

# *ipsogen*<sup>®</sup> BCR-ABL1 MbcR Kiti Kasutusjuhend



Version 1

IVD

Kvantitatiivne in vitro diagnostika

Kasutamiseks Rotor-Gene<sup>®</sup> Q, ABI PRISM<sup>®</sup> 7000, 7700 või 7900HT SDS, Applied Biosystems<sup>®</sup> 7500 Real-Time PCR System, LightCycler<sup>®</sup> ja SmartCycler<sup>®</sup> instrumentidega



REF

670125



QIAGEN GmbH, QIAGEN Strasse 1, 40724 Hilden,  
GERMANY

R2

MAT

1072508EN



## **QIAGEN – Kõik vajalik proovist testini**

QIAGEN toodab innovatiivseid lahendusi proovi ja analüüsi tehnoloogia vallas, meie toodete abil on võimalik eraldada ja detekteerida iga bioloogilise proovi sisu. Meie kvaliteetsed tooted ja teenused kindlustavad eduka tee proovist tulemuseni.

### **QIAGENi tooted hõlmavad:**

- DNA, RNA ja valkude eraldamine
- Nukleiinhapete ja valkude testid
- mikroRNA uurimine ja RNAi
- Proovi ja analüüsi tehnoloogiate automatiseerimine

Meie missiooniks on võimaldada teil saavutada väljapaistvat edu. Lisainformatsiooni saate kodulehelt, [www.qiagen.com](http://www.qiagen.com).

# Sisukord

<b>Sihtotstarbeline kasutamine</b>	<b>5</b>
<b>Kokkuvõte ja selgitus</b>	<b>5</b>
Haiguse jälgimine	5
<b>Protseduuri põhimõte</b>	<b>8</b>
<b>Kitis sisalduvad materjalid</b>	<b>10</b>
Kiti sisu	10
<b>Lisaks vajalikud materjalid</b>	<b>11</b>
<b>Hoiatused ja ettevaatusabinõud</b>	<b>12</b>
Üldised ettevaatusabinõud	12
<b>Reagentide säilitamine ja käsitlemine</b>	<b>13</b>
<b>Protseduur</b>	<b>14</b>
Proovi RNA ettevalmistamine	14
Protokoll: Soovituslik standardiseeritud EAC pöörd-transkriptsioon	14
Protokoll: qPCR Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM või Rotor-Gene Q 5plex HRM instrumendil 72-tuubi rootoriga	17
Protokoll: qPCR ABI PRISM 7000, 7700 ja 7900HT SDS, Applied Biosystems 7500 Real-Time PCR System ja LightCycler 480 instrumentidel	21
Protokoll: qPCR LightCycler 1.2 ja 2.0 instrumentidel	26
Protokoll: qPCR SmartCycler instrumendil	30
<b>Tulemuste tõlgendamine</b>	<b>33</b>
Andmeanalüüsi põhimõte	33
Tulemused	34
Vigade leidmise juhised	36
<b>Kvaliteedikontroll</b>	<b>39</b>
<b>Piirangud</b>	<b>39</b>
<b>Toimimise tunnused</b>	<b>40</b>
Mittekliinilised uuringud	40
Kliinilised uuringud	42
<b>Viited</b>	<b>46</b>
<b>Sümbolid</b>	<b>47</b>
<b>Kontaktinformatsioon</b>	<b>48</b>



## Sihtotstarbeline kasutamine

*ipsogen* BCR-ABL1 Mbcr Kitt on mõeldud BCR-ABL p210 b2a2 või b3a2 transkriptide kvantifitseerimiseks lümfoblastilise leukeemia (ALL) või kroonilise müeloidse leukeemia (CML) patsientidel, kellel on eelnevalt diagnoositud BCR-ABL Mbcr fusioongeen (FG). Test on mõeldud molekulaarse vastuse taseme hindamiseks; tulemusi saab kasutada minimaalse residuaalse haiguse järelkontrolliks.

## Kokkuvõte ja selgitus

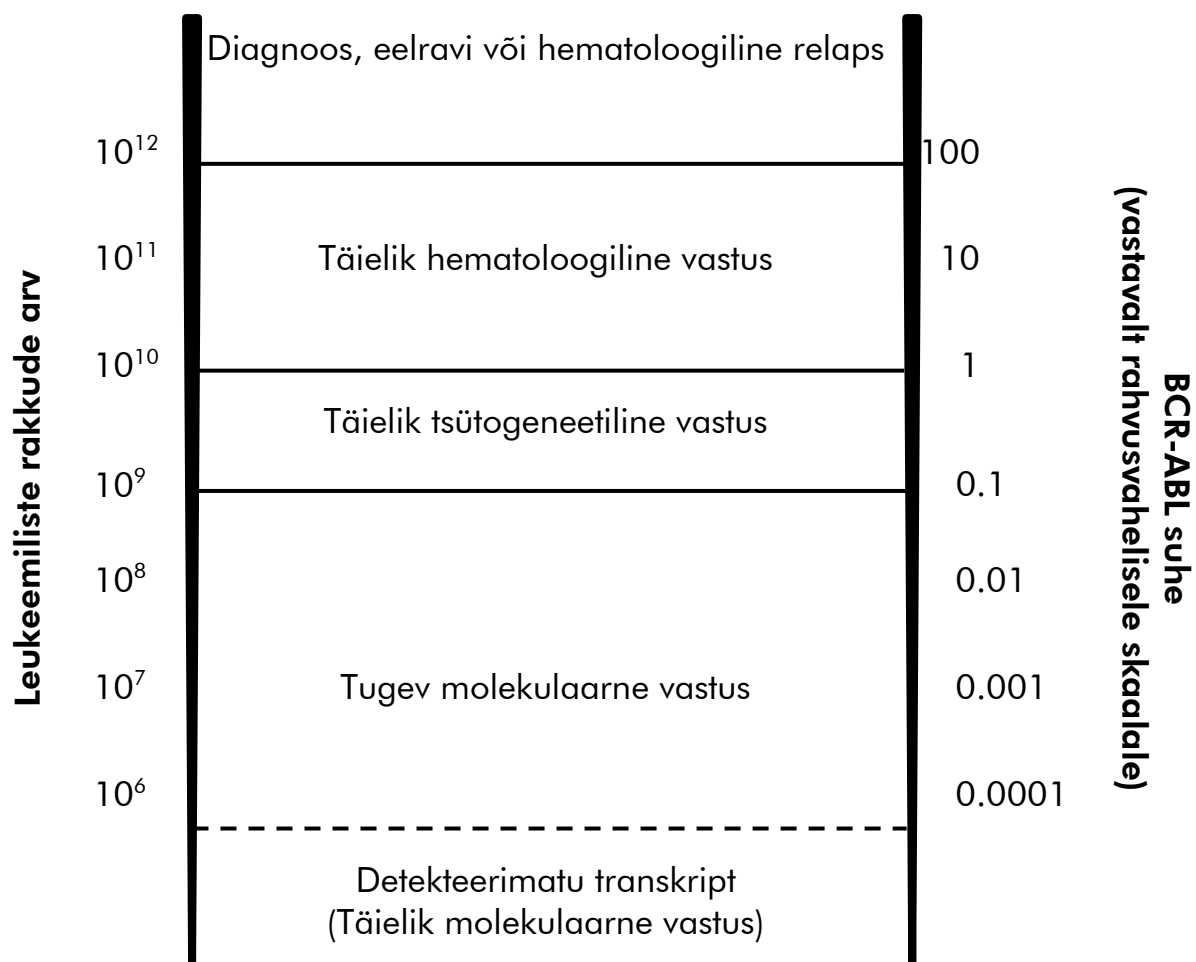
CML kuulub müeloproliferatiivsete neoplasmide gruppi ja seda iseloomustab >90% juhtudest Philadelphia kromosoomi (Ph CHR5) esinemine.

See kromosoom on tekkinud retsiiprookse translokatsiooni tulemusena kromosoomide 9 ja 22 vahel, t(9;22), BCR (*breakpoint cluster region*) asub kromosoomil 22 ja c-ABL onkogeen pärineb kromosoomilt 9. Vastav fusioongeen, BCR-ABL, transkribeeritakse 8.5 kb mRNA-ks, 2 ühendusvariandiga b2a2 (40% juhtudest) ja b3a2 (55% juhtudest). See kodeerib kimäärset valku, p210, millel on kõrgendatud türosiini kinaasne aktiivsus. b2a3 ja b3a3 transkriptid moodustavad alla 5% juhtudest. Ph kromosoom esineb ka 35% täiskasvanud ALL patsientidel.

CML juhtude arv aastal on umbes 1–2 juhtu 100 000 kohta ja CML moodustab 20% täiskasvanute leukeemiatest. Kliiniliselt iseloomustab seda normaalselt diferentseeruvate ja funktsioneerivate müeloidsete rakkude liigi. CML patsientidel diagnoositakse 90–95% juhtudest haiguse krooniline või stabiilne faas. Ajalooliselt algas patsientidel keskmiselt 4 kuni 6 aasta jooksul haiguse kiirendatud faas, mis viis blastilise kriisi ja akuutse leukeemiani, mis on alati surmav. Imatinib'i ja hiljem teise generatsiooni türosiini kinaasi inhibiitorite (TKI) kasutuselevõtt on haiguse loomulikku kulgu dramaatiliselt muutnud: enamus patsientidest jäävad nüüd remissioonifaasi ja nende haiguskuulgu on vaja pikemaajaliselt jälgida.

## Haiguse jälgimine

Praegu on CML ravi eesmärk saavutada 100% elulemus ja Ph kromosoomi puudumine. Haiguse jälgimine on seega põhiline tööriist ravivastuse hindamiseks ja iga individuaalse patsiendi varase relapsi detekteerimiseks. TKI ravis lähevad patsiendid tüüpiliselt hematoloogilisest tsütogeneetilisse, siis molekulaarsesse remissiooni, vastavalt leukeemiliste rakkude arvu ja BCR-ABL transkriptide vähenemisele nagu kirjeldatud Joonisel 1.



### Joonis 1. Adapteeritud viitest 1.

Standardmeetod CML patsientide kasvujamahu hindamiseks on konventsionaalne tsütogeneetiline analüüs (*G-banding*) luuüdi (BM) metafasiist. Tsütogeneetilist vastust hinnatakse vähemalt 20 luuüdi metafasiis. Tsütogeneetilise vastuse taset hinnatakse Ph kromosoom-positiivsete metafasiide protsendi põhjal (vt Tabel 1, viide 2). Sellegipoolest sõltub see hindamine labori oskustest ja sellel on madal tundlikkus, 5% kui analüüsitakse 20 metafasiisi.

Reaalaja kvantitatiivne polümeraasahelreaktsioon (qPCR) BCR-ABL M<sub>bcr</sub> mRNA kvantifitseerimiseks perifeersetes vereproovides (PB) on praegu osa haiguse jälgimise tehnikatest CML ravis. See on vähem invasiivne kui konventsionaalne luuüdi metafasiisi tsütogeneetika ja palju tundlikum.

Soovitusi CML haiguse jälgimiseks uuendati hiljuti, et võtta arvesse uusi kliinilisi tõendeid kliinilistest uuringutest ning arenenud haiguse jälgimise eesmärgi ja tööriistu. Kõige värskemad soovitusel imatinib patsientide vastuse tõlgendamiseks ja nende jälgimiseks tulevad ELN ekspertidelt (2).

Tehnilisest küljest on rahvusvahelised eksperdid teinud pingutusi harmoniseerida BCR-ABL M<sub>bcr</sub> testimine ja raporteerimine (3–5). Lisaks on

hiljuti WHO egiidi all valideeritud referentspaneel, et võimaldada BCR-ABL kvantifitseerimise lihtne standardiseerimine (6).

**Tabel 1. Rahvusvahelised soovitusel CML patsientide uurimiseks (adapteeritud viitest 2)**

	<b>Hematoloogiline vastus</b>	<b>Tsütogeneetiline vastus</b>	<b>Molekulaarne vastus (BCR-ABL suhe kontrollgeeni vastavalt rahvusvahelise skaalale)</b>
<b>Definitsioonid</b>	Täielik: Vereliistakute arv <450 x 10 <sup>9</sup> /liitris Valgete vereliblede arv <10 x 10 <sup>9</sup> /liitris Diferentsiaal ilma väljaarenemata granulotsüütideta ja vähem kui 5% basofiilidega Mitte-palpeeritav põrn	Täielik: Ph+ 0% Osaline: Ph+ 1–35% Vähene: Ph+ 36–65% Minimaalne: Ph+ 66–95% Puuduv: Ph+ >95%	" Täielik" näitab, et transkript ei ole kvantifitseeritav ega detekteeritav Tugev: ≤0.1
<b>Monitooring</b>	Kontrollida iga 2 nädala tagant, kuni saavutatakse täielik vastus, seejärel iga 3 kuu tagant kui just ei ole teisiti vaja	Kontrollida vähemalt iga 6 kuu tagant, kuni saavutatakse ja kinnitatakse täielik vastus, seejärel iga 12 kuu tagant	Kontrollida iga 3 kuu tagant Mutatiooni-analüüs ebaõnnestumise, suboptimaalse vastuse või transkripti taseme tõusu korral

Täielikku hematoloogilist vastust, tsütogeneetilist vastust ja molekulaarset vastust tuleb kinnitada kahel järjestikusel juhul. Tsütogeneetilist vastust hinnatakse morfoloogilise tsütogeneetika teel vähemalt 20 luuüdi metafaasist. Fluorestsents in situ hübriidsatsiooni (FISH) perifeersetest vererakkudest tuleks kasutada ainult siis kui luuüdi rakke ei ole võimalik saada. Molekulaarset vastust hinnatakse perifeersete vererakkude põhjal.

