

Příručka sady *ipsogen*[®] BCR-ABL1 MbcR IS-MMR



Verze 1

IVD

In vitro diagnostikum pro kvantitativní stanovení

Pro použití s přístroji Rotor-Gene[®] Q, Applied Biosystems[®],
ABI PRISM[®] a LightCycler[®]



REF 670723



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

R3 **MAT** 1072509CS



QIAGEN Sample and Assay Technologies

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

QIAGEN určuje standardy:

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

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

Obsah

Použití	5
Souhrn a vysvětlení	5
Základní informace o CML	5
Sledování nemoci	5
Princip metody	7
Dodávané materiály	9
Obsah sady	9
Požadované materiály, které nejsou součástí dodávky	10
Varování a bezpečnostní opatření	11
Všeobecná bezpečnostní opatření	11
Uchovávání a nakládání s reagensy	12
Uchovávání a nakládání se vzorky	12
Postup	13
Příprava vzorku RNA	13
Protokoly	
■ Reverzní transkripce pomocí reverzní transkriptázy SuperScript III	13
■ qPCR na přístrojích Rotor Gene Q MDx 5plex HRM nebo RotorGene Q 5plex HRM se 72zkumavkovým rotorem	16
■ qPCR na Applied Biosystems 7500 Real-Time PCR System, přístroje ABI PRISM 7900HT SDS a LightCycler 480	20
■ Protokol: qPCR na přístrojích LightCycler 1.2, 1.5 a 2.0	26
Interpretace výsledků	30
Princip datové analýzy	30
Standardní křivky a kritéria jakosti platná pro surová data	31
Normalizovaný počet kopií (NCN)	33
Konverze IS a hlášení MMR	34
Souhrn kritérií jakosti	35
Odstraňování poruch	35
Řízení jakosti	36
Omezení	36
Výkonnostní charakteristiky	36
Mez slepého pokusu a mez detekce	37
Linearita	37

Vstupy	37
Přesnost	37
Studie pro vyhodnocení shody: Jednoplazmidový standard ERM-AD623 BCR-ABL1 (IRMM) ve srovnání s jednoplazmidovým standardem <i>ipsogen</i> (QIAGEN)	38
Literatura	40
Symboly	41
Kontaktní informace	41
Informace o způsobu objednávání	42

Použití

Sada *ipsogen* BCR-ABL1 MbcR IS-MMR je určena pro kvantifikaci transkriptů BCR-ABL p210 b2a2 nebo b3a2 ve vzorcích kostní dřeně nebo periferní krve u pacientů s akutní lymfoblastovou leukémií (ALL) nebo chronickou myeloidní leukémií (CML), u nichž byla předtím diagnostikována příhoda fúze genu (FG) BCR-aBL MbcR. Test je určen k hodnocení úrovně molekulární odezvy; výsledky lze používat k minimálnímu sledování reziduálního onemocnění.

