

Priručnik za komplet *ipsogen*[®] BCR-ABL1 mbc



Verzija 1

IVD

Kvantitativna in vitro dijagnostika

Za uporabu s instrumentima Rotor-Gene[®] Q, ABI PRISM[®],
LightCycler[®] i SmartCycler[®]



REF

670023



QIAGEN GmbH, QIAGEN Strasse 1, 40724 Hilden,
NJEMAČKA

R2

MAT

1072506HR



QIAGEN Sample and Assay Technologies

QIAGEN je vodeći dobavljač inovativnih tehnologija za uzimanje uzoraka i testiranje koje omogućuju izolaciju i otkrivanje sadržaja bilo kojeg biološkog uzorka. Naši napredni, visoko kvalitetni proizvodi i usluge osiguravaju uspjeh u procesu od uzimanja uzorka do dobivanja rezultata.

QIAGEN postavlja standarde za:

- pročišćavanje DNA, RNA i proteina
- analiziranje nukleinske kiseline i proteina
- istraživanje microRNA i RNAi
- automatiziranje tehnologija za uzimanja uzoraka i testiranje

Naš zadatak je omogućiti vam postizanje izvanrednog uspjeha i novih otkrića. Za više informacija posjetite www.qiagen.com.

Sadržaj

Namjenska uporaba	5
Pregled i objašnjenje	5
Načelo postupka	6
Priloženi materijali	8
Sadržaj kompleta	8
Materijali koji su potrebni, ali nisu priloženi	9
Upozorenja i mjere opreza	10
Opće mjere opreza	11
Pohranjivanje i rukovanje reagensima	12
Postupak	13
Priprema RNA iz uzorka	13
Protokoli	
■ Preporučena standardizirana EAC reverzna transkripcija	13
■ qPCR na instrumentima Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM ili RotorGene Q 5plex HRM s rotorom sa 72 epruvete	16
■ qPCR na instrumentima ABI PRISM 7000, 7700 i 7900HT SDS i LightCycler 480	20
■ qPCR na instrumentima LightCycler 1.2 i 2.0	25
■ qPCR na instrumentu SmartCycler	29
Tumačenje rezultata	32
Načelo analize podataka	32
Rezultati	33
Vodič za uklanjanje smetnji	35
Kontrola kvalitete	39
Ograničenja	39
Karakteristike izvedbe	40
Nekliničke studije	40
Klinička ispitivanja	42
Reference	45
Simboli	46
Kontakt informacije	47

Namjenska uporaba

Komplet *ipsogen* BCR-ABL1 mbcr je namijenjen za kvantificiranje BCR-ABL p190 prijepisa u koštanoj srži ili perifernim uzorcima krvi bolesnika s Ph-pozitivnom akutnom limfoblastičnom leukemijom (ALL) kojima je prethodno dijagnosticirana prisutnost fuzijskog gena BCR-ABL mbcr. Dobiveni rezultati namijenjeni su za praćenje efikasnosti liječenja u bolesnika koji se podvrgavaju terapiji i praćenje minimalne rezidualne bolesti (MRD) kako bi se pratio relaps bolesti.

Pregled i objašnjenje

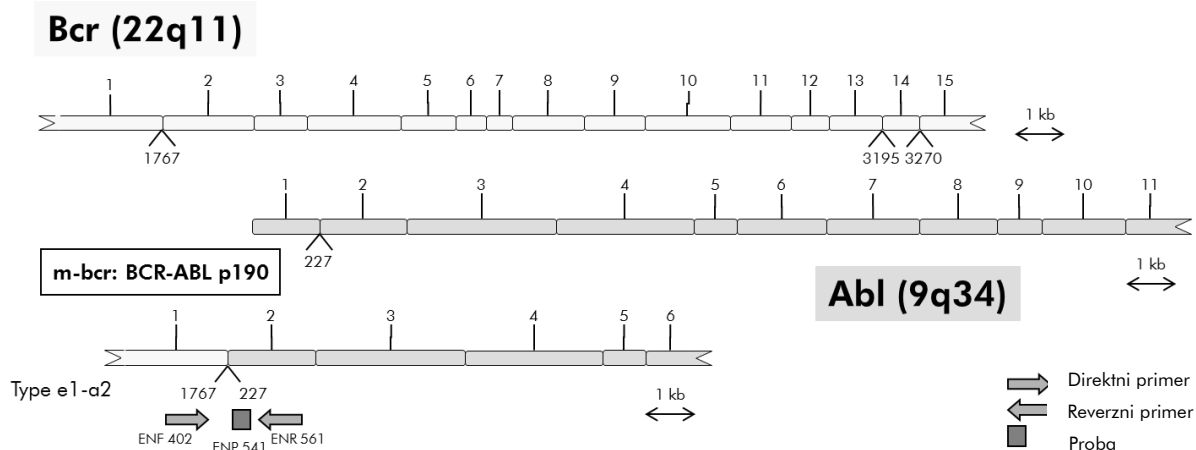
Filadelfijski (Ph) kromosom je najčešća kariotipna aberacija u odraslih s ALL. Pojavljuje se u 20–30% svih odraslih bolesnika s ALL, s postotkom učestalosti koji se povećava do više od 50% u bolesnika starosti 50 godina ili više.

U ovoj translokaciji, 3' segment ABL proto-onkogen na kromosomu 9 je podređen 5' segmentu BCR gena na kromosomu 22. BCR-ABL FG je proizvod Ph kromosoma i konstitutivno aktivnog proteina tirozin-kinaze.

Prekidi u ABL genu obično se pojavljuju u prvom intronu. Prekidi u BCR genu općenito se pojavljuju u jednoj od sljedeće 3 regije: regiji s 5,8 kb koja obuhvaća eksone 12–16, koja se naziva glavna regija uskog dijela kromosoma (Mbcr), sekvenci s 55 kb prvog introna, koja se naziva manja regija uskog dijela kromosoma (mbcr) i mikro regiji uskog dijela kromosoma (μ -bcr).

Uski dijelovi koji se pojavljuju u mbcr priključuju se eksonu 1 (e1) s drugim eksonom ABL gena (a2) što za rezultat ima manji prijepis fuzije, e1a2, koji kodira 190 kDa (p190) kimerični protein (slika 1). p190 BCR-ABL protein primijećen je samo u Ph+ ALL dok je p210 BCR-ABL protein uobičajen u 20–40% bolesnika s Ph+ ALL i gotovo svih bolesnika s Ph+ kroničnom mijeloblastičnom leukemijom (CML).

Svi oblici BCR-ABL fuzijskog proteina prikazuju povećanu i nereguliranu aktivnost tirozin-kinaze i pokazalo se da p190 oblik ima više pretvorbenog potencijala od p210. Osim toga, izgleda da ovaj kimerični protein deregulira normalne načine pretvaranja signala ovisnog o citokinu, što dovodi do sprječavanja apoptoze ili porasta ovisnog o faktoru rasta.



Slika 1. Shematski prikaz BCR-ABL mbc r prijevsa pokriven primerima i setom proba za qPCR: ENF402-ENP541-ENR561. Broj ispod primera i probe odnosi se na njihovu nukleotidnu poziciju u normalnom prijepisu gena.

Terapija za PH + ALL bolesnike optimirana je uvođenjem inhibitora tirozin-kinaze što značajno poboljšava postotak preživljavanja tih bolesnika (za pregled pogledajte referencu 1). Za ove bolesnike potrebno je praćenje minimalne rezidualne bolesti. Trenutačna metodologija za mjerenje ozbiljnosti minimalne rezidualne bolesti uključuje korištenje kvantitativne lančane reakcije polimerazom (qPCR) u realnom vremenu gdje su BCR-ABL brojevi prijepisa povezani s brojevima prijepisa kontrolnog gena. Komplet *ipsogen* BCR-ABL1 mbc r temelji se na ovoj tehnici.

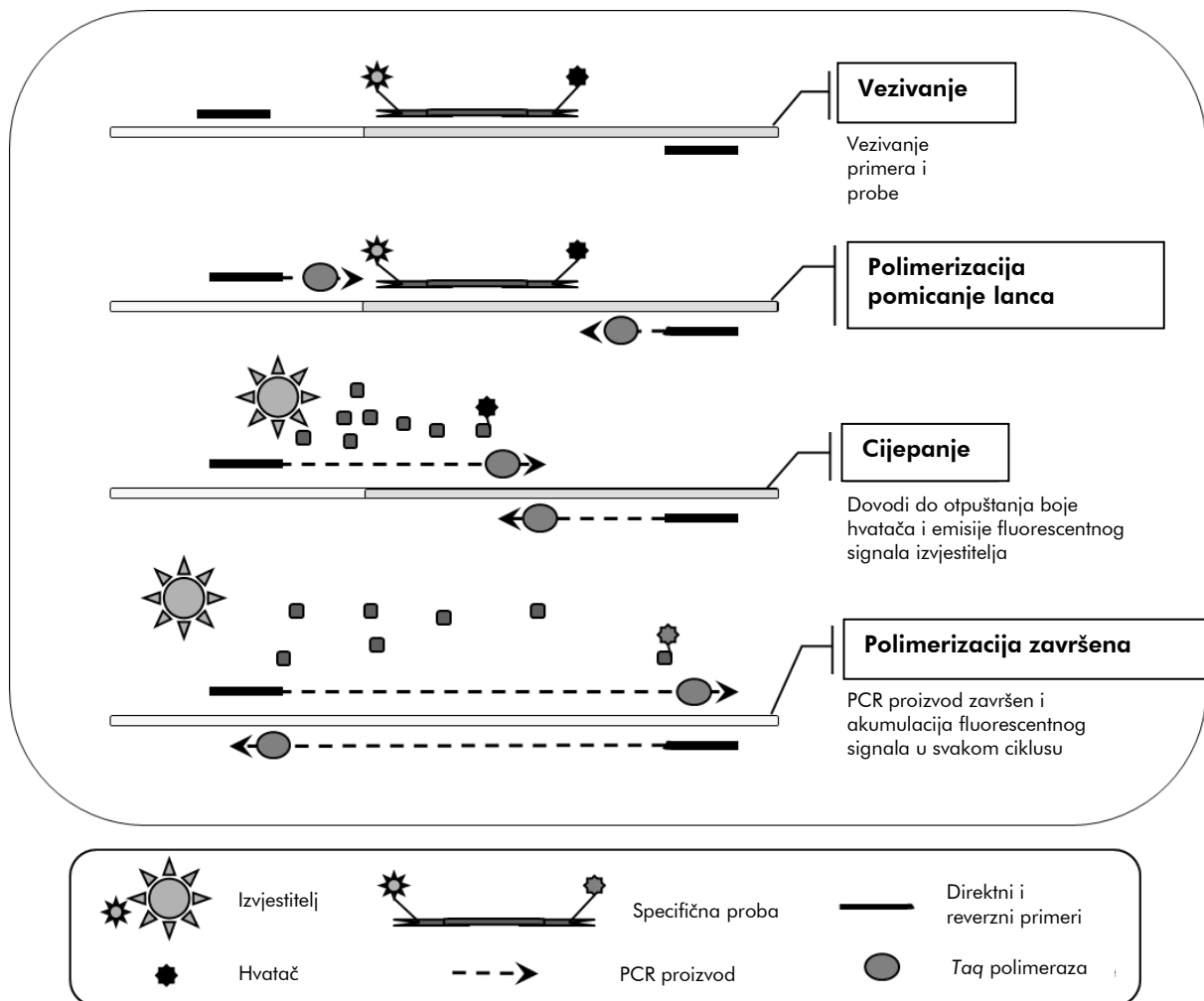
Načelo postupka

qPCR omogućuje točnu kvantifikaciju PCR proizvoda tijekom eksponencijalne faze procesa amplifikacije PCR. Podaci za kvantitativni PCR mogu se brzo dobiti, bez obrade nakon PCR, detekcijom fluorescentnih signala u realnom vremenu tijekom i/ili odmah nakon PCR ciklusa i time smanjiti rizik od kontaminacije PCR proizvoda. Trenutačno su na raspolaganju 3 osnovne vrste qPCR tehnika: qPCR analiza uz uporabu SYBR® zelene I boje, qPCR analiza uz uporabu probi hidrolize i qPCR analiza uz uporabu hibridizacijskih proba.