## Protseduuri põhimõte

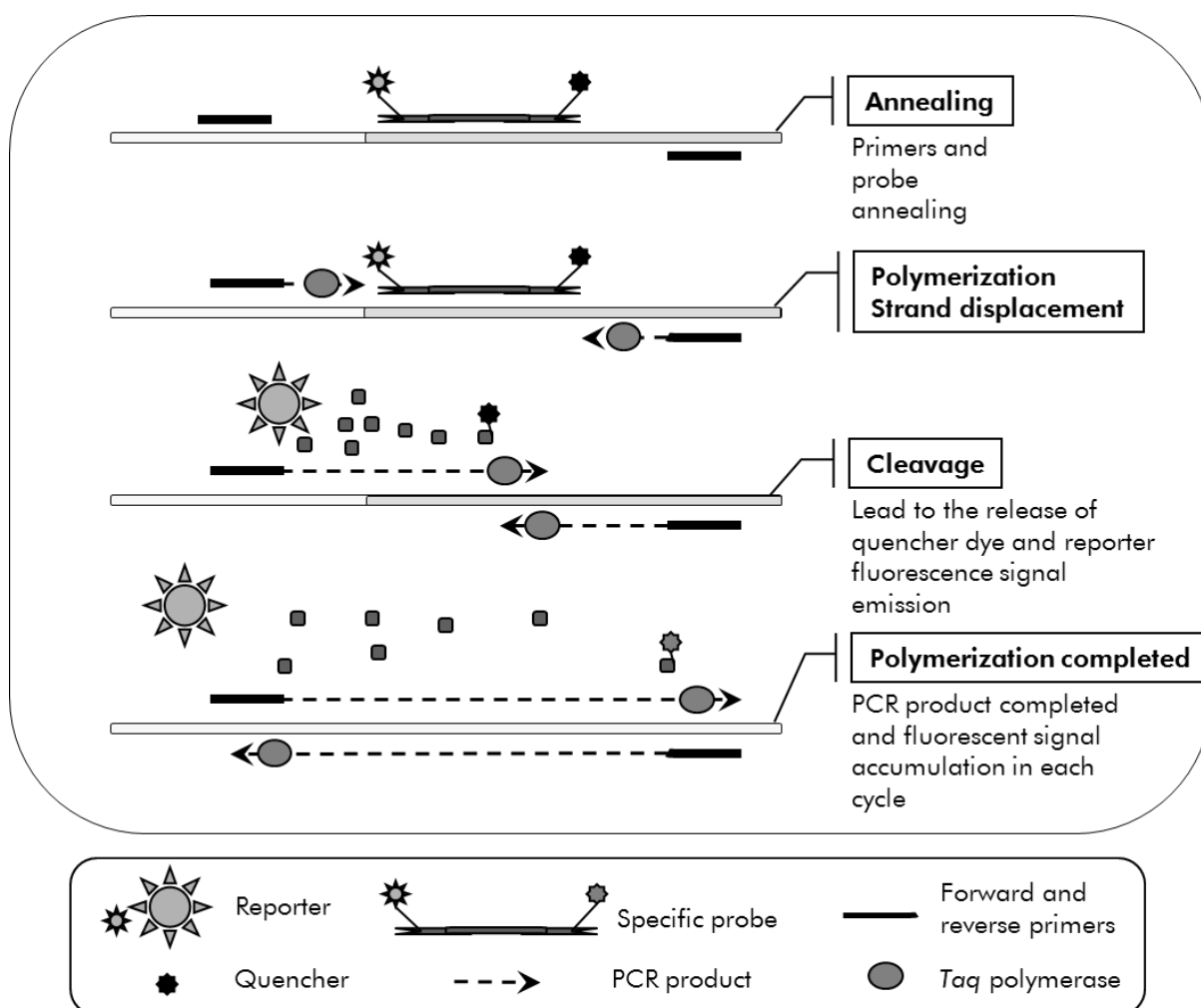
qPCR tehnika võimaldab PCR produktide täpset kvantifitseerimist PCR amplifitseerimise protsessi eksponentsiaalses faasis. Lisaks saab qPCR andmeid kiiresti lugeda ilma PCR-järgse töötlemiseta – fluorestsents-signaalide reaajas detekteerimine toimub PCR tsükleerimise ajal ja/või koheselt pärast seda vähendades nii drastiliselt PCR produkti kontaminatsiooni ohtu. Hetkel on saadaval 3 põhilist tüüpi qPCR tehnikat: qPCR analüüs kasutades SYBR® Green I värvi, qPCR analüüs kasutades hüdrolüüsitavaid proove ja qPCR analüüs kasutades hübriidsatsiooniproove.

Selles analüüsis kasutatakse qPCR kahe-värvi oligonukleotiidi hüdrolüüsi põhimõtet. PCR ajal hübriidiseeruvad *forward* ja *reverse* praimerid kindlale järjestusele. Kahe värviga märgistatud oligonukleotiidid on samas segus. See proov, mis koosneb 5' otsas reportervärvi ja 3' otsas summutaja märkega oligonukleotiidist, hübriidiseerub sihtmärk-järjestusele PCR produktis. Hüdrolüüsiproovidega qPCR analüüs kasutab ära *Thermus aquaticus* (*Taq*) DNA polümeraasi 5'→3' eksonukleasest aktiivsust. Kui proov on intaktne, summutab summutaja lähedus reportervärvi fluorestsentsi peamiselt Förster-tüüpi energia ülekande teel.

PCR ajal kui huvipakkuv märklaud on olemas, seondub proov spetsiifiliselt *forward* ja *reverse* praimerisaitide vahele. DNA polümeraasi 5'→3' eksonukleasne aktiivsus hüdrolüüsib proovi reporteri ja summutaja vahel ainult siis, kui proov on sihtmärgile hübriidiseerunud. Proovi fragmendid tõrjutakse seejärel sihtmärgilt eemale ja ahela polümeriseerumine jätkub. Proovi 3' ots on blokeeritud, et vältida proovi pikendamist PCR käigus (Joonis 2). See protsess toimub igas tsüklis ega sega produkti eksponentsiaalset kogunemist.

Fluorestsents-signaali kasvu detekteeritakse ainult siis, kui sihtmärk-järjestus on prooviga komplementaarne ja seetõttu amplifitseerub PCR käigus. Nende nõuete tõttu ei nähta mittespetsiifilist amplifikatsiooni. Seega on fluorestsentsi kasv otseselt proportsionaalne sihtmärgi amplifitseerumisega PCR käigus.





**Joonis 2. Reaktsiooni põhimõte.** Totaalne RNA pöördtranskribeeritakse ja saadud cDNA amplifitseeritakse PCR abil kasutades spetsiifiliste praimerite paari ja spetsiifilist sisemist kahevärvilist proovi (FAM™–TAMRA™). Proov seondub amplikonile igas PCR seondumise etapis. Kui Taq pikendab amplikonile seondunud praimerit, asendab see proovi 5' otsa, mis degradeeritakse Taq DNA polümeraasi 5'→3' eksonukleasse aktiivsuse abil. Hüdroolüüs jätkub kuni allesjäänud proov amplikonilt lahti sulab. Selle protsessi tulemusena vabanevad fluorofoor ja summutaja lahusesse, satuvad teineteisest ruumiliselt eemale, FAM fluorestents kasvab ning TAMRA fluorestents väheneb.

## Kitis sisalduvad materjalid

### Kiti sisu

<b>ipsogen BCR-ABL1 Mbcr Kitt</b>		<b>(52)</b>
<b>Katalooginr.</b>		<b>670125</b>
<b>Reaktioonide arv</b>		<b>52</b>
ABL Control Gene Standard Dilution (ABL kontrollgeeni standardi lahus) (10 <sup>3</sup> koopiat/5 µl)	C1-ABL	50 µl
ABL Control Gene Standard Dilution (ABL kontrollgeeni standardi lahus) (10 <sup>4</sup> koopiat/5 µl)	C2-ABL	50 µl
ABL Control Gene Standard Dilution (ABL kontrollgeeni standardi lahus) (10 <sup>5</sup> koopiat/5 µl)	C3-ABL	50 µl
BCR-ABL Mbcr Fusion Gene Standard Dilution (BCR-ABL Mbcr fusioongeeni standardi lahus) (10 <sup>1</sup> koopiat/5 µl)	F1-BCR-ABL-Mbcr	50 µl
BCR-ABL Mbcr Fusion Gene Standard Dilution (BCR-ABL Mbcr fusioongeeni standardi lahus) (10 <sup>2</sup> koopiat/5 µl)	F2-BCR-ABL Mbcr	50 µl
BCR-ABL Mbcr Fusion Gene Standard Dilution (BCR-ABL Mbcr fusioongeeni standardi lahus) (10 <sup>3</sup> koopiat/5 µl)	F3-BCR-ABL Mbcr	50 µl
BCR-ABL Mbcr Fusion Gene Standard Dilution (BCR-ABL Mbcr fusioongeeni standardi lahus) (10 <sup>5</sup> koopiat/5 µl)	F4-BCR-ABL Mbcr	50 µl
BCR-ABL Mbcr Fusion Gene Standard Dilution (BCR-ABL Mbcr fusioongeeni standardi lahus) (10 <sup>6</sup> koopiat/5 µl)	F5-BCR-ABL Mbcr	50 µl
Two vials of Primers and Probe Mix ABL* (Kaks viaali praimerite ja proovi segu ABL*)	PPC-ABL 25x	2 x 90 µl
Two vials of Primers and Probe Mix BCR-ABL Mbcr Fusion Gene <sup>†</sup> (Kaks viaali praimerite ja proovi segu BCR-ABL Mbcr fusioongeen <sup>†</sup> )	PPF-BCR-ABL Mbcr 25x	2 x 110 µl

\* Spetsiifiliste *reverse* ja *forward* praimerite segu ABL kontrollgeenile (CG) pluss spetsiifiline FAM–TAMRA proov.

† Spetsiifiliste *reverse* ja *forward* praimerite segu BCR-ABL *Mbc* fusioongenile (FG) pluss spetsiifiline FAM–TAMRA proov.

**Märkus:** Tsentrifuugige standardite lahuseid ja praimerite-proovi segusid kergelt enne kasutamist.

## Lisaks vajalikud materjalid

Kemikaalidega töötamisel tuleb alati kanda sobivat laborikitlit, ühekordseid kindaid ja kaitseprille. Lisainformatsiooni saamiseks lugege SDS infolehti (*safety data sheets*), mille saate tootjalt.

### Reagendid

- Nukleaaside-vaba PCR puhtusega vesi
- Reagendid pöördtranskriptsiooniks: Valideeritud reagent on Superscript® II (või Superscript) Reverse Transcriptase, sisaldab 5x *first-strand* puhvrit, 100 mM DTT (Life Technologies, kat. nr. 18064-022)
- RNAasi inhibiitor: Valideeritud reagent on RNaseOUT™ (Life Technologies, kat. nr. 10777-019)
- dNTP-d, PCR puhtusega
- Juhuslik heksameer
- MgCl<sub>2</sub>
- Puhver ja Taq DNA polümeraas: Valideeritud reagentid on TaqMan® Universal PCR Master Mix (Master Mix PCR 2x) (Life Technologies, kat. nr. 4304437) ja LightCycler TaqMan Master (Master Mix PCR 5x) (Roche, kat. nr. 04535286001)

### Kulutarvikud

- Nukleaaside-vabad aerosooli-resistentsed steriilsed PCR pipetiotsikud hüdrofoobsete filtritega
- 0.5 ml või 0.2 ml RNAasi- ja DNAasi-vabad PCR tuubid
- Jää

## Equipment

- Mikrolitri pipetid\* ainult PCR jaoks (1–10  $\mu$ l; 10–100  $\mu$ l; 100–1000  $\mu$ l)
- Lauatsentrifuug\* rootoriga 0.2 ml/0.5 ml tuubidele (võimeline saavutama 10,000 rpm)
- Reaalaja PCR instrument:\* Rotor-Gene Q 5plex HRM<sup>®</sup> või muu Rotor-Gene instrument; LightCycler 1.2, 2.0 või 480; ABI PRISM 7000, 7700 või 7900HT SDS; Applied Biosystems 7500 Real-Time PCR System; või SmartCycler; ja sellega seotud spetsiifiline materjal
- Termotsükler\* või vesivann\* (pöördtranskriptsiooni etapp)

\* Veenduge, et kõik instrumendid on kontrollitud ja kalibreeritud vastavalt tootja soovitudele.

## Lisareagendid

- *ipsogen* BCR-ABL1 MbcR Controls Kit (kat. nr. 670191), mis koosneb negatiivse, kõrge ja madala positiivse BCR-ABL MbcR fusioongeeni ekspressiooniga rakuliinidest, RNA ekstraktsiooni ja pöördtranskriptsiooni kvalitatiivseks valideerimiseks

## Hoiatused ja ettevaatusabinõud

In vitro diagnostiliseks kasutamiseks

Kemikaalidega töötamisel tuleb alati kanda sobivat laborikitlit, ühekordseid kindaid ja kaitseprille. Lisainformatsiooni saamiseks lugege SDS infolehti (*safety data sheets*). Need on internetis kättesaadavad mugavas ja kompaktses PDF formaadis [www.qiagen.com/safety](http://www.qiagen.com/safety), kus saate iga QIAGENi kiti ja kiti komponendi kohta SDS otsida, vaadata ja printida.

