavuzu) ve *Rotor-Gene AssayManager v2.1 Core Application User Manual* (Rotor-Gene AssayManager v2.1 Core Application Kullanım Kılavuzu).
- İnkübasyon sürelerinin ve sıcaklıkların değiştirilmesi hatalı veya uyumsuz verilere neden olabilir.
- Tüm reaksiyonları (reaksiyon karışımı artı örnek) buz üzerinde veya bir soğutma blokunda hazırlayın.
- Süresi dolmuş ve yanlış saklanmış bileşenleri kullanmayın.
- Reaksiyon karışımları ışığa maruz kalırsa değişikliğe uğrayabilir.

- Karışımların, CALR Mutant Kontrol ve CALR Yabani Tip Kontrol reaktiflerinde bulunan malzemelerle kontaminasyonunu engellemek için aşırı dikkat edin.
- Yanlış pozitif sinyale neden olabilecek DNA veya PCR ürünü aktarma kontaminasyonunu engellemek için son derece dikkatli olun.
- DNA şablonunun bozulmasına yol açabilecek DNase kontaminasyonunu engellemek için son derece dikkatli olun.
- Reaksiyon karışımlarını kurmak ve şablonları eklemek için birbirinden ayrı pipetler kullanın.
- İşlem bitmeden Rotor-Gene Q MDx cihazını açmayın.
- İşlem bittikten sonra Rotor-Gene Q MDx tüplerini açmayın. Tipleri, yerel güvenlik prosedürlerinize uygun olarak imha edin.
- Doğru örnek testi yapabilmek için yanlış örnek girişi, yükleme hatası ve pipetleme hatası gibi durumlara karşı dikkatli olunmalıdır.
- Doğru tanımlama yapabilmek amacıyla örneklerin sistematik bir şekilde kullanıldığından emin olun.

Bu nedenle aşağıdakileri öneririz:

- Nükleaz içermeyen laboratuvar malzemeleri (örn., pipetler, pipet uçları, reaksiyon şişeleri) kullanın ve testi gerçekleştirirken eldiven takın.
- Örneklerin ve reaktiflerin çapraz kontaminasyonunu önlemek için tüm pipetleme adımları için yeni aerosole dirençli pipet uçları kullanın.
- Ön-PCR ana karışımının hiçbir DNA matrisinin (DNA, plazmid veya PCR ürünü) içeri sokulmadığı ayrılmış bir alanda özel malzemeler (pipetler, uçlar vb.) kullanarak hazırlayın. Aynı alanda NTC tüplerinin içine TE Tamponu ekleyin ve tüpleri kapatın. Test edilecek örnekleri, CALR Mutant Kontrol ve CALR Yabani Tip Kontrol reaktiflerini bu işe özgü malzemelerle (pipetler, uçlar vb.) ayrı bir odada ekleyin.

# Reaktifi Saklama ve Kullanma

*ipsogen* CALR RGQ PCR Kiti kuru buz üzerinde taşınır ve teslim edilir. Teslimat esnasında *ipsogen* CALR RGQ PCR Kitinin herhangi bir bileşeninin donmuş olmadığını, dış ambalajın nakliye esnasında açılmış olduğunu veya paket içinde ambalaj notu veya reaktiflerin bulunmadığını fark ederseniz, lütfen QIAGEN Teknik Servisleriyle veya yerel dağıtıcılarla irtibata geçin ([www.qiagen.com](http://www.qiagen.com) adresini ziyaret edin).

*ipsogen* CALR RGQ PCR Kiti teslim alınmasından hemen sonra -30°C ila -15°C arasında sabit sıcaklıklı bir dondurucuda saklanmalı ve ışıktan korunmalıdır. *ipsogen* CALR RGQ PCR Kiti, belirtilen saklama koşullarında saklandığı zaman belirtilen son kullanma tarihine kadar stabil kalır.

Bir kez açıldığında, reaktifler -30°C ila -15°C sıcaklıkta orijinal ambalajı içinde saklanırsa ambalaj üzerindeki son kullanma tarihine kadar kullanılabilir. Tekrarlanan çözündürme ve dondurma işlemlerinden kaçınılmalıdır. En fazla 5 kez çözündürüp dondurmanız tavsiye edilir.

QIAamp DSP DNA Blood Mini Kit (kat. no. 61104) ve QIASymphony DSP DNA Mini Kit (kat. no. 937236) ekstraksiyon kitleri ile ilgili saklama ve kullanma bilgileri için lütfen ilgili el kitaplarına bakın.

Tüm bileşenlerin kutusunda ve etiketlerinin üstünde yazılı olan son kullanma tarihlerine ve saklama koşullarına dikkat edilmelidir. Süresi dolmuş ve yanlış saklanmış bileşenleri kullanmayın.

# Numune Kullanımı ve Saklanması

## Tam kan

*ipsogen* CALR RGQ PCR Kiti 2K-EDTA ile antikoagüle edilmiş tam kan örneklerinden ekstrakte edilen genomik DNA örnekleri ile kullanım amaçlıdır. Tam kan aşağıdaki şekilde saklanabilir:

- 2°C ila 8°C'de 96 saatten uzun olmamak kaydıyla
- 15°C ila 25°C'de 96 saatten uzun olmamak kaydıyla
- -30°C ila -15°C'de dondurulmuş olarak 1 aydan uzun olmamak kaydıyla

## Genomik DNA örnekleri

Genomik DNA, ekstraksiyondan sonra 2°C ila 8°C'de 1 hafta boyunca veya doğrudan ekstraksiyondan sonra veya TE tamponunda seyreltikten sonra -30°C ila -15°C'de 24 aydan uzun olmamak kaydıyla saklanabilir.

# Prosedür

## Genomik DNA ekstraksiyonu ve hazırlanması

*ipsogen* CALR RGQ PCR Kiti, manuel ekstraksiyon için QIAamp DSP DNA Blood Mini Kit (kat. no. 61104) veya otomatik ekstraksiyon için QIASymphony SP cihazıyla birlikte QIASymphony DSP DNA Mini Kit (kat. no. 937236) ile birlikte doğrulanmıştır.

gDNA ekstraksiyon reaktiflerinin son kullanma tarihinin geçmediğinden ve doğru koşullarda nakledilip saklandığından emin olun.

### QIAamp DSP DNA Blood Mini Kit ile manuel gDNA ekstraksiyonu

QIAamp DSP DNA Blood Mini Kit (kat. no. 61104) ile manuel gDNA ekstraksiyonu *QIAamp DSP DNA Blood Mini Kit El Kitabı*'na göre gerçekleştirilir.

### Başlamadan önce yapılması gerekenler

- Kan örneklerini oda sıcaklığıyla dengeye getirin (15 ila 25°C) ve iyi homojenleştirilmiş olduklarından emin olun.

- Parçalama Tamponunu hazırlayın

Parçalama Tamponu içinde (AL) çökelti oluştuysa, 56°C'de inkübe ederek çözdürün.

- QIAGEN Proteazı hazırlayın

Liyofilize QIAGEN Proteaz (QP) şişesine 1,2 ml Proteaz Solvent (PS) ekleyip dikkatlice karıştırın. Köpürmeyi engellemek için şişeyi pek çok kez baş aşağı çevirerek karıştırın. QP'nin tamamen çözüldüğünden emin olun.

**Not:** PS içinde çözüldükten sonra, QP 2 ila 8°C'de saklandığında 2 aya kadar stabildir. Proteazın ömrünü uzatmak için -20°C'de saklama önerilir ancak tekrar dondurup çözdürmekten kaçınılmalıdır. Bu nedenle, QP alikotlarının saklanması önerilir.

- Yıkama Tamponu 1'i hazırlayın

Bir dereceli silindir kullanarak 19 ml konsantre Yıkama Tamponu 1 (AW1) içeren şişeye 25 ml etanol (%96 ila 100) ekleyin. Çözülmüş AW1'i oda sıcaklığında (15 ila 25°C) saklayın.

**Not:** Prosedüre başlamadan önce daima çözülmüş AW1'i şişeyi pek çok kez baş aşağı çevirerek karıştırın.

- Yıkama Tamponu 2'yi hazırlayın

Bir dereceli silindir kullanarak 13 ml konsantre Yıkama Tamponu 2 (AW2) içeren şişeye 30 ml etanol (%96 ila 100) ekleyin. Çözülmüş AW2'yi oda sıcaklığında (15 ila 25°C) saklayın.

**Not:** Prosedüre başlamadan önce daima çözülmüş AW2'yi şişeyi pek çok kez baş aşağı çevirerek karıştırın.

- Elüsyon Tamponunu hazırlayın

Kit ile bir şişe Elüsyon Tamponu (AE) tedarik edilmiştir. AE'nin kontaminasyonunu engellemek için AE'yi şişeden pipetlerken aerosol bariyerli pipet uçları kullanılmasını ve ardından şişenin kapağının derhal kapatılmasını şiddetle tavsiye ederiz.

Tampon AE'yi oda sıcaklığına getirin (15 ila 25°C).

- Adım 4'te kullanılmak üzere bir ısıtma blokunu 56°C'ye getirin.

## Prosedür

1. 20 µl proteaz QP'yi bir lizis tüpü (LT) içine pipetleyin.

**Not:** Çözdürülmüş proteazı kullanmadan önce son kullanma tarihini kontrol edin.

2. Lizis tüpüne 200 µl kan örneği ekleyin.

3. Lizis tüpüne 200 µl Parçalama Tamponu (AL) ekleyip kapağı kapatın ve bir puls vorteks kullanarak 15 saniye karıştırıp kısaca santrifüjleyin.

**Not:** Verimli parçalamanın garanti edilmesi için örnek ve AL'nin homojen bir çözelti verecek şekilde iyice karışmaları elzemdir.

**Not:** Tampon AL'nin yüksek viskozitesi olduğu için dikkatlice pipetleyerek ve uygun bir pipet kullanarak doğru hacimde AL eklediğinizden emin olun.

**Önemli:** QP'yi doğrudan Tampon AL'ye eklemeyin.

4. 56°C'de ( $\pm 1^\circ\text{C}$ ) 10 dakika ( $\pm 1$  dakika) inkübe edin.
5. Kapağın içindeki damlaları gidermek için lizis tüpünü tam hızda yaklaşık 5 saniye için santrifüjleyin.
6. Lizis tüpüne 200  $\mu\text{l}$  ethanol (%96 ila 100) ekleyip kapağı kapatın ve bir puls vorteks kullanarak  $\geq 15$  saniye karıştırın.
7. Kapağın içindeki tüm sıvı damlalarını gidermek için lizis tüpünü tam hızda yaklaşık  $\geq 5$  saniye santrifüjleyin.
8. Adım 7'deki lizatın tamamını QIAamp Mini dönel kolonuna kenarını ıslatmadan dikkatlice uygulayın. QIAamp Mini dönel kolon membranına pipet ucuyla dokunmaktan kaçının.

**Not:** Pek çok örnek işliyorsanız bir seferde sadece bir lizis tüpü açın.

9. QIAamp Mini dönel kolonunun kapağını kapatın ve yaklaşık 6000 x g'de (8000 rpm) 1 dakika boyunca santrifüjleyin.
10. QIAamp Mini dönel kolonunu temiz bir yıkama tüpüne (WT) yerleştirin ve süzüntüyü içeren tüpü atın.

**Not:** 6000 x g'de (8000 rpm) santrifüj işleminden sonra lizat membrandan tamamen geçmediyse, tam hızda (20.800 x g'ye kadar) 1 dakika boyunca yeniden santrifüjleyin.

**Not:** Lizat santrifüjleme sırasında hala membrandan geçmiyorsa örneği atıp izolasyonu ve saflaştırmayı yeni örnek malzemesiyle tekrarlayın.

11. QIAamp Mini dönel kolonu dikkatlice açıp kenarı ıslatmadan 500  $\mu\text{l}$  Tampon AW1 ekleyin. QIAamp Mini dönel kolon membranına pipet ucuyla dokunmaktan kaçının.
12. QIAamp Mini dönel kolonunun kapağını kapatın ve yaklaşık 6000 x g'de (8000 rpm) 1 dakika boyunca santrifüjleyin.
13. QIAamp Mini dönel kolonunu temiz bir yıkama tüpüne yerleştirin ve süzüntüyü içeren tüpü atın.

14. QIAamp Mini dönel kolonu dikkatlice açıp kenarı ıslatmadan 500 µl Tampon AW2 ekleyin. QIAamp Mini dönel kolon membranına pipet ucuyla dokunmaktan kaçının.
15. QIAamp Mini dönel kolonunun kapağını kapatın ve tam hızda (yaklaşık 20.000 x g veya 14.000 rpm) 1 dakika boyunca santrifüjleyin.
16. QIAamp Mini dönel kolonunu temiz bir yıkama tüpüne yerleştirin ve süzüntüyü içeren tüpü atın.
17. Membranı tamamen kurutmak için tam hızda (yaklaşık 20.000 x g veya 14.000 rpm) 3 dakika boyunca santrifüjleyin.
18. QIAamp Mini dönel kolonunu temiz bir elüsyon tüpüne (ET) yerleştirin ve süzüntüyü içeren yıkama tüpünü atın.
19. QIAamp Mini dönel kolon kapağını dikkatlice açın ve membranın ortasında 50 ila 200 µl Tampon AE uygulayın.  
**Not:** Elüat içindeki nihai DNA konsantrasyonunu artırmak ancak toplam DNA verimini biraz düşürmek için elüsyon hacimlerini düşürün.
20. Kapağı kapatın ve oda sıcaklığında (15 ila 25°C) 1 dakika boyunca inkübe edin.
21. DNA elüsyonunu sağlamak için yaklaşık 6000 x g'de (8000 rpm) 1 dakika boyunca santrifüjleyin.
22. gDNA örneğini uygun koşullarda saklayın.
23. Kullanılmış örnek tüplerini, plakalarını ve atığını yerel güvenlik düzenlemelerinize göre atın.



## QIASymphony DSP DNA Mini Kit ile otomatik gDNA ekstraksiyonu

Otomatik gDNA ekstraksiyonu QIASymphony SP cihazıyla QIASymphony DSP DNA Mini Kit (kat. no. 937236) ile birlikte gerçekleştirilir. *QIASymphony DSP DNA Kit El Kitabı*'ndaki talimatlara uyun. QIASymphony üzerinde **Blood\_200\_V7\_DSP** protokolün seçin.