Za ovo testiranje koristi se načelo qPCR s hidrolizom dvostruko obojanog oligonukleotida. Tijekom PCR, direktni i reverzni primeri hibridiziraju se u specifičnu sekvencu. Dvostruko obojani oligonukleotid je sadržan u istoj mješavini. Ova proba, koja se sastoji od oligonukleotida označenog na 5' kraju bojom izvjestitelja i na 3' kraju bojom hvatača, hibridizira se do ciljne sekvence unutar PCR proizvoda. qPCR analiza s probama hidrolize koristi egzonukleaznu aktivnost 5'→3' *Thermus aquaticus* (*Taq*) DNA polimeraze. Kad je proba intaktna, blizina boje izvjestitelja boji hvatača za rezultat ima supresiju izvjestiteljske fluorescencije primarno zbog prijenosa energije fluorescentnom rezonancom.

Tijekom PCR, ako je cilj od interesa prisutan, proba se posebice vezuje zagrijavanjem između lokacija direktnog i reverznog primera. Egzonukleazna aktivnost 5'→3' DNA polimeraze razbija probu između izvjestitelja i hvatača samo ako se proba hibridizira do cilja. Fragmenti probe se potom udaljavaju od cilja i polimerizacija lanca se nastavlja. 3' kraj probe je blokiran kako bi se spriječilo širenje probe tijekom PCR (slika 2). Ovaj proces se obavlja u svakom ciklusu i ne utječe na eksponencijalnu akumulaciju proizvoda.

Povećanje fluorescentnog signala detektira se samo ako je ciljna sekvenca komplementarna s probom i prema tome se pojačava tijekom PCR. Zbog ovih zahtjeva nespecifična amplifikacija se ne detektira. Prema tome, povećavanje fluorescencije je izravno proporcionalno ciljnoj amplifikaciji tijekom PCR.



Slika 2. Načelo reakcije. Ukupna RNA se reverzno transkribira, a generirana cDNA se amplificira tijekom PCR pomoću nekoliko specifičnih primera i specifične interne probe s dvostrukim bojanjem (FAM™–TAMRA™). Proba se povezuje s amplikomom tijekom svakog koraka vezivanja PCR. Kad se Taq DNA polimeraza proširuje od spoja primera do amplikona, on pomiče 5' kraj probe koji se potom razgrađuje egzonukleaznom aktivnošću 5'→3' Taq DNA polimeraze. Razbijanje se nastavlja dok preostala proba ne istopi amplikon. Ovaj proces oslobađa fluorofor i hvatač u otopinu, prostorno ih odvajajući i dovodeći do povećavanja fluorescencije od FAM i smanjivanja fluorescencije od TAMRA.

Priloženi materijali

Sadržaj kompleta

ipsogen BCR-ABL1 mbc Kit		(24)
Kataloški br.		670023
Broj reakcija		24
ABL Control Gene Standard Dilution (ABL standardna otopina kontrolnog gena) (10^3 kopija/5 μ l)	C1-ABL	50 μ l
ABL Control Gene Standard Dilution (ABL standardna otopina kontrolnog gena) (10^4 kopija/5 μ l)	C2-ABL	50 μ l
ABL Control Gene Standard Dilution (ABL standardna otopina kontrolnog gena) (10^5 kopija/5 μ l)	C3-ABL	50 μ l
BCR-ABL mbc Fusion Gene Standard Dilution (BCR-ABL mbc standardna otopina fuzijskog gena) (10^1 kopija/5 μ l)	F1-BCR-ABL e1 α 2 mbc	50 μ l
BCR-ABL mbc Fusion Gene Standard Dilution (BCR-ABL mbc standardna otopina fuzijskog gena) (10^2 kopija/5 μ l)	F2-BCR-ABL e1 α 2 mbc	50 μ l
BCR-ABL mbc Fusion Gene Standard Dilution (BCR-ABL mbc standardna otopina fuzijskog gena) (10^3 kopija/5 μ l)	F3-BCR-ABL e1 α 2 mbc	50 μ l
BCR-ABL mbc Fusion Gene Standard Dilution (BCR-ABL mbc standardna otopina fuzijskog gena) (10^5 kopija/5 μ l)	F4-BCR-ABL e1 α 2 mbc	50 μ l
BCR-ABL mbc Fusion Gene Standard Dilution (BCR-ABL mbc standardna otopina fuzijskog gena) (10^6 kopija/5 μ l)	F5-BCR-ABL e1 α 2 mbc	50 μ l
Primers and Probe Mix ABL* (mješavina primera i probe za ABL)	PPC-ABL 25x	90 μ l
Primers and Probe Mix BCR-ABL mbc Fusion Gene† (Mješavina primera i probe za fuzijski gen Mix BCR-ABL mbc)	PPF-mbc 25x	110 μ l

* Mješavina specifičnih reverznih i direktnih primera za ABL kontrolni gen plus specifična FAM-TAMRA proba.

† Mješavina specifičnih reverznih i direktnih primera za BCR-ABL mbc fuzijski gen plus specifična FAM-TAMRA proba.

ipsogen BCR-ABL1 mbcr Kit	(24)
Kataloški br.	670023
Broj reakcija	24
ipsogen BCR-ABL1 mbcr Kit Handbook (engleski)	1

Napomena: Kratko centrifugirajte standardne otopine i mješavine primera i proba prije uporabe.

Materijali koji su potrebni, ali nisu priloženi

Kad radite s kemikalijama, uvijek nosite odgovarajuću laboratorijsku kutu, rukavice za jednokratnu uporabu i zaštitne naočale. Za više informacija pogledajte odgovarajuće listove sa sigurnosnim podacima (SDSs) koji su dostupni kod dobavljača proizvoda.

Reagensi

- sterilna voda bez nukleaze za PCR
- Reagensi za reverznu transkripciju: Odobreni reagens je Superscript® II (ili Superscript) reverzna transkriptaza, uključuje 5x pufer za prvi lanac, 100 mM DTT (Life Technologies, kat. br. 18064-022)
- Ribonukleazni inhibitor: Validirani reagens je RNaseOUT™ (Life Technologies, kat. br. 10777-019)
- Komplet dNTPs, PCR stupnja
- Proizvoljni heksamer
- MgCl₂
- Pufer i Taq DNA polimeraza: Validirani reagensi su TaqMan® Universal PCR Master Mix (glavna mješavina PCR 2x) (Life Technologies, kat. br. 4304437) i LightCycler TaqMan Master (glavna mješavina PCR 5x) (Roche, kat. br. 04535286001)

Potrošni materijal

- Sterilni vrhovi pipeta s hidrofobnim filtrima otporni na aerosole za PCR bez nukleaze
- Epruvete za PCR od 0,5 ml ili 0,2 ml bez ribonukleaze i dezoksiribonukleaze
- Led

Oprema

- Mikrolitarska pipeta* za PCR (1–10 μ l; 10–100 μ l; 100–1000 μ l)
- Stacionarni uređaj za centrifugu* s rotorom za reakcijske epruvete od 0,2 ml/0,5 ml (sposobne za postizanje 10.000 rpm)
- Instrument za PCR u realnom vremenu:* Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM ili drugi Rotor-Gene instrument; LightCycler 1.2, 2.0 ili 480; ABI PRISM 7000, 7700 ili 7900HT SDS; ili SmartCycler instrument; i povezani specifični materijal
- Amplifikator* ili vodena kupelj* (korak reverzne transkripcije)

Komplementarni reagensi

- *ipsogen* BCR-ABL1 mbcr kontrolni komplet (kat. br. 670091), koji se sastoji od staničnih linija s negativnom, visokom i niskom pozitivnom ekspresijom BCR-ABL mbc fuzijskog gena za kvalitativnu validaciju RNA ekstrakcije i reverzne transkripcije

Upozorenja i mjere opreza

Za in vitro dijagnostičku uporabu

Kad radite s kemikalijama, uvijek nosite odgovarajuću laboratorijsku kutu, rukavice za jednokratnu uporabu i zaštitne naočale. Za više informacija molimo pogledajte odgovarajuće listove s podacima o sigurnosti (SDSs). Dostupni su online u standardnom i kompaktnom PDF formatu na www.qiagen.com/safety gdje možete pronaći, pregledati i ispisivati SDS za svaki QIAGEN komplet i komponente kompleta.

Zbrinite uzorke i otpad od testiranja u skladu s vašim lokalnim sigurnosnim odredbama.

* Uvjerite se da su instrumenti provjereni i kalibrirani u skladu s preporukama proizvođača.

Opće mjere opreza

Za qPCR testiranja potrebne su dobre laboratorijske prakse, uključujući održavanje opreme, koje su vezane uz molekularnu biologiju i koje su u skladu s primjenjivim odredbama i relevantnim standardima.

Ovaj komplet je namijenjen za in vitro dijagnostičku uporabu. Reagensi i upute koji su priloženi uz ovaj komplet predviđeni su za optimalnu izvedbu. Daljnje razrjeđivanje reagenasa ili izmjena vremena i temperatura inkubacije za rezultat može imati krive ili odstupajuće podatke. Do promjene PPC i PPF reagenasa može doći ukoliko se izlože svjetlosti. Svi reagensi su formulirani specifično za uporabu s ovim testom. Da bi se postigla optimalna izvedba testa, ne smiju se vršiti nikakve preinake.

Za određivanje razine prijepisa pomoću qPCR potrebna je reverzna transkripcija mRNA i amplifikacija generirane cDNA iz PCR. Prema tomu, cjelokupni postupak testiranja mora se obaviti u uvjetima bez prisutnosti ribonukleaze/dezoksiribonukleaze.

Budite iznimno oprezni kako biste spriječili:

- kontaminaciju ribonukleazom/dezoksiribonukleazom koja može prouzročiti degradaciju matične mRNA i generirane cDNA
- kontaminaciju mRNA ili kontaminaciju zbog prijenosa u PCR koja za rezultat ima lažno pozitivan signal

Zbog toga mi preporučamo sljedeće.

- Koristite laboratorijsku opremu bez prisutnosti nukleaze (npr. pipete, vrhove pipeta, reakcijske bočice) i nosite rukavice kad provodite testiranje.
- Koristite svježih vrhove pipeta otporne na aerosole za sve korake pipetiranja kako biste spriječili križnu kontaminaciju uzoraka i reagenasa.
- Pripremite glavnu mješavinu prije PCR s priloženim materijalom (pipete, vrhovi, itd.) na predviđenom mjestu gdje nisu uvedene DNA matrice (cDNA, DNA, plazmid). Dodajte matricu na odvojenom mjestu (po mogućnosti u odvojenoj prostoriji) s predviđenim materijalom (pipete, vrhovi, itd.).
- Obradite standardne otopine (C1–3 i F1–5) u odvojenoj prostoriji.

Pohranjivanje i rukovanje reagensima

Kompleti se isporučuju na suhom ledu i po prijemu se moraju pohraniti na temperaturi od -30°C do -15°C .