Käideldge proovide ja analüüside jäätmed vastavalt kohalikele regulatsioonidele.

## Üldised ettevaatusabinõud

qPCR testide kasutamine eeldab häid laboritööharjumusi, sh seadmete hooldamine, mis on pühendatud molekulaarbioloogiale ja kooskõlas vastavate regulatsioonide ning oluliste standarditega.

See kitt on mõeldud in vitro diagnostiliseks kasutamiseks. Selle kiti reagentid ja juhised on valideeritud optimaalseks toimimiseks. Reagentide edasine lahjendamine või inkubatsiooniaegade ja –temperatuuride muutmine võib anda vigaseid või ebakõlalisi tulemusi. PPC ja PPF reagentid võivad kokkupuutel valgusega muutuda. Kõik reagentid on formuleeritud spetsiifiliselt selle testiga kasutamiseks. Testi optimaalseks toimimiseks ei tohi ühtegi komponenti asendada.

Transkripti hulga määramine qPCR abil vajab nii mRNA pöördtranskribeerimist kui ka saadud cDNA amplifitseerimist PCR abil. Seega tuleb kogu analüüs viia läbi RNAasi/DNAasi-vabadel tingimustel.

Olge eriti ettevaatlikud, et vältida:

- RNAasi/DNAasi kontaminatsiooni, mis võib degradeerida algse mRNA ja sünteesitud cDNA
- mRNA või PCR jääkkontaminatsiooni, mis annab valepositiivse signaali

Seetõttu soovitame järgmist:

- Kasutage nukleasid-vabasid laboritarvikuid (nt pipetid, pipetiotsikud, reaktsioonitubid) ja kandke analüüsi läbi viies kindaid.
- Kasutage kõikides pipeteerimisetappides värskeid aerosooli-resistentseid pipetiotsikuid, et vältida proovide ja reagentide kross-kontaminatsiooni.
- Valmistage pre-PCR mastermix selleks pühendatud materjaliga (pipetid, otsikud jne) selleks pühendatud alal, kus ei ole kindlasti DNA maatrikseid (cDNA, DNA, plasmidid). Lisage proovimaterjal eraldi alal (eelistatult eraldi ruumis) spetsiifilise materjaliga (pipetid, otsikud jne).
- Käsitsege standardite lahjendusi (C1–3 ja F1–5) eraldi ruumis.

## Reagentide säilitamine ja käsitsemine

Kitid transporditakse kuival jääl ja neid tuleb säilitada kohalejõudmisel temperatuuril  $-30^{\circ}\text{C}$  kuni  $-15^{\circ}\text{C}$ .

- Minimeerige praimerite ja proovi segude (PPC ja PPF tuubid) valgusega kokkupuudet.
- Enne avamist segage tube õrnalt ja tsentrifuugige.
- Säilitage kõiki kiti komponente originaalpakendites.

Need säilitustingimused kehtivad nii avatud kui avamata komponentidele. Komponendid, mida on hoitud teistel tingimustel kui siltidel kirjas, ei pruugi korralikult toimida ning võivad analüüsi tulemusi ebasoodsalt mõjutada.

Iga reagendi aegumistähtjad on näidatud komponendi sildil. Korrektsete säilitamistingimuste korral on toode kasutamiskõlblik sildil prinditud aegumistähtjani.

Toote ebastabiilsuse määramiseks ei ole üheseid signaale. Küll aga tuleb positiivseid ja negatiivseid kontrole alati tundmatute proovidega koos analüüsida.

## Protseduur

### Proovi RNA ettevalmistamine

RNA ettevalmistamine patsientide proovidest (veri või luuüdi) tuleb läbi viia valideeritud protseduuri abil. Analüüsi kvaliteet sõltub suuresti sisend-RNA kvaliteedist. Seetõttu soovitame enne analüüsi puhastatud RNA kvaliteeti kontrollida agaros-geelelektroforeesi\* või Agilent® Bioanalyzer® instrumendi abil.

### Protokoll: Soovituslik standardiseeritud EAC pöörd-transkriptsioon

#### Mida teha enne alustamist

- Valmistage ette dNTP-d, 10 mM igaüks. Säilitage temperatuuril  $-20^{\circ}\text{C}$  alikvootidena.
- Valmistage ette juhuslik heksameer, 100  $\mu\text{M}$ . Säilitage temperatuuril  $-20^{\circ}\text{C}$  alikvootidena.
- Valmistage ette  $\text{MgCl}_2$ , 50 mM. Säilitage temperatuuril  $-20^{\circ}\text{C}$  alikvootidena.

#### Protseduur

1. Sulatage kõik komponendid ja asetage need jääle.
2. Inkubeerige 1  $\mu\text{g}$  RNA-d (1–4  $\mu\text{l}$ ) 10 minutes temperatuuril  $70^{\circ}\text{C}$  ja jahutage koheselt jääl 5 minutit.
3. Tsentrifugeerige lühidalt (ca 10 sekundit, 10,000 rpm), et koguda vedelik tuubi põhja. Seejärel hoidke jääl.
4. Valmistage ette järgmine RT segu vastavalt töödeldavate proovide arvule (Tabel 2).

\* Kemikaalidega töötamisel kandke alati sobivat laborikitlit, ühekordseid kindaid ja kaitseprille.

**Tabel 2. RT segu ettevalmistamine**

Komponent	Maht proovi kohta ( $\mu\text{l}$ )	Lõpp-kontsentr.
First-Strand Buffer (kaasas Superscript II Reverse Transcriptase ensüümiga), 5x	4.0	1x
MgCl <sub>2</sub> (50 mM)	2.0	5 mM
dNTP-d (10 mM igaüks, eelnevalt valmistada ja säilitada temperatuuril – 20°C alikvootidena)	2.0	1 mM
DTT (100 mM, kaasas Superscript II Reverse Transcriptase ensüümiga)	2.0	10 mM
RNAasi inhibiitor (40 U/ $\mu\text{l}$ )	0.5	1 U/ $\mu\text{l}$
Juhuslik heksameer (100 $\mu\text{M}$ )	5.0	25 $\mu\text{M}$
Superscript II või Superscript Reverse Transcriptase ensüüm (200 U/ $\mu\text{l}$ )	0.5	5 U/ $\mu\text{l}$
Kuumutatud RNA proov (lisada etapis 5)	1.0–4.0	50 ng/ $\mu\text{l}$
Nukleaaside-vaba PCR-puhtusega vesi (lisada etapis 5)	0.0–3.0	–
Lõppmaht	20.0	–

**5. Pipeteerige 16  $\mu\text{l}$  RT segu igasse PCR tuubi. Seejärel lisage 1–4  $\mu\text{l}$  (1  $\mu\text{g}$ ) RNA (etapist 3) ja kohandage mahuni 20  $\mu\text{l}$  nukleaaside-vaba PCR-puhtusega veega (vt Tabel 3).**

**Tabel 3. Pöörtranskriptsiooni reaktsiooni ettevalmistamine**

Komponent	Maht ( $\mu\text{l}$ )
RT segu	16
Kuumutatud RNA proov (1 $\mu\text{g}$ )	1–4
Nukleaaside-vaba PCR-puhtusega vesi	0–3
Lõppmaht	20

6. Segage korralikult ja tsentrifuugige lühidalt (ca 10 sekundit, 10,000 rpm), et koguda vedelik tuubi põhja.
7. Inkubeerige temperatuuril 20°C 10 minutit.
8. Inkubeerige temperatuuril 42°C termotsükleris 45 minutit, seejärel koheselt temperatuuril 99°C 3 minutit.
9. Jahutage jääl reaktsiooni peatamiseks 5 minutit.
10. Tsentrifugeerige lühidalt (ca 10 sekundit, 10,000 rpm), et koguda vedelik tuubi põhja. Seejärel hoidke jääl.
11. Lahjendage lõplik cDNA 30 µl nukleaaside-vaba PCR-puhtusega veega nii, et lõppmaht on 50 µl.
12. Viige läbi PCR vastavalt järgnevatele protokollidele, vastavalt teie qPCR instrumendile.



## Protokoll: qPCR Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM või Rotor-Gene Q 5plex HRM instrumendil 72-tuubi rootoriga

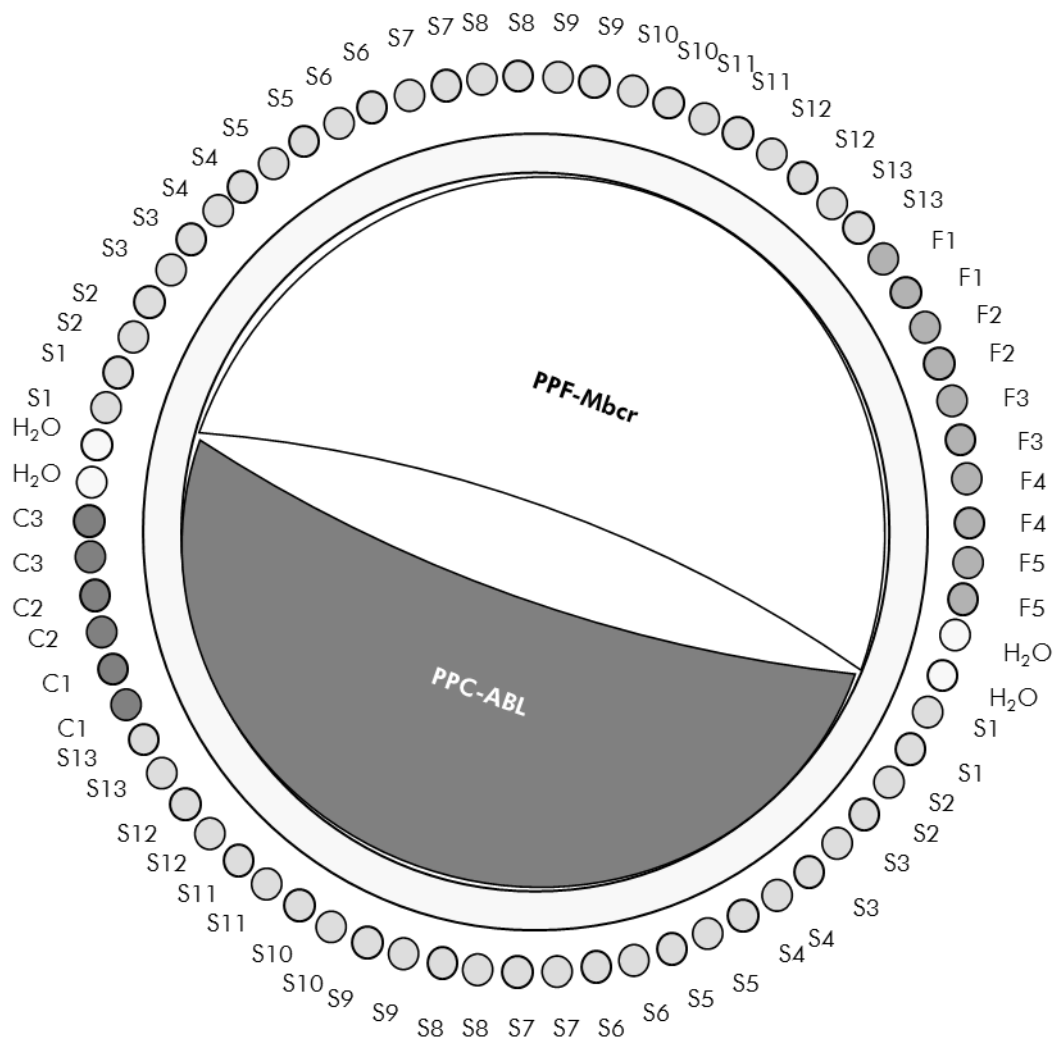
Kasutades seda instrumenti, soovitame kõik mõõtmised läbi viia duplikaatidena, nagu näidatud Tabelis 4.

**Tabel 4. Reaktsioonide arv Rotor-Gene Q instrumendil 72-tuubi rootoriga**

<b>Proovid</b>	<b>Reaktsioonid</b>
<b>ABL praimerite ja proovi seguga (PPC-ABL)</b>	
n cDNA proovi	n x 2 reaktsiooni
ABL standard	2 x 3 reaktsiooni (3 lahjendust, igaüks testitud duplikaadina)
Vee-kontroll	2 reaktsiooni
<b>BCR-ABL Mbcr praimerite ja proovi seguga (PPF-Mbcr)</b>	
n cDNA proovi	n x 2 reaktsiooni
Mbcr standard	2 x 5 reaktsiooni (5 lahjendust, igaüks testitud duplikaadina)
Vee-kontroll	2 reaktsiooni

### Proovide töötlemine Rotor-Gene Q instrumendil 72-tuubi rootoriga

Soovitame testida vähemalt 13 cDNA proovi samas eksperimendis, et optimeerida standardite ning praimerite ja proovi segude kasutamist.