**Not:** Protokolün aşağıdaki özellikleri *ipsogen* CALR RGQ PCR Kit ile analiz için tam kandan gDNA ekstraksiyonu içindir:

- 300 µl tam kanı bir mikro tüpe aktarın (2,0 ml Type H, Sarstedt, kat. no. 72.694).
- Tam kan protokolü için elüsyon hacmi ve çıktı konumu **100 µl**'dir.

### Başlamadan önce önemli noktalar

- Ekstrakte edilecek tam kan toplam hacmi 200 µl'dir (artı 100 µl ölü hacim).
- QIASymphony SP cihazını çalıştırma hakkında bilgi sahibi olduğunuzdan emin olun. Çalıştırma talimatları için cihazınızla tedarik edilen QIASymphony SP kullanım kılavuzlarına bakın.
- Cihaz işlevi için ek bakım zorunlu değildir ancak kontaminasyon riskini azaltmak için şiddetle tavsiye edilir.
- Bir reaktif kartuşunu ilk kez kullanmadan önce QSL1 ve QSB1 Tamponlarının çökelti içermediğinden emin olun. Gerekirse, QSL1 ve QSB1 Tamponları içeren olukları reaktif kartuşundan çıkarın ve 30 dakika boyunca 37°C'de arada çökeltiyi çözdürmek için çalkalayarak inkübe edin. Olukları doğru konumlara geri yerleştirdiğinizden emin olun. Reaktif kartuşu zaten delinmişse, olukların Reuse Seal Strips ile kapatıldığından emin olun ve tam reaktif kartuşlarını bir su banyosunda 30 dakika boyunca 37°C'de arada çalkalayarak inkübe edin.
- Reaktif kartuşunu (RC) şiddetli çalkalamaktan kaçının, aksi halde sıvı seviyesi tespiti sorunlarına yol açacak köpük oluşabilir.

## Başlamadan önce yapılması gerekenler

- Prosedüre başlamadan önce manyetik parçacıkların tamamen yeniden asılı kaldıklarından emin olun.  
İlk kullanımdan önce manyetik parçacıkları içerek oluğa en az 3 dakika boyunca şiddetli biçimde vorteks yapın.
- Delme kapağının reaktif kartuşu üzerine yerleştirildiğinden ve manyetik partikül oluşunun kapağının çıkarıldığından veya kısmen kullanılmış bir reaktif kartuşu kullanılıyorsa Reuse Seal Strips'in çıkarıldığından emin olun.
- Enzim tüplerini açtığınızdan emin olun.
- Örnekler barkodluysa, örnekleri tüp taşıyıcısında barkodları QIASymphony SP'nin sol tarafındaki barkod okuyucusuna bakacak şekilde çevirin.

## Prosedür

1. Tüm çekmeceleri ve davlumbazı kapatın.
2. QIASymphony SP'yi açın; **Sample Preparation** (Örnek Hazırlama) ekranı belirene kadar ve başlangıç prosedürü bitene kadar bekleyin.  
Güç anahtarı QIASymphony SP'nin sol alt köşesinde bulunur.
3. Cihazda oturum açın.
4. Çalıştırılacak protokolü seçin.  
Tam kan örnekleri için **Select All** (Tümünü Seç) düğmesini seçin ve **DNA Blood** (DNA Kan) ögesini, ardından da **Blood\_200\_V7\_DSP** ögesini seçin.
5. "Waste" (Atık) çekmecesinin düzgün şekilde hazırlandığından emin olun. Uç şutu ve sıvı atık kabı dahil "Waste" (Atık) çekmecesinin envanter taramasını gerçekleştirin. Gerekirse uç atma torbasını değiştirin.
6. Gerekli elüsyon rafını "Eluate" (Elüat) çekmecesine yükleyin.  
"Elution slot 4" (Elüsyon yuva 4) üzerine 96 kuyucuklu plaka yüklemeyin.  
Sadece karşılık gelen soğutma adaptörüyle "Elution slot 1"i (Elüsyon yuva 1) kullanın.

96 kuyucuklu bir plaka kullanırken plakanın doğru yönelimde olduğundan emin olun, çünkü yanlış yerleştirme alt analizde örnek karışmasına neden olabilir.

7. Gerekli reaktif kartuşunu/kartuşlarını ve sarf malzemelerini “Reagents and Consumables” (Reaktifler ve Sarf Malzemeleri) çekmecesine yükleyin.

**Not:** Pipet uçlarının çekmece içinde doğru biçimde sabitlendiğinden emin olun.

8. “Reagents and Consumables” (Reaktifler ve Sarf Malzemeleri) çekmecесinin envanter taramasını gerçekleştirin.

9. Ekstrakte edilecek tam kan örneğinin 300 µl'sini bir mikro tüpe (2,0 ml Type H) aktarıp bunu tüp örnek taşıyıcısı üzerindeki 3B 2 ml adaptör içine yerleştirin.

Örnek tüplerini “Sample” (Örnek) çekmecесine yükleyin.

10. Dokunmatik ekranı kullanarak işlenecek her bir örnek partisi için gerekli bilgileri girin:

- Örnek bilgileri: **Select All** (Tümünü Seç) öğesini seçip **Tube Insert** (Tüp Yerleştir) sayfasından **Sarstedt reference 72.694** (Sarstedt referans 72.694) öğesini seçerek varsayılan tüp biçimini değiştirin.
- Seçili protokolü onaylayın: **Blood\_200\_V7\_DSP**.
- Elüsyon hacmi ve çıktığı konumu: Tam kan protokolü için **100 µl** öğesini seçin.

**Not:** Parti ile ilgili bilgiler girildikten sonra durum **LOADED**'dan (YÜKLENDİ) **QUEUED**'a (SIRADA) değişir. Bir parti sıraya girdikten sonra **Run** (Çalıştır) düğmesi belirir.

11. **Run** (Çalıştır) düğmesine basarak çalışmayı başlatın.

12. Beliren mesajı okuyun ve onaylayın.

**Not:** Dahili kontrol tüplerinin sıvı seviyesi tespiti gerçekleştirilene kadar ve QIASymphony SP taşıyıcı durumu **RUNNING**'e (ÇALIŞIYOR) değişene kadar cihazın yanında beklemeniz önerilir.

**Not:** İşleme sırasında çalışmayı duraklatmayın veya durdurmayın (bir acil durum oluşması dışında) çünkü bu örneklerin “unclear” (belirsiz) olarak işaretlenmesine neden olacaktır.

**Not:** Örnekleri sürekli olarak yüklemek ve bu çalışmaya eklemek (reaktifler yüklenene kadar) mümkündür. Safılaştırma prosedürünü başlatmak için **Run** (Çalıştır) düğmesine basın.

13. Protokol çalışmasının sonunda partinin durumu **RUNNING**'den (ÇALIŞIYOR)

**COMPLETED**'a (TAMAMLANDI) değişir. Safılaştırılmış nükleik asitleri içeren elüsyon rafını "Eluate" (Elüat) çekmecesinden alın.

Çalışma bittiğinde elüat plakasının "Eluate" (Elüat) çekmecesinden derhal çıkarılması önerilir. Sıcaklık ve neme bağlı olarak çalışma tamamlandıktan sonra QIASymphony SP içinde bırakılan elüsyon plakaları yoğunlaşma veya buharlaşmaya maruz kalabilirler.

14. QIASymphony SP sonuç dosyasını dışa aktarın: bu rapor her bir elüsyon plakası için oluşturulur.

14a. USB belleği, QIASymphony SP cihazının ön kısmındaki USB portlarından birine yerleştirin.

14b. **Tools** (Araçlar) düğmesine tıklayın.

14c. **File Transfer** (Dosya Aktarım) öğesini seçin.

14d. **In-/Output Files** (Girdi/Çıktı Dosyaları) sekmesinde **Results Files** (Sonuç Dosyaları) öğesini seçip **Transfer** (Aktar) öğesine tıklayın.

Dosya aktarımının adını aşağıdaki formatta tutun:

yyyy-aa-gg sasa:dd:snsn\_Elüsyon raf ID.

15. QIASymphony SP sonuç dosyasında her örnek için **Validity of result** (Sonucun doğruluğu) kolonunu kontrol edin.

- Doğru ve belirsiz durum: DNA kalite ve miktar tayinine devam edin
- Geçersiz durum: örnek reddedilmiştir. Ekstraksiyon adımını tekrarlayın

16. Bir reaktif kartuşu sadece kısmen kullanılmışsa, buharlaşmayı engellemek için protokolün sonunda tedarik edilmiş Reuse Seal Strips ile kapatın ve proteinaz K içeren tüpleri vidalı kapaklarla derhal kapatın.

17. Kullanılmış örnek tüplerini, plakalarını ve atığını yerel güvenlik düzenlemelerinize göre atın.

18. QIASymphony SP cihazını temizleyin.

Cihazınız ile tedarik edilmiş QIASymphony SP kullanım kılavuzlarında bulunan bakım talimatlarına uyun. Çapraz kontaminasyon riskini en aza indirmek için uç muhafazalarını düzenli olarak temizlediğinizden emin olun.

19. Cihaz çekmecelerini kapatın ve QIASymphony SP cihazını kapatın.

Genelde manyetik parçacıklar elüatların içine karışmaz. Elüat içinde siyah parçacıklar görülürse manyetik parçacıklar aşağıdaki şekilde giderilebilir:

- DNA içeren tüpünü manyetik parçacıklar ayrışana uygun bir manyetik ayrıştırıcıya (örn., QIAGEN 12-Tube Magnet, kat. no. 36912) uygulayın.
- DNA mikro plakalar içindeyse mikro plakayı manyetik parçacıklar ayrışana uygun bir manyetik ayrıştırıcıya (örn., QIAGEN 96-Well Tube Magnet A, kat. no. 36915) uygulayın.
- Uygun manyetik ayrıştırıcı mevcut değilse, kalan tüm manyetik parçacıkları ayırmak için DNA'yı içeren tüpü mikro santrifüjde 1 dakika boyunca tam hızda santrifüjleyin.

## DNA'nın miktarının saflığının tayini

gDNA ekstraksiyon kitlerinde kullanılan elüsyon kitleri koruyucu sodyum azit içerir. Sodyum azit 260 nm'yi abzorbe eder, bu nedenle spektrofotometreyi kalibre etmek için bir boş ölçüm gerçekleştirilmelidir. Boş olarak ekstraksiyon protokolüne göre elüsyon tamponu kullanılmalıdır.

- $A_{260}/A_{280}$  oranı  $\geq 1,7$  olmalıdır. Daha küçük oranlar genelde protein kontaminasyonuna veya PCR adımını olumsuz etkileyen organik kimyasalların varlığına işaret eder.
- DNA konsantrasyonu 260 nm'de abzorbans ölçülerek tayin edilir. Doğru olması için 260 nm'deki abzorbans okumaları 0,1 ila 1,0 arasında olmalıdır.  
1 birimin 260 nm'deki abzorbansı ml başına 50  $\mu\text{g}$  DNA'ya karşılık gelir  
( $A_{260} = 1 = 50 \mu\text{g/ml}$ ).  
Saflaştırılmış toplam DNA miktarı (ng) = DNA konsantrasyonu (ng/ $\mu\text{l}$ )  $\times$  örneğin hacmi ( $\mu\text{l}$ ).
- $A_{260}/A_{280}$  oranı 1,7'den düşükse ve/veya gDNA konsantrasyonu 10 ng/ $\mu\text{l}$ 'den düşükse, örnek daha fazla işlenmemelidir.

## Genomik DNA örneği normalizasyonu

DNA'yı *ipsogen* CALR RGQ PCR Kit içinde tedarik edilen TE tamponu içinde 10 ng/ $\mu\text{l}$ 'ye seyreltin.

Rotor-Gene Q MDx PCR reaksiyonu 5  $\mu\text{l}$  nihai örnek hacmi içinde 50 ng saflaştırılmış gDNA için optimize edilmiştir.

## Protokol: Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM cihazı üzerinde qPCR\*

*ipsogen* CALR RGQ PCR Kiti Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM cihazı üzerinde Rotor-Gene AssayManager v2.1 ile sonuçların otomatik yorumlanması kullanılarak çalıştırılmalıdır. Çalışma için döngü parametreleri kilittir.

Protokole başlamadan önce Rotor-Gene Q MDx cihazı ve Rotor-Gene AssayManager v2.1 yazılımı hakkında bilgi sahibi olmak için gerektiği kadar zaman geçirin. Ayrıntılar için cihaz, Rotor-Gene AssayManager v2.1 ve Gamma Plug-in için kullanım kılavuzlarına bakın.

### Gamma Plug-in kurulumu ve test profilinin içe aktarımı

Rotor-Gene Q MDx cihazına bağlı bilgisayarda Rotor-Gene AssayManager v2.1 yazılımı yüklü olmalıdır. Yazılım, [www.qiagen.com/Products/Rotor-GeneAssayManager\\_v2\\_1.aspx](http://www.qiagen.com/Products/Rotor-GeneAssayManager_v2_1.aspx) internet sitesinde Rotor-Gene AssayManager v2.1 ürün sayfasındaki **Product Resources** (Ürün Kaynakları) sekmesi altındaki **Operating Software**'dan (İşletim Yazılımı) indirilebilir.

Rotor-Gene AssayManager v2.1 temel yazılım hakkında ayrıntılar için bkz. *Rotor-Gene AssayManager v2.1 Core Application User Manual* (Rotor-Gene AssayManager v2.1 Temel Uygulama Kullanım Kılavuzu). Bağlı bilgisayarlar üzerindeki ek yazılımlar hakkında ayrıntılar için lütfen bkz. *Rotor-Gene AssayManager v2.1 Quick-Start Guide* (Rotor-Gene AssayManager v2.1 Hızlı Başlangıç Kılavuzu).

*ipsogen* CALR RGQ PCR Kitin Rotor-Gene AssayManager v2.1 kullanımında sonuçların otomatik yorumlanması için Rotor-Gene AssayManager v2.1 üzerinde Gamma eklentisi kurulu olmalıdır. Eklentinin en güncel sürümüne erişmek için [www.qiagen.com/Products/](http://www.qiagen.com/Products/)

\* Varsa, Ocak 2010 veya daha sonra üretilmiş Rotor-Gene Q 5plex HRM cihazı. Üretim tarihi bilgisi, cihazın arkasındaki seri numarasından edinilebilir. Seri numarası, "mm" ibaresinin basamak olarak üretim ayını, "yy" ibaresinin üretim yılının son iki basamağını ve "nnn" ibaresinin benzersiz cihaz tanımlayıcıyı gösterdiği "mmyyynn" biçimindedir.