- Pobrinite se da se mješavine primera i proba što manje izlažu svjetlosti (PPC i PPF epruvete).
- Lagano promiješajte i centrifugirajte epruvete prije otvaranja.
- Čuvajte sve komponente kompleta u originalnim spremnicima.

Ovi uvjeti pohrane odnose se i na otvorene i na neotvorene komponente. Komponente koje se pohranjuju pod nekim drugim uvjetima a ne onim koji su navedeni na naljepnicama možda neće pravilno funkcionirati i mogu negativno utjecati na rezultate testiranja.

Rokovi valjanosti za svaki reagens su navedeni na naljepnicama pojedinačnih komponenti. Pod pravilnim uvjetima pohrane proizvod će nastaviti funkcionirati do isteka roka valjanosti koji je otisnut na naljepnici.

Nema očiglednih znakova koji ukazuju na nestabilnost ovog proizvoda. Međutim, pozitivne i negativne kontrole moraju se provoditi istodobno s nepoznatim uzorcima.

Postupak

Priprema RNA iz uzorka

Priprema RNA iz uzoraka bolesnika (iz krvi ili koštane srži) mora se provesti s odobrenim postupkom. Kvaliteta testiranja u velikoj je mjeri ovisna o kvaliteti korištene RNA. Mi zbog toga prije analize preporučamo kvalificiranje pročišćene RNA elektroforezom s agaroznim* gelom pomoću uređaja Agilent® Bioanalyzer®.

Protokol: Preporučena standardizirana EAC reverzna transkripcija

Stvari koje treba obaviti prije početka postupka

- Pripremite dNTPs, svaki s 10 mM. Čuvajte pri -20°C u alikvotima.

Postupak

1. Odmrznite sve potrebne komponente i stavite ih na led.
2. Inkubirajte $1\ \mu\text{g}$ RNA ($1\text{--}4\ \mu\text{l}$) tijekom 10 minuta pri 70°C i odmah rashladite na ledu u trajanju od 5 minuta.
3. Kratko centrifugirajte (približno 10 sekundi, 10.000 rpm, kako bi se tekućina skupila na dno epruvete). Potom držite na ledu.
4. Pripremite sljedeću mješavinu za RT u skladu s brojem uzoraka koji se obrađuju (tablica 1).

* Kad radite s kemikalijama, uvijek nosite odgovarajuću laboratorijsku kutu, rukavice za jednokratnu uporabu i zaštitne naočale.

Tablica 1. Priprema RT mješavine

Komponenta	Volumen po uzorku (μl)	Konačna koncentracija
Pufer za prvi lanac (priložen uz Superscript III reverznu transkriptazu), 5x	4,0	1x
MgCl ₂ (50 mM)	2,0	5 mM
dNTPs (svaki od 10 mM, potrebno ih je prethodno pripremiti i pohraniti pri – 20°C u alikvotima)	2,0	1 mM
DTT (100 mM, priloženo uz Superscript III reverznu transkriptazu)	2,0	10 mM
RNase inhibitor (40 U/ μl)	0,5	1 U/ μl
Proizvoljni heksamer (100 μM)	5,0	25 μM
Superscript II ili Superscript reverzna transkriptaza (200 U/ μl)	0,5	5 U/ μl
Zagrijan RNA uzorak (treba ga dodati u koraku 5)	1,0–4,0	50 ng/ μl
Sterilna voda bez nukleaze za PCR (treba ju dodati u koraku 5)	0,0–3,0	–
Konačan volumen	20,0	–

- 5. Pipetirajte 16 μl RT mješavine u svaku epruvetu za PCR. Potom dodajte 1–4 μl (1 μg) RNA (iz koraka 3) i podesite količinu na 20 μl sa sterilnom vodom bez nukleaze za PCR (vidjeti tablicu 2).**

Tablica 2. Priprema reakcije za reverznu transkriptazu

Komponenta	Količina (μl)
RT mješavina	16
Zagrijan uzorak RNA (1 μg)	1–4
Sterilna voda bez nukleaze za PCR	0–3
Konačan volumen	20

6. Dobro promiješajte i kratko centrifugirajte (približno 10 sekundi, 10.000 rpm, kako bi se tekućina skupila na dno epruvete).
7. Inkubirajte pri 20°C u trajanju od 10 minuta.
8. Inkubirajte pri 42°C u amplifikatoru u trajanju od 45 minuta, potom odmah pri 99°C u trajanju od 3 minute.
9. Hladite na ledu (kako biste zaustavili reakciju) u trajanju od 5 minuta.
10. Kratko centrifugirajte (približno 10 sekundi, 10.000 rpm, kako bi se tekućina skupila na dno epruvete). Potom držite na ledu.
11. Razrijedite konačnu cDNA s 30 μ l sterilne vode bez nukleaze za PCR tako da konačni volumen bude 50 μ l.
12. Provedite PCR u skladu sa sljedećim protokolima, u skladu s vašim instrumentom za qPCR.

Protokol: qPCR na instrumentima Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM ili RotorGene Q 5plex HRM s rotorom sa 72 epruvete

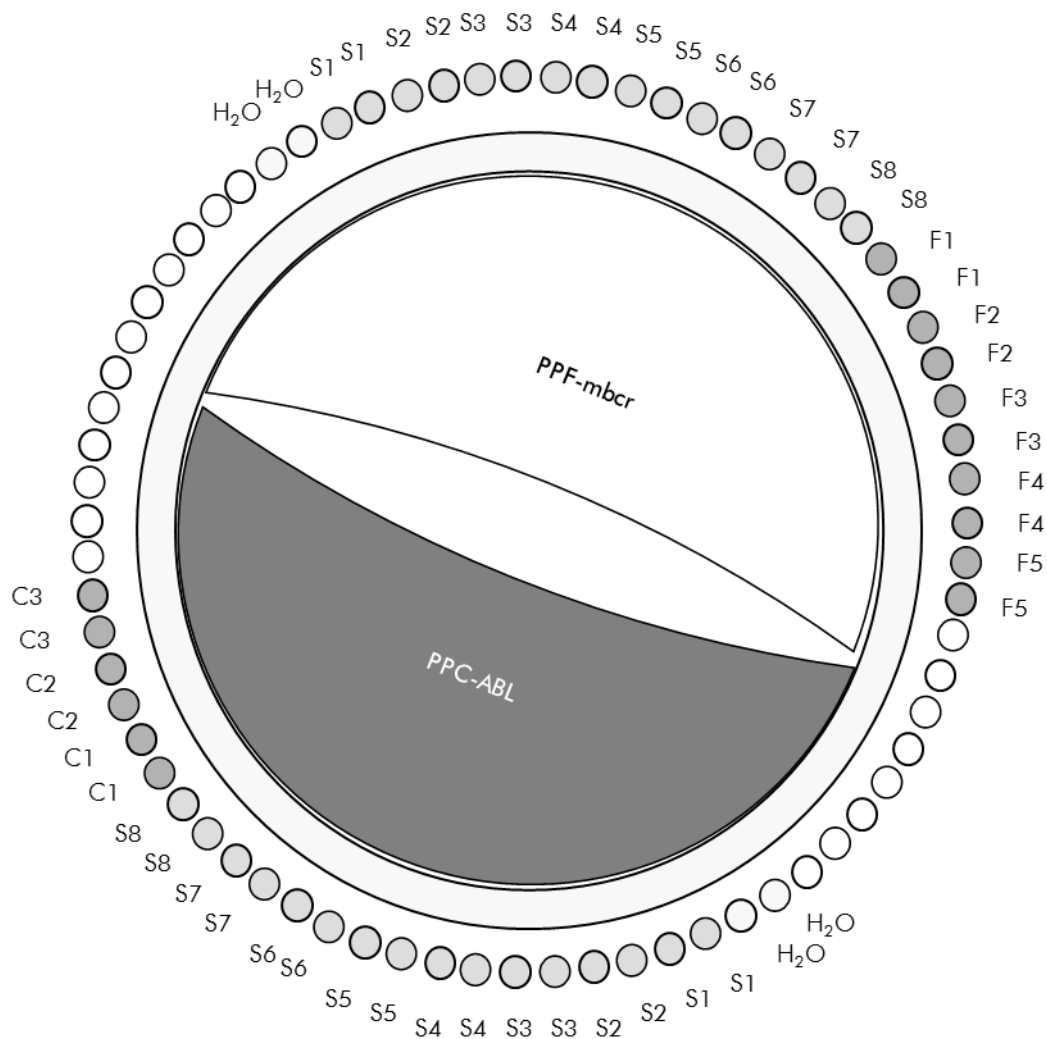
Koristite li ovaj instrument, preporučamo provođenje svih mjerenja dvaput, kao što je navedeno u tablici 3.

Tablica 3. Broj reakcija za instrumente Rotor-Gene Q s rotorom sa 72 epruvete

Uzorci	Reakcije
S mješavinom primera i proba za ABL (PPC-ABL)	
n cDNA uzorci	n x 2 reakcije
ABL standard	2 x 3 reakcije (3 otopine, svaka od njih testirana dvaput)
Kontrola vode	2 reakcije
S mješavinom primera i proba za BCR-ABL mbcr (PPF-mbcr)	
n cDNA uzorci	n x 2 reakcije
mbcr standard	2 x 5 reakcija (5 otopina, svaka od njih testirana dvaput)
Kontrola vode	2 reakcije

Obrada uzoraka na instrumentima Rotor-Gene Q s rotorom sa 72 epruvete

Mi preporučamo testiranje najmanje 8 uzoraka cDNA u istom eksperimentu kako bi se optimizirala uporaba standarda i mješavina primera i proba.



Slika 3. Preporučena postavka rotora za svaki eksperiment s kompletom ipsogen BCR-ABL1 mbcr. F1–5: BCR-ABL mbcr standardi; **C1–3:** ABL standardi; **S:** cDNA uzorak; **H₂O:** kontrola vode.

Napomena: Pobrinite se da uzorak koji treba testirati uvijek stavite u poziciju 1 na rotoru. U suprotnom, tijekom koraka kalibracije, instrument neće provesti kalibraciju i prikupit će se netočni podaci o fluorescenciji.

Popunite sve ostale pozicije praznim epruvetama.

qPCR na instrumentima Rotor-Gene Q s rotorom sa 72 epruvete

Napomena: Provedite sve korake na ledu.

Postupak

1. Odmrznite sve potrebne komponente i stavite ih na led.
2. Pripremite sljedeću mješavinu za qPCR u skladu s brojem uzoraka koji se obrađuju.

Sve koncentracije su predviđene za konačni volumen reakcije.

U tablici 4 opisana je shema pipetiranja za pripremu jedne mješavine reagensa koja je predviđena za dobivanje konačnog volumena reakcije od 25 μ l. Predmješavina se može pripremiti, u skladu s brojem reakcija, uz uporabu iste mješavine primera i proba (ili PPC-ABL ili PPF-mbcr). Dodatni volumeni su uključeni radi kompenziranja grešaka pri pipetiranju.