### Joonis 3. Soovituslik rootori paigutus igas eksperimendis ipsogen BCR-ABL1 Mbc

**Kitiga.** F1–5: BCR-ABL Mbc standardid; C1–3: ABL standardid; S: cDNA proov; H<sub>2</sub>O: vee-kontroll.

**Märkus:** Veenduge, et asetate rootori 1. positsiooni alati testitava proovi. Vastasel juhul ei saa instrument kalibreerimise etapis kalibreerimist läbi viia ja kogutakse ebaõigeid fluorestsentsandmeid.

Täitke kõik ülejäänud positsioonid tühjade tuubidega.

### qPCR Rotor-Gene Q instrumendil 72-tuubi rootoriga

**Märkus:** Viige kõik etapid läbi jääl.

#### Protseduur

1. Sulatage kõik vajalikud komponendid ja asetage need jääle.
2. Valmistage ette järgmine qPCR segu vastavalt töödeldavate proovide arvule.

Kõik kontsentratsioonid on reaktsiooni lõppmahu kohta.

Tabelis 5 kirjeldatakse ühe reagendisegu ettevalmistamise pipeteerimisskeemi, arvatud nii, et reaktsiooni lõppmaht on 25  $\mu$ l. Vastavalt reaktsioonide arvule saab ette valmistada eelsegu, kasutades sama praimerite ja proovi segu (kas PPC-ABL või PPF-Mbcr). Pipeteerimisvigade kompenseerimiseks on sisse arvestatud lisamahud.

**Tabel 5. qPCR segu ettevalmistamine**

<b>Komponent</b>	<b>1 reakts. (<math>\mu</math>l)</b>	<b>ABL: 34 + 1 reakts. (<math>\mu</math>l)</b>	<b>BCR-ABL Mbcr: 38 +1 reakts. (<math>\mu</math>l)</b>	<b>Lõpp- kontsentr.</b>
TaqMan Universal PCR Master Mix, 2x	12.5	437.5	487.5	1x
Praimerite ja proovi segu, 25x	1	35	39	1x
Nukleaaside- vaba PCR- puhtusega vesi	6.5	227.5	253.3	–
Proov (lisada etapis 4)	5	5 igat	5 igat	–
Kogumaht	25	25 igat	25 igat	–

- 3. Dispenseerige iga tuubi kohta 20  $\mu$ l qPCR eelsegu.**
- 4. Lisage 5  $\mu$ l RT produkti (cDNA, 100 ng RNA ekvivalent), mis saadi pöördtranskriptsioonil (vt "Protokoll: Soovituslik standardiseeritud EAC", lk 14) vastavasse tuubi (kogumaht 25  $\mu$ l).**
- 5. Segage õrnalt pipeteerides üles-alla.**
- 6. Asetage tuubid termotsüklerisse vastavalt tootja soovitudele.**
- 7. Programmeerige Rotor-Gene Q instrumendi termotsükleerimise programm nagu toodud Tabelis 6.**

**Tabel 6. Temperatuuriprofiil**

<b>Mode of analysis</b>	Quantitation
<b>Hold</b>	Temperatuur: 50 deg Aeg: 2 mins
<b>Hold 2</b>	Temperatuur: 95 deg Aeg: 10 mins
<b>Cycling</b>	50 korda 95 kraadi 15 sekundit 60 kraadi 1 min FAM fluorestsentsi kogumine kanalis Green: Single

- 8. Rotor-Gene Q instrumendil valige analüüsiks "Slope Correct". Soovitame lävendiks panna 0.03. Käivitage termotsükleerimise programm, nagu kirjeldatud Tabelis 6.**

## Protokoll: qPCR ABI PRISM 7000, 7700 ja 7900HT SDS, Applied Biosystems 7500 Real-Time PCR System ja LightCycler 480 instrumentidel

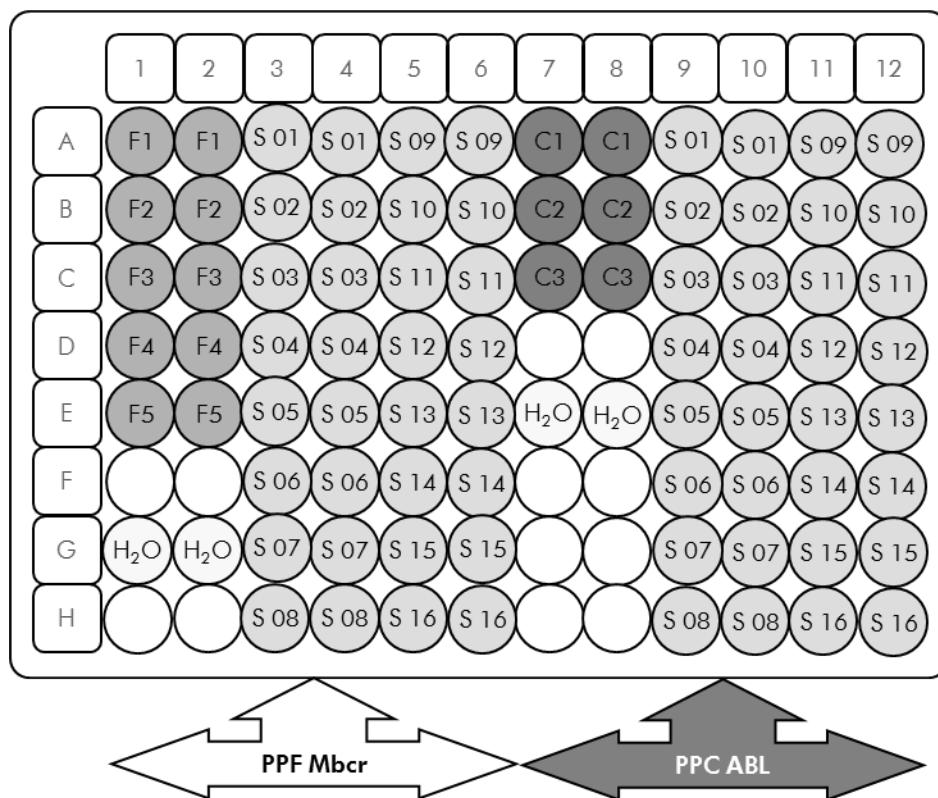
Kasutades 96-augulise-plaadi qPCR seadmeid, soovitame kõik mõõtmised läbi viia duplikaatidena, nagu näidatud Tabelis 7.

**Tabel 7. Reaktsioonide arv kasutades 96-augulise-plaadi qPCR seadet**

Proovid	Reaktsioonid
<b>ABL praimerite ja proovi seguga (PPC-ABL)</b>	
n cDNA proovi	n x 2 reaktsiooni
ABL standard	2 x 3 reaktsiooni (3 lahjendust, igaüks testitud duplikaadina)
Vee-kontroll	2 reaktsiooni
<b>BCR-ABL Mbc r primerite ja proovi seguga (PPF-Mbc r)</b>	
n cDNA proovi	n x 2 reaktsiooni
Mbc r standard	2 x 5 reaktsiooni (5 lahjendust, igaüks testitud duplikaadina)
Vee-kontroll	2 reaktsiooni

### Proovi töötlemine ABI PRISM 7000, 7700 ja 7900 SDS, Applied Biosystems Real-Time PCR System ja LightCycler 480 instrumentidel

Soovitame testida vähemalt 16 cDNA proovi samas eksperimendis, et optimeerida standardite ning primerite ja proovi segude kasutamist. Joonisel 4 on näidatud sellise eksperimendi plaadiskeem.



**Joonis 4. Soovituslik plaadiskeem ühe eksperimendi jaoks. S:** cDNA proov; **F1–5:** BCR-ABL MbcR standardid; **C1–3:** ABL standardid; **H<sub>2</sub>O:** vee-kontroll.

### qPCR ABI PRISM 7000, 7700 ja 7900 SDS, Applied Biosystems Real-Time PCR System ja LightCycler 480 instrumentidel

**Märkus:** Viige kõik etapid läbi jääl.

#### Protseduur

- 1. Sulatage kõik vajalikud komponendid ja asetage need jääle.**
- 2. Valmistage ette järgmine qPCR segu vastavalt töödeldavate proovide arvule.**

Kõik kontsentratsioonid on reaktsiooni lõppmahu kohta.

Tabelis 8 kirjeldatakse ühe reagensisegu ettevalmistamise pipeteerimisskeemi, arvatud nii, et reaktsiooni lõppmaht on 25 µl. Vastavalt reaktsioonide arvule saab ette valmistada eelsegu, kasutades sama praimerite ja proovi segu (kas PPC-ABL või PPF-MbcR). Pipeteerimisvigade kompenseerimiseks on sisse arvestatud lisamahud.

**Tabel 8. qPCR segu ettevalmistamine**

<b>Komponent</b>	<b>1 reakts. (<math>\mu</math>l)</b>	<b>ABL: 40 + 1 reakts. (<math>\mu</math>l)</b>	<b>BCR-ABL Mbc: 44 + 1 reakts. (<math>\mu</math>l)</b>	<b>Lõpp- kontsentr</b>
TaqMan Universal PCR Master Mix, 2x	12.5	512.5	562.5	1x
Praimerite ja proovi segu, 25x	1	41	45	1x
Nukleaaside- vaba PCR- puhtusega vesi	6.5	266.5	292.5	–
Proov (lisada etapis 4)	5	5 igat	5 igat	–
Kogumaht	25	25 igat	25 igat	–

3. Dispenseerige iga plaadiaugu kohta 20  $\mu$ l qPCR eelsegu.
4. Lisage 5  $\mu$ l RT produkti (cDNA, 100 ng RNA ekvivalent), mis saadi pöördtranskriptsioonil (vt "Protokoll: Soovituslik standardiseeritud EAC", lk 14) vastavasse auku (kogumaht 25  $\mu$ l).
5. Segage õrnalt pipeteerides üles-alla.
6. Sulgege plaat ja tsentrifugeerige lühidalt (300 x g, ca 10 sekundit).
7. Asetage tuubid termotsüklerisse vastavalt tootja soovitudele. Programmeerige termotsükleri termotsükleerimise programm nagu kirjeldatud Tabelis 9 ABI PRISM 7000, 7700 ja 7900HT SDS ja Applied Biosystems 7500 Real-Time PCR System kohta, või Tabelis 10 LightCycler 480 instrumendi kohta.

**Tabel 9. Temperatuuriprofiil ABI PRISM 7000, 7700 ja 7900HT SDS või Applied Biosystems 7500 Real-Time PCR System puhul**

<b>Mode of analysis</b>	Standard Curve — Absolute Quantitation
<b>Hold</b>	Temperatuur: 50°C Aeg: 2 minutes
<b>Hold 2</b>	Temperatuur: 95°C Aeg: 10 minutes
<b>Cycling</b>	50 korda 95°C 15 sekundit 60°C 1 minut kogudes FAM fluorestsentsi; summutaja: TAMRA

**Tabel 10. Temperatuuriprofiil LightCycler 480 instrumendi puhul**

<b>Mode of analysis</b>	Absolute Quantification ("Abs Quant")
<b>Detection formats</b>	Valige "Simple Probe" Detection formats aknas
<b>Hold</b>	Temperatuur: 50°C Aeg: 2 minutes
<b>Hold 2</b>	Temperatuur: 95°C Aeg: 10 minutes
<b>Cycling</b>	50 korda 95°C 15 sekundit 60°C 1 minut kogudes FAM fluorestsentsi, mis vastab (483–533 nm) LC versioonis 01 ja (465–510 nm) LC versioonis 02

- 8. ABI PRISM 7000, 7700 ja 7900HT SDS või Applied Biosystems 7500 Real-Time PCR System puhul järgige etappi 8a. LightCycler 480 instrumendi puhul järgige etappi 8b.**
- 8a. ABI PRISM 7000, 7700 and 7900HT SDS, or Applied Biosystems 7500 Real-Time PCR System: Soovitame lävendi seada 0.1 nagu kirjeldatud EAC protokollis analüüsetapis ABI PRISM SDS seadmehel ja baseline seada tsüklite 3 ja 15 vahele. Käivitage termotsükleerimise programm nagu kirjeldatud Tabelis 9.**



**8b. LightCycler 480 instrument: Soovitame Fit point analüüsirežiimi, taust 2.0 ja lävend 2.0. Käivitage termotsükleerimise programm nagu kirjeldatud Tabelis 10.**

## Protokoll: qPCR LightCycler 1.2 ja 2.0 instrumentidel

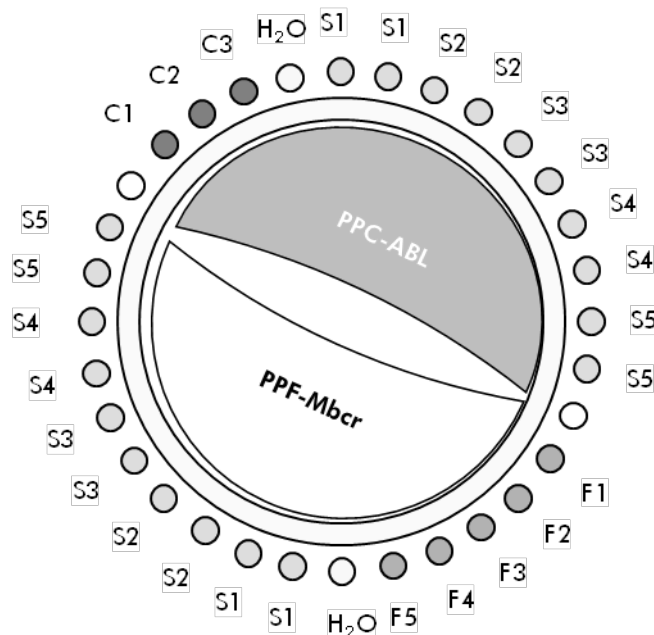
Kapillaarinstrumentide puhul soovitame mõõta proove duplikaatidena ja kontrolle ainult ühe korra, nagu kirjeldatud Tabelis 11.