**Rotor-GeneAssayManager\_v2\_1.aspx** internet sayfasındaki Rotor-Gene AssayManager v2.1 ürün sayfasında **Product Resources**'a (Ürün Kaynakları) bakın.

Eklentinin kurulumu ile ilgili ayrıntılar için *Rotor-Gene AssayManager v2.1 Core Application User Manual*'da (Rotor-Gene AssayManager v2.1 Temel Uygulama Kullanım Kılavuzu) "Installing Plug-ins" (Eklentilerin Kurulumu) bölümüne bakın.

*ipsogen* CALR RGQ PCR Kit ayrıca bir test profili gerektirir. Test profili, qPCR testinde döngüleme ve analiz yapmak için gereken tüm parametreleri içerir. CALR test profili (*ipsogen\_CALR\_blood\_CE*), **Product Resources** (Ürün Kaynakları) sekmesi altında *ipsogen* CALR RGQ PCR Kit ürün sayfasından **Protocol Files**'dan (Protokol Dosyaları) indirilebilen bir .iap dosyasına karşılık gelir. Test profili Rotor-Gene AssayManager v2.1 yazılımına aktarılmalıdır.

Gamma eklentisinin kurulumu ve test profili hakkında ayrıntılı bilgi için bkz. *Rotor-Gene AssayManager v2.1 Core Application User Manual* (Rotor-Gene AssayManager v2.1 Temel Uygulama Kullanım Kılavuzu) ve *Rotor-Gene AssayManager v2.1 Gamma Plug-in User Manual* (Rotor-Gene AssayManager v2.1 Gamma Eklentisi Kullanım Kılavuzu).

1. Hem Gamma Plug-in hem de CALR test profilinin en güncel sürümünü **www.qiagen.com** internet adresinden indirin.
2. Kurulum işlemine **RGAM\_V2\_1\_Gamma\_Plug-in.Installation.V1\_0\_0.msi** dosyasına çift tıklayarak başlayın ve kurulum talimatlarını izleyin.  
Ayrıntılı bir açıklama için *Rotor-Gene AssayManager v2.1 Core Application User Manual* (Rotor-Gene AssayManager v2.1 Temel Uygulama Kullanım Kılavuzu) içinde "Installing Plug-ins" (Eklentilerin Kurulumu) bölümüne bakın.



Not: Sistem çapında süreç güvenliği için aşağıdaki yapılandırma ayarlarının kapalı mod için ayarlanması Őarttır:

- **Configuration** (Yapılandırma) ortamında **Settings** (Ayarlar) sekmesini seçin.
- **Closed mode** (Kapalı mod) altındaki **Work list** (alıŐma listesi) panelinde **Material number required** (Materyal numarası zorunlu), **Valid expiry date required** (Geçerli son kullanma tarihi zorunlu) ve **Lot number required** (Lot numarası zorunlu) kutucuklarını işaretleyin.

Bu sadece “Administrator” (Yönetici) haklarına sahip bir kullanıcı tarafından yapılabilir.

3. Gamma Plug-in kurulduktan sonra CALR test profilini (.iap dosyası) ie aktarın. Rotor-Gene AssayManager v2.1 yazılımına Rotor-Gene AssayManager v2.1 için “Administrator” (Yönetici) haklarına sahip bir kullanıcı olarak oturum açın.
4. **Configuration** (Yapılandırma) ortamını seçin.
5. **Assay Profiles** (Test Profilleri) sekmesini seçin.
6. **Import** (İe Aktar) düğmesine tıklayın.
7. Dosya a penceresinde CALR test profili ipsogen\_CALR\_blood\_CE dosyasını seçin.
8. **Open** (A) Ğmesine tıklayın. Test profili yüklenip mevcut test profileri listesine eklenir ve **Setup** (Kurulum) ortamında kullanılabilir.

**Not:** Bir test profilinin aynı sürümü iki kez ie aktarılamaz.

## Yükleme bloku ve rotorun kurulumu

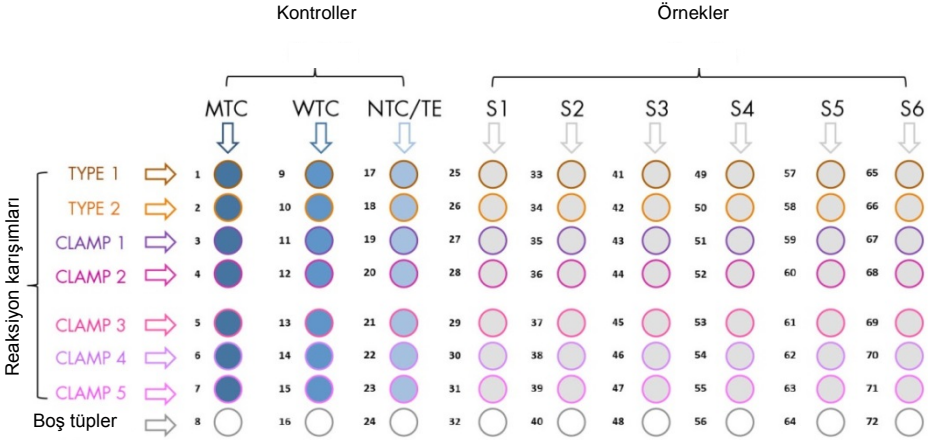
Kontrollerin ve reaksiyon karışımlarının kullanımını optimize etmek için, aynı deney içinde 6 gDNA rneği test edilmesi önerilir.

Her reaksiyon karışımı (CALR TYPE 1, CALR TYPE 2, CALR CLAMP 1, CALR CLAMP 2, CALR CLAMP 3, CALR CLAMP 4 ve CALR CLAMP 5) 9 reaksiyon için kullanılır: 6 gDNA rneği ve 3 harici kontrol [1 CALR Mutant Kontrol (MTC), 1 CALR Yabani Tip Kontrol (WTC) ve 1 Şablonsuz Kontrol (NTC = *ipsogen* CALR RGQ PCR Kit içinde tedarik edilen TE tamponu)].

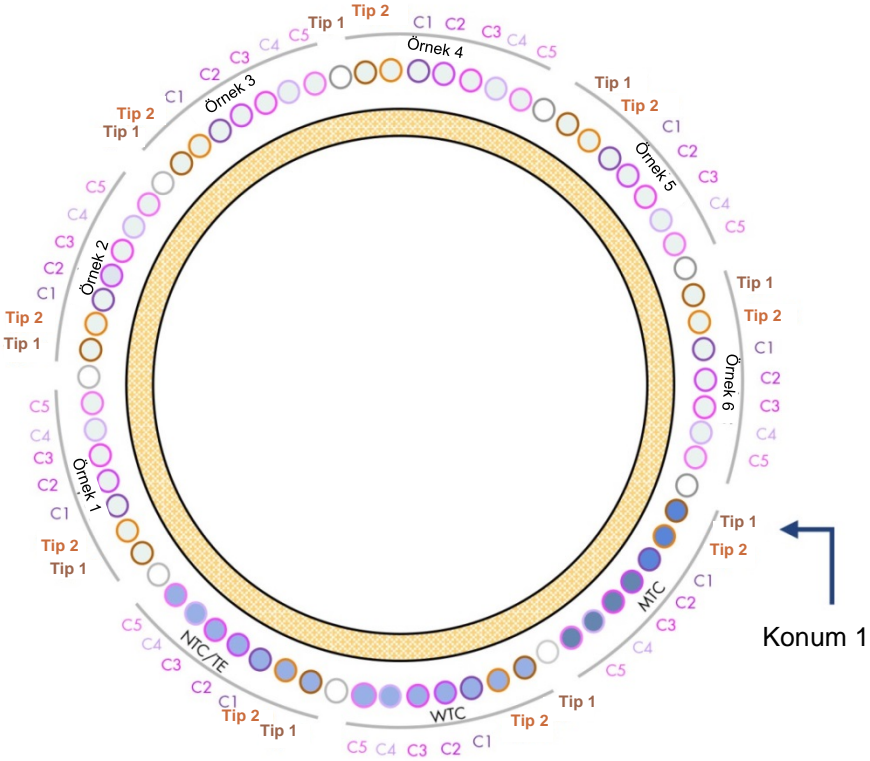
Şekil 4 ve Şekil 5'te gösterilen şemalar *ipsogen* CALR RGQ PCR Kit ile optimize bir deney için yükleme bloku ve rotor kurulumunun gösterimini sağlar.

CALR reaktif karışımlarının ve kontrollerinin konumu CALR test profilinde ayarlanır ve değiştirilemez. Reaksiyon karışımları/kontroller aşağıda anlatıldığı şekilde yerleştirilmese otomatik sonuç analizi gerçekleştirilemez.

Şekil 4'teki sayılar yükleme bloğu içindeki konumları gösterir ve nihai rotor pozisyonunu belirtir.



**Şekil 4. *ipsogen* CALR RGQ PCR Kit ile bir deney için yükleme bloku kurulumu.** TYPE 1: CALR Reaksiyon karışımı TYPE 1; TYPE 2: CALR Reaksiyon karışımı TYPE 2; CLAMP 1: CALR Reaksiyon karışımı CLAMP 1; CLAMP 2: CALR Reaksiyon karışımı CLAMP 2; CLAMP 3: CALR Reaksiyon karışımı CLAMP 3; CLAMP 4: CALR Reaksiyon karışımı CLAMP 4; CLAMP 5: CALR Reaksiyon karışımı CLAMP 5; MTC: CALR Mutant Kontrol; WTC: CALR Yabancı Tip Kontrol; NTC/TE: Şablonsuz Kontrol (TE); S1-S6: gDNA örnekleri.



**Şekil 5. ipsogen CALR RGQ PCR Kit ile bir deney için rotor kurulumu.**

Pozisyon 1 MTC'den: CALR Mutant Kontrol; WTC: CALR Yabani Tip Kontrol; NTC/TE: Şablonsuz Kontrol (TE); Tip 1: CALR Reaksiyon karışımı TYPE 1; TYPE 2: CALR Reaksiyon karışımı TYPE 2; C1: CALR Reaksiyon karışımı CLAMP 1; C2: CALR Reaksiyon karışımı CLAMP 2; C3: CALR Reaksiyon karışımı CLAMP 3; C4: CALR Reaksiyon karışımı CLAMP 4; C5: CALR Reaksiyon karışımı CLAMP 5; Örnek 1 ila Örnek 6: gDNA örnekleri. **Not:** Kalan tüm konumlar ○ boş tüplerle doldurulmalıdır.

## Bir çalışma listesi oluşturma

**Setup** (Kurulum) ortamı ve “Creating/Editing a Work List” (Bir Çalışma Listesi Oluşturma/ Düzenleme) ile ilgili genel işlevler *Rotor-Gene AssayManager v2.1 Core Application User Manual* (Rotor-Gene AssayManager v2.1 Temel Uygulama Kullanıcı Kılavuzu) içinde anlatılır.

**Not:** Çalışma listesi dosyası kaydedilebilir. Çalışma listesi örnekler cihaza yüklenmeden önce veya cihazda deney kurulduğunda oluşturulabilir.

1. Rotor-Gene Q MDx cihazını açın.
2. Rotor-Gene AssayManager v2.1 yazılımını açın ve kapalı modda “Operator” (Operatör) rolüne sahip bir kullanıcı olarak oturum açın.
3. **Setup** (Kurulum) ortamını seçin.
4. Çalışma listesi yöneticisinde **New manual work list** (Yeni manuel çalışma listesi) düğmesine tıklayın.
5. Kullanılabilir test profilleri listesinden CALR test profilini seçin.
6. Seçilen test profilini **Selected assay profiles** (Seçilen test profilleri) listesine aktarmak için **Move** (Taşı) ögesine tıklayın. Test profili artık **Selected assay profiles** (Seçilen test profilleri) listesinde görüntülenmelidir.
7. İlgili alana, örnek sayısını (6 adete kadar) girin.
8. **Kit Information** (Kit Bilgisi) adımını seçin. Kit barkodunu kullanın veya *ipsogen* CALR RGQ PCR Kit kutusu kapağında bulunan aşağıdaki kit bilgisini manuel olarak girin:
  - Materyal numarası 1100703
  - Geçerli son kullanma tarihi
  - Lot numarası
9. **Samples** (Örnekler) adımını seçin. Örnek ayrıntılarını içeren bir liste gösterilir. Bu liste, beklenen rotor düzenini temsil eder.

10. Örnek tanımlama numarasını/numaralarını her örnek için bir yorum gibi tüm isteğe bağlı örnek bilgileriyle birlikte bu listeye girin.
11. **Properties** (Özellikler) ögesini seçin ve bir çalışma listesi adı girin.
12. **Worklist is complete (can be applied)** (Çalışma listesi tamamlandı (uygulanabilir)) onay kutusunu işaretleyin.
13. Çalışma listesini **Save** (Kaydet) ögesiyle kaydedin.
14. Çalışma listesini yazdırmak için **Print work list** (Çalışma listesini yazdır) ögesine basın. Çalışma listesinin yazdırılması qPCR hazırlaması ve kurulumuna yardımcı olabilir. Örnek bilgileri çalışma listenin bir parçası olacaktır.

## qPCR kurulumu

### Başlamadan önce yapılması gerekenler

- Kullanılmadığında dondurucuda saklanması gereken *Taq* DNA polimeraz enzimi hariç tüm gerekli bileşenleri çözdüren. Bileşenleri içeren tüpleri buz üzerinde veya bir soğutma bloku kullanarak erimeye bırakın.
  - PCR karışımı hazırlanacak tezgahın üzerini, herhangi bir şablon veya nükleaz kontaminasyonu riskini azaltmak için temizleyin.
  - Standartları, kontrolleri ve reaksiyon karışımları içeren tüpleri kullanmadan önce vorteks yapın (10 ila 12 saniye) ve kısaca santrifüjleyin.
1. Her reaksiyon karışımı (CALR TYPE 1, CALR TYPE 2, CALR CLAMP 1, CALR CLAMP 2, CALR CLAMP 3, CALR CLAMP 4 ve CALR CLAMP 5) için qPCR ana karışımlarını **buz üzerinde** (veya bir soğutma bloku kullanarak) işlenecek örnek sayısına göre hazırlayın.