Souhrn a vysvětlení

Základní informace o CML

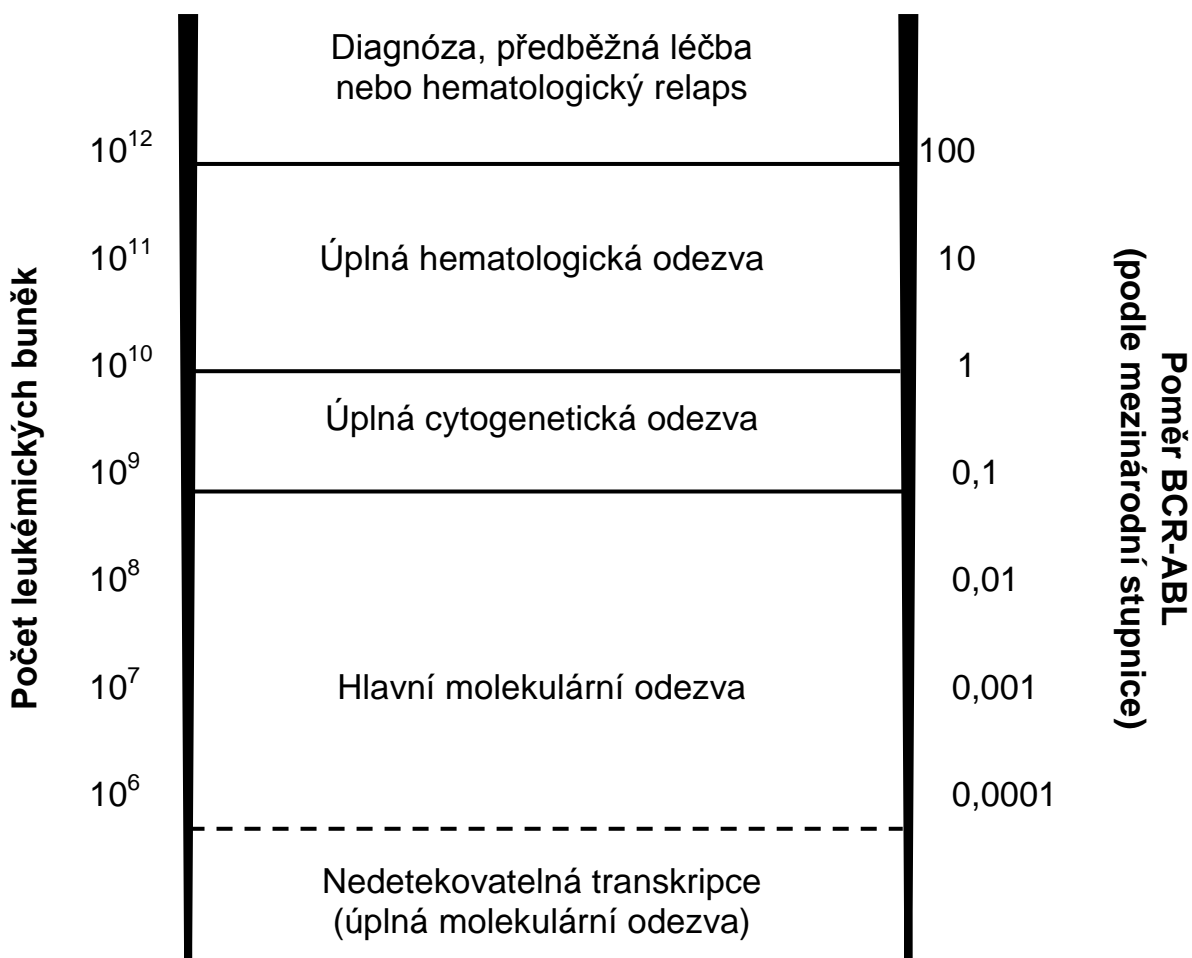
CML patří do skupiny myeloproliferativních neoplazmat a vyznačuje se ve >90 % případů přítomností filadelfského chromosomu (chromosom Ph).

Tento chromosom je produktem reciproční translokace mezi dlouhými rameny chromosomů 9 a 22, t(9;22), gen BCR (breakpoint cluster region) je umístěn na chromosomu 22 a onkogen c-ABL přichází z chromosomu 9. Odpovídající fúzní gen, BCR-ABL, je transkribován do 8,5 kb mRNA s dvěma junkčními variantami b2a2 (40 % případů) a b3a2 (55 % případů). Kóduje chimérický protein, p210, se zvýšenou aktivitou tyrozinkinázy. Transkripce b2a3 a b3a3 představují méně než 5 % případů. Chromosom Ph lze rovněž detekovat u 35 % VŠECH dospělých pacientů.