**Tabel 11. Reaktsioonide arv LightCycler 1.2 ja 2.0 instrumentidel**

Proovid	Reaktsioonid
<b>ABL praimerite ja proovi seguga (PPC-ABL)</b>	
n cDNA proovi	n x 2 reaktsiooni
ABL standard	1 x 3 reaktsiooni (3 lahjendust, igaüks testitud ühekordselt)
Vee-kontroll	1 reaktsioon
<b>BCR-ABL Mbc r praimerite ja proovi seguga (PPF-Mbc r)</b>	
n cDNA proovi	n x 2 reaktsiooni
Mbc r standard	1 x 5 reaktsiooni (5 lahjendust, igaüks testitud ühekordselt)
Vee-kontroll	1 reaktsioon

### Proovide töötlemine LightCycler 1.2 ja 2.0 instrumentidel

Soovitame testida vähemalt 5 cDNA proovi samas eksperimendis, et optimeerida standardite ning praimerite ja proovi segude kasutamist. Joonise 5 kapillaarskeemil on näidiseksperiment.



**Joonis 5. Soovituslik rootori paigutusega eksperimendi jaoks ipsogen BCR-ABL1 Mbcr Kitiga. F1–5:** BCR-ABL Mbcr standardid; **C1–3:** ABL standardid; **S:** tundmatu DNA proov analüüsimiseks; **H<sub>2</sub>O:** vee-kontroll.

### qPCR LightCycler 1.2 ja 2.0 instrumentidel

**Märkus:** Tehnoloogiliste nõuete tõttu tuleb LightCycleri eksperimente läbi viia spetsiaalsete reagentidega. Soovitame kasutada LightCycler TaqMan Master ja järgida tootja juhiseid Master Mix 5x valmistamisel.

**Märkus:** Viige kõik etapid läbi jääl.

### Protseduur

- 1. Sulatage kõik vajalikud komponendid ja asetage need jääle.**
- 2. Valmistage ette järgmine qPCR segu vastavalt töödeldavate proovide arvule.**

Kõik kontsentratsioonid on reaktsiooni lõppmahu kohta.

Tabelis 12 kirjeldatakse ühe reagensisegu ettevalmistamise pipeteerimisskeemi, arvatud nii, et reaktsiooni lõppmaht on 20 µl. Vastavalt reaktsioonide arvule saab ette valmistada eelsegu, kasutades sama praimerite ja proovi segu (kas PPC-ABL või PPF-Mbcr). Pipeteerimisvigade kompenseerimiseks on sisse arvestatud lisamahud.

**Tabel 12. qPCR segu ettevalmistamine**

<b>Komponent</b>	<b>1 reakts. (<math>\mu</math>l)</b>	<b>ABL: 14 +1 reakts. (<math>\mu</math>l)</b>	<b>BCR-ABL Mbcr: 16 + 1 reakts. (<math>\mu</math>l)</b>	<b>Löpp- kontsentr.</b>
Värskelt valmistatud LightCycler TaqMan Master Mix, 5x	4.0	60	68.0	1x
Praimerite ja proovi segu, 25x	0.8	12	13.6	1x
Nukleaasidevaba PCR-puhtusega vesi	10.2	153	173.4	–
Proov (lisada etapis 4)	5	5 igat	5 igat	–
Kogumaht	20	20 igat	20 igat	–

3. Dispenseerige 15  $\mu$ l qPCR eelsegu kapillaari kohta.
4. Lisage 5  $\mu$ l RT produkti (cDNA, 100 ng RNA ekvivalent), mis saadi pöördtranskriptsioonil (vt "Protokoll: Soovituslik standardiseeritud EAC", lk 14) vastavasse tuubi (kogumaht 20  $\mu$ l).
5. Segage õrnalt pipeteerides üles-alla.
6. Asetage kapillaarid seadmega kaasasolevatesse adapteritesse ja tsentrifugeerige lühidalt (700 x g, ca 10 sekundit).
7. Laadige kapillaarid termotsüklerisse vastavalt tootja soovitustele.
8. Programmeerige LightCycler 1.2 või 2.0 instrumendi termotsükleerimise programm nagu kirjeldatud Tabelis 13.

**Tabel 13. Temperatuuriprofiil**

<b>Mode of analysis</b>	Quantification
<b>Hold</b>	Temperatuur: 95°C Aeg: 10 minutes Ramp: 20
<b>Cycling</b>	50 korda 95°C 10 sekundit; ramp: 20 60°C 1 minut; ramp: 20; FAM fluorestsentsi kogumine: Single
<b>Hold 2</b>	45°C 1 minut; ramp: 20

9. LightCycler 1.2 puhul järgige etappi 9a. LightCycler 2.0 puhul järgige etappi 9b.
- 9a. LightCycler 1.2: Soovituslik on F1/F2 ja "2<sup>nd</sup> derivative analysis" režiim. Käivitage termotsükleerimise programm nagu kirjeldatud Tabelis 13.
- 9b. LightCycler 2.0: Soovituslik on Automated (F''max) analüüs LightCycler 2.0 Software versioonil 4.0, et saada korratavaid tulemusi. Käivitage termotsükleerimise programm nagu kirjeldatud Tabelis 13.

## Protokoll: qPCR SmartCycler instrumendil

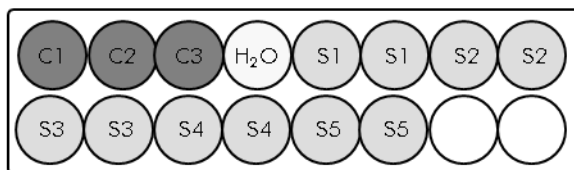
Seda instrumenti kasutades on soovitatav mõõta proove duplikaatidena ja kontrolle ühekordselt, nagu näidatud Tabelis 14.

**Tabel 14. Reaktsioonide arv SmartCycler instrumendil**

Proovid	Reaktsioonid
<b>ABL praimerite ja proovi seguga (PPC-ABL)</b>	
n cDNA proovi	n x 2 reaktsiooni
ABL standard	1 x 3 reaktsiooni (3 lahjendust, igaüks testitud ühekordselt)
Vee-kontroll	1 reaktsioon
<b>BCR-ABL Mbc r praimerite ja proovi seguga (PPF-Mbc r)</b>	
n cDNA proovi	n x 2 reaktsiooni
Mbc r standard	1 x 5 reaktsiooni (5 lahjendust, igaüks testitud ühekordselt)
Vee-kontroll	1 reaktsioon

### Proovi töötlemine SmartCycler instrumendil

Soovitame testida vähemalt 5 cDNA proovi samas eksperimendis, et optimeerida standardite ning praimerite ja proovi segude kasutamist. Joonisel 6 toodud kahe-bloki skeemil on toodud näidis.



All the assays on this first block are performed with PPC-ABL



All the assays on this second block are performed with PPF-Mbc r

**Joonis 6. Soovituslik plaadipaigutus ühe eksperimendi jaoks. S:** cDNA proov; **F1–5:** BCR-ABL Mbc r standardid; **C1–3:** ABL standardid; **H<sub>2</sub>O:** vee-kontroll.

## qPCR SmartCycler instrumendil

**Märkus:** Viige kõik etapid läbi jääl.

### Protseduur

1. Sulatage kõik vajalikud komponendid ja asetage need jääle.
2. Valmistage ette järgmine qPCR segu vastavalt töödeldavate proovide arvule.

Kõik kontsentratsioonid on reaktsiooni lõppmahu kohta.

Tabelis 15 kirjeldatakse ühe reagensisegu ettevalmistamise pipeteerimisskeemi, arvatud nii, et reaktsiooni lõppmaht on 25  $\mu$ l. Vastavalt reaktsioonide arvule saab ette valmistada eelsegu, kasutades sama praimerite ja proovi segu (kas PPC-ABL või PPF-Mbcr). Pipeteerimisvigade kompenseerimiseks on sisse arvestatud lisamahud.

**Tabel 15. qPCR segu ettevalmistamine**

Komponent	1 reakts. ( $\mu$ l)	ABL: 14 + 1 reakts. ( $\mu$ l)	BCR-ABL Mbcr: 16 + 1 reakts. ( $\mu$ l)	Lõpp- kontsentr.
TaqMan Universal PCR Master Mix, 2x	12.5	187.5	212.5	1x
Praimerite ja proovi segu, 25x	1	15	17	1x
Nukleaside- vaba PCR- puhtusega vesi	6.5	97.5	110.5	–
Proov (lisada etapis 4)	5	5 igat	5 igat	–
Kogumaht	25	25 igat	25 igat	–

3. Dispenseerige 20  $\mu$ l qPCR eelsegu plaadiaugu kohta.
4. Lisage 5  $\mu$ l RT produkti (cDNA, 100 ng RNA ekvivalent), mis saadi pöördtranskriptsioonil (vt "Protokoll: Soovituslik standardiseeritud EAC", lk 14), vastavasse tuubi (kogumaht 25  $\mu$ l).

5. Segage õrnalt pipeteerides üles-alla.
6. Laadige proovid termotsüklerisse vastavalt tootja soovitudele.
7. Programmeerige SmartCycler instrumendi termotsükleerimise program nagu kirjeldatud Tabelis 16.

**Tabel 16. Temperatuuriprofiil**

<b>Hold</b>	Temperatuur: 50°C Aeg: 2 minutes
<b>Hold 2</b>	Temperatuur: 95°C Aeg: 10 minutes
<b>Cycling</b>	50 korda 95°C 15 sekundit 60°C 1 minut andmete kogumisega <i>acquisition</i> : Single

8. Soovitame lävendi seada 30. Käivitage termotsükleerimise program nagu kirjeldatud Tabelis 16.

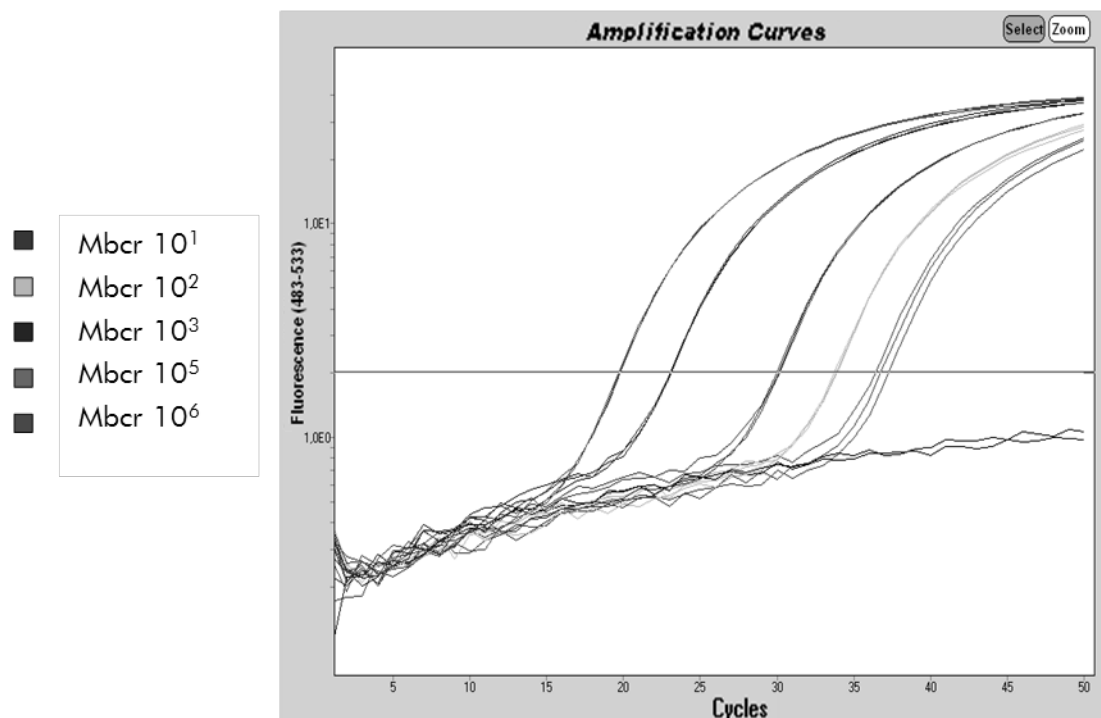


# Tulemuste tõlgendamine

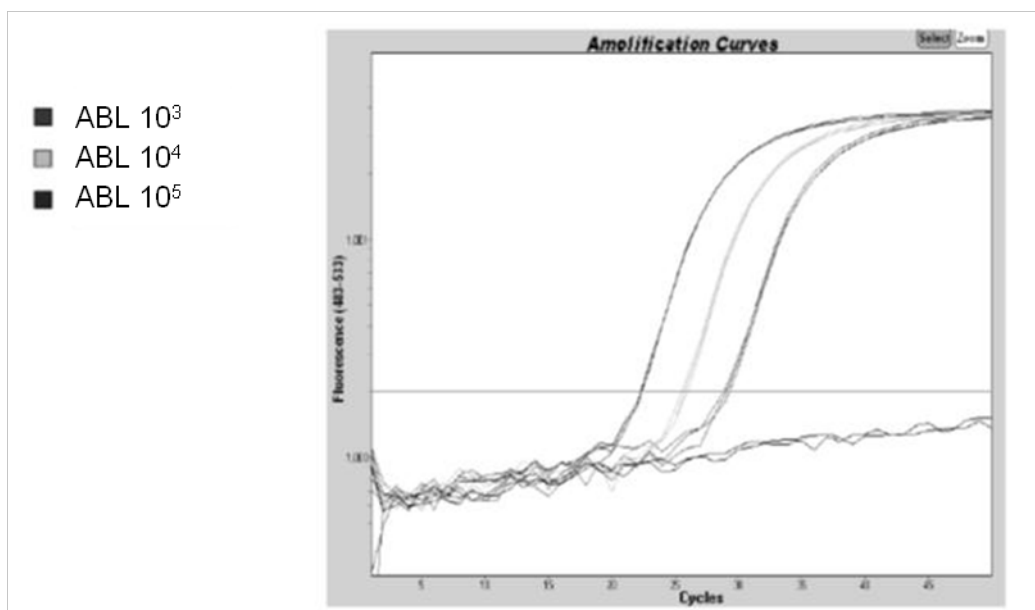
## Andmeanalüüsi põhimõte

TaqMan tehnoloogiat kasutades nimetatakse PCR tsüklite arvu, mis on vajalik signaali detekteerimiseks üle lävendi, lävitsükliks ( $C_T$ ) ning see on otseselt proportsionaalne reaktsiooni alguses olemas olnud sihtmärgi hulgaga.