Tüm CALR reaktif ana karışımlarının hazırlanması için aşağıdaki tabloda gösterilen pipetleme şeması 5 µl gDNA veya kontrol eklenmesinden sonra 25 µl nihai reaksiyon hacmi elde edecek şekilde hesaplanmıştır. Pipetleme hatasını telafi etmek için ve

6 örnek artı 3 harici kontrol için yeterli reaksiyon ana karışımı hazırlanmasına olanak tanımak için ek hacim dahil edilmiştir.

Bileşen	1 reaksiyon (µl)	9 + 1 reaksiyon (µl)*
CALR Reaction Mix (CALR Reaksiyon Karışımı)	19,83	198,3
Taq DNA polimeraz	0,17	1,7
<b>qPCR ana karışımının toplam hacmi (µl)</b>	<b>20</b>	<b>200</b>
qPCR Ana karışım dağılımı	Tüp başına 20 µl	
Örnek dağılımı	Tüp başına 5 µl	
<b>qPCR reaksiyonunun toplam hacmi</b>	<b>25 µl</b>	

\* Pipetleme hatasını telafi etmek için ilave reaksiyon hacimleri eklenir.

**Not:** 1 µl'den küçük hacimleri pipetlememenizi öneririz.

2. Tüm qPCR karışımlarını vorteks ile karıştırıp kısaca santrifüjleyin.
3. qPCR şeritli tüpleri soğutulmuş Loading Block 72 x 0.1 ml Tubes üzerine yerleştirin ve şeritli tüp başına 20 µl CALR qPCR ana karışımını Şekil 4'de gösterilen yükleme bloku kurulumuna uyarak koyun.
4. gDNA örneklerine, CALR Yabani Tip Kontrol (WTC), CALR Mutant Kontrol (MTC) ve TE tamponuna (NTC) vorteks yapın ve kısa süreyle santrifüjleyin. Ardından toplam 25 µl hacim verecek şekilde Şekil 4 içindeki kurulumla göre karşılık gelen tüpe 5 µl örnek veya kontrol malzemesi ekleyin. Yukarı aşağı pipetleme yaparak yavaşça karıştırın.

**Not:** Herhangi bir belirsiz şablon veya reaksiyon karışımından kontaminasyon kaynaklı yanlış pozitif sonuçlardan kaçınmak için her tüpte uç değiştirmeye dikkat edin. Tüm tüpleri kapatın ve tüplerin dibinde hiç kabarcık olmadığını kontrol edin.

5. Malzeme bozunumundan kaçınmak için tüm *ipsogen* CALR RGQ PCR Kit bileşenlerini uygun saklama koşullarına geri getirin.

## Rotor-Gene MDx'i hazırlama ve qPCR çalışmasını başlatma

1. 72 kuyulu rotoru Rotor-Gene Q MDx rotor tutucuya yerleştirin.
2. Rotoru Şekil 5'de gösterildiği şekilde atanmış pozisyonlara göre pozisyon 1'den başlayarak ve kullanılmayan tüm pozisyonlara boş kapaklı şerit tüpleri yerleştirerek şerit tüpleriyle doldurun.

**Not:** İlk tüpün pozisyon 1'e yerleştirildiğinden ve şerit tüplerinin Şekil 4 ve Şekil 5'de gösterildiği şekilde doğru yönelim ve pozisyonda yerleştirildiğinden emin olun.

**Not:** TYPE 1 reaksiyon karışımını ve üç kontrolü (MTC, WTC, NTC) kazanç optimizasyonunun (tüp pozisyonu 1'de gerçekleştirilir) daima aynı amplifikasyon ile yapılması için daima konum 1, 9 ve 17'de tutun (bkz. Şekil 4 ve Şekil 5).

3. Kilitleme halkasını takın.
4. Rotoru ve kilitleme halkasını Rotor-Gene Q MDx cihazına yükleyin. Cihaz kapağını kapatın.
5. Rotor-Gene AssayManager v2.1 yazılımında, çalışma listesi yöneticisinden ilgili çalışma listesini seçin ve **Apply** (Uygula) ögesine tıklayın.  
Alternatif olarak, çalışma listesi hala açıksa **Apply** (Uygula) ögesine tıklayın.  
**Not:** Deney için atanmış bir çalışma listesi oluşturulmamışsa devam etmeden önce Rotor-Gene AssayManager v2.1 oturumu açın ve "Bir çalışma listesi oluşturma," sayfa 36 içindeki adımları uygulayın.
6. Deney adını girin.
7. **Cycler Selection** (Döngüleyici Seçimi) içinden kullanılacak döngüleyiciyi seçin. Bir Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM döngüleyici kullanılmalıdır.
8. Kilitleme halkasının doğru takıldığını kontrol edin ve ekranda kilitleme halkasının takılı olduğunu bunu onaylayın.
9. **Start run** (Çalışmayı başlat) ögesine tıklayın.  
qPCR çalışması başlayacaktır.

10. Çalışma bittiğinde **Finish run** (Çalışmayı bitir) ögesine tıklayın.

**Not:** Bu adım tamamlanana kadar deney dahili veritabanına kaydedilmez.

Çıkarın ve qPCR sonuçlarını raporlayın

**Approval** (Onay) ortamının genel işlevleri *Rotor-Gene AssayManager v2.1 Gamma Plug-in User Manual* (Rotor-Gene AssayManager v2.1 Gamma Eklentisi Kullanım Kılavuzu) içinde anlatılmıştır.

Bir çalışma tamamlandıktan ve döngüleyici çıkarıldıktan sonra deney dahili veritabanında saklanacaktır. Elde edilen verinin analizi test profiline, kurallara ve test profilinde tanımlanan parametre değerlerine karşılık gelen bir eklentiye göre otomatik olarak gerçekleştirilir.

**Not:** Bir çalışmayı onaylamak için “Approver” (Onaylayıcı) kullanıcı rolü gereklidir.

Onaylama işleminin ilk adımı onaylanacak testin filtrelenmesidir. Bu, **Approval** (Onay) ortamındaki filtrele kriterleri kullanılarak yapılır.

1. Çalışmayı çıkarın ve onaylayın.

Bir “Approver” (Onaylayıcı) rolüyle oturum açan kullanıcılar **Release and go to approval** (Çıkar ve onaya git) ögesine tıklamalıdır.

Bir “Operator” (Operatör) rolüyle oturum açan kullanıcılar **Release** (Çıkar) ögesine tıklamalıdır.

**Release and go to approval** (Çıkar ve onaya git) tıklandıysa, deney sonuçları **Approval** (Onay) ortamında görüntülenir.

Bir “Operator” (Operatör) rolündeki kullanıcı tarafından **Release** (Çıkar) ögesine tıklanmışsa, “Approver” (Onaylayıcı) rolünde bir kullanıcı oturum açmalı ve **Approval** (Onay) ortamını seçin.

2. Onaylanacak test için filtre seçeneklerini seçin ve **Apply** (Uygula) ögesini tıklayın.



3. Sonuçları gözden geçirin ve **Release/Report data** (Verileri çıkar/raporla) düğmesine tıklayın.

4. **OK** (Tamam) öğesine tıklayın.

Rapor .pdf formatında oluşturulur ve önceden tanımlanmış klasörde otomatik olarak saklanır.

Varsayılan klasör yolu **QIAGEN > Rotor-Gene AssayManager > Export > Reports**'tur.

**Not:** Bu yol ve klasör, **Configuration** (Yapılandırma) ortamından değiştirilebilir.

5. Rotor-Gene Q MDx cihazını boşaltın ve şerit tüplerini yerel güvenlik düzenlemelerine uygun şekilde imha edin.

**Not:** QIAGEN Teknik Destek tarafından sorun giderme ile destek için çalışmadan bir destek paketi gereklidir. Destek paketi **Approval** (Onay) veya **Archive** (Arşiv) ortamlarından oluşturulabilir. Daha fazla bilgi için *Rotor-Gene AssayManager v2.1 Core Application User Manual*'da (Gene AssayManager v2.1 Temel Uygulama Kullanım Kılavuzu) bkz. "Creating a support package" (Bir destek paketi oluşturma).

Destek paketine ek olarak olay tarihine göre  $\pm 1$  gün şeklinde denetim geçmişi girmek faydalı olabilir. Denetim geçmişi **Service** (Servis) ortamından alınabilir. Daha fazla bilgi için bkz. *Rotor-Gene AssayManager v2.1 Core Application User Manual* (Rotor-Gene AssayManager v2.1 Temel Uygulama Kullanım Kılavuzu).

# Sonuçların Yorumlanması

## Veri analizi

Her ayrı test ve örnek için qPCR sonuçlarının analizi tamamen otomatiktir. Rotor-Gene AssayManager v2.1 amplifikasyon eğrilerini analiz eder; şekillerine ve gürültü miktarlarına bakarak uygun olmayan eğrileri geçersiz sayabilir. Böyle bir durum söz konusu olursa, geçersiz sayılan eğri, bir bayrakla işaretlenir. Uyarı işaretleri geçersiz kılmayan eğri anormallikleri için de görüntülenebilir.

Test geçerliliğini belirlemek için, Rotor-Gene AssayManager v2.1 ayrıca çalışma kontrollerini, yani *ipsogen* CALR RGQ PCR Kit reaksiyon karışımları (CALR TYPE 1, CALR TYPE 2, CALR CLAMP 1, CALR CLAMP 2, CALR CLAMP 3, CALR CLAMP 4 ve CALR CLAMP 5) için Yeşil (FAM) ve Sarı (HEX) kanallardaki CALR Yabancı Tip Kontrol (WTC), CALR Mutant Kontrol (MTC) ve TE tamponu (NTC) analiz eder. Her kontrolün geçerliliği önceden belirlenmiş özelliklerdeki  $C_T$  değerleriyle uyumluluğa dayanır.

**Not:** Belli bir tüpteki dahili amplifikasyon kontrolü geçersizse (Sarı kanal) aynı tüpteki CALR'a özgü hedefin (Yeşil kanal) geçersiz olduğuna karar verilir.

**Not:** Belli bir CALR testi için harici kontrollerden en az biri geçersizse (örn. CLAMP 1 testi), tüm örneklerde o reaksiyon karışımıyla elde edilmiş sonuçlar geçersiz sayılır. Bu durumda tüm qPCR çalışması değil, sadece CALR testi geçersizdir.

Rotor-Gene AssayManager v2.1 ayrıca ABL1 dahili kontrolünün geçerliliğini kontrol ederek bilinmeyen örnekleri de analiz eder.

Son olarak, bilinmeyen örneklere bir CALR durumu atanır. İlk durumda, yazılım TYPE 1 ve TYPE 2 testler için elde edilmiş sonuçları dikkate alır. Bir örneğe Tip 1 veya Tip 2 pozitif mutasyon durumu atanırsa CALR durumu belirlenir. Ardından, bilgilendirme amacıyla CLAMP testleri için elde edilen sonuçlar görüntülenir.

Ne Tip 1 ne de Tip 2 mutasyonu tanımlanırsa, analiz *CALR* durumu (yani mutasyon tespit edildi veya hiç mutasyon tespit edilmedi) belirlenene kadar CLAMP testleri için elde edilen sonuçlarla sürdürülür.

Bir örneğin pozitif olduğu sonucuna varmak için en az yedi *CALR* testiyle tespit gereklidir. Söz konusu testlerle ilgili tüm kontroller ve test edilen örnekteki kontrol, yani MTC, WTC, NTC ve ABL1 dahili kontrol geçerli olmalıdır.

Bir örneğin negatif olduğu sonucuna varmak için, örnek tüm testler için negatif olmalıdır ve yedi *CALR* testinin her birindeki tüm kontrollerin (MTC, WTC ve NTC) yanı sıra örnekteki ABL1 dahili kontrolünde geçerli olmalıdır.

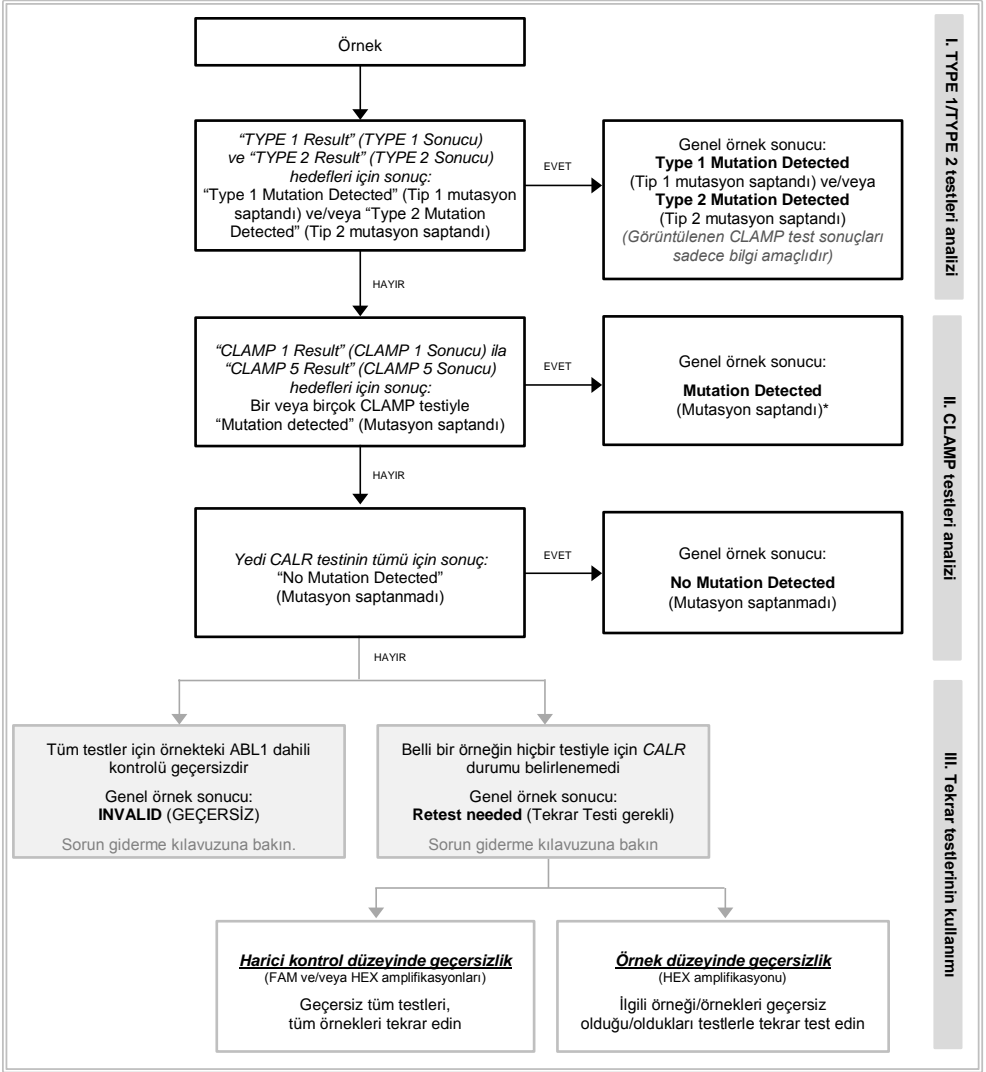
Rotor-Gene AssayManager v2.1 yazılımı tarafından ayarlanan ve otomatik olarak analiz edilen test örneklerinin sonuçları “Approver” (Onaylayıcı) rolünde oturum açmış bir kullanıcı tarafından onaylanmayı ve çıkarılmalıdır. Onaylanacak örnekler sonuçlarının belirlenmiş satırın sonunda üç ek onay düğmesi bulunur. Bu düğmeler örnek sonuçlarını etkileşimli olarak kabul veya reddetmek için kullanılır. Daha fazla bilgi için lütfen bkz. *Rotor-Gene AssayManager v2.1 Gamma Plug-in User Manual* (Rotor-Gene AssayManager v2.1 Gamma Eklentisi Kullanım Kılavuzu).