Roční výskyt CML je přibližně 1–2 na 100 000 a MCL představuje 20 % dospělých leukémií. Klinicky je charakterizován přebytkem myeloidních buněk, které se diferencují a fungují normálně. Pacienti s CML budou diagnostikováni v 90–95 % případů chronické nebo stabilní fáze onemocnění. Z historického pohledu v průměru 4 až 6 let pacienti vstoupí do akcelerované fáze, která vyvolá blastickou krizi a akutní leukémii, která je vždy smrtelná. Nástup imatinibu a v nedávné minulosti druhé generace inhibitorů tyrozinkinázy (TKI) dramaticky změnil přirozený průběh nemoci: většina pacientů nyní zůstává v remisi a zaslouží si dlouhodobou kontrolu a sledování nemoci.

Sledování nemoci

K dnešnímu dni je cílem terapie CML dosáhnout 100% přežití a negativity chromosomu Ph. Sledování nemoci je proto zásadním nástrojem k hodnocení odezvy a detekci časného relapsu u každého individuálního pacienta. Při terapii TKI pacienti obvykle progredují od hematologické k cytogenetické a pak molekulární remisi s odpovídajícím snížením počtu leukémických buněk a transkriptů BCR-ABL, jak je to podrobně uvedeno na následujícím obrázku 1.



Obrázek 1. Převzato z literatury 1.

Standardní metoda pro odhad tumorového zatížení u pacientů s CML je konvenční cytogenetická analýza (G-banding) na metafázích kostní dřeně (BM). Cytogenetická odezva se hodnotí na nejméně 20 metafázích kostní dřeně. Úroveň cytogenetické odezvy se odhaduje jako procentuální podíl metafází pozitivních na chromozom Ph (viz tabulka 1, odkaz 2). Ovšem toto hodnocení závisí na laboratorních výsledcích a má nízkou senzitivitu, 5 % při analýze 20 metafází.

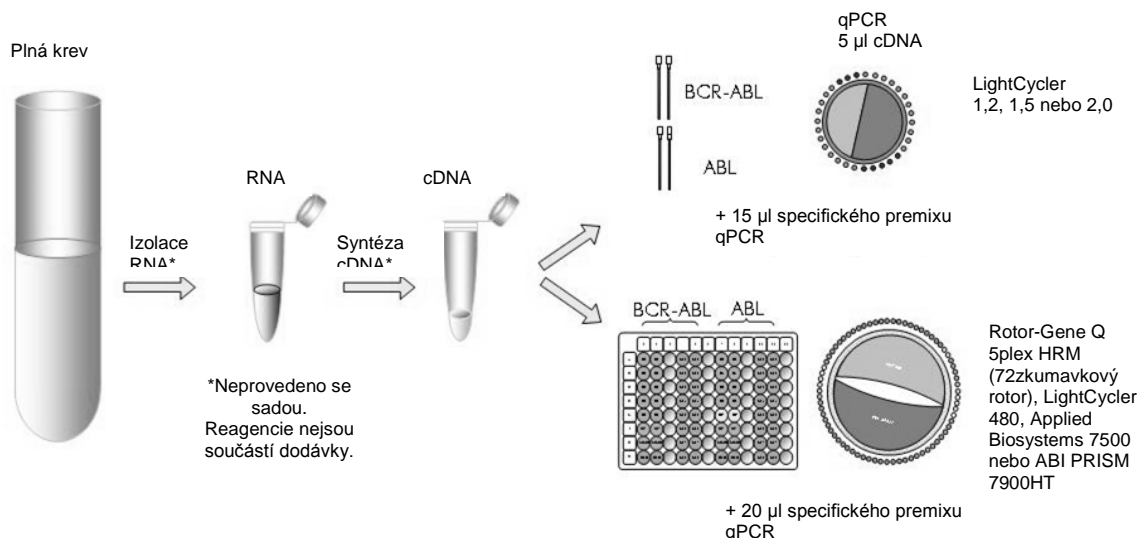
Součástí technik sledování nemoci v případě léčby CML je nyní kvantitativní polymerázová řetězová reakce v reálném čase (qPCR), kvantifikující BCR-ABL Mbc r mRNA na vzorcích periferní krve (PB). Není tak invazivní jako konvenční cytogenetika metafáze kostní dřeně a je mnohem citlivější.