Tablica 4. Priprema mješavine za qPCR

Komponenta	1 reakcija (μl)	ABL: 24+1 reakcija (μl)	BCR-ABL mbcr: 28+1 reakcija (μl)	Konačna koncentracija
TaqMan univerzalna glavna mješavina za PCR, 2x	12,5	312,5	362,5	1x
mješavina primera i proba, 25x	1	25	29	1x
sterilna voda bez nukleaze za PCR	6,5	162,5	188,5	–
uzorak (treba ga dodati u koraku 4)	5	svaki po 5	svaki po 5	–
ukupni volumen	25	svaki po 25	svaki po 25	–

- 3. Uzmite 20 μ l predmješavine za qPCR po epruveti.**
- 4. Dodajte 5 μ l RT proizvoda (cDNA, odgovara 100 ng RNA) koji je dobiven reverznom transkripcijom (vidjeti "Protokol: Preporučena standardizirana EAC reverzna transkripcija", stranica 13) u odgovarajuću epruvetu (ukupni volumen 25 μ l).**
- 5. Lagano promiješajte okretanjem pipete prema gore i prema dolje.**
- 6. Stavite epruvete u amplifikator u skladu s preporukama proizvođača.**
- 7. Programirajte instrument Rotor-Gene Q s programom za toplinsko cikliranje kao što je navedeno u tablici 5.**

Tablica 5. Temperaturni profil

Način analiziranja	Kvantifikacija
Hold	temperatura: 50 stup. vrijeme: 2 min
Hold 2	temperatura: 95 stup. vrijeme: 10 min
Cikliranje	50 puta 95 stup. tijekom 15 sek. 60 stup. tijekom 1 min uz prikupljanje FAM fluorescencije u kanalu Green (Zeleno): pojedinačno

- 8. Za instrumente Rotor-Gene Q odaberite "Slope Correct" ("Ispravka pada krivulje") za analizu. Mi preporučamo postavljanje granice na 0,03. Pokrenite program za toplinsko cikliranje kao što je navedeno u tablici 5.**

Protokol: qPCR na instrumentima ABI PRISM 7000, 7700 i 7900HT SDS i LightCycler 480

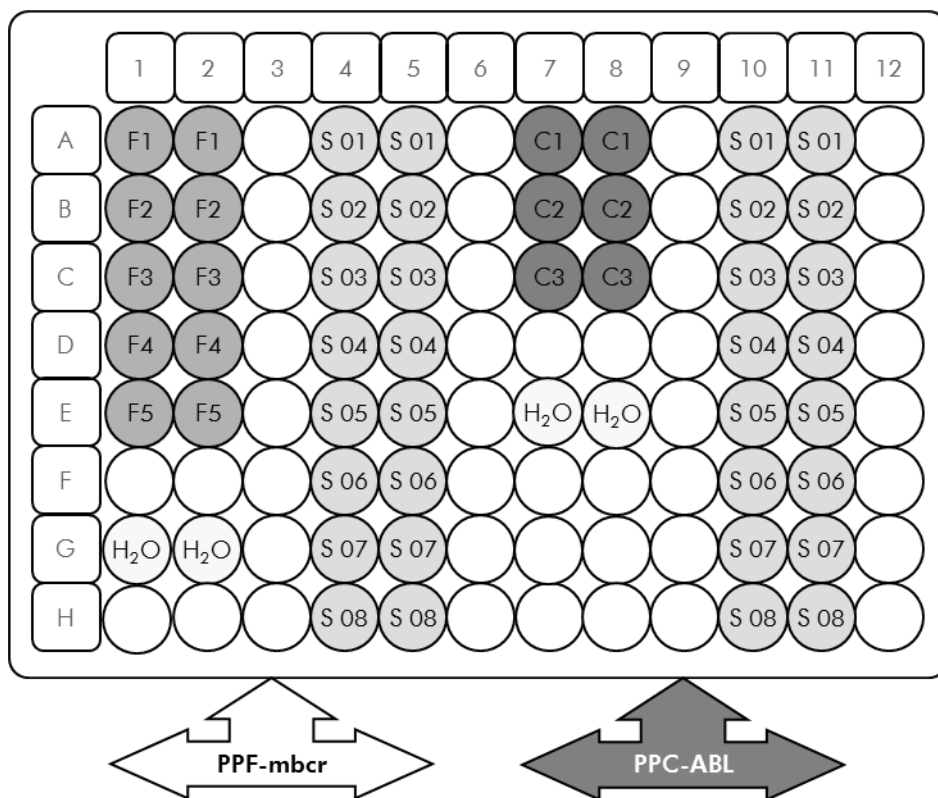
Koristite li opremu s pločom s 96 udubljenja za qPCR, preporučamo provođenje svih mjerenja dvaput, kao što je navedeno u tablici 6.

Tablica 6. Broj reakcija uz uporabu opreme s pločom s 96 udubljenja za qPCR

Uzorci	Reakcije
S mješavinom primera i proba za ABL (PPC-ABL)	
n cDNA uzorci	n x 2 reakcije
ABL standard	2 x 3 reakcije (3 otopine, svaka od njih testirana dvaput)
Kontrola vode	2 reakcije
S mješavinom primera i proba za BCR-ABL mbcr (PPF-mbcr)	
n cDNA uzorci	n x 2 reakcije
mbcr standard	2 x 5 reakcija (5 otopina, svaka od njih testirana dvaput)
Kontrola vode	2 reakcije

Obrada uzoraka na instrumentima ABI PRISM 7000, 7700 i 7900 SDS i LightCycler 480

Mi preporučamo testiranje najmanje 8 uzoraka cDNA u istom eksperimentu kako bi se optimizirala uporaba standarda i mješavina primera i proba. Shema ploče na slici 4 prikazuje primjer takvog eksperimenta.



Slika 4. Predložena postavka ploče za jedan eksperiment. S: cDNA uzorak; **F1–5:** BCR-ABL mbcr standardi; **C1–3:** ABL standardi; **H₂O:** kontrola vode.

qPCR na instrumentima ABI PRISM 7000, 7700 i 7900 SDS i LightCycler 480

Napomena: Provedite sve korake na ledu.

Postupak

- 1. Odmrznite sve potrebne komponente i stavite ih na led.**
- 2. Pripremite sljedeću mješavinu za qPCR u skladu s brojem uzoraka koji se obrađuju. Ako koristite opremu s pločom s 96 udubljenja za qPCR, preporučamo provedbu svih mjerenja dvaput.**

Sve koncentracije su predviđene za konačni volumen reakcije.

U tablici 7 opisana je shema pipetiranja za pripremu jedne mješavine reagensa koja je predviđena za dobivanje konačnog volumena reakcije od 25 μ l. Predmješavina se može pripremiti, u skladu s brojem reakcija, uz uporabu iste mješavine primera i proba (ili PPC-ABL ili PPF-mbcr). Dodatni volumeni su uključeni radi kompenziranja grešaka pri pipetiranju.

Tablica 7. Priprema mješavine za qPCR

Komponenta	1 reakcija (μl)	ABL: 24+1 reakcija (μl)	BCR-ABL mbc: 28+1 reakcija (μl)	Konačna koncentracija
TaqMan univerzalna glavna mješavina za PCR, 2x	12,5	312,5	362,5	1x
mješavina primera i proba, 25x	1	25	29	1x
sterilna voda bez nukleaze za PCR	6,5	162,5	188,5	–
uzorak (treba ga dodati u koraku 4)	5	svaki po 5	svaki po 5	–
ukupni volumen	25	svaki po 25	svaki po 25	–

- 3. Uzmite 20 μ l predmješavine za qPCR po udubljenju.**
- 4. Dodajte 5 μ l RT proizvoda (cDNA, odgovara 100 ng RNA) koji je dobiven reverznom transkripcijom (vidjeti "Protokol: Preporučena standardizirana EAC reverzna transkripcija", stranica 13) u odgovarajuće udubljenje (ukupni volumen 25 μ l).**
- 5. Lagano promiješajte okretanjem pipete prema gore i prema dolje.**
- 6. Zatvorite ploču i kratko centrifugirajte (300 x g, približno 10 sekundi).**
- 7. Stavite ploču u amplifikator u skladu s preporukama proizvođača. Programirajte amplifikator s programom za toplinsko cikliranje kao što je navedeno u tablici 8 za instrumente ABI PRISM 7000, 7700 i 7900HT SDS ili u tablici 9 za instrument LightCycler 480.**

Tablica 8. Temperaturni profil za ABI PRISM 7000, 7700 i 7900HT SDS

Način analiziranja	Standardna krivulja — Apsolutna kvantifikacija
Hold	temperatura: 50°C vrijeme: 2 minute
Hold 2	temperatura: 95°C vrijeme: 10 minuta
Cikliranje	50 puta 95°C tijekom 15 sekundi 60°C tijekom 1 minutu s prikupljanjem FAM fluorescencije; hvatač: TAMRA

Tablica 9. Temperaturni profil za instrument LightCycler 480

Način analiziranja	Apsolutna kvantifikacija ("Abs Quant")
Formati detekcije	Odaberite "Simple Probe" ("Jednostavna proba") u prozoru za formate detekcije
Hold	temperatura: 50°C vrijeme: 2 minute
Hold 2	temperatura: 95°C vrijeme: 10 minuta
Cikliranje	50 puta 95°C tijekom 15 sekundi 60°C tijekom 1 minutu s prikupljanjem FAM fluorescencije što odgovara (483–533 nm) za LC verziju 01 i (465–510 nm) za LC verziju 02

8. Za ABI PRISM 7000, 7700 i 7900HT SDS, slijedite korak 8a. Za instrument LightCycler 480 slijedite korak 8b.

8a. ABI PRISM 7000, 7700 i 7900HT SDS: Preporučujemo postavljanje granice na 0,1 kao što je opisano u EAC protokolu u koraku analize na ABI PRISM SDS i početne točke podešene između ciklusa 3 i 15. Pokrenite program cikliranja kao što je navedeno u tablici 8.

8b. Instrument LightCycler 480: Preporučamo način analize "Fit point" s pozadinom na 2,0 i granicom na 2,0. Pokrenite program toplinskog cikliranja kao što je navedeno u tablici 9.

Protokol: qPCR na instrumentima LightCycler 1.2 i 2.0

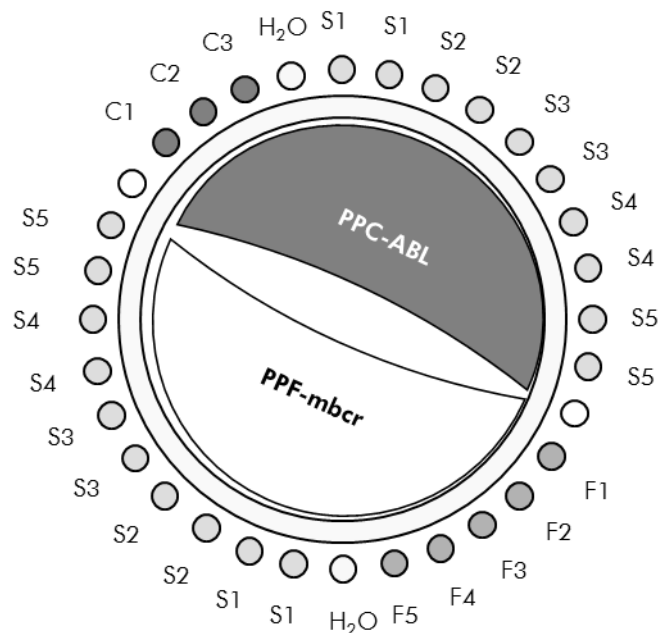
Ako se koriste kapilarni instrumenti, preporučamo mjerenje uzoraka dvaput, a kontrola samo jednom, kao što je navedeno u tablici 10.

Tablica 10. Broj reakcija za instrumente LightCycler 1.2 i 2.0

Uzorci	Reakcije
S mješavinom primera i proba za ABL (PPC-ABL)	
n cDNA uzorci	n x 2 reakcije
ABL standard	1 x 3 reakcije (3 standardne otopine, svaka od njih testirana jednom)
Kontrola vode	1 reakcija
S mješavinom primera i proba za BCR-ABL mbcr (PPF-mbcr)	
n cDNA uzorci	n x 2 reakcije
mbcr standard	1 x 5 reakcija (5 standardnih otopina, svaka od njih testirana jednom)
Kontrola vode	1 reakcija

Obrada uzoraka na instrumentima LightCycler 1.2 i 2.0

Mi preporučamo testiranje najmanje 5 uzorka cDNA u istom eksperimentu kako bi se optimizirala uporaba standarda i mješavina primera i proba. Kapilarna shema na slici 5 prikazuje primjer takvog pokusa.