Kasutades teadaoleva molekulide arvuga standardeid, on võimalik tekitada standardkõver ja määrata kindlaks sihtmärgi täpne hulk testitavas proovis. *ipsogen* standardkõverad on plasmiidipõhised; kasutame 3 plasmiidse standardi lahjendust ABL kontrollgeeni (CG) ja 5 standardi lahjendust FG puhul, et kindlustada täpsed standardkõverad. Joonistel 7 ja 8 on toodud näidised TaqMan amplifikatsioonikõveratest, mis on saadud *ipsogen* BCR-ABL Mbc Kitiga.



**Joonis 7. BCR-ABL Mbc standardite detekteerimine (F1–F5).** 10<sup>1</sup>, 10<sup>2</sup>, 10<sup>3</sup>, 10<sup>5</sup>, 10<sup>6</sup> koopiat/5  $\mu$ l.



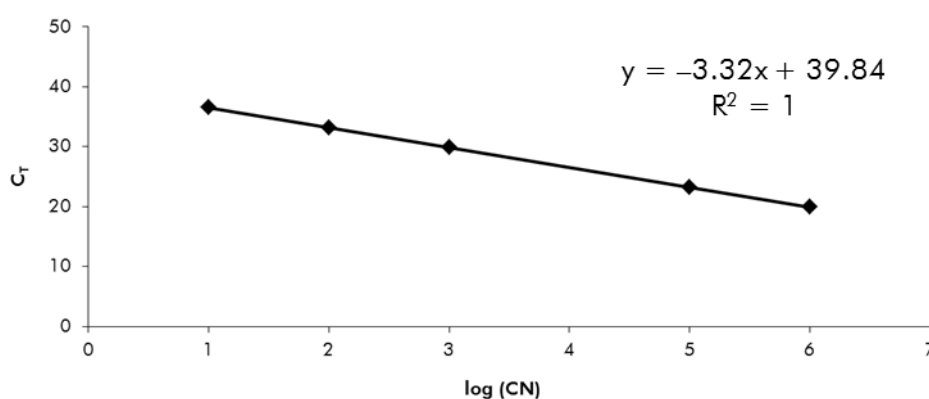
Joonis 8. ABL standardite detekteerimine (C1, C2, C3).  $10^3$ ,  $10^4$  ja  $10^5$  koopiat/5  $\mu$ l.

## Tulemused

### Standardkõver ja kvaliteedikriteeriumid

Toorandmeid on võimalik transportida analüüsimiseks Excel® faili.

Iga geeni (ABL ja BCR-ABL) toor- $C_T$  väärtused, mis saadakse plasmiidse standardi lahjendustest, seatakse graafikule vastavalt log koopianumbrile (3, 4 ja 5 C1, C2 ja C3 puhul; 1, 2, 3, 5 ja 6 F1, F2, F3, F4 ja F5 puhul). Joonisel 9 on toodud näidis teoreetilisest kõverast, mis on arvutatud 5 standardi lahjenduse põhjal.



Joonis 9. Teoreetiline kõver, mis on arvutatud 5 standardi lahjenduse põhjal.

Lineaarne regressioonikõver ( $y = ax + b$ ) arvutatakse igale geenile (ABL ja BCR-ABL), milles  $a$  on joone kalle ja  $b$  on  $y$ -lõikaja, mis on joone  $y$ -teljega lõikumise punkti  $y$ -koordinaat. Selle võrrand ja määramise koefitsent ( $R^2$ ) prinditakse graafikule.

Kuna standardid on 10-kordsed lahjendused, on joone teoreetiline kalle –3.3. Kalle –3.0 kuni –3.9 on vastuvõetav seni kuni  $R^2$  on  $>0.95$  (7). Sellegipoolest on täpsete tulemuste huvides eelistatav  $R^2$  väärtus  $>0.98$  (3).

### Normaliseeritud koopianumber (NCN)

ABL standardkõvera valemite tuleb kasutada, et teisendada tundmatute proovide toor- $C_T$  väärtused (saadud PPC-ABL-ga) ABL koopianumbriteks ( $ABL_{CN}$ ).

BCR-ABL standardkõvera valemite tuleb kasutada, et teisendada tundmatute proovide toor- $C_T$  väärtused (saadud PPF-Mbcr-ga) BCR-ABL koopianumbriteks ( $BCR-ABL Mbcr_{CN}$ ).

Nende CN väärtuste suhe annab normaliseeritud koopianumbri (NCN):

$$NCN = \frac{BCR-ABL Mbcr_{CN}}{ABL_{CN}} \times 100$$

### MRD väärtus

Minimaalse residuaalse haiguse (MRD) väärtus on suhe CG normaliseeritud FG ekspressiooni vahel kordusproovis ( $(FG_{CN}/CG_{CN})_{FUP}$ ) ja diagnostilises proovis ( $(FG_{CN}/CG_{CN})_{DX}$ ).

$$MRD \text{ väärtus (MRD}_v) = \frac{(FG_{CN}/CG_{CN})_{FUP}}{(FG_{CN}/CG_{CN})_{DX}}$$

### Tundlikkus

Tundlikkus ( $SENS_v$ ) arvutatakse vastavalt FG relatiivsele ekspressioonile diagnoosimisel ( $(FG_{CN}/CG_{CN})_{DX}$ ) ja CG ekspressioonile ( $CG_{CN,FUP}$ ) kordusproovis.

$$Tundlikkus (SENS}_v) = \frac{CG_{CN,DX}}{CG_{CN,FUP} \times FG_{CN,DX}}$$

### ABL väärtuste kvaliteedikontroll

Kehv RNA kvaliteet või probleemid qPCR etappides annavad tulemuseks madala  $ABL_{CN}$ . Soovitame kõrvale jätta nende proovide tulemused, mille  $ABL_{CN} < 4246.2$  (madalam väärtus 95% CI patsientide proovidest EAC uurimuses, viide 8).

### Kordusproovide korratavus

$C_T$  väärtuste varieeruvus kordusproovide vahel peaks olema  $<2$ , mis vastab 4-kordsele muutusele koopianumbrite väärtustes.

$C_T$  väärtuste varieeruvus kordusproovide vahel on tavaliselt  $<1.5$  kui kordusproovide keskmine  $C_T$  väärtus on  $<36$  (7).

**Märkus:** Iga kasutaja peab mõõtma nende enda korratavust oma laboris.

## Vee-kontrollid

Negatiivsed kontrollid peaksid andma null CN.

Positiivsed vee-kontrolli tulemused näitavad kross-kontaminatsiooni. Vt "Vigade leidmise juhis", allpool, et leida lahendus.

## Vigade leidmise juhis

Vigade leidmise peatükk on võimalike probleemide lahendamisel abiks. Lisainformatsiooni saamiseks vaadake ka Korduma Kippuvaid Küsimusi meie tehnilise toe kodulehel: [www.qiagen.com/FAQ/FAQList.aspx](http://www.qiagen.com/FAQ/FAQList.aspx). QIAGENi tehnilises toes töötavad teadlased vastavad alati hea meelega küsimustele, mis puudutavad informatsiooni ja protokolle selles kasutusjuhendis või proovi ja testi tehnoloogiaid (kontaktinformatsiooni leiate "Kontaktinformatsioon", lk 48).

### Kommentaariid ja soovitused

---

#### Negatiivne tulemus kontrollgeeni (ABL) ja BCR-ABL Mbcr puhul kõikides proovides — standard korras

- |   |  |
|---|--|
| a) Kehv RNA kvaliteet                         | Kontrollige alati enne alustamist RNA kvaliteeti ja kontsentratsiooni.<br><br>Testige paralleelselt rakuliini RNA positiivset kontrolli ( <i>ipsogen</i> BCR-ABL1 Mbcr Controls Kit, kat. nr. 670191). |
| b) Pöördtranskriptsiooni etapi ebaõnnestumine | Kontrollige alati enne alustamist RNA kvaliteeti ja kontsentratsiooni.<br><br>Testige paralleelselt rakuliini RNA positiivset kontrolli ( <i>ipsogen</i> BCR-ABL1 Mbcr Controls Kit, kat. nr. 670191). |

#### Negatiivne tulemus kontrollgeeni (ABL) puhul proovides — standard korras

## Kommentaariid ja soovitused

---

- a) Kehv RNA kvaliteet      Kontrollige alati enne alustamist RNA kvaliteeti ja kontsentratsiooni.  
Testige paralleelselt rakuliini RNA positiivset kontrolli (*ipsogen* BCR-ABL1 Mbc Controls Kit, kat. nr. 670191).
- b) Pöördtranskriptsiooni etapi ebaõnnestumine      Kontrollige alati enne alustamist RNA kvaliteeti ja kontsentratsiooni.  
Testige paralleelselt rakuliini RNA positiivset kontrolli (*ipsogen* BCR-ABL1 Mbc Controls Kit, kat. nr. 670191).

### Standardi signaal negatiivne

- a) Pipeteerimisviga      Kontrollige pipeteerimisskeemi ja reaktsiooni koostist.  
Korrake PCR.
- b) Kiti komponentide ebaõige säilitamine      Säilitage *ipsogen* BCR-ABL1 Mbc Kiti temperatuuril  $-15$  kuni  $-30^{\circ}\text{C}$  ja hoidke praimerite ja proovi segusid (PPC ja PPF) valguse eest kaitstuna. Vt "Reagentide säilitamine ja käsitlemine", lk 13.  
Vältige korduvat külmutamist ja sulatamist.  
Säilitage reagentid alikvootidena.

### Negatiivsed kontrollid on positiivsed

- Kross-kontaminatsioon      Asendage kõik olulised reagentid.  
Korrake eksperimenti kõikide reagentide uute alikvootidega.  
Käsitsege alati proove, kiti komponente ja kulutarvikuid kooskõlas üldtunnustatud tavadega vältimaks *carry-over* kontaminatsiooni.

### Puuduv signaal, isegi standardkontrollide puhul

- a) Pipeteerimisviga või unustatud reagentid      Kontrollige pipeteerimisskeemi ja reaktsiooni koostist.  
Korrake PCR.

## Kommentaariid ja soovitusid

---

- |   |  |
|---|--|
| b) Proovimaterjali inhibitoorsed efektid, põhjuseks ebapiisav puhastamine | Korrake RNA puhastamist.   |
| c) LightCycler: valitud vale detektsioonikanal                            | Seadke Channel Setting F1/F2 või 530 nm/640 nm.  |
| d) LightCycler: andmete kogumine ei ole programmeeritud                   | Kontrollige tsükleerimise programme.<br>PCR programmi iga seondumise etapi lõpus valige <i>acquisition mode "single"</i> . |

### Proovidel puuduvad või madalad signaalid, aga standardkontrollid korras

- |  |   |
|--|---|
| a) Kehv RNA kvaliteet või madal kontsentratsioon | Kontrollige alati enne alustamist RNA kvaliteeti ja kontsentratsiooni.<br><br>Testige paralleelselt rakuliini RNA positiivset kontrolli ( <i>ipsogen BCR-ABL1 Mbc</i> r Controls Kit, kat. nr. 670191). |
| b) Pöördtranskriptsiooni etapi ebaõnnestumine    | Kontrollige alati enne alustamist RNA kvaliteeti ja kontsentratsiooni.<br><br>Testige paralleelselt rakuliini RNA positiivset kontrolli ( <i>ipsogen BCR-ABL1 Mbc</i> r Controls Kit, kat. nr. 670191). |

### Fluorestsentsi intensiivsus liiga madal

- |  |  |
|--|--|
| a) Kiti komponentide ebaõige säilitamine | Säilitage <i>ipsogen BCR-ABL1 Mbc</i> r Kitti temperatuuril –15 kuni –30°C ja hoidke praimerite ja proovi segusid (PPC ja PPF) valguse eest kaitstuna. Vt "Reagentide säilitamine ja käsitlemine", lk 13.<br><br>Vältige korduvat külmutamist ja sulatamist.<br>Säilitage reagentid alikvootidena. |
| b) Väga madal algne sihtmärk-RNA hulk    | Suurendage proovi RNA hulka.<br><b>Märkus:</b> Olenevalt valitud RNA puhastamise meetodist võib esineda inhibitoorseid efekte.   |

### LightCycler: Fluorestsentsi intensiivsus varieerub

## Kommentaariid ja soovitusid

---

- a) Pipeteerimisviga Nn "pipeteerimisveast" põhjustatud varieeruvust saab vähendada analüüsid andmeid F1/F2 või 530 nm/640 nm režiimis.
- b) Kapillaaride ebapiisav tsentrifuugimine Ettevalmistatud PCR segu võib olla endiselt kapillaari ülemises kambris või on kapillaari otsas õhumull.  
Tsentrifuugige reaktsiooniseguga laaditud kapillaare alati nii nagu on kirjeldatud spetsiifilise seadme kasutusjuhendis.
- c) Kapillaari otsa välispind on märdunud Kandke kapillaaridega töötamisel alati kindaid.