Nedávno byla aktualizována doporučení pro sledování onemocnění CML, která zahrnovala nový klinický důkaz z klinických hodnocení a dále cíle a nástroje pro dokonalejší sledování onemocnění. Nejnovější doporučení ohledně definice odezvy a sledování pacientů užívajících imatinib přichází od expertů ELN (2).

Z technického hlediska mezinárodní experti vynaložili úsilí na harmonizaci testování a hlášení BCR-ABL Mbc r (3–5). Navíc byl nedávno validován

referenční panel pod dohledem WHO, aby byla možná jednoduchá standardizace kvantifikace BCR-ABL (6).

Princip metody



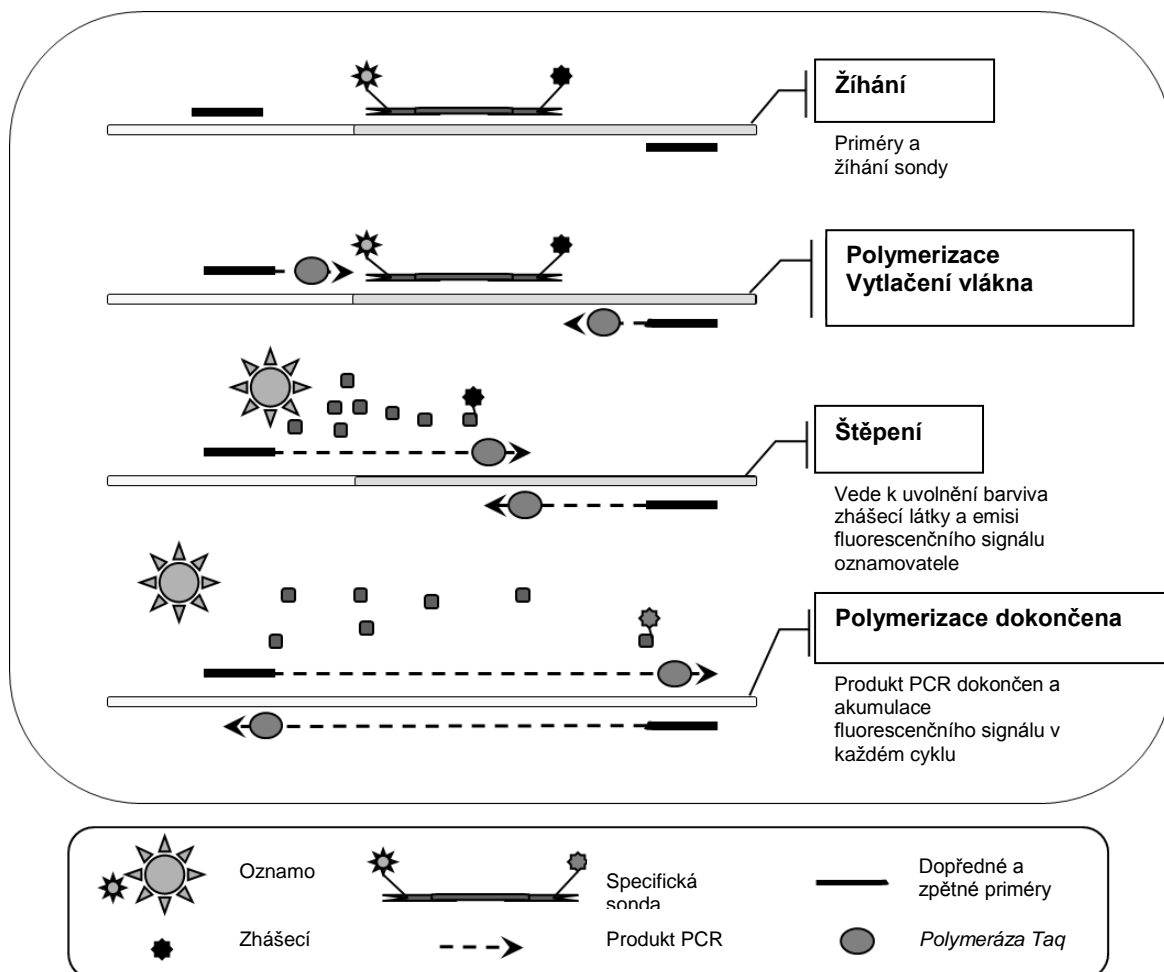
Obrázek 2. Izolace RNA, syntéza cDNA a qPCR.