Geçersiz sonuçlar olduğu durumda başarısızlığın nedenini ve olasılıkla düzeltilmesi gereken herhangi bir hatanın araştırılması için bkz. “Sorun giderme kılavuzu”, sayfa 53.

## Tekrar Testleri

Geçersiz sonuçlar olduğu durumda tekrar testleri için ihtiyacı değerlendirmek üzere Şekil 6'daki karar akış şemasını takip edin.

Yedi *CALR* testinin herhangi biriyle ilgili örneğe/örneklere bir *CALR* durumu atanabiliyorsa tekrar testlerine ihtiyaç olmamalıdır.



\* Tip 1/Tip 2 tanımlamanın zorunlu olduğu ve TYPE 1 ve/veya TYPE 2 testinin geçersiz olduğu durumlarda (bir CLAMP testi pozitif olduğu halde) TYPE 1 ve/veya TYPE 2 testinden kesin bir sonuç elde etmek için bir tekrar testi gerekebilir.

**Şekil 6. Test örneklerinin CALR mutasyon durumunu belirlemek için karar akış şeması.**

**Not:** Tip 1/Tip 2 tanımlamanın zorunlu olduğu ve TYPE 1 ve/veya TYPE 2 testinin geçersiz olduğu durumlarda (bir CLAMP testi pozitif olduğu halde) TYPE 1 ve/veya TYPE 2 testinden kesin bir sonuç elde etmek için bir tekrar testi gerekebilir.

Tekrar testleri başka durumlarda gerekebilir. Tekrar testlerini gerçekleştirirken TYPE 1 reaksiyon karışımını ve üç kontrolü (MTC, WTC, NTC) kazanç optimizasyonunun (tüp pozisyonu 1'de gerçekleştirilir) daima aynı amplifikasyon ile yapılması için daima konum 1, 9 ve 17'de tutun. Plakada tüm testler bulunmasa bile tekrar test edilmiş her testi kendi pozisyonuna (Şekil 4) yerleştirdiğinizden emin olun.

**Not:** Örnekler tekrar test edildiğinde yedi CALR testinin bazıları eksikse normalde doldurulan tüm boş pozisyonlar yazılımda bir "INVALID" (GEÇERSİZ) yanıtı tetikleyecektir. Daha iyi izlenebilirlik için boş pozisyonlar ve ilgili yanıtın beklenen doğası raporun yorumlar bölümünde belgelenmelidir.

## Sonuçlar ekranı

### Hedefler

*ipsogen* CALR RGQ PCR Kitinin her bir testi için sonuçlar aşağıdaki hedef adları altında görüntülenir:

- ABL1 dahili amplifikasyon kontrolü (Sarı kanal sonuçları) için "ABL\_AssayName" (ABL\_TestAdı) (örn. ABL\_TYPE\_1)
- Bir CALR Reaksiyon Karışımı için "AssayName" (TestAdı) (örn. CALR Reaksiyon Karışımı TYPE 1 için TYPE 1) (Yeşil kanal sonuçları)
- "AssayName Result" (TestAdı Sonucu) (örn. TYPE 1 Sonucu). Bu hedefler birleştirilmiş hedeflerdir: karşılık gelen sonuç kontrollerin geçerliliğini hesaba katar (MTC, WTC, NTC ve ABL1).

## Sonuçlar

Yukarıdaki hedefler için sonuçlar raporun **Result** (Sonuçlar) sütununda görüntülenir.

**Tablo 3. Her hedef için görüntülenen sonuçlar**

Hedef	Örnekler	Görüntülenen sonuçlar
ABL_TestAdı (örn. ABL_TYPE_1)	MTC, WTC, NTC, Test örnekleri	Internal Control Valid, INVALID (Dahili Kontrol Geçerli, GEÇERSİZ)
TestAdı (örn. TYPE 1)	MTC, WTC, NTC	Signal, No Signal, INVALID (Sinyal Var, Sinyal Yok, GEÇERSİZ)
TestAdı (örn. TYPE 1)	Test örnekleri	Significant Amplification Detected, No Significant Amplification Detected, No Amplification Detected, INVALID (Kayda Değer Amplifikasyon Saptandı, Kayda Değer Amplifikasyon Saptanmadı, Amplifikasyon Saptanmadı, GEÇERSİZ)
TYPE 1 Sonucu	Test örnekleri	Type 1 Mutation Detected, No Mutation Detected, INVALID (Tip 1 Mutasyon Saptandı, Mutasyon Saptanmadı, GEÇERSİZ)
TYPE 2 Sonucu	Test örnekleri	Type 2 Mutation Detected, No Mutation Detected, INVALID (Tip 2 Mutasyon Saptandı, Mutasyon Saptanmadı, GEÇERSİZ)
CLAMP X Sonucu (örn. CLAMP 1 Sonucu)	Test örnekleri	Mutation Detected, No Mutation Detected, INVALID (Mutasyon Saptandı, Mutasyon Saptanmadı, GEÇERSİZ)

Belli bir örneğe bağlı kontrollerden biri (MTC, WTC, NTC) belli bir test için geçersizse veya ABL1 dahili kontrolü geçersizse, birleştirilmiş hedef sonucu için görüntülenen sonuç "INVALID" (GEÇERSİZ) olacaktır.

Her örnek için analizin sonucu raporun **Overall Sample Result** (Genel Örnek Sonucu) sütununda görüntülenecektir.

**Tablo 4. Genel örnek sonuçları**

Örnek sonucu	Tanım
Type 1 Mutation Detected (Tip 1 Mutasyon Saptandı)	Test edilen örnek Tip 1 <i>CALR</i> mutasyonu taşımaktadır.
Type 2 Mutation Detected (Tip 2 Mutasyon Saptandı)	Test edilen örnek Tip 2 <i>CALR</i> mutasyonu taşımaktadır.
Type 1 and Type 2 Mutation Detected (Tip 1 ve Tip 2 Mutasyon Saptandı)	Test edilen örnek Tip 1 ve Tip 2 <i>CALR</i> mutasyonları taşımaktadır. Bu ender bir durumdur ancak <i>ipsogen</i> <i>CALR</i> RGQ PCR kitinin klinik doğrulaması sırasında bir kez gözlemlenmiştir.
Mutation Detected (Mutasyon Saptandı)	Test edilen örnek Tip 1 veya Tip 2 dışında bir <i>CALR</i> mutasyonu taşımaktadır.
No Mutation Detected (Mutasyon Saptanmadı)	Test edilen örnekte hiçbir <i>CALR</i> mutasyonu saptanmadı.

Örnek sonucu	Tanım
Retest Needed (Tekrar Testi Gerekli)	<p>Bir veya birçok CALR reaksiyon karışımı için bir veya birçok kontrolün geçersizliği nedeniyle sonuç belirsizdir. Kesin bir cevap elde etmek için bir tekrar testi gereklidir (bkz. Şekil 6).</p> <p>Örnek: Bir örnek sadece CLAMP 1 testiyle pozitifdir (yani "Significant Amplification Detected" (Kayda Değer Amplifikasyon Saptandı)), ancak CLAMP 1 testi için NTC kuyucuğunun kontaminasyonu nedeniyle geçersizdir. CLAMP 1 için örnek sonucu hesaba katılamaz ve CLAMP 1 Sonucu INVALID (GEÇERSİZ) olarak görüntülenecektir. Örnek için pozitif bir sonucun doğrulanması için CLAMP 1 testinin (MTC, WTC, NTC ve ilgili örnek) bir tekrar testi gerçekleştirilmelidir.</p>
INVALID (GEÇERSİZ)	<p>ABL1 dahili amplifikasyon kontrolü test edilen örnek için yedi CALR reaksiyon karışımının tümünde geçersizken tüm harici kontroller (MTC, WTC, NTC) geçerlidir. Büyük ihtimalle be düşük örnek kalitesi veya yanlış örnek normalizasyonu nedeniyle. Daha fazla ayrıntı için bkz. "Sorun giderme kılavuzu", sayfa 53.</p>

## İşaretler

İşaretler elde edilen sonuçlar, özellikle geçersiz sonuçlar hakkında ek bilgiler görüntülemek içindir. Problemlenmeyen anormallikler geçersiz bir sonuca yol açmayan bir uyarı işareti ile işaretlenebilir. Gamma Eklentisinde bulunan genel geçer işaretler için ayrıca bkz. *Rotor-Gene AssayManager v2.1 Gamma Plug-in User Manual* (Rotor-Gene AssayManager v2.1 Gamma Eklentisi Kullanım Kılavuzu).



*ipsogen* CALR RGQ PCR Kit testinin otomatik analizi aşağıdaki teste özgü ve genel geçer işaretleri getirebilir:

<b>İşaret</b>	<b>Tanım</b>
Teste özgü işaretler	
CONSECUTIVE_FAULT	Bu hedefin hesaplanması için kullanılan bir hedef geçersizdir.
IC_INVALID	Dahili kontrol geçersizdir. Hedef ve dahili kontrol aynı tüpü paylaşmaktadır.
INVALID_SIGNAL	NTC'ye özgü işaret. $C_T$ değeri dahili kontrol veya CALR'a özgü amplifikasyon için çok düşüktür.
MC_HIGH_CT (CLAMP X)	$C_T$ değeri Mutant Kontrol için çok yüksektir.
MC_HIGH_CT (TYPE X)	$C_T$ değeri Mutant Kontrol için çok yüksektir.
MC_IC_HIGH_CT (CLAMP X)	Mutant kontrolü içeren tüpteki dahili kontrol için $C_T$ değeri beklenenden yüksektir.
MC_IC_HIGH_CT (TYPE X)	Mutant kontrolü içeren tüpteki dahili kontrol için $C_T$ değeri beklenenden yüksektir.
MC_IC_LOW_CT (CLAMP X)	Mutant kontrolü içeren tüpteki dahili kontrol için $C_T$ değeri beklenenden düşüktür.
MC_IC_LOW_CT (TYPE X)	Mutant kontrolü içeren tüpteki dahili kontrol için $C_T$ değeri beklenenden düşüktür.
MC_LOW_CT (CLAMP X)	$C_T$ değeri Mutant Kontrol için çok düşüktür.

<b>İşaret</b>	<b>Tanım</b>
MC_LOW_CT (TYPE X)	C <sub>T</sub> değeri Mutant Kontrol için çok düşüktür.
MC_NO_CT (CLAMP X)	Mutant kontrol için CLAMP X reaksiyon karışımıyla saptanabilir hiçbir C <sub>T</sub> yoktur.
MC_NO_CT (TYPE X)	Mutant kontrol için TYPE X reaksiyon karışımıyla saptanabilir hiçbir C <sub>T</sub> yoktur.
NO_SIGNAL_IC_INVALID	Dahili kontrol sinyali saptanamadı. Hedef ve dahili kontrol aynı tüpü paylaşmaktadır.
NTC_IC_LOW_CT (CLAMP X)	Şablonsuz kontrolü içeren tüpteki dahili kontrol için C <sub>T</sub> değeri çok düşüktür.
NTC_IC_LOW_CT (TYPE X)	Şablonsuz kontrolü içeren tüpteki dahili kontrol için C <sub>T</sub> değeri çok düşüktür.
NTC_LOW_CT (CLAMP X)	C <sub>T</sub> değeri Şablonsuz Kontrol için çok düşüktür.
NTC_LOW_CT (TYPE X)	C <sub>T</sub> değeri Şablonsuz Kontrol için çok düşüktür.
SAMPLE_CLAMP X_IC_HIGH_CT	Bir örneği içeren tüpteki dahili kontrol için C <sub>T</sub> değeri beklenenden yüksektir.
SAMPLE_CLAMP X_IC_LOW_CT	Bir örneği içeren tüpteki dahili kontrol için C <sub>T</sub> değeri beklenenden düşüktür.
SAMPLE_TYPE X_IC_HIGH_CT	Bir örneği içeren tüpteki dahili kontrol için C <sub>T</sub> değeri beklenenden yüksektir.

<b>İşaret</b>	<b>Tanım</b>
SAMPLE_TYPE X_IC_LOW_CT	Bir örneği içeren tüpteki dahili kontrol için $C_T$ değeri beklenenden düşüktür.
WTC_IC_HIGH_CT (CLAMP X)	WT kontrolü içeren tüpteki dahili kontrol için $C_T$ değeri beklenenden yüksektir.
WTC_IC_HIGH_CT (TYPE X)	WT kontrolü içeren tüpteki dahili kontrol için $C_T$ değeri beklenenden yüksektir.
WTC_IC_LOW_CT (CLAMP X)	WT kontrolü içeren tüpteki dahili kontrol için $C_T$ değeri beklenenden düşüktür.
WTC_IC_LOW_CT (TYPE X)	WT kontrolü içeren tüpteki dahili kontrol için $C_T$ değeri beklenenden düşüktür.
WTC_LOW_CT (CLAMP X)	$C_T$ değeri WT Kontrol için çok düşüktür.
WTC_LOW_CT (TYPE X)	$C_T$ değeri WT Kontrol için çok düşüktür.
Diğer işaretler	
ANALYSIS_FAILED	Test geçersiz olarak belirlendi çünkü analiz çeşitli nedenlerle başarısız oldu. QIAGEN Teknik Servisleri ile bağlantı kurun.
CURVE_SHAPE_ANOMALY	Ham veri amplifikasyon eğrisi, bu test için tesis edilen davranıştan farklı bir şekil göstermektedir. Yanlış sonuç alınmış veya sonuçların yanlış yorumlanmış olması olasılığı yüksektir.