### LightCycler: Standardkõvera viga

- Pipeteerimisviga Nn "pipeteerimisveast" põhjustatud varieeruvust saab vähendada analüüsid andmeid F1/F2 või 530 nm/640 nm režiimis.

## Kvaliteedikontroll

Kogu kiti kvaliteedikontroll on läbi viidud LightCycler 480 instrumendil. See kitt on toodetud vastavuses ISO 13485:2003 standardile. Analüüsertifikaadid on soovi avaldamise korral kättesaadavad [www.qiagen.com/support/](http://www.qiagen.com/support/).

## Piirangud

Kasutajad peavad olema koolitatud ja tehnoloogiaga tuttavad enne selle seadme kasutamist. Seda kitti tuleb kasutada järgides käesolevas kasutusjuhendis olevaid juhiseid, koos valideeritud instrumendiga, mis on mainitud "Lisaks vajalikud materjalid", lk 11.

Kõiki saadud diagnostilisi tulemusi tuleb tõlgendada koos muude kliiniliste või laboratoorsete leidudega. On kasutaja vastutusel valideerida süsteemi toimimine sellisteks nende laboris läbiviidavateks protseduurideks, mis ei ole kaetud QIAGEN toimimise uuringutega.

Tähelepanu tuleb pöörata karbil ja kõikide komponentide siltidel prinditud aegumiskuupäevadele. Ärge kasutage aegunud komponente.

**Märkus:** See kitt on disainitud kooskõlas "Europe Against Cancer" (EAC) uuringutega (8) ja vastab uuendatud rahvusvahelistele soovitudele (3, 5). Seda tuleb kasutada järgides selles kasutusjuhendis toodud juhiseid, koos valideeritud reagentide ja instrumentidega. Selle toote igasugune mitte-

ettenähtud kasutus ja/või komponentide modifitseerimine tühistab QIAGENi vastutuse.

## Toimimise tunnused

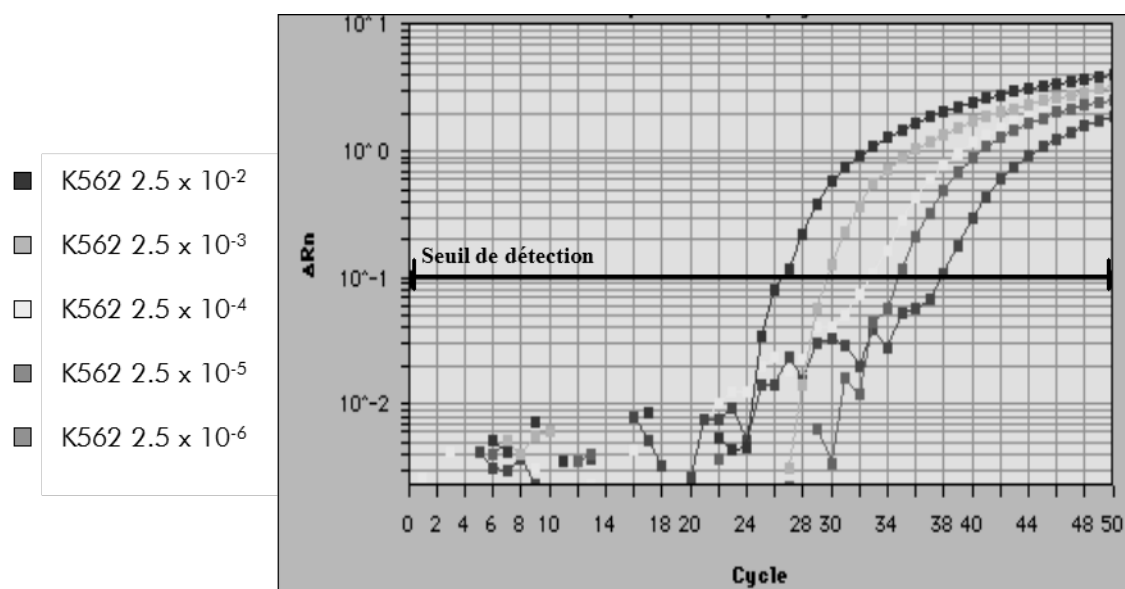
### Mittekliinilised uuringud

#### Materjalid ja meetodid

Toimimise hindamine viidi läbi ABI PRISM 7700 SDS seadmel koos reagentidega, mis on toodud "Lisaks vajalikud materjalid", lk 11. Ekvivalentsuse uuringutes valideeriti selle kasutamine järgmistel instrumentidel: ABI PRISM 7000 ja 7900HT SDS, LightCycler 1.2 ja 480, Rotor-Gene 3000 ja SmartCycler (9).

Viidi läbi mittekliinilised uuringud, et määrata *ipsogen* BCR-ABL1 Mbcr Kiti analüütiline toimimine. Need mittekliinilised laboratoorsed uuringud viidi läbi K562 rakuliini totaalse RNA-ga, mis oli lahjendatud konstantses lõppmahus MV4-11 rakuliini totaalses RNA-s.

Analüüsi korratavuse määramiseks analüüsiti 5 erinevat kontsentratsiooni K562 totaalses RNA-d (5 ng, 500 pg, 50 pg, 5 pg ja 0.5 pg), mis oli lahjendatud MV4-11 totaalses RNA-s, konstantses lõppmahus 200 ng, 5 kordusena ühes töösükli ja 4 erinevas töösükli (Joonis 10).



**Joonis 10. Amplifikatsioonikõverad  $2.5 \times 10^{-2}$  (5 ng),  $2.5 \times 10^{-3}$  (0.5 ng) ja  $2.5 \times 10^{-4}$  (0.05 ng),  $2.5 \times 10^{-5}$  (0.005 ng) ja  $2.5 \times 10^{-6}$  (0.0005 ng) K562 totaalse RNA lahjendustest MV4-11 negatiivses totaalses RNA-s.**



## Analüütilised andmed

Tabelites 17–20 on toodud testidevahelised analüüsid keskmise lävitsükli ( $C_T$ ), standardhälbe (SD), proovide arvu (n), variatsioonikordaja (CV), keskmise koopianumbri (CN) ja keskmise normaliseeritud koopianumbriga (NCN).

**Tabel 17. Testidevaheline analüüs — rakuliinid BCR-ABL Mbcr ja ABL**

Rakuliin	Lahjendus	Keskm. $C_T$	SD	n	CV (%)
BCR-ABL Mbcr	$2.5 \times 10^{-2}$ (5 ng/200 ng)	26.18	0.40	20	1.54
	$2.5 \times 10^{-3}$ (0.5 ng/200 ng)	29.32	0.53	19	1.82
	$2.5 \times 10^{-4}$ (0.05 ng/200 ng)	32.62	0.62	20	1.91
ABL	–	23.59	0.20	95	0.83

**Tabel 18. Testidevaheline analüüs — plasmiidid BCR-ABL Mbcr ja ABL**

Geen	Plasmiid	Keskm. $C_T$	SD	n	CV (%)
BCR-ABL Mbcr	F1 ( $10^1$ koopiat)	34.47	1.25	8	3.64
	F2 ( $10^2$ koopiat)	31.48	0.54	8	1.71
	F3 ( $10^3$ koopiat)	28.17	1.11	7	3.95
	F4 ( $10^5$ koopiat)	21.20	0.65	8	3.06
	F5 ( $10^6$ koopiat)	18.22	0.09	6	0.49
ABL	C1 ( $10^3$ koopiat)	28.47	0.34	8	1.18
	C2 ( $10^4$ koopiat)	25.25	0.31	8	1.22
	C3 ( $10^5$ koopiat)	21.92	0.70	8	3.19

**Tabel 19. Testidevaheline analüüs — rakuliinid BCR-ABL Mbc r ja ABL (keskmine CN)**

Rakuliin	Lahjendus	Keskm. CN	SD	n	CV (%)
BCR-ABL Mbc r	$2.5 \times 10^{-2}$ (5 ng/200 ng)	4134.27	2512.40	20	60.77
	$2.5 \times 10^{-3}$ (0.5 ng/200 ng)	512.80	479.51	19	93.51
	$2.5 \times 10^{-4}$ (0.05 ng/200 ng)	42.94	22.05	20	51.36
ABL	–	33831.51	13637.70	94	40.31

**Tabel 20. Testidevaheline analüüs — rakuliin BCR-ABL Mbc r (keskmine NCN)**

Rakuliin	Lahjendus	Keskm. NCN*	SD	n	CV (%)
BCR-ABL Mbc r	$2.5 \times 10^{-2}$ (5 ng/200 ng)	12.6338	532.79	20	42.17
	$2.5 \times 10^{-3}$ (0.5 ng/200 ng)	1.1605	94.69	19	81.61
	$2.5 \times 10^{-4}$ (0.05 ng/200 ng)	0.1782	10.73	20	60.23

\* Ainult nendes analüüsitulemustes on NCN antud kui  $\frac{Mbc r_{CN}}{ABL_{CN}} \times 100$

## Kliinilised uuringud

Toimimise hindamine viidi läbi ABI PRISM 7700 SDS seadmel koos reagentidega, mis on kirjas "Lisaks vajalikud materjalid", lk 11. Ekvivalentsuse uuringutes valideeriti selle kasutamine järgmistel instrumentidel: ABI PRISM 7000 ja 7900HT SDS, LightCycler 1.2 ja 480, Rotor-Gene 3000 ja SmartCycler (9).

26 laborist koosnev grupp 10 Euroopa riigis, mis olid organiseeritud Europe Against Cancer (EAC) poolt, kasutasid IPSOGENi plasmide, et töötada välja standardiseeritud protokoll peamiste leukeemiaga seostatud fusioongenide (FG) qPCR analüüsiks kliinilises keskkonnas. BCR-ABL p210 transkript oli üks

uuritud fusioongeenidest (FG). Esitame siin selle valideerimisuuringu kokkuvõtte; täielikud tulemused on avaldatud aastal 2003 (8, 10).

### **CG ja FG plasmiidsete standardite laboritevaheline korratavus**

11 laborit osales laboritevahelises korratavuse eksperimendis, et hinnata CG ja FG plasmiidse standardi lahjenduste mõõtmise varieeruvust. Lahjendusi testiti igas laboris duplikaatidena. Tabelis 21 on iga lahjenduse keskmine, standardhälve, ja CV (%).

**Tabel 21. CG ja FG plasmiidsete standardite laboritevaheline korratavus**

<b>Geen</b>	<b>Lahjendus</b>	<b>Keskmine</b>	<b>C<sub>T</sub> SD</b>	<b>CV (%)</b>
ABL kontrollgeen	C1	29.59	1.34	4.54
	C2	26.33	1.02	3.90
	C3	22.75	1.59	6.97
BCR-ABL Mbc r p210 FG	F1	41.11	2.26	5.50
	F2	37.43	1.51	4.04
	F3	33.76	1.28	3.81
	F4	26.50	1.03	3.90
	F5	22.98	0.97	4.21

### **BCR-ABL Mbc r FG transkripti ekspresiooniväärtused**

Tabelites 22 ja 23 on toodud BCR-ABL Mbc r FG transkripti ja ABL CG ekspresiooniväärtused K562 rakuliinis, CML ja ALL patsientidel diagnoosimisel ja võrreldes negatiivset kontrollpatsientide proovidega.

**Tabel 22. BCR-ABL Mbcr FG transkripti ja ABL CG ekspressiooniväärtused — C<sub>T</sub> väärtused**

	C <sub>T</sub> väärtused (95% vahemik)	
	BCR-ABL Mbcr	ABL
<b>K562 rakuliin</b>	20.5	20.7
<b>CML patsientide proovid</b>		
Luuüdi (n = 15)	25.1 (21.5–27.0)	25.2 (20.7–26.8)
Perifeerne veri (n = 14)	23.1 (21.9–25.8)	23.7 (22.6–26.7)
<b>ALL patsientide proovid</b>		
Luuüdi ja perifeerne veri (n = 17)	24.1 (21.5–29.9)	24.0 (21.6–26.4)
<b>Negatiivsete patsientide proovid</b>		
Luuüdi (n = 26)	–	25.35 (24.68–26.02)
Perifeerne veri (n = 74)	–	25.15 (24.83–25.48)

ABL CT väärtused ei erinenud oluliselt normaalsete ja leukeemiaproovide vahel, ega ka proovitüüpide (perifeerne veri või luuüdi) või leukeemia proovide vahel (ALL, AML, CML).