Slika 5. Preporučena postavka rotora za svaki eksperiment s kompletom *ipsogen* BCR-ABL1 mbcr. F1–5: BCR-ABL mbcr standardi; C1–3: ABL standardi; S: nepoznat DNA uzorak koji treba analizirati; H₂O: kontrola vode.

qPCR na instrumentima LightCycler 1.2 i 2.0

Napomena: Zbog posebnih tehnoloških zahtjeva eksperimenti s instrumentom LightCycler moraju se provoditi uz uporabu specifičnih reagenasa. Mi preporučamo uporabu LightCycler TaqMan Master i slijedenje uputa proizvođača za pripremu glavne mješavine 5x.

Napomena: Provedite sve korake na ledu.

Postupak

- 1. Odmrznite sve potrebne komponente i stavite ih na led.**
- 2. Pripremite sljedeću mješavinu za qPCR u skladu s brojem uzoraka koji se obrađuju.**

Sve koncentracije su predviđene za konačni volumen reakcije.

U tablici 11 opisana je shema pipetiranja za pripremu jedne mješavine reagensa koja je predviđena za dobivanje konačnog volumena reakcije od 20 µl. Predmješavina se može pripremiti, u skladu s brojem reakcija, uz uporabu iste mješavine primera i proba (ili PPC-ABL ili PPF-mbcr). Dodatni volumeni su uključeni radi kompenziranja grešaka pri pipetiranju.

Tablica 11. Priprema mješavine za qPCR

Komponenta	1 reakcija (μl)	ABL: 14+1 reakcija (μl)	BCR-ABL mbc: 16+1 reakcija (μl)	Konačna koncentracija
Svježe pripremljena LightCycler TaqMan Master mješavina, 5x	4,0	60	68,0	1x
mješavina primera i proba, 25x	0,8	12	13,6	1x
sterilna voda bez nukleaze za PCR	10,2	153	173,4	–
uzorak (treba ga dodati u koraku 4)	5,0	svaki po 5	svaki po 5,0	–
ukupni volumen	20,0	svaki po 20	svaki po 20,0	–

- 3. Uzmite 15 μ l predmješavine za qPCR po kapilaru.**
- 4. Dodajte 5 μ l RT proizvoda (cDNA, odgovara 100 ng RNA) koji je dobiven reverznom transkripcijom (vidjeti "Protokol: Preporučena standardizirana EAC reverzna transkripcija", stranica 13) u odgovarajuću epruvetu (ukupni volumen 20 μ l).**
- 5. Lagano promiješajte okretanjem pipete prema gore i prema dolje.**
- 6. Stavite kapilare u adaptore koji su priloženi uz aparaturu i kratko centrifugirajte (700 x g, približno 10 sekundi).**
- 7. Stavite kapilare u amplifikator u skladu s preporukama proizvođača.**
- 8. Programirajte instrument LightCycler 1.2 ili 2.0 s programom za toplinsko cikliranje kao što je navedeno u tablici 12.**

Tablica 12. Temperaturni profil

Način analiziranja	Kvantifikacija
Hold	temperatura: 95°C vrijeme: 10 minuta rampa: 20
Cikliranje	50 puta 95°C tijekom 10 sekundi; rampa: 20 60°C tijekom 1 minute; rampa: 20; s prikupljanjem FAM fluorescencije: pojedinačno
Hold 2	45°C tijekom 1 minute; rampa: 20

- 9. Za LightCycler 1.2 slijedite korak 9a. Za LightCycler 2.0 slijedite korak 9b.**
- 9a. LightCycler 1,2: Preporučuje se način rada F1/F2 i "2nd derivative analysis" ("2. derivativna analiza"). Pokrenite program za toplinsko cikliranje kao što je navedeno u tablici 12.**
- 9b. LightCycler 2.0: Mi preporučamo uporabu automatizirane (F''maks) analize na LightCycler 2.0 verzija softvera 4.0 kako bi se dobili rezultati koji se mogu reproducirati. Pokrenite program za toplinsko cikliranje kao što je navedeno u tablici 12.**

Protokol: qPCR na instrumentu SmartCycler

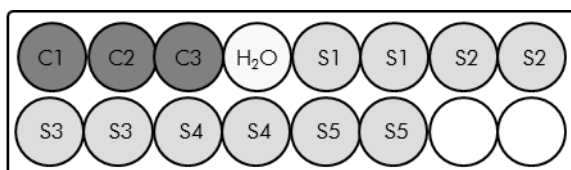
Ako se koristi ovaj instrument, preporučamo mjerenje uzoraka dvaput, a kontrola samo jednom, kao što je navedeno u tablici 13.

Tablica 13. Broj reakcija za instrument SmartCycler

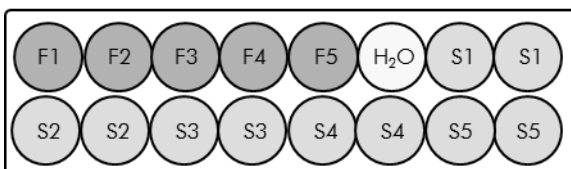
Uzorci	Reakcije
S mješavinom primera i proba za ABL (PPC-ABL)	
n cDNA uzorci	n x 2 reakcije
ABL standard	1 x 3 reakcije (3 standardne otopine, svaka od njih testirana jednom)
Kontrola vode	1 reakcija
S mješavinom primera i proba za BCR-ABL mbc (PPF-mbc)	
n cDNA uzorci	n x 2 reakcije
mbcr standard	1 x 5 reakcija (5 standardnih otopina, svaka od njih testirana jednom)
Kontrola vode	1 reakcija

Obrada uzoraka na instrumentu SmartCycler

Mi preporučamo testiranje najmanje 5 uzorka cDNA u istom eksperimentu kako bi se optimizirala uporaba standarda i mješavina primera i proba. Na shemi s dva bloka na slici 6 prikazan je primjer.



Sva testiranja na ovom prvom bloku provode se s PPC-ABL.



Sva testiranja na ovom drugom bloku provode se s PPF-mbc.

Slika 6. Predložena postavka ploče za jedan eksperiment. S: cDNA uzorak; **F1–5:** BCR-ABL mbc standardi; **C1–3:** ABL standardi; **H₂O:** kontrola vode.

qPCR na instrumentu SmartCycler

Napomena: Provedite sve korake na ledu.

Postupak

- 1. Odmrznite sve potrebne komponente i stavite ih na led.**
- 2. Pripremite sljedeću mješavinu za qPCR u skladu s brojem uzoraka koji se obrađuju.**

Sve koncentracije su predviđene za konačni volumen reakcije.

U tablici 14 opisana je shema pipetiranja za pripremu jedne mješavine reagensa koja je predviđena za dobivanje konačnog volumena reakcije od 25 μ l. Predmješavina se može pripremiti, u skladu s brojem reakcija, uz uporabu iste mješavine primera i proba (ili PPC-ABL ili PPF-mbcr). Dodatni volumeni su uključeni radi kompenziranja grešaka pri pipetiranju.

Tablica 14. Priprema mješavine za qPCR

Komponenta	1 reakcija (μl)	ABL: 14+1 reakcija (μl)	BCR-ABL mbcr: 16+1 reakcija (μl)	Konačna koncentracija
TaqMan univerzalna glavna mješavina za PCR, 2x	12,5	187,5	212,5	1x
mješavina primera i proba, 25x	1	15	17	1x
sterilna voda bez nukleaze za PCR	6,5	97,5	110,5	–
uzorak (treba ga dodati u koraku 4)	5	svaki po 5	svaki po 5	–
ukupni volumen	25	svaki po 25	svaki po 25	–

- 3. Uzmite 20 μ l predmješavine za qPCR po udubljenju.**

4. Dodajte 5 μ l RT proizvoda (cDNA, odgovara 100 ng RNA) koji je dobiven reverznom transkripcijom (vidjeti "Protokol: Preporučena standardizirana EAC reverzna transkripcija", stranica 13) u odgovarajuću epruvetu (ukupni volumen 25 μ l).
5. Lagano promiješajte okretanjem pipete prema gore i prema dolje.
6. Stavite uzorke u amplifikator u skladu s preporukama proizvođača.
7. Programirajte instrument SmartCycler s programom za toplinsko cikliranje kao što je navedeno u tablici 15.

Tablica 15. Temperaturni profil

Hold	temperatura: 50°C vrijeme: 2 minute
Hold 2	temperatura: 95°C vrijeme: 10 minuta
Cikliranje	50 puta 95°C tijekom 15 sekundi 60°C tijekom 1 minute s prikupljanjem: pojedinačno

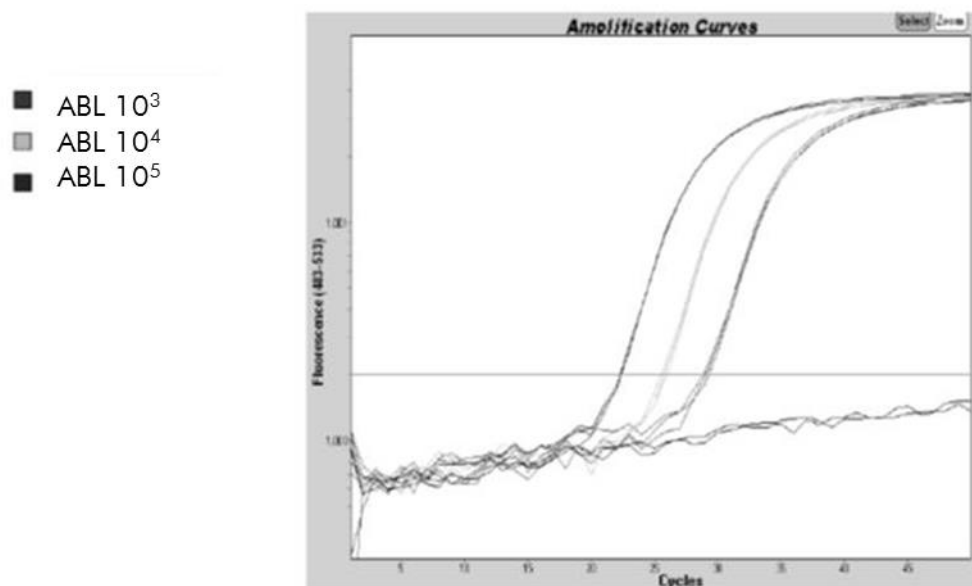
8. Mi preporučamo postavljanje granice na 30. Pokrenite program amplifikatora kao što je navedeno u tablici 15.

Tumačenje rezultata

Načelo analize podataka

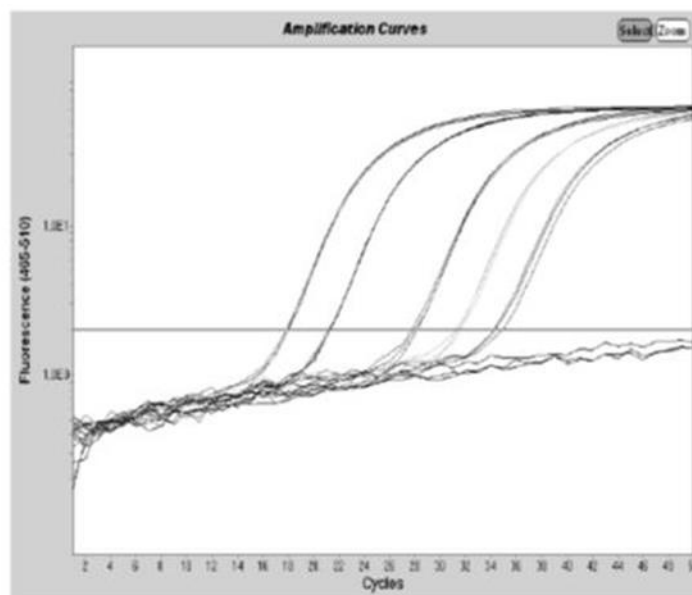
Pri primjeni tehnologije TaqMan broj PCR ciklusa koji su potrebni za detekciju signala iznad granice naziva se granični ciklus (C_T) i izravno je proporcionalan količini proizvoda koja je prisutna na početku reakcije.