<b>İşaret</b>	<b>Tanım</b>
FLAT_BUMP	Ham veri amplifikasyon eğrisi, bu test için tesis edilen davranıştan düz bir tümsek şeklinde farklılık göstermektedir. Yanlış sonuç alınmış veya sonuçların yanlış yorumlanmış olması olasılığı yüksektir (örn. yanlış $C_T$ değeri belirlenmesi).
LOW_FLUORESCENCE_CHANGE (Uyarı)	En yüksek floresans değişimi olan örnek tüpüne kıyasla bu örnek tüpü için yüzde floresans değişim tanımlanmış bir sınırdan daha düşüktür.
NO_BASELINE	Başlangıç referans hattı bulunamadı. Sonraki analizler gerçekleştirilemez.
RUN_FAILED	Döngüleyici veya döngüleyici bağlantısında bir sorun nedeniyle test geçersiz olarak belirlendi.
RUN_STOPPED	Çalışma manuel olarak durdurulduğu için test geçersiz olarak belirlendi.
SATURATION	Amplifikasyon eğrisinin bükülme noktasından önce ham veri floresansı kuvvetli bir şekilde doygunluğa ulaşıyor.
SPIKE	Amplifikasyon eğrisinin içinde ancak $C_T$ 'nin belirlendiği alanın dışında ham veri floresansında ani bir artış saptandı.
SPIKE_CLOSE_TO_CT	Amplifikasyon eğrisinde $C_T$ değerinin yakınında ani bir artış saptandı.

İşaret	Tanım
STEEP_BASELINE	Amplifikasyon eğrisinde ham veri floresanı için dik bir şekilde yükselen referans hattı saptandı.
STRONG_BASELINE_DIP	Amplifikasyon eğrisinde ham veri floresanı için kuvvetli bir şekilde düşen referans hattı saptandı.
STRONG_NOISE	Amplifikasyon eğrisinin yükselme fazı dışında büyük bir gürültü saptandı.
STRONG_NOISE_IN_GROWTH_PHASE	Amplifikasyon eğrisinin yükselme (katsal) fazında büyük bir gürültü saptandı.
WAVY_BASE_FLUORESCENCE	Amplifikasyon eğrisinde ham veri floresanı için dalgalı referans hattı saptandı.

## Sorun giderme kılavuzu

Bu sorun giderme kılavuzu *ipsogen* CALR RGQ PCR Kit kullanarak *CALR* mutasyon durumu değerlendirmesinde ortaya çıkabilecek her tür problemi çözmeye yardımcı olabilir. İletişim bilgileri için arka kapağa bakın veya [www.qiagen.com](http://www.qiagen.com) adresini ziyaret edin.

QIAamp DSP DNA Blood Mini Kit (kat. no. 61104) veya QIASymphony DSP DNA Mini Kit (kat. no. 937236) ile ilgili sorun giderme bilgileri için lütfen ilgili kit el kitaplarına bakın.

Rotor-Gene Q MDx cihazı ve Rotor-Gene AssayManager v2.1 yazılımı ile ilgili sorun giderme bilgileri için lütfen ilgili kullanım kılavuzuna bakın.

## Yorum ve öneriler

---

### Bir örnek bir çok test ile pozitif olarak saptandı

Belli bir mutasyon pek çok test ile saptanabilir. Örneğin Tip 1 mutasyon taşıyan bir örneğin TYPE 1 testine ek olarak CLAMP 1 ve CLAMP 2 testleriyle de yükseltilmesi yaygındır. Tip 2 mutasyon taşıyan bir örnek için TYPE 2 testine ek olarak CLAMP 5 testiyle de amplifikasyon sağlanması yaygındır.

### Harici kontroller ve/veya örneklerdeki dahili amplifikasyon kontrolünün hiç amplifikasyonu olmaması veya az amplifikasyonu olması

- a) Reaksiyon karışımı ve/veya Taq DNA polimeraz ve/veya şablon eklenmemiştir. Pipetleme şemasını ve reaksiyon kurulumunu kontrol edin. Tüm şablon DNA'nın ve qPCR ana karışımının tüm bileşenlerinin eklenmiş olduğunu kontrol edin. PCR çalışmasını tekrarlayın.
- b) Reaksiyon karışımı bozulmuştur. Kit içeriğini -30 ila -15°C arasında saklayın ve reaksiyon karışımlarını ışıktan koruyun. Reaktiflerin saklama koşullarını ve son kullanma tarihlerini (etikete bakın) kontrol edin ve gerekirse PCR çalışmasını tekrarlamak için yeni bir kit kullanın.

## Yorum ve öneriler

- c) Pipetleme hacmi yanlış olabilir  
Pipetleme şemasını ve reaksiyon kurulumunu kontrol edin. 5 µl hacminde kontrolün/örneğin ve 20 µl hacminde qPCR ana karışımının eklenmiş olduğunu kontrol edin. Pipetlenmiş tüm hacimleri görsel olarak kontrol edin.  
Gerekirse, qPCR adımını tekrarlamadan önce pipetleri kontrol ve tekrar kalibre edin.
- d) DNA konsantrasyonu çok düşük  
Örneğin DNA konsantrasyonunu kontrol edin. *Ipsogen* CALR RGQ PCR Kiti 10 ng/µl DNA çalışma konsantrasyonu için optimize edilmiştir. DNA konsantrasyonu 10 ng/µl'den azsa, qPCR adımını tekrarlamadan önce konsantre edin veya elüsyon hacmini azaltarak tam kandan tekrar DNA ekstrakte edin.
- e) DNA'da protein kontaminasyonu veya organik kimyasalların varlığı  
 $A_{260}/A_{280}$  oranını kontrol edin.  $A_{260}/A_{280}$  oranı  $\geq 1,7$  olmalıdır. Oran  $< 1,7$  ise, yeni bir DNA ekstraksiyonu gerçekleştirin ve PCR çalışmasını tekrarlayın.

## Harici kontroller ve/veya örneklerdeki dahili amplifikasyon kontrolünün erken amplifikasyonu

- a) DNA konsantrasyonu çok yüksek  
Örneğin DNA konsantrasyonunu kontrol edin. *Ipsogen* CALR RGQ PCR Kiti 10 ng/µl çalışma konsantrasyonu için optimize edilmiştir. DNA konsantrasyonu 10 ng/µl'den büyükse, DNA'yı TE tamponunda seyreltin ve PCR çalışmasını tekrarlayın.

## Yorum ve öneriler

- b) Pipetleme hacmi yanlış olabilir  
Pipetleme şemasını ve reaksiyon kurulumunu kontrol edin. 5 µl hacminde kontrolün/örneğin ve 20 µl hacminde qPCR ana karışımının eklenmiş olduğunu kontrol edin. Pipetlenmiş tüm hacimleri görsel olarak kontrol edin.  
Gerekirse, qPCR adımını tekrarlamadan önce pipetleri kontrol ve tekrar kalibre edin.
- c) Amplifikasyon eğrisi yanlış olabilir.  
Sıra dışı eğriler için karşılık gelen amplifikasyonu kontrol edin. PCR çalışmasını tekrarlayın.

## Örneklere dahili amplifikasyon kontrolü için hiç sinyal yok veya sinyal düşük ancak harici kontroller geçerli

- a) DNA konsantrasyonu çok düşük  
Örneğin DNA konsantrasyonunu kontrol edin. *İpsogen* CALR RGQ PCR Kiti 10 ng/µl DNA çalışma konsantrasyonu için optimize edilmiştir. DNA konsantrasyonu 10 ng/µl'den azsa, qPCR adımını tekrarlamadan önce konsantre edin veya elüsyon hacmini azaltarak tam kandan tekrar DNA ekstrakte edin.
- b) DNA'da protein kontaminasyonu veya organik kimyasalların varlığı  
 $A_{260}/A_{280}$  oranını kontrol edin.  $A_{260}/A_{280}$  oranı  $\geq 1,7$  olmalıdır. Oran  $< 1,7$  ise, yeni bir DNA ekstraksiyonu gerçekleştirin ve PCR çalışmasını tekrarlayın.



## Yorum ve öneriler

- c) Pipetleme hacmi yanlış olabilir
- Pipetleme şemasını ve reaksiyon kurulumunu kontrol edin. 5 µl hacminde kontrolün/örneğin ve 20 µl hacminde qPCR ana karışımının eklenmiş olduğunu kontrol edin. Pipetlenmiş tüm hacimleri görsel olarak kontrol edin.
- Gerekirse, qPCR adımını tekrarlamadan önce pipetleri kontrol ve tekrar kalibre edin.

### Şablonsuz kontrol (NTC/TE tamponu) pozitif (FAM ve/veya HEX)

- a) Çapraz kontaminasyon veya reaktiflerin kontaminasyonu
- Tüm kritik reaktifleri değiştirin ve PCR çalışmasını tekrarlayın.
- Taşınma kontaminasyonunu önlemek için her zaman örnekleri, kit bileşenlerini ve sarf malzemelerini önerilen uygulamalar çerçevesinde kullanın. Farklı reaktifler pipetlenirken veya farklı tüpler yüklenirken uçları değiştirdiğinizden emin olun. Ön PCR ana karışımını özel malzemelerle (pipet, uç, vb.) hazırlayın.
- Ön PCR ana karışımını ve NTC reaksiyonunu hiçbir DNA matrisinin (DNA, plazmid veya PCR ürünleri) içeri sokulmadığı ayrılmış bir alanda hazırlayın. Mümkünse, test edilecek örneğin eklenmesinden sonra PCR tüplerini doğrudan kapatın.
- b) Şerit tüpü ve/veya örnek ID ters dönmesi
- Pipetleme şemasını ve reaksiyon kurulumunu kontrol edin. PCR çalışmasını tekrarlayın.

## Yorum ve öneriler

---

- c) Reaksiyon karışımı veya prob bozulmuş  
Kit içeriğini -30 ila -15°C arasında saklayın ve reaksiyon karışımlarını ışıktan koruyun. Reaktiflerin saklama koşullarını ve son kullanma tarihlerini (etikete bakın) kontrol edin ve gerekirse PCR çalışmasını tekrarlamak için yeni bir kit kullanın.
- d) Amplifikasyon eğrisi yanlış olabilir  
Sıra dışı eğriler için karşılık gelen amplifikasyonu kontrol edin. PCR çalışmasını tekrarlayın.

## **Mutant kontrolde (MTC) hiç amplifikasyon yok veya düşük amplifikasyon var (FAM amplifikasyon)**

- a) Reaksiyon karışımı ve/veya Taq DNA polimeraz eklenmemiştir  
Pipetleme şemasını ve reaksiyon kurulumunu kontrol edin. qPCR ana karışımının tüm bileşenlerinin eklenmiş olduğunu kontrol edin. PCR çalışmasını tekrarlayın.
- b) Reaksiyon karışımı bozulmuştur  
Kit içeriğini -30 ila -15°C arasında saklayın ve reaksiyon karışımlarını ışıktan koruyun. Reaktiflerin saklama koşullarını ve son kullanma tarihlerini (etikete bakın) kontrol edin ve gerekirse PCR çalışmasını tekrarlamak için yeni bir kit kullanın.
- c) Şerit tüpü ve/veya örnek ID ters dönmesi  
Pipetleme şemasını ve reaksiyon kurulumunu kontrol edin. PCR çalışmasını tekrarlayın.

## Yorum ve öneriler

---

- d) Pipetleme hacmi yanlış olabilir
- Pipetleme şemasını ve reaksiyon kurulumunu kontrol edin. 5 µl hacminde kontrolün/örneğin ve 20 µl hacminde qPCR ana karışımının eklenmiş olduğunu kontrol edin. Pipetlenmiş tüm hacimleri görsel olarak kontrol edin.
- Gerekirse, qPCR adımını tekrarlamadan önce pipetleri kontrol ve tekrar kalibre edin.

### **Mutant kontrolde (MTC) erken amplifikasyon (FAM amplifikasyon)**

- a) Pipetleme hacmi yanlış olabilir
- Pipetleme şemasını ve reaksiyon kurulumunu kontrol edin. 5 µl hacminde kontrolün/örneğin ve 20 µl hacminde qPCR ana karışımının eklenmiş olduğunu kontrol edin. Pipetlenmiş tüm hacimleri görsel olarak kontrol edin.
- Gerekirse, qPCR adımını tekrarlamadan önce pipetleri kontrol ve tekrar kalibre edin.
- b) Amplifikasyon eğrisi yanlış olabilir
- Sıra dışı eğriler için karşılık gelen amplifikasyonu kontrol edin. PCR çalışmasını tekrarlayın.
- c) Şerit tüpü ve/veya örnek ID ters dönmesi
- Pipetleme şemasını ve reaksiyon kurulumunu kontrol edin. PCR çalışmasını tekrarlayın.

## Yorum ve öneriler

---

### Yabani tip kontrolde (WTC) erken amplifikasyon (FAM amplifikasyon)

- a) Reaksiyon karışımı bozulmuştur
- Kit içeriğini -30 ila -15°C arasında saklayın ve reaksiyon karışımlarını ışıktan koruyun. Reaktiflerin saklama koşullarını ve son kullanma tarihlerini (etikete bakın) kontrol edin ve gerekirse PCR çalışmasını tekrarlamak için yeni bir kit kullanın.
- b) Pipetleme hacmi yanlış olabilir
- Pipetleme şemasını ve reaksiyon kurulumunu kontrol edin. 5 µl hacminde kontrolün/örneğin ve 20 µl hacminde qPCR ana karışımının eklenmiş olduğunu kontrol edin. Pipetlenmiş tüm hacimleri görsel olarak kontrol edin. Gerekirse, qPCR adımını tekrarlamadan önce pipetleri kontrol ve tekrar kalibre edin.
- c) Şerit tüpü ve/veya örnek ID ters dönmesi
- Pipetleme şemasını ve reaksiyon kurulumunu kontrol edin. PCR çalışmasını tekrarlayın.
- d) Amplifikasyon eğrisi yanlış olabilir
- Sıra dışı eğriler için karşılık gelen amplifikasyonu kontrol edin. PCR çalışmasını tekrarlayın.