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

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

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

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



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

Dodávané materiály

Obsah sady

<i>ipsogen</i> BCR-ABL1 Mbc <i>IS-MMR</i> Kit		(24)
Katalogové č.		670723
Počet reakcí		24
High Positive RNA Control (Vysoce pozitivní kontrola RNA)		3 x 10 µl
IS-MMR Calibrator (Kalibrátor IS-MMR)		3 x 10 µl
Mbc and ABL Single Plasmid Standard Dilution (10 ¹ copies/5 µl) (Standardní ředění jediného plazmidu Mbc a ABL (101 kopií/5 µl))	SP1-BCR-ABL Mbc a ABL	35 µl
Mbc and ABL Single Plasmid Standard Dilution (10 ² copies/5 µl) (Standardní ředění jediného plazmidu Mbc a ABL (102 kopií/5 µl))	SP2-BCR-ABL Mbc a ABL	35 µl
Mbc and ABL Single Plasmid Standard Dilution (10 ³ copies/5 µl) (Standardní ředění jediného plazmidu Mbc a ABL (103 kopií/5 µl))	SP3-BCR-ABL Mbc a ABL	70 µl
Mbc and ABL Single Plasmid Standard Dilution (10 ⁴ copies/5 µl) (Standardní ředění jediného plazmidu Mbc a ABL (104 kopií/5 µl))	SP4-BCR-ABL Mbc a ABL	35 µl
Mbc and ABL Single Plasmid Standard Dilution (10 ⁵ copies/5 µl) (Standardní ředění jediného plazmidu Mbc a ABL (105 kopií/5 µl))	SP5-BCR-ABL Mbc a ABL	70 µl
Mbc and ABL Single Plasmid Standard Dilution (10 ⁶ copies/5 µl) (Standardní ředění jediného plazmidu Mbc a ABL (106 kopií/5 µl))	SP6-BCR-ABL Mbc a ABL	70 µl
Primers and Probe Mix ABL* (Priméry a směs sond ABL*)	PPC-ABL 25x	110 µl
Primers and Probe Mix BCR-ABL Mbc Fusion Gene [†] (Priméry a směs sond genu fúze BCR-ABL Mbc) □	PPF-Mbc 25x	110 µl
<i>ipsogen</i> BCR-ABL1 Mbc <i>IS-MMR</i> Kit Handbook (Angličtina)		1

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

† Směs specifických zpětných a dopředných primérů pro gen fúze BCR-ABL Mbc plus specifická sonda FAM–TAMRA.

Poznámka: Standardy (SP1–SP6) a priméry a směsi sond před použitím jemně promíchejte a krátce odstředíte.

Požadované materiály, které nejsou součástí dodávky

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

Reagencie

- Činidla pro purifikaci RNA: Validovanými činidly jsou souprava RNeasy[®] Midi Kit (QIAGEN, kat. č. 75144) nebo TRIzol[®] Reagent (Thermo Fisher Scientific Inc., kat. č. 15596018 nebo 15596026)
- Voda pro PCR bez nukleázy
- Pufr a *Taq* DNA polymeráza: Validovaná činidla jsou premix polymerázy *Premix Ex Taq[™]* DNA (Perfect Real Time) (TaKaRa, kat. č. RR039A) a premix polymerázy *Premix Ex Taq* DNA (Probe qPCR) (TaKaRa, kat. č. RR390A). Oba zahrnují 2x polymerázovou master mix *Taq* DNA a referenční barviva ROX[™]
- Činidla pro reverzní transkripci: Validovanými činidly jsou souprava *ipsogen* RT Kit, která obsahuje reverzní transkriptázu, 5x RT pufr, 100 mM DTT, inhibitor RNázy, náhodný primer a dNTPs (QIAGEN, kat. č. 679923); nebo reverzní transkriptázu SuperScript[®] III, která obsahuje reverzní transkriptázu, 5x pufr a 100 mM DTT (Thermo Fisher Scientific Inc., kat. č. 18080044)
- Při použití přípravku Superscript III se vyžadují následující dodatečná činidla:
 - Inhibitor RNázy: Validovaným činidlem je rekombinantní inhibitor ribonukleázy RNaseOUT[™] (Thermo Fisher Scientific Inc., kat. č. 10777019)
 - Sestava dNTP, úroveň pro PCR
 - Náhodný bezejmenný preparát