Uporabom standarda s poznatim brojem molekula moguće je uspostaviti standardnu krivulju i odrediti preciznu količinu proizvoda koja je prisutna u testiranom uzorku. Standardne *ipsogen* krivulje temelje se na plazmidu; mi koristimo 3 standardne otopine plazmida za CG i 5 standardnih otopina za FG kako bi se osigurala točne standardne krivulje. Na slikama 7 i 8 prikazan je primjer TaqMan amplifikacijskih krivulja koje su dobivene s kompletom *ipsogen* BCR-ABL mbc.



Slika 7. Detekcija ABL standarda (C1, C2, C3). 10³, 10⁴ i 10⁵ kopija/5 μ l.

- m-bcr 10^1
- m-bcr 10^2
- m-bcr 10^3
- m-bcr 10^5
- m-bcr 10^6



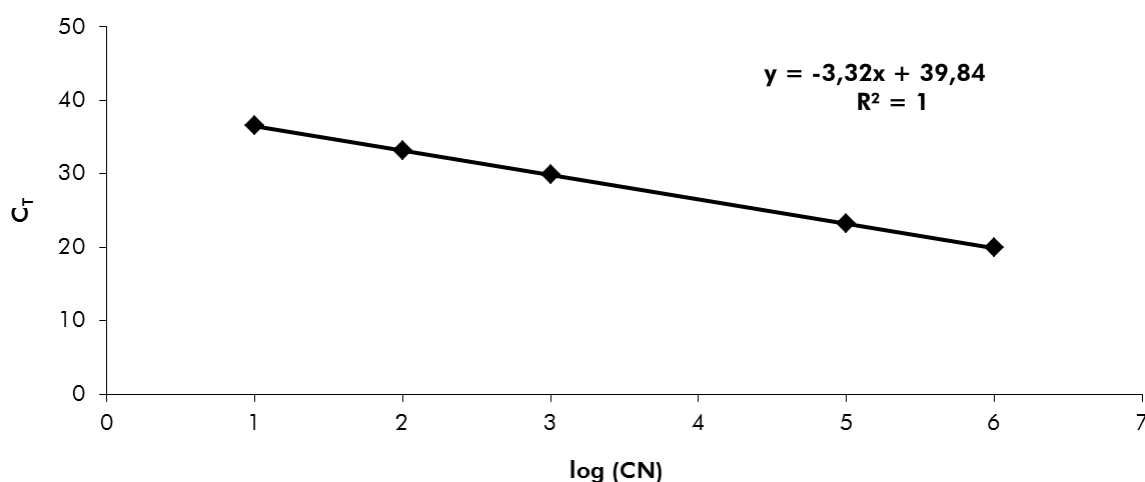
Slika 8. Detekcija BCR-ABL mbc standarda (F1–F5). 10^1 , 10^2 , 10^3 , 10^5 , 10^6 kopije/ $5 \mu\text{l}$.

Rezultati

Standardna krivulja i kriteriji kvalitete

Neobrađeni podaci mogu se unijeti u Excel® datoteku radi analize.

Za svaki gen (ABL i BCR-ABL) neobrađene C_T vrijednosti dobivene iz standardnih otopina plazmida obilježavaju se u skladu s brojem kopija zapisa (3, 4 i 5 za C1, C2 i C3; 1, 2, 3, 5 i 6 za F1, F2, F3, F4 i F5). Na slici 9 prikazan je primjer teoretske krivulje izračunat za 5 standardnih otopina.



Slika 9. Teoretska krivulja izračunata iz 5 standardnih otopina. Linearna regresijska krivulja ($y = ax + b$) se izračunava za svaki gen (ABL i BCR-ABL), tako da je a pad crte, a b je y sjecište, što predstavlja koordinata y točke gdje se crta križa s osi y . Jednadžba i koeficijent određivanja (R^2) ispisani su na grafikonu.

Kao standardi se koriste deseterostruke otopine, teoretski pad krivulje je –3,3. Pad između –3,0 i –3,9 je prihvatljiv sve dok je $R^2 > 0,95$ (2). Međutim, vrijednost za $R^2 > 0,98$ je poželjna za precizne rezultate (3).

Normaliziran broj kopija (NCN)

Jednadžbu ABL standardne krivulje treba koristiti za pretvorbu neobrađenih C_T vrijednosti (dobivenih sa PPC-ABL) za nepoznate uzorke i brojeve kopija za ABL (ABL_{CN}).

Jednadžbu BCR-ABL standardne krivulje treba koristiti za pretvorbu neobrađenih C_T vrijednosti (dobivenih sa PPF-mbcr) za nepoznate uzorke i brojeve kopija za BCR-ABL ($BCR-ABL_{mbcr_{CN}}$).

Omjer ovih CN vrijednosti daje normaliziran broj kopija (NCN):

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

MRD vrijednost

Vrijednost minimalne rezidualne bolesti (MRD) je omjer između CG normaliziranog izraza FG u praćenju ($(FG_{CN}/CG_{CN})_{FUP}$) i dijagnostičkim uzorcima ($(FG_{CN}/CG_{CN})_{DX}$).

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

Osjetljivost

Osjetljivost (SENSv) se izračunava u skladu s relevantnom ekspresijom FG pri dijagnozi ($(FG_{CN}/CG_{CN})_{DX}$) i CG ekspresijom ($CG_{CN,FUP}$) u uzorku za praćenje.

$$Osjetljivost (SENSv) = \frac{CG_{CN,DX}}{CG_{CN,FUP} \times FG_{CN,DX}}$$

Kontrola kvalitete na vrijednostima za ABL

Loša kvaliteta RNA ili problemi tijekom koraka qPCR za rezultat imaju mali broj ABL_{CN} . Preporučujemo odbacivanje rezultata za uzorke koji su $ABL_{CN} < 1318$ (niža vrijednost od 95% CI iz uzoraka bolesnika u EAC ispitivanju, referenca 4).

Ponovljivost između replikacija

Variranje C_T vrijednosti između replikacija treba biti < 2 , što odgovara četverostrukoj promjeni vrijednosti brojeva kopija.

Variranje C_T vrijednosti između replikacija općenito je $< 1,5$ ako je srednja C_T vrijednost replikacija < 36 (2).

Napomena: Svaki korisnik treba izmjeriti svoju vlastitu ponovljivost u svom laboratoriju.

Kontrole vode

Negativne kontrole trebaju dati nulti CN.

Pozitivni rezultati kontrole vode dobiju se iz križne kontaminacije. Vidjeti "Vodič za uklanjanje smetnji" ispod kako biste pronašli rješenje.

Vodič za uklanjanje smetnji

Ovaj vodič za uklanjanje smetnji može biti od koristi u rješavanju svih problema koji se mogu pojaviti. Za više informacija pogledajte i stranicu Često postavljana pitanja u našem Centru za tehničku podršku:

www.qiagen.com/FAQ/FAQList.aspx. Znanstvenici u tehničkim službama tvrtke QIAGEN uvijek će rado odgovoriti na sva pitanja koja možda imate vezano uz informacije i protokol u ovom priručniku ili uzorak i tehnologije testiranja (za kontakt informacije pogledajte "Kontakt informacije", stranica 47).

Komentari i prijedlozi

Negativni rezultat za kontrolni gen (ABL) i BCR-ABL mbc r u svim uzorcima — standardno u redu

- a) Loša RNA kvaliteta Uvijek provjerite RNA kvalitetu i koncentraciju prije početka postupka.
Paralelno obavite pozitivnu kontrolu RNA staničnih linija (visoko pozitivna kontrola u kontrolnim kompletima *ipsogen* BCR-ABL1 mbc r, kat. br. 670091).
- b) Neuspjao korak Uvijek provjerite RNA kvalitetu i koncentraciju reverzne transkripcije prije početka postupka.
Paralelno obavite pozitivnu kontrolu RNA staničnih linija (kontrolni komplet *ipsogen* BCR-ABL1 mbc r, kat. br. 670091).

Negativan rezultat za kontrolni gen (ABL) u uzorcima — standardno u redu

- a) Loša RNA kvaliteta Uvijek provjerite RNA kvalitetu i koncentraciju prije početka postupka.
Paralelno obavite pozitivnu kontrolu RNA staničnih linija (kontrolni komplet *ipsogen* BCR-ABL1 mbc r, kat. br. 670091).
- b) Neuspjao korak Uvijek provjerite RNA kvalitetu i koncentraciju reverzne transkripcije prije početka postupka.
Paralelno obavite pozitivnu kontrolu RNA staničnih linija (kontrolni komplet *ipsogen* BCR-ABL1 mbc r, kat. br. 670091).

Standardni signal negativan

- a) Greška pri pipetiranju Provjerite shemu za pipetiranje i postavku reakcije.
Ponovite postupak PCR.

Komentari i prijedlozi

- b) Neodgovarajuća pohrana komponenti kompleta
- Pohranite komplet *ipsogen* BCR-ABL1 mbcr pri temperaturi –15 do –30°C i držite mješavine primera i proba zaštićene od svjetlosti (PPC i PPF). Vidjeti "Pohranjivanje i rukovanje reagensima", stranica 12.
- Izbjegavajte ponovljeno zamrzavanje i odmrzavanje.
- Alikvotirajte reagense za pohranu.

Negativne kontrole su pozitivne

- Križna kontaminacija
- Zamijenite sve kritične reagense.
- Ponovite eksperiment s novim alikvotima svih reagenasa.
- Uvijek rukujte uzorcima, komponentama kompleta i potrošnim materijalima u skladu s opće prihvaćenim praksama kako bi se izbjegla kontaminacija prijenosom.

Nema signala, čak i u standardnim kontrolama

- a) Greška pri pipetiranju ili izostavljeni reagensi
- Provjerite shemu za pipetiranje i postavku reakcije.
- Ponovite postupak PCR.
- b) Ometajući utjecaji materijala uzorka prouzročeni nedovoljnim pročišćavanjem
- Ponovite RNA pripremu.
- c) LightCycler: Odabran je nepravilan kanal detekcije
- Podesite postavku kanala na F1/F2 ili 530 nm/640 nm.
- d) LightCycler: Nema programiranog prikupljanja podataka
- Provjerite programe cikliranja.
- Odaberite način prikupljanja "single" ("pojedinačno") na kraju svakog segmenta vezivanja zagrijavanjem u programu PCR.

Komentari i prijedlozi

Nema signala ili slab signal u uzorcima, ali standardne kontrole su u redu

- a) Loša RNA kvaliteta ili mala koncentracija Uvijek provjerite RNA kvalitetu i koncentraciju prije početka postupka.
Paralelno obavite pozitivnu kontrolu RNA staničnih linija (kontrolni komplet *ipsogen* BCR-ABL1 mbc, kat. br. 670091).
- b) Neuspjeh korak reverzne transkripcije Uvijek provjerite RNA kvalitetu i koncentraciju prije početka postupka.
Paralelno obavite pozitivnu kontrolu RNA staničnih linija (kontrolni komplet *ipsogen* BCR-ABL1 mbc, kat. br. 670091).