## Yorum ve öneriler

---

- e) Taşınma kontaminasyonu
- Tüm kritik reaktifleri değiştirin.  
Deneyi tüm reaktifler için yeni şişe kullanarak tekrarlayın.  
Taşınma kontaminasyonunu önlemek için her zaman örnekleri, kit bileşenlerini ve sarf malzemelerini önerilen uygulamalar çerçevesinde kullanın.  
Farklı reaktifler pipetlenirken uçları değiştirdiğinizden emin olun.

### **Yabani tip kontrolün (WTC) erken amplifikasyonu (FAM amplifikasyon) ve mutant kontrolün (MTC) hiç amplifikasyonu olmaması ve düşük amplifikasyonu olması (FAM amplifikasyon)**

- a) Çapraz kontaminasyon
- Pipetleme şemasını ve reaksiyonun düzenini kontrol edip PCR çalışmasını tekrarlayın.
- b) Reaksiyon karışımlarının tüpler veya ön karışım için ters dönmesi
- Pipetleme şemasını ve reaksiyonun düzenini kontrol edip PCR çalışmasını tekrarlayın.
- c) Şerit tüpü ve/veya örnek ID ters dönmesi
- Pipetleme şemasını ve reaksiyon kurulumunu kontrol edin. PCR çalışmasını tekrarlayın.

## Yorum ve öneriler

---

### **Test geçerlilik hedefi (C<sub>T</sub>) altında yüksek arkaplan amplifikasyonu nedeniyle sık yabani tip kontrol (WTC) başarısızlığı**

Rotor-Gene Q MDx cihazında arıza	Cihaz bakım günlüklerini kontrol edin. Örneğin lens hizasının bozulması daha yüksek arkaplana yol açabilir. Lens hizalanması bakım planınızın bir parçası değilse daha fazla bilgi ve olası girişim için lütfen QIAGEN Teknik Servisiyle irtibat kurun.
----------------------------------	--

### **Kontroller ve/veya örneklerde (tüm tüplerde) tutarsız floresans sinyali nedeniyle çalışma başarısızlığı**

Rotor-Gene Q MDx cihaz aksesuarlarında arıza	Cihaz bakım günlüklerini kontrol edin. 72 Kuyucuk Rotoru arızalı olabilir.
--	---

Sorun “Troubleshooting guide” (Sorun giderme kılavuzu) içinde listelenen herhangi bir nedenle bağdaştırılamazsa veya önerilen düzeltici eylemler bir sorunu gidermekte başarısız olursa lütfen tavsiye için QIAGEN Teknik Servisi ile irtibat kurun.

# Kalite Kontrol

QIAGEN ISO sertifikalı Kalite Yönetim Sistemi uyarınca, *ipsogen* CALR RGQ PCR Kitinin her bir lotu tutarlı ürün kalitesi sağlamak için önceden belirlenmiş özelliklere göre test edilir.

Tüm kitin kalite kontrol işlemi, Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM cihazında gerçekleştirilmiştir. Bu kit ISO 13485 standardına göre üretilmiştir. Analiz sertifikaları talep üzerine [www.qiagen.com/support](http://www.qiagen.com/support) adresinde alınabilir.

## Sınırlamalar

Kit, profesyonel kullanım için üretilmiştir.

Ürün yalnızca özel eğitim almış, moleküler biyoloji teknikleri konusunda öğrenim görmüş ve bu teknolojiyle ilgili bilgi sahibi olan personel tarafından kullanılmalıdır.

Bu kit, “Gerekli Olan Ancak Sağlanmayan Malzemeler”, sayfa 14’te belirtilen onaylanmış bir cihazla birlikte bu kılavuzda verilen aşağıdaki talimatlarla kullanılmalıdır.

*ipsogen* CALR RGQ PCR Kitinde tedarik edilmiş tüm reaktifler, yalnızca aynı kit ile tedarik edilen reaktiflerle birlikte kullanılmak üzere geliştirilmiştir. Bu performansı etkileyebilir.

Tüm bileşenlerin kutu etiketlerinin üstünde yazılı olan son kullanma tarihlerine dikkat edilmelidir. Son kullanma tarihleri geçmiş bileşenleri kullanmayın.

*ipsogen* CALR RGQ PCR Kiti sadece 2K EDTA içinde antikoagüle edilmiş tam kan için doğrulanmıştır.

*ipsogen* CALR RGQ PCR Kiti sadece QIASymphony DSP DNA Mini Kit (kat. no. 937236) veya QIAamp DSP DNA Blood Mini Kit (kat. no. 61104) ile kullanım için doğrulanmıştır.

---

Sadece Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM (PCR için) ve QIASymphony SP (örnek hazırlama için) doğrulanmıştır.

Bu ürünün herhangi bir etiket dışı kullanımı ve/veya bileşenlerin değiştirilmesi QIAGEN sorumluluğunu geçersiz kılar.

Elde edilen herhangi bir tanı amaçlı sonucun diğer klinik ve laboratuvar bulguları ile birlikte yorumlanması gerekir. Bir örneğin *CALR* durumu “No Mutation Detected” (Mutasyon Saptanmadı) ise, bu durum sadece bu kılavuzda anlatılan 36 mutasyondan birinin bulunmadığını (bkz. Tablo 1) –kitin hassasiyet sınırları dahilinde– veya Tip 23 ve Tip 27 mutasyonlarının tespit edilemediğini gösterir (bkz. “Performans Özellikleri/Özgüllük”, sayfa 68). Bu, diğer *CALR* mutasyonlarının varlığını dışarıda bırakmaz.

QIAGEN performans çalışmaları kapsamında olmayan laboratuvarlarında kullanılan herhangi bir prosedür için sistem performansının doğrulanması kullanıcıların sorumluluğundadır.



# Performans Özellikleri

## Boş örnek sınırı

Boş örnek sınırı (LOB) yabancı tip *CALR* durumu olan sağlıklı donör tam kan örneklerinde CLSI/NCCLS EP-17-A2 standardı (8) uygulanarak belirlenmiştir (5 örnek, reaktif lotu başına 60 ölçüm, 2 *ipsogen* *CALR* RGQ PCR Kit lotu kullanılmıştır). LOB, her bir test için elde edilen en düşük LOB değeri olarak belirlenmiştir.

LOB sonuçları Tablo 5'te özetlenmiştir.

**Tablo 5. *ipsogen* *CALR* RGQ PCR Kiti için boş örnek sınırı sonuçlarının özeti**

<b>CALR testi</b>	<b>Boş örnek sınırı (C<sub>T</sub> FAM değerleri)</b>
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

## Tespit sınırı

Tespit sınırı (LOD) CLSI/NCCLS EP-17-A2 standardında (8) anlatılan "Probit approach"a (Probit yaklaşımı) göre belirlenmiştir. Bu çalışmada, 5 adet düşük mutasyon seviyesi 3 ayrı örnek için analiz edilmiştir (Yabancı tip DNA ile karışık olarak *CALR* mutasyon pozitif hastadan ekstrakte edilen gDNA). TYPE 1 ve TYPE 2 testleri için pozitif her örnekte

seyreltme başına toplam 20 kopya 2 lot *ipsogen* CALR RGQ PCR Kitiyle gerçekleştirilmiştir.

Belli bir test için LOD, söz konusu iki partiden elde edilen en yüksek LOD değeri olarak belirlenmiştir. Sonuçlar analitik hassasiyetin, Tip 1 *CALR* mutasyonu için %0,60 ve Tip 2 *CALR* mutasyonu için %0,08 olduğunu göstermiştir (Şekil 6).

**Tablo 6. *ipsogen* CALR RGQ PCR Kiti için tespit sınırı sonuçlarının özeti**

CALR testi	Tespit sınırı
TYPE 1	%0,60
TYPE 2	%0,08

## DNA girdisi

*ipsogen* CALR RGQ PCR Kitiyle birlikte kullanılacak optimize edilmiş gDNA girdisi 5 farklı gDNA girdisi için bir kit lotuyla 3 *CALR*-pozitif örnekte (yabani tip gDNA ile karışık plazmidler) ve bir *CALR*-negatif örnekte değerlendirilmiştir. Bu çalışmada her örnek ve her *CALR* testinin her girdisi için 3 kopya yapılmıştır. Sonuçlar kullanılacak optimize girdinin 50 ng (10 ng/μl) olduğunu göstermiştir.

## Tekrarlanabilirlik ve yeniden üretilebilirlik

Hassasiyet çalışması, CLSI/NCCLS EP5-A2 standardına (9) göre yapılmıştır. Her bir *CALR* testi için hassasiyet belli bir *CALR* mutasyonunda değerlendirilmiştir: TYPE 1, CLAMP 1 ve CLAMP 2 testleri için Tip 1; TYPE 2 ve CLAMP 5 testleri için Tip 2 ve CLAMP 3 ile CLAMP 4 testleri için Tip 28. Test 3 mutasyon seviyesinde gerçekleştirilmiştir: %5, %25 ve %50 (yabani tip gDNA ile karışık plazmidler). Her seviye 20 gün boyunca gerçekleştirilen 49 tekrarlı çalışmada mutasyon ve test başına en az 73 ölçümle gerçekleştirilmiştir. 3 örnek toplam hassasiyet için çoğu testte %5 altında bir varyasyon katsayısı ( $CV_{\text{Toplam}}$ ) (Tablo 7) göstermiştir.

**Not:** CLAMP testlerinde toplam hassasiyet bir CALR mutantından diğerine değışiklik gösterebilir.

**Tablo 7. *ipsogen* CALR RGQ PCR Kiti için sonuçların tekrar edilebilirliği ve yeniden üretilebilirliği**

CALR testi	Mutasyon seviyesi	Ölçüm sayısı	Sr*	Srr <sup>†</sup>	Toplam <sup>‡</sup>	CV <sub>Toplam</sub> <sup>§</sup>
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: Tekrar edilebilirlik standart sapma olarak ifade edilmiştir.

† Srr: Çalışmalar arası yeniden üretilebilirlik standart sapma olarak ifade edilmiştir.

‡ Toplam hassasiyet (cihazlar arası, kullanıcılar arası ve lotlar arası; standart sapma olarak ifade edilmiş).

§ Toplam hassasiyet için varyasyon katsayısı.

## Engelleyici maddeler

Çalışma, NCCLS standardı EP07-A2 (10) içinde verilen öneriler baz alınarak tasarlanmıştır. Kan örneklerinde bulunabilecek olan toplam 17 madde PCR üzerindeki olası etkileri için seçildi: busulfan, sitalopram hidrobromid, paroksetine hidroklorür hemihidrat, sertralin hidroklorür, fluoksetin hidroklorür, asetaminofen [parasetamol], bilirubin konjüge olmayan, potasyum EDTA, hemoglobin [insan], trigliseritler, lisinopril dihidre, hidroksiüre, asetilsalisilik asit, salisilik asit, thiotepa, anagrelid, interferon alfa 2b. Ek olarak, gDNA ekstraksiyon işlemi sırasında kullanılan bir maddenin de (proteinaz K) olası etkisi değerlendirildi.

Sonuçlar bu maddelerin hiçbirinin engelleyici bir etkisi olmadığını göstermiştir.

## Özgüllük

*ipsogen* CALR RGQ PCR Kiti için özgüllükü Tip 1 ve Tip 2 mutasyonlarını doğru biçimde tanımlama ve Tablo 1'de anlatılan mutasyonları saptama yetenekleri test edilerek değerlendirilmiştir.

Tip 1 ve Tip 2 mutasyonları için çalışma MPN Ph- hastaların tam kanından ekstrakte edilen gDNA örneklerinde, Tip 1 için  $\geq$  %16 mutasyon ve Tip 2 için  $\geq$  %9 mutasyon konsantrasyonlarına gerçekleştirilmiştir. Tip 1 ve Tip 2 için özgüllük doğrulanmıştır: tüm örnekler saptanmış ve doğru biçimde tanımlanmıştır.

Tip 3 ila Tip 36 mutasyonları için özgüllük, varsa (yani Tip 3, 4, 5, 24, 25, 27, 29 için) MPN Ph- hastaların tam kan örneklerinden ekstrakte edilen gDNA örnekleri kullanılarak test edilmiştir. Hasta örneği elde edilememiş her bir ender mutasyon için özgüllük bilinen bir CALR mutasyonu taşıyan plazmid DNA ile karıştırılmış yabani tip insan gDNA'sından oluşan sentetik malzeme kullanılarak klinik olarak ilgili  $>$  %10 değerindeki konsantrasyonlarda (ortalama konsantrasyon %30 civarı mutasyondur) değerlendirilmiştir.

Sonuçlar, sık olarak gözlemlenen Tip 3 ile Tip 10 arasındaki tüm *CALR* mutasyonlarının *ipsogen CALR RGQ PCR* Kitinin en az bir testi tarafından saptandığını göstermiştir. Tip 11 ile 36 arasındaki (%0,3 meydana geliş sıklığı) çoğu *CALR* mutasyonu *ipsogen CALR RGQ PCR* Kitinin en az bir testi tarafından saptanmaktadır. Kit tarafından sadece Tip 23 ve 27 saptanamazken Tip 22, 25, 26, 29 ve 30 sadece yüksek *CALR* allelik yükü olan örneklerde saptanabilir.

**Önemli not:** Özgüllük çalışması Tip 5 ve Tip 17 mutasyonlarının TYPE 1 test ile saptandığını göstermiştir. TYPE 2 testi Tip 10, Tip 31 ve Tip 33 ile 36 mutasyonlarının amplifikasyonlarına olanak tanımaktadır. Bu durum, Tip 17 mutasyonu hariç bu *CALR* mutasyon tipleriyle (bkz. Tablo 1) yüksek sıralama benzerliğine dayanarak beklenmekteydi. Bu nedenle, *ipsogen CALR RGQ PCR* Kiti Tip 1 ve Tip 5/17 mutasyonlarını ve Tip 2 ve Tip 10/31/33–36 mutasyonlarını ayırt edemez. Teşhis ve tedaviler açısından her bir *CALR* mutasyonunun ayırt edilmesi şu anda gerekli değildir; çoğu *CALR* mutasyonu benzer mutant *CALR* proteinlerinin üretilmesine yol açar.