**Tabel 23. BCR-ABL Mbc r FG transkripti ja ABL CG ekspressiooniväärtused — CN ja NCN väärtused**

	CN väärtused (95% vahemik)		NCN väärtused (95% vahemik)
	BCR-ABL Mbc r	ABL	CN BCR-ABL Mbc r/CN ABL
<b>CML patsientide proovid</b>			
Luuüdi (n = 15)	8710 (2089–112,202)	10,115.8 (4786.3–37,153.52)	0.86 (0.44–3.02)
Perifeerne veri (n = 14)	17,783 (2042–112,202)	15,237 (4246.2–25,568.3)	1.17 (0.48–4.41)
<b>Negatiivsed patsientide proovid</b>			
Luuüdi (n = 26)	–	19,201 (12,922–25,480)	–
Perifeerne veri (n = 74)	–	21,136 (17,834–24,437)	–

### Valepositiivsete ja valenegatiivsete esinemine

Valepositiivsete ja valenegatiivsete esinemise sagedus arvutati järgmiste kontrollide abil.

- Positiivsed kontrollid: K562 rakud, rakuliin, mis on tuntud BCR-ABL p210 FG; positiivsuse poolest; patsientide proovid, mis on juba hinnatud p210 positiivseks.
- Negatiivsed kontrollid: Negatiivsed RNA proovid, amplifikatsioonivabad kontrollid (NAC), milles on inim-RNA asemel *E. coli* RNA, et kontrollida PCR kontaminatsiooni, ja ilma sihtmärgita kontrollid (NTC), milles on inim-RNA asemel vesi.

FG RNA proovide amplifitseerimine viidi läbi kolmes korduses ja CG puhul kahes korduses.

Valenegatiivseks loeti positiivne RNA proov, mis andis vähem kui 50% positiivseid tulemusi (0/2, 0/3 või 1/3).

Valepositiivseks loeti negatiivne RNA proov, mis andis vähemalt 50% positiivseid tulemusi (1/2, 2/3, or 3/3).

Tabelis 24 on toodud valenegatiivsete ja valepositiivsete proovide arv ja protsent.

**Tabel 24. Valenegatiivsed ja valepositiivsed proovid**

Valenegatiivsus		Valepositiivsus	
10 <sup>-3</sup>	10 <sup>-4</sup>	FG negatiivne kontroll	NAC/NTC
0% (0/33)	6.1% (2/33)	10.9% (6/55)	4.1% (14/340)

## Viited

QIAGENil on suur ja kaasaegne andmebaas teaduslikest publikatsioonidest, milles kasutatakse QIAGENi tooteid. Põhjalike otsinguvalikute abil võite leida vajalikke artikleid. Otsida saate kas märksõna järgi või valides uurimisvaldkonna, artikli pealkirja jne.

Täieliku viidete nimekirja leiate veebist – QIAGEN Reference Database [www.qiagen.com/RefDB/search.asp](http://www.qiagen.com/RefDB/search.asp) või küsides QIAGEN tehnilisest toest või kohalikult edasimüüjalt.

## Tsiteeritud viited

1. Baccarani M. et al. (2006) Evolving concepts in the management of chronic myeloid leukemia: recommendations from an expert panel on behalf of the European LeukemiaNet. *Blood* **108**, 1809.
2. Baccarani, M. et al. (2009) Chronic myeloid leukemia : an update of concepts and management recommendations of European LeukemiaNet. *J. Clin. Oncol.* **27**, 6041.
3. Branford, S. et al. (2006) Rationale for the recommendations for harmonizing current methodology for detecting BCR-ABL transcripts in patients with chronic myeloid leukaemia. *Leukemia* **20**, 1925
4. Branford, S et al. (2008) Desirable performance characteristics for BCR-ABL measurement on an international reporting scale to allow consistent interpretation of individual patient response and comparison of response rates between clinical trials. *Blood* **112**, 3330.
5. Hughes, T. et al. (2006) Monitoring CML patients responding to treatment with tyrosine kinase inhibitors: review and recommendations for harmonizing current methodology for detecting BCR-ABL transcripts and kinase domain mutations and for expressing results. *Blood* **108**, 28.

6. White, H.E. et al. (2010) Establishment of the first World Health Organization International Genetic Reference Panel for quantitation of BCR-ABL mRNA. *Blood* **116**, e111.
7. van der Velden, V.H. et al. (2003) Detection of minimal residual disease in hematologic malignancies by real-time quantitative PCR: principles, approaches, and laboratory aspects. *Leukemia* **17**, 1013.
8. Gabert, J. et al. (2003) Standardization and quality control studies of 'real-time' quantitative reverse transcriptase polymerase chain reaction of fusion gene transcripts for residual disease detection in leukemia — a Europe Against Cancer program. *Leukemia* **17**, 2318.
9. Silvy, M. et al. (2005) Evaluation of real-time quantitative PCR machines for the monitoring of fusion gene transcripts using the Europe against cancer protocol. *Leukemia* **19**, 305.
10. Beillard, E. et al. (2003) Evaluation of candidate control genes for diagnosis and residual disease detection in leukemic patients using 'real-time' quantitative reverse-transcriptase polymerase chain reaction (RQ-PCR) - a Europe against cancer program. *Leukemia* **17**, 2474.

## Sümbolid

Pakendil ja siltidel võivad olla järgmised sümbolid:



Sisaldab piisavalt reagente <N> reaktsioonile



Kasutada enne



In vitro diagnostiline meditsiiniseade



Katalooginumber



Loti number



Materjali number



Globaalne kaubaartikli number



Temperatuuri piirangud



Tootja



Kasutamiseks tutvuge juhendiga

## **Kontaktinformatsioon**

Tehnilist tuge ja lisainformatsiooni pakub meie Technical Support Center aadressil [www.qiagen.com/Support](http://www.qiagen.com/Support), telefoninumbril 00800-22-44-6000 või kontakteeruge ühega QIAGENi Tehnilise Toe Osakondadest või kohalikest edasimüüjatest (vt tagakaant või külastage [www.qiagen.com](http://www.qiagen.com)).



## Tellimisinfo

Toode	Sisu	Kat. nr.
<i>ipsogen</i> BCR-ABL1 Mbc Kit (52)	52 reaktsiooni jaoks: ABL kontrollgeeni standardid, BCR-ABL Mbc fusioongeeni standardid, Praimerite ja proovi segu ABL, Praimerite ja proovi segu BCR-ABL Mbc Fusioongen	670125
<b>Rotor-Gene Q MDx — IVD-valideeritud reaalaaja PCR analüüsiks kliinilistes rakendustes</b>		
Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM Platform	Reaalaaja PCR tsükler ja High Resolution Melt analüsaator 5 kanaliga (roheline, kollane, oranž, punane, karmiinpunane) pluss HRM kanal, sülearvuti, tarkvara, lisad, 1-aastane garantii, installatsioon ja koolitus ei ole kaasa arvatud	9002032
Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM System	Reaalaaja PCR tsükler ja High Resolution Melt analüsaator 5 kanaliga (roheline, kollane, oranž, punane, karmiinpunane) pluss HRM kanal, sülearvuti, tarkvara, lisad, 1-aastane garantii, installatsioon ja koolitus	9002033
<b><i>ipsogen</i> BCR-ABL1 Mbc Controls Kit — RNA ekstraktsiooni ja BCR-ABL Mbc fusioongeeni kvalitatiivseks valideerimiseks</b>		
<i>ipsogen</i> BCR-ABL1 Mbc Controls Kit	Rakuliinid BCR-ABL Mbc fusioongeeni negatiivse, kõrge ja madala positiivse ekspresiooniga	670191

Kaasaegset infot litsentside ja toodete kohta saate vastava toote QIAGENi kasutusjuhendist. QIAGENi kasutusjuhendid on saadaval veebis [www.qiagen.com](http://www.qiagen.com) või saate neid küsida QIAGENi tehnilisest toest või kohalikult edasimüüjalt.

See lehekülg jäeti tahtlikult tühjaks

See toode on mõeldud kasutamiseks in vitro diagnostikas. *ipsogen* tooteid ei tohi edasi müüa, edasimüümiseks modifitseerida ega kasutada kommertsiaalsete toodete tootmiseks ilma QIAGENi kirjaliku loata.

Selles dokumendis toodud infot võib ilma etteatamata muuta. QIAGEN ei võta vastutust selles dokumendis esineda võivate vigade eest. See dokument usutakse publitseerimise hetkel olevat täielik ja täpne. Mingil juhul ei ole QIAGEN vastutav juhuslike, eriliste, mitmekordsete või tegevusest tulenevate kahjustuste eest, mis on seotud või tulenevad selle dokumendi kasutamisest.

*ipsogen* tooted on garanteeritud vastama kirjasolevale spetsifikatsioonile. QIAGENi ainus kohustus ja kasutaja ainus abinõu piirneb toodete tasuta asendamises juhul kui tooted ei toimi nii nagu garanteeritud.

Kaubamärgid: QIAGEN<sup>®</sup>, *ipsogen*<sup>®</sup>, Rotor-Gene<sup>®</sup> (QIAGEN Group); ABI PRISM<sup>®</sup>, Applied Biosystems<sup>®</sup>, FAM<sup>™</sup>, RNaseOUT<sup>™</sup>, SuperScript<sup>®</sup>, SYBR<sup>®</sup>, TAMRA<sup>™</sup> (Life Technologies Corporation); Agilent<sup>®</sup>, Bioanalyzer<sup>®</sup> (Agilent Technologies, Inc); Excel<sup>®</sup> (Microsoft Corporation); LightCycler<sup>®</sup>, TaqMan<sup>®</sup> (Roche Group); SmariCycler<sup>®</sup> (Cepheid).

### Limiteeritud litsentsi kokkulepe

Selle toote kasutamine tähendab *ipsogen* BCR-ABL1 Mbcr Kiti ostja või kasutaja nõustumist järgmiste tingimustega:

1. *ipsogen* BCR-ABL1 Mbcr Kiti võib kasutada ainult kooskõlas *ipsogen* BCR-ABL1 Mbcr Kiti Kasutusjuhendiga ja ainult koos kitis olevate komponentidega. QIAGEN ei anna litsentsi kasutada selle kiti komponente koos sellesse kiti mittekuuluvate komponentidega ja *ipsogen* BCR-ABL1 Mbcr Kiti Kasutusjuhendis ja veebilehel [www.qiagen.com](http://www.qiagen.com) toodud lisaprotokollides kirjeldatud juhtudel.
2. Peale sõnaselgelt avaldatud litsentside, ei anna QIAGEN garantiid, et see kitt ja/või selle kasutusala(d) ei riku kolmandate osapoolte õigusi.
3. See kitt ja selle komponendid on litsentseeritud ühekordseks kasutamiseks ja neid ei või korduvalt kasutada, värskendada ega uuesti müüa.
4. QIAGEN ütleb lahti kõikidest muudest litsentsidest, väljendatud või vihjatud, ja need mis on sõnaselgelt avaldatud.
5. Kiti ostja ja kasutaja ei tohi teha midagi, mis võiks ülaltoodud keeldude rikkumiseni viia või seda kergendada, samuti ei tohi nad lubada kellelgi teisel selliseid samme ette võtta. QIAGEN võib selles limiteeritud litsentsi kokkuleppes olevad keelud jõustada igas kohtus ja saada tagasi kõik uurimis- ja kohtukulud, sh kulud advokaadile, tegevuses selle limiteeritud litsentsi kokkuleppe või kiti ja/või selle komponente puudutava intellektuaalse omandi õiguste jõustamiseks.

Uuendatud litsentsitingimused leiate [www.qiagen.com](http://www.qiagen.com).

HB-1361-002 © 2013-2015 QIAGEN, kõik õigused reserveeritud.

---

**www.qiagen.com**

**Australia** ■ techservice-au@qiagen.com

**Austria** ■ techservice-at@qiagen.com

**Belgium** ■ techservice-bnl@qiagen.com

**Brazil** ■ suportetecnico.brasil@qiagen.com

**Canada** ■ techservice-ca@qiagen.com

**China** ■ techservice-cn@qiagen.com

**Denmark** ■ techservice-nordic@qiagen.com

**Finland** ■ techservice-nordic@qiagen.com

**France** ■ techservice-fr@qiagen.com

**Germany** ■ techservice-de@qiagen.com

**Hong Kong** ■ techservice-hk@qiagen.com

**India** ■ techservice-india@qiagen.com

**Ireland** ■ techservice-uk@qiagen.com

**Italy** ■ techservice-it@qiagen.com

**Japan** ■ techservice-jp@qiagen.com

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

**Luxembourg** ■ techservice-bnl@qiagen.com

**Mexico** ■ techservice-mx@qiagen.com

**The Netherlands** ■ techservice-bnl@qiagen.com

**Norway** ■ techservice-nordic@qiagen.com

**Singapore** ■ techservice-sg@qiagen.com

**Sweden** ■ techservice-nordic@qiagen.com

**Switzerland** ■ techservice-ch@qiagen.com

**UK** ■ techservice-uk@qiagen.com

**USA** ■ techservice-us@qiagen.com