Jakost fluorescencije preslaba

- a) Neodgovarajuća pohrana komponenti kompleta Pohranite komplet *ipsogen* BCR-ABL1 mbc pri temperaturi -15 do -30°C i držite mješavine primera i proba zaštićene od svjetlosti (PPC i PPF). Vidjeti "Pohranjivanje i rukovanje reagensima", stranica 12.
Izbjegavajte ponovljeno zamrzavanje i odmrzavanje.
Alikvotirajte reagense za pohranu.
- b) Vrlo mala početna količina ciljane RNA Povećajte količinu uzorka RNA.
Napomena: Ovisno o odabranoj metodi RNA preparacije, mogu se pojaviti ometajući efekti.

LightCycler: Jakost fluorescencije varira

- a) Greška pri pipetiranju Varijabilnost prouzročena takozvanom "greškom pri pipetiranju" može se smanjiti analiziranjem podataka u načinu rada F1/F2 ili 530 nm/640 nm.
- b) Nedovoljno centrifugiranja kapilara Pripremljena mješavina za PCR još uvijek može biti u gornjoj komori kapilara ili je moguće da se zračni mjehur zadržao u vrhu kapilara.
Uvijek centrifugirajte kapilare napunjene reakcijskom mješavinom kao što je opisano u odgovarajućem radnom priručniku aparature.

- c) Vanjska površina vrha kapilara zaprljana Uvijek nosite rukavice kad rukujete kapilarima.

LightCycler: Greška na standardnoj krivulji

- Greška pri pipetiranju Varijabilnost prouzročena takozvanom "greškom pri pipetiranju" može se smanjiti analiziranjem podataka u načinu rada F1/F2 ili 530 nm/640 nm.

Kontrola kvalitete

Kontrola kvalitete cijelog kompleta provedena je na instrumentu LightCycler 480. Ovaj komplet je proizveden u skladu sa standardom ISO 13485:2003. Certifikati za analizu su dostupni na zahtjev na poveznici www.qiagen.com/support/.

Ograničenja

Korisnici moraju proći obuku i upoznati se s ovom tehnologijom prije uporabe ovog uređaja.

Svi generirani dijagnostički rezultati moraju se tumačiti ovisno o ostalim kliničkim ili laboratorijskim nalazima. U odgovornost korisnika spada da potvrdi radni učinka sustava za sve postupke koji se koriste u njegovom laboratoriju a koji nisu pokriveni ispitivanjima radnog učinka od strane tvrtke QIAGEN.

Potrebno je obratiti pozornost na rokove valjanosti koji su otisnuti na kutiji i naljepnicama svih komponenti. Ne koristite komponente čiji je rok valjanosti istekao.

Napomena: Komplet je dizajniran u skladu s ispitivanjima "Europa protiv raka" (engl. "Europe Against Cancer", EAC) (4) i usklađen je s aktualiziranim međunarodnim preporukama (3,5). Treba ga koristiti uz slijeđenje uputa koje su navedene u ovom priručniku, u kombinaciji s validiranim reagensima i instrumentima (vidjeti "Materijali koji su potrebni, ali nisu priloženi", stranica 9). Svaka uporaba ovog proizvoda koja odstupa od uputa na naljepnici i/ili modificiranje komponenti poništavaju jamstvo tvrtke QIAGEN.

Karakteristike izvedbe

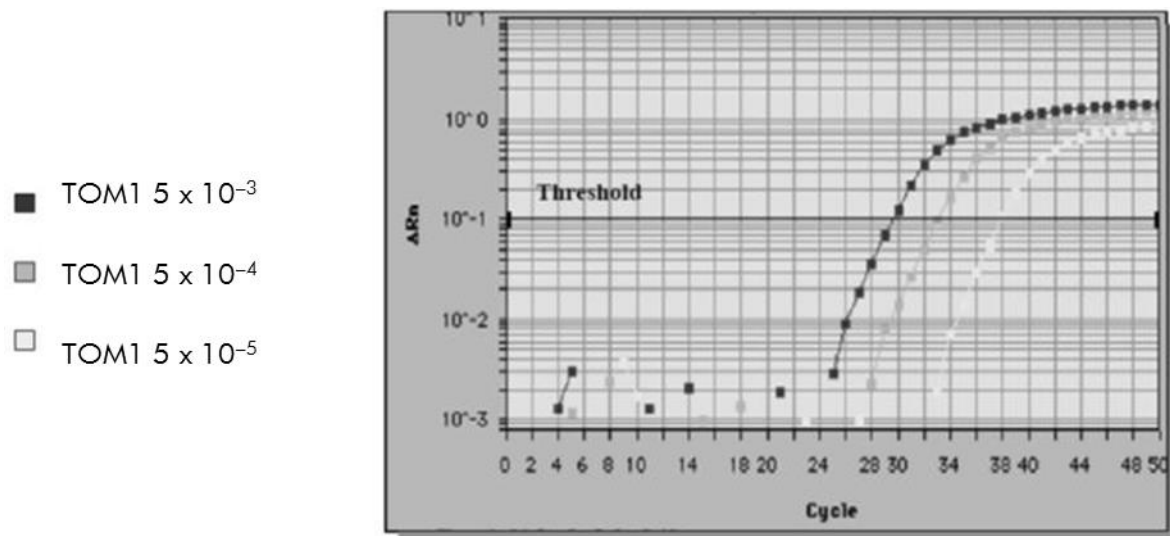
Nekliničke studije

Materijali i metode

Procjena izvedbe obavljena je na ABI PRISM 7700 SDS, u kombinaciji s reagensima koji su navedeni u "Materijali koji su potrebni, ali nisu priloženi", stranica 9. Nakon ispitivanja usklađenosti njegova uporaba odobrena je na sljedećim instrumentima: instrumenti ABI PRISM 7000 i 7900HT SDS, LightCycler 1.2 i 480, Rotor

Neklinička ispitivanja su provedena kako bi se utvrdio analitički radni učinak kompleta *ipsogen* BCR-ABL1 mbc. Ova neklinička laboratorijska ispitivanja provedena su na ukupnoj RNA iz TOM1 stanične linije razrijeđene u konstantnoj konačnoj količini MV4-11 ukupne RNA stanične linije.

Za određivanje ponovljivosti analize, 5 različitih koncentracija TOM1 ukupne RNA (5 ng, 500 pg, 50 pg, 5 pg i 0,5 pg) razrijeđene u MV4-11 ukupne RNA, u konstantnoj konačnoj ukupnoj količini od 1000 ng analizirano je u 5 replikacija po ciklusu i u 4 različita ciklusa (slika 10).



Slika 10. Oznake amplifikacije za 5×10^{-3} (5 ng), 5×10^{-4} (0,5 ng) i 5×10^{-5} (0,05 ng) otopina TOM1 ukupne RNA u MV4-11 negativnoj ukupnoj RNA.

Analitički podaci

U tablicama 16- 19 prikazane su analize tijekom testiranja sa srednjim graničnim ciklusom (C_T), standardno odstupanje (SD), broj uzoraka (n), koeficijent varijacije (CV), srednji broj kopija (CN) i srednji normalizirani broj kopija (NCN).

Tablica 16. Analiza tijekom testiranja — stanične linije mbcr i ABL

Stanična linija	Otopina	Srednji C_T	SD	n	CV (%)
mbcr	5×10^{-3} (5 ng/1 μ g)	29,19	0,26	20	0,88
	5×10^{-4} (0,5 ng/1 μ g)	33,70	0,48	20	1,47
	5×10^{-5} (0,05 ng/1 μ g)	37,03	1,16	20	3,15
ABL	–	25,01	0,87	100	3,46

Tablica 17. Analiza tijekom testiranja — plazmidi

Gen	Plazmid	Srednji C_T	SD	n	CV (%)
mbcr	F1 (10^1 kopija)	35,19	0,90	11	2,57
	F2 (10^2 kopija)	31,87	0,64	12	1,99
	F3 (10^3 kopija)	28,41	0,71	12	2,50
	F4 (10^5 kopija)	21,48	0,59	12	2,76
	F5 (10^6 kopija)	18,37	0,71	12	3,89
ABL	C1 (10^3 kopija)	29,68	0,85	12	2,86
	C2 (10^4 kopija)	26,01	0,51	12	1,96
	C3 (10^5 kopija)	22,53	0,42	12	1,86

Tablica 18. Analiza tijekom testiranja — stanične linije BCR-ABL mbc r i ABL (srednji CN)

Stanična linija	Otopina	Srednji CN	SD	n	CV (%)
BCR-ABL mbc r	5×10^{-3} (5 ng/1 μ g)	587,30	194,10	20	33,05
	5×10^{-4} (0,5 ng/1 μ g)	57,84	20,38	20	35,23
	5×10^{-5} (0,05 ng/1 μ g)	4,39	2,73	20	62,35
ABL	–	22.038,22	9459,17	100	42,92

Tablica 19. Analiza tijekom testiranja — stanična linija BCR-ABL mbc r (srednji NCN)

Stanična linija	Otopina	Srednji NCN*	SD	n	CV (%)
BCR-ABL mbc r	5×10^{-3} (5 ng/1 μ g)	267,46	93,22	20	34,85
	5×10^{-4} (0,5 ng/1 μ g)	23,54	7,36	20	31,28
	5×10^{-5} (0,05 ng/1 μ g)	2,60	2,80	20	107,66

* Samo za ove rezultate ispitivanja, NCN se navodi kao

$$\frac{\text{BCR-ABL mbc r}_{\text{CN}}}{\text{ABL}_{\text{CN}}} \times 10.000.$$

Klinička ispitivanja

Procjena radnog učinka obavljena je na ABI PRISM 7700 SDS, u kombinaciji s reagensima koji su navedeni u "Materijali koji su potrebni, ali nisu priloženi", stranica 9. Nakon ispitivanja usklađenosti njegova uporaba odobrena je na sljedećim instrumentima: instrumenti ABI PRISM 7000 i 7900HT SDS, LightCycler 1.2 i 480, Rotor-Gene 3000 i SmartCycler (6).

Grupa od 26 laboratorija, u 10 europskih zemalja, organizirana u usklađenoj akciji Europa protiv raka (engl. Europe Against Cancer) (EAC), koristila je plazmide koje je osigurala kompanija IPSOGEN kako bi se uspostavio standardiziran protokol za qPCR analizu glavnih fuzijskih gena koji su povezani s leukemijom u kliničkom okružju. BCR-ABL p190 prijepis je bio jedan od fuzijskih gena (FG) koji su uključeni u ispitivanje. Mi ovdje predstavljamo sažetak tog ispitivanja; potpuni rezultati su objavljeni 2003. godine (4, 7).

Ponovljivost unutar laboratorija za CG i FG standarde plazmida

Jedanaest laboratorija je provelo eksperiment ponovljivosti unutar laboratorija kako bi se procijenila varijabilnost u mjerenju standardnih otopina CG i FG plazmida. Otopine su napravljene u dva primjerka u svakom laboratoriju. U tablici 20 navedeno je srednje, standardno odstupanje i CV (%) za svaku otopinu.

Tablica 20. Ponovljivost unutar laboratorija za CG i FG standarde plazmida

Gen	Otopina	Srednja vrijednost	C _T SD	CV (%)
ABL kontrolni gen	C1	29,04	0,53	1,82
	C2	25,64	0,47	1,84
	C3	22,10	0,34	1,55
BCR-ABL mbc r fuzijski gen	F1	35,99	1,18	3,28
	F2	32,05	0,74	2,32
	F3	28,43	0,65	2,29
	F4	21,60	0,59	2,72
	F5	18,24	0,46	2,57

Vrijednost ekspresije BCR-ABL mbc r FG prijepisa

U tablicama 21 i 22 prikazane su vrijednosti ekspresije BCR-ABL mbc r FG prijepisa i ABL CG, za TOM1 stanične linije, bolesnike s ALL pri uspostavljanju dijagnoze i ostale bolesnike.