## Klinik doğrulama ve yöntem karşılaştırması

Bu çalışmanın amacı normal kullanım koşulları altında *ipsogen CALR RGQ PCR* Kitini doğrulamaktır. Çalışma kitin MPN olduğundan şüphelenilen hastalardan oluşan bir örnek kohortundaki Tip 1 ve Tip 2 *CALR* mutasyonlarını tanımlama yeteneğini değerlendirdi. Doğrulama çalışması MPN olduğundan şüphelenilen 227 hastadan ekstrakte edilen gDNA örneklerinde (*CALR*-pozitif ve *CALR*-negatif örnekler dahil) gerçekleştirildi.

gDNA örneklerinin *ipsogen CALR RGQ PCR* Kitiyle elde edilen *CALR* durumu Sanger iki yönlü sıralamayla birlikte kullanılan fragman boyutu bazlı bağımsız bir mutasyon saptama yöntemiyle elde edilen *CALR* durumuyla karşılaştırıldı. Uyumsuz sonuçlar olduğu durumda, üçüncü bir mutasyon saptama yöntemi kullanıldı: yeni nesil sıralama (NGS).

Bu çalışmada kullanılan tüm örneklerin *CALR* durumu Tablo 8'de listelenen referans yöntemlerle belirlenmiştir. Örnek kohortu %54,6 pozitif örnek ve %45,4 negatif örnekten oluşmaktadır. Referans yöntemleri bu pozitif örnekler arasından %42,7'sini Tip 1 olarak ve %33,1'ini Tip 2 olarak karakterize etmiştir. Bu oranlar Klampfl vd. (5) tarafından anlatılanlarla tutarlıdır. yani Tip 1 için %53 ve Tip 2 için %31,7 (bkz. Tablo 1).

**Tablo 8. Referans yöntemlerle belirlendiği şekilde genel kohortun *CALR* mutasyon durumu: parçacık boyut analizi, Sanger iki yönlü sıralama ve NGS analizi**

<b>CALR durumu</b>	<b>Numara</b>
Tip 1 mutasyon	53
Tip 2 mutasyon	41
Tip 1 ve Tip 2	1
Diğer <i>CALR</i> mutasyonları	29
<i>CALR</i> mutasyonu pozitif	124 (%54,6)
<i>CALR</i> mutasyonu negatif	103 (%45,4)
<b>Toplam örnekler</b>	<b>227</b>

Kohortun Tip 1 ve/veya Tip 2 *CALR* mutasyon durumu ile karakterize edilmiş tüm örnekleri *ipsogen* *CALR* RGQ PCR Kiti tarafından doğru biçimde tanımlanmıştır. Tip 1 mutasyonu *ipsogen* *CALR* RGQ PCR Kit tarafından iki örneğe hatalı olarak atanmıştır: bir örnek referans yöntemler tarafından Tip 5 olarak karakterize edilmiştir ve bir örnek Klampfl vd. (5) tarafından anlatılmamış bir mutasyon olarak karakterize edilmiştir. Benzer şekilde Tip 2 mutasyonu, referans yöntemleri tarafından Klampfl vd. (5) tarafından anlatılmamış bir mutasyon olarak karakterize edilmiş bir örneğe hatalı olarak atanmıştır. *In silico* analiz bu uyumsuz örneklerin büyük olasılıkla bu mutasyonlar ile Tip 1 veya Tip 2 mutasyonlar arasındaki yüksek sıralama benzerliğinden kaynaklandığını göstermiştir.

Dolayısıyla, Tip 1 ve Tip 2 mutasyonları için *ipsogen* CALR RGQ PCR Kit ve parçacık analizi/Sanger sıralama/NGS ile elde edilen sonuçlar arasında %98,7 genel tutarlılık mevcuttur (güven aralığı [%96,2; %99,5]). *ipsogen* CALR RGQ PCR Kitinin Tip 1 ve Tip 2 CALR mutasyonları için toplam hassasiyeti ve özgüllüğü %100 (güven aralığı [%96,2; %100] ve %97,7'dir [%93,5; %99,5]) (Tablo 9).

**Tablo 9. Tip 1 ve Tip 2 CALR mutasyonları için toplam performans çıktılarının özeti**

<b>Değişken</b>	<b>Tahmin</b>	<b>%95 güven aralığı</b>
Genel tutarlılık	%98,7	[%96,2; %99,7]
Hassasiyet	%100	[%96,2; %100]
Özgüllük	%97,7	[%93,5; %99,5]

---

## Referanslar







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).

## Semboller

Aşağıdaki semboller ambalaj ve etiket üzerinde görülebilir:

Sembol	Sembol tanımı
	Katalog numarası
	Üretici
	Materyal numarası
Rn	R harfi El Kitabı revizyonunu, n harfi ise revizyon numarasını temsil eder
	Lot numarası
	Küresel Ticaret Parça Numarası
	İn vitro tanı amaçlı tıbbi cihaz

**Sembol****Sembol tanımı**

Avrupa uyumluluğu için CE işareti



Son kullanma



N reaksiyon için yeterli reaktif içerir



Sıcaklık sınırlaması



Kullanım talimatlarına bakın



Güneş ışığından uzak tutun

# Sipariş Bilgileri

Ürün	İçindekiler	Kat. no.
<i>ipsogen</i> CALR RGQ PCR Kit (24)	24 reaksiyon için: CALR Yabani Tip Kontrol, CALR Mutant Kontrol, CALR TYPE 1 Reaksiyon Karışımı, CALR TYPE 2 Reaksiyon Karışımı, CALR CLAMP 1 Reaksiyon Karışımı, CALR CLAMP 2 Reaksiyon Karışımı, CALR CLAMP 3 Reaksiyon Karışımı, CALR CLAMP 4 Reaksiyon Karışımı, CALR CLAMP 5 Reaksiyon Karışımı, Taq DNA polimeraz, seyreltme için TE tamponu ve NTC	674023
<b>Rotor-Gene Q MDx ve aksesuarları</b>		
Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM Platform	Gerçek zamanlı PCR döngüleyici ve 5 kanal (yeşil, sarı, turuncu, kırmızı, kızıl) artı HRM kanallı HRM analizörü, dizüstü bilgisayar, yazılım, aksesuarlar, 1 yıl parça ve işçilik garantisi, kurulum ve eğitim dahil değildir	9002032
Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM System	Gerçek zamanlı PCR döngüleyici ve 5 kanal (yeşil, sarı, turuncu, kırmızı, kızıl) artı HRM kanallı HRM analizörü, dizüstü bilgisayar, yazılım, aksesuarlar, 1 yıl parça ve işçilik garantisi, kurulum ve eğitim	9002033
Loading Block 72 x 0.1 ml Tubes	72 x 0,1 ml tüplerde tek kanallı pipet ile manuel reaksiyon kurulumu için alüminyum blok	9018901
72-Well Rotor	Strip Tubes and Caps 0.1 ml'yi tutmak için; Locking Ring 72-Well Rotor gerektirir	9018903

Ürün	İçindekiler	Kat. no.
Locking Ring 72-Well Rotor	72-Well Rotor içindeki Strip Tubes and Caps, 0.1 ml'yi kilitlemek için	9018904
Rotor Holder	Rotorların içine tüpleri ve Rotor-Discs®'i monte etmek için metal bağımsız duran tutucu	9018908
Strip Tubes and Caps, 0.1 ml (250)	1000 reaksiyon için 4 tüplü 250 şerit ve kapakları	981103
Strip Tubes and Caps, 0.1 ml (2500)	10.000 reaksiyon için 4 tüplü ve kapaklı 10 x 250 şerit	981106
<b>QIASymphony SP ve aksesuarları</b>		
QIASymphony SP System	QIASymphony örnek hazırlama modülü: kurulum ve eğitim, 1 yıllık parça ve işçilik garantisi içerir	9001751
QIASymphony SP	QIASymphony örnek hazırlama modülü: 1 yıllık parça ve işçilik garantisi içerir	9001297
Sample Prep Cartridges, 8-well (336)	QIASymphony SP ile kullanım için 8 kuyucuklu örnek hazırlama kartuşları	997002
8-Rod Covers (144)	QIASymphony SP ile kullanım için 8-Rod Covers	997004
Filter-Tips, 200 µl, Qsym SP (1024)	Tek Kullanımlık Filtre Uçları, raflı; (8 x 128). QIACube® ve QIASymphony SP/AS cihazlarıyla kullanım için	990332
Filter-Tips, 1500 µl, Qsym SP (1024)	Tek Kullanımlık Filtre Uçları, raflı; (8 x 128). QIASymphony SP/AS cihazlarıyla kullanım için	997024
Tube Insert 3b, 2 ml, v2, sample carrier, Qsym	QIASymphony tüp taşıyıcı ile kullanım için ikincil tüp adaptörü (2 ml vida kapaklı tüpler için)	9242083

Ürün	İçindekiler	Kat. no.
Elution Microtubes CL (24 x 96)	Steril olmayan polipropilen tüpler (0,85 ml maksimum kapasite, 0,7 ml'den az saklama kapasitesi, 0,4 ml elüsyon kapasitesi); 96'lık raflarda 2304 adet; kapak şeritleri dahil	19588
<b>İlgili ürünler</b>		
QIAamp DSP DNA Blood Mini Kit (50)	50 örnek için: QIAamp Mini Dönel Kolonlar, Tamponlar, Reaktifler, Tüpler, VacConnectors	61104
QIASymphony DSP DNA Mini Kit (192)	Her biri 200 µl'lik 192 örnek için: 2 reaktif kartuşu ve enzim rafları ile aksesuarları içerir.	937236
RNase A (17,500 U)	2,5 ml (100 mg/ml; 7000 birim/ml, solüsyon)	19101

Güncel lisans bilgileri ve ürüne özgü yasal uyarılar için ilgili QIAGEN kiti el kitabına veya kullanıcı kılavuzuna bakın. QIAGEN kiti el kitapları ve kullanıcı kılavuzları [www.qiagen.com](http://www.qiagen.com) adresinde bulunabilir veya QIAGEN Teknik Servisleri ve yerel dağıtıcınızdan istenebilir.

---

Bu sayfa bilerek boş bırakılmıştır

Bu ürün in vitro tanı amaçlı kullanımı içindir. QIAGEN ürünleri tekrar satılamaz, yeniden satış için değiştirilemez veya QIAGEN'in yazılı izni olmadan ticari ürünler üretmek üzere kullanılamaz.

Bu belgedeki bilgiler önceden bildirilmeksizin değiştirilebilir. QIAGEN bu belgede görülebilecek herhangi bir hata için hiçbir sorumluluk kabul etmez. Bu belgenin yayınlama sırasında tam ve doğru olduğuna inanılmaktadır. Hiçbir durumda QIAGEN size karşı bu belgenin kullanımıyla ilgili veya bundan doğan rastlantısal, özel, çoklu veya dolaylı zarar için yükümlü olmaz.

QIAGEN ürünleri belirtilen özellikleri karşılamak üzere garanti edilmiştir. QIAGEN'in yegane yükümlülüğü ve müşterinin yegane telafi hakkı ürünlerin garanti edildiği şekilde uygulanmaması durumunda ürünlerin ücretsiz olarak değiştirilmesi ile sınırlıdır.

CALR mutasyonu ve kullanımları Avrupa patenti EP2808338 ve yabancı karşılıkları dahil patent hakları tarafından korunur. Bu ürünün satın alınması CALR hedefli ilaçlar için klinik çalışmalarda kullanımına ait herhangi bir hakkı devretmez. QIAGEN bu tip kullanımlar için özel lisans programları geliştirir. Lütfen QIAGEN Kurumsal İş Geliştirme ile [bd@qiagen.com](mailto:bd@qiagen.com) internet adresi üzerinden irtibat kurun.

Ticari markalar: QIAGEN®, Sample to Insight®, QIAamp®, QIAcube®, QIASymphony®, *ipsogen*®, Rotor-Gene®, Rotor-Gene AssayManager® (QIAGEN Grup); 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 Kiti için Sınırlı Lisans Sözleşmesi

Bu ürünün kullanımı herhangi bir alıcının veya ürün kullanıcısının aşağıdaki koşulları kabul ettiği anlamına gelir:

1. Ürün sadece Kullanım Talimatları'na (El Kitabı) uygun olarak tek başına kullanılabilir ve yalnızca kitin içinde bulunan bileşenlerle kullanım içindir. QIAGEN bu kitin kapalı bileşenlerinin bu Kullanım Talimatlarında (El Kitabı) ve [www.qiagen.com](http://www.qiagen.com) adresinden ulaşılabilen protokollerde belirtilenlerin dışında bu kitin içinde yer almayan herhangi bir bileşenle kullanımı veya birleştirilmesi için kendi fikri mülkiyet haklarının herhangi biri altında lisans hakkı vermez.
2. Açıkça belirtilen lisanslar dışında, QIAGEN bu kit ve/veya kullanımlarının üçüncü tarafların haklarını ihlal etmeyeceğini garanti etmez.
3. Bu kit ve bileşenleri bir kez kullanım için lisanslıdır ve tekrar kullanılamaz, yenilenemez ve tekrar satılamaz.
4. QIAGEN açıkça ifade edilenlerin dışında açık veya zımni diğer tüm lisansları açıkça reddeder.
5. Bu kitin alıcısı veya kullanıcısı yukarıda yasaklanan eylemlere neden olabilecek veya kolaylaştırabilecek herhangi bir girişimde bulunmayacağını ve başka birisine izin veremeyeceğini kabul eder. QIAGEN herhangi bir Mahkemede bu Sınırlı Lisans Anlaşması yasaklamalarını uygulayabilir ve bu sınırlı lisans anlaşmasının veya *ipsogen* CALR RGQ PCR Kiti ve/veya bileşenleriyle ilgili fikri mülkiyet haklarının herhangi birinin uygulanmasına yol açan tüm durumlarda avukat ücreti dahil tüm soruşturma ve mahkeme masraflarını geri alabilir.

Güncellenmiş lisans koşulları için bkz. [www.qiagen.com](http://www.qiagen.com).

HB-2198-002 1103549 157025473 04-2017

© 2016-2017 QIAGEN, tüm hakları saklıdır.