Tablica 21. Vrijednost ekspresije BCR-ABL mbc r FG prijepisa i ABL CG — C_T vrijednosti

	C _T vrijednosti (raspon od 95%)	
	BCR-ABL mbc r	ABL
TOM1 stanična linija	22,8	21,8
Uzorci bolesnika s ALL		
BM (n = 17)	24,7 (21,3–27,1)	24,5 (21,7–27,1)
PB (n = 7)	23,3 (21,7–29,1)	22,5 (21,0–27,0)
Negativni uzorci bolesnika		
BM (n = 26)	–	25,35 (24,68–26,02)
PB (n = 74)	–	25,15 (24,83–25,48)

Tablica 22. Vrijednosti ekspresije BCR-ABL mbc r FG prijepisa i ABL CG — CT i NCN vrijednosti

	CN vrijednosti (raspon od 95%)		NCN vrijednosti (raspon od 95%)
	BCR-ABL mbc r	ABL	CN BCR-ABL mbc r/CN ABL
Uzorci bolesnika s ALL			
BM (n = 17)	9550 (1738–97.724)	11.912 (5012–70.795)	0,8 (0,35–1,38)
PB (n = 7)	91.201 (1905–208.930)	134.896 (4786–114.815)	0,68 (0,4–1,82)
Negativni uzorci bolesnika			
BM (n = 26)	–	19.201 (12.922–25.480)	–
PB (n = 74)	–	21.136 (17.834–24.437)	–

ABL C_T vrijednosti se nisu bitno razlikovale između normalnih i leukemičnih uzoraka, niti između tipova uzoraka (PB ili BM) ili leukemičnih uzoraka (ALL, AML, CML).

Netočno pozitivni i netočno negativni postoci

Netočno negativni i netočno pozitivni postoci izračunati su koristeći sljedeće kontrole.

- Pozitivne kontrole: TOM1 stanice, stanična linija dobro poznata po svojoj pozitivnosti na BCR-ABL p190 fuzijski gen; uzorci bolesnika koji su već procijenjeni na p190 pozitivnost
- Negativne kontrole: Negativni RNA uzorci, amplifikacijske kontrole (NAC) nisu napravljene za *E. coli* RNA umjesto ljudske RNA za provjeru kontaminacije PCR i kontrole bez matrice (NTC), koje su sadržavale vodu umjesto ljudske RNA

Amplifikacija na RNA uzorcima FG provedena je u tri primjerka i dva primjerka za CG.

Netočno negativan uzorak definiran je kao pozitivan RNA uzorak s manje od 50% pozitivnih udubljenja (0/2, 0/3 ili 1/3).

Netočno pozitivan uzorak definiran je kao negativan uzorak s manje od 50% pozitivnih udubljenja (1/2, 2/3 ili 3/3).

U tablici 23 prikazan je broj i postotak netočno negativnih i netočno pozitivnih uzoraka.

Tablica 23. Netočno negativni i netočno pozitivni uzorci

Netočna negativnost		Netočna pozitivnost	
10 ⁻³	10 ⁻⁴	FG negativna kontrola	NAC/NTC
0% (0/54)	4% (3/75)	4,8% (6/126)	5,8% (7/120)

Reference

Tvrtka QIAGEN održava ogromnu, suvremenu online bazu podataka znanstvenih publikacija o QIAGEN proizvodima. Opcije opsežne pretrage omogućuju vam da pronađete članke koji su vam potrebni, pretragom jednostavnih ključnih riječi ili detaljnim navođenjem područja primjene, istraživanja, naslova, itd.

Za potpun popis referenci posjetite online QIAGEN bazu podataka na poveznici www.qiagen.com/RefDB/search.asp ili kontaktirajte tehničku službu tvrtke QIAGEN ili vašeg lokalnog distributera.

Citirane reference

1. Thomas, D.A. (2007) Philadelphia chromosome positive acute lymphocytic leukemia: a new era of challenges. *Hematology Am. Soc. Hematol. Educ. Program* **2007**, 435.
2. van der Velden, V.H., Hochhaus, A., Cazzaniga, G., Szczepanski, T., Gabert, J., and van Dongen, J.J. (2003) Detection of minimal residual disease in hematologic malignancies by real-time quantitative PCR: principles, approaches, and laboratory aspects. *Leukemia* **17**, 1013.
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. 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.
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. Silvy, M., Mancini, J., Thirion, X., Sigaux, F., and Gabert, J. (2005) Evaluation of real-time quantitative PCR machines for the monitoring of fusion gene transcripts using the Europe against cancer protocol. *Leukemia* **19**, 305.
7. 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.

Simboli

Sljedeći simboli se mogu pojaviti na pakiranju i naljepnici:











<N>

Sadržava reagens koji je dovoljan za <N> reakcija



Upotrijebiti do

	In vitro dijagnostički medicinski uređaj
	Kataloški broj
	Broj serije
	Broj materijala
	Global broj proizvoda (GTIN)
	Ograničenje temperature
	Proizvođač
	Pogledati upute za uporabu

Kontakt informacije

Za tehničku pomoć i više informacija molimo pogledajte naš Centar za tehničku podršku na poveznici www.qiagen.com/Support, pozovite 00800-22-44-6000 ili kontaktirajte jedan od odjela tehničke službe tvrtke QIAGEN ili lokalne distributere (pogledajte stražnju koranicu ili posjetite www.qiagen.com).

Informacije za naručivanje

Proizvod	Sadržaj	Kat. br.
<i>ipsogen</i> BCR-ABL1 mbr Kit (24)	Za 24 reakcije: standardi za ABL kontrolni gen, standardi za BCR-ABL mbr fuzijski gen, mješavina primera i probe za ABL, mješavina primera i probe BCR-ABL mbr fuzijski gen	670023
Rotor-Gene Q MDx — za IVD validiranu analizu PCR u realnom vremenu u kliničkim primjenama		
Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM Platform	PCR uređaj u realnom vremenu i uređaj za analizu mekšanja velike razlučivosti (engl. High Resolution Melt analyzer, HRM) s 5 kanala (zeleni, žuti, narančasti, crveni, grimizni) plus HRM kanal, prijenosno računalo, softver, pribor, 1-godišnje jamstvo na dijelove i izradu, instalacija i obuka nisu uključene	9002032
Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM System	PCR uređaj u realnom vremenu i uređaj za analizu mekšanja velike razlučivosti (engl. High Resolution Melt analyzer, HRM) s 5 kanala (zeleni, žuti, narančasti, crveni, grimizni) plus HRM kanal, prijenosno računalo, softver, pribor, 1-godišnje jamstvo na dijelove i izradu, instalacija i obuka	9002033
Kontrolni komplet <i>ipsogen</i> BCR-ABL1 mbr — za kvalitativnu validaciju RNA ekstrakcije i reverznu transkripciju BCR-ABL mbr fuzijskog gena		
<i>ipsogen</i> BCR-ABL1 mbr Controls Kit	Stanične linije s negativnom, visoko i nisko pozitivnom ekspresijom BCR-ABL mbr fuzijskog gena	670091

Za aktualizirane informacije o licenciranju i izjave o odricanju specifične za određen proizvod pogledajte odgovarajući priručnik za QIAGEN komplet ili korisnički priručnik. Priručnici za QIAGEN komplete i korisnički priručnici dostupni su na poveznici www.qiagen.com ili se mogu zatražiti od tehničkih službi tvrtke QIAGEN ili vašeg lokalnog distributera.

Ova stranica je namjerno ostavljena praznom

Ova stranica je namjerno ostavljena praznom

Ovaj proizvod je namijenjen za in vitro dijagnostičku uporabu. *ipsogen* proizvodi se ne smiju preprodavati, modificirati u svrhu preprodaje ili koristiti za izradu komercijalnih proizvoda bez pismenog odobrenja tvrtke QIAGEN.

Informacije u ovom dokumentu podložne su izmjenama bez prethodnog obavještenja. Tvrtka QIAGEN ne preuzima nikakvu odgovornost za bilo kakve greške koje se mogu pojaviti u ovom dokumentu. Ovaj dokument važi kao potpun i točan u trenutku objavljivanja. Ni u kojem slučaju tvrtka QIAGEN se ne može smatrati odgovornom za slučajne, posebne, višestruke ili posljedične štete koje nastanu u svezi s ovim dokumentom ili proizvadu iz njegove uporabe.

Zajamčeno je da *ipsogen* proizvodi odgovaraju svojim navedenim specifikacijama. Jedina odgovornost tvrtke QIAGEN i jedini lijek za korisnika ograničeni su na besplatnu zamjenu proizvoda u slučaju da proizvodi ne funkcioniraju onako kako je zajamčeno.

Zaštitni znakovi: QIAGEN®, *ipsogen*®, Rotor-Gene® (QIAGEN grupa); ABI PRISM®, FAM™, RNaseOUT™, SuperScript®, SYBR®, TAMRA™ (Life Technologies Corporation); Agilent®, Bioanalyzer® (Agilent Technologies, Inc.); Excel® (Microsoft Corporation); LightCycler®, TaqMan® (Roche Group); SmartCycler® (Cepheid).

Ugovor o ograničenom licenciranju

Uporaba ovog proizvoda znači prihvaćanje sljedećih uvjeta od strane svakog kupca ili korisnika kompleta *ipsogen* BCR-ABL1 mbc:

1. Komplet *ipsogen* BCR-ABL1 mbc smije se koristiti samo u skladu s *priručnikom za komplet ipsogen BCR-ABL1 mbc* i namijenjen je samo za uporabu s komponentama koje su sadržane u kompletu. QIAGEN ne dodjeljuje licencu niti za jedno svoje intelektualno vlasništvo radi uporabe ili povezivanja priloženih komponenti ovog kompleta s bilo kojom komponentom koja nije uključena u ovaj komplet osim što je opisano u *priručniku za komplet ipsogen BCR-ABL1 mbc* i dodatnim protokolima koji su dostupni na poveznici www.qiagen.com.
2. Osim kako je izričito navedeno u licencama, tvrtka QIAGEN ne daje nikakvo jamstvo da ovaj komplet i/ili njegova uporaba ne krše prava trećih strana.
3. Ovaj komplet i njegove komponente su licencirani za jednokratnu uporabu i ne smiju se ponovno koristiti, prerađivati ili preprodavati.
4. Tvrtka QIAGEN posebice ne prihvaća nikakve druge licence, izričite ili implicirane, osim onih koje su izričito navedene.
5. Kupac i korisnik kompleta prihvaćaju da neće angažirati nikog drugog ili mu dopustiti da poduzima bilo kakve korake koji bi doveli do ili olakšali bilo kakve aktivnosti koje su gore zabranjene. Tvrtka QIAGEN na bilo kojem sudu može osporiti ovaj Ugovor o ograničenom licenciranju i može tražiti naknadu za sve troškove istrage i sudske troškove, uključujući troškove odvjetnika, na bilo koji način može nametnuti poštovanje ovog ugovora o ograničenom licenciranju ili bilo kojeg prava na svoje intelektualno vlasništvo vezano uz ovaj komplet i/ili njegove komponente.

Za aktualizirane uvjete o licenciranju posjetite www.qiagen.com.

HB-1357-002 © 2013–2015 QIAGEN, sva prava pridržana.

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