Spotřební díly

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

Vybavení

- Mikrolitrové pipety* vyčleněná pro PCR (1–10 µl; 10–100 µl; 100–1000 µl)
- Stolní centrifuga* s rotorem pro 0,2 ml/0,5 ml reakční zkumavky a mikrodisky (schopná dosáhnout 10.000 ot/min)
- Přístroj PCR pracující v reálném čase:* Přístroj Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM nebo jiný přístroj RotorGene; LightCycler 1.2, 1.5, 2.0 nebo 480; Applied Biosystems 7500 Real-Time PCR System; ABI PRISM 7900HT SDSa s tím spojený specifický materiál
- Tepelný cyklovač* nebo vodní lázeň* (reverzní transkripční krok)

Varování a bezpečnostní opatření

Pro diagnostické použití in vitro

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

Odpad ze vzorků a rozborů likvidujte podle místních bezpečnostních předpisů.

Všeobecná bezpečnostní opatření

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

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

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

* Ujistěte se, že byly přístroje kontrolovány a kalibrovány podle doporučení výrobce.

Postupujte s maximální opatrností, aby nedošlo k následujícímu:

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

Proto doporučujeme následující.

- Použijte laboratorní vybavení zbavené nukleázy (např. pipety, pipetovací špičky, reakční lahvičky) a při provádění analýzy mějte nasazené rukavice.
- Použijte čerstvé pipetovací špičky odolné vůči aerosolu pro všechny pipetovací kroky, aby se zabránilo zkřížené kontaminaci vzorků a reagensů.
- Připravte hlavní směs před PCR s vyčleněnými materiály (pipety, špičky atd.) ve vyhrazeném místě, kam nebyly zavlečeny žádné matrice DNA (cDNA, DNA, plazmid). Dejte templát do samostatné zóny (nejlépe do samostatné místnosti) se specifickým materiálem (pipety, špičky atd.).
- Standardy (SP1–SP6) zpracovávajíte v oddělené místnosti

Uchovávání a nakládání s reagensy

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

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

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

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

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

Uchovávání a nakládání se vzorky

Vzorky plné krve je třeba zajistit proti koagulaci draselnou EDTA a uchovávat při 2–8°C před extrakcí RNA nejdéle 5 dnů.

Postup

Příprava vzorku RNA

Příprava RNA ze vzorků pacienta (kost nebo kostní dřeň) se musí provést validovaným postupem. Kvalita rozboru do velké míře závisí na kvalitě vstupní RNA. Proto doporučujeme provést kvalifikaci čištěné RNA elektroforézu agarozového gelu* pomocí Agilent® Bioanalyzer® nebo spektrofotometrií před analýzou†. □

Protokol: Reverzní transkripce pomocí reverzní transkriptázy SuperScript III

Tento protokol slouží k reverzní transkripci pomocí reverzní transkriptázy SuperScript III. Při použití sady *ipsogen* RT postupujte podle protokolu v Příručce sady *ipsogen* RT.

Věci, které je nutné udělat před zahájením

- Připravte dNTP, každý 10 mM. Uchovávejte v alikvotních množstvích při -20°C.

Postup

1. Nechte roztát všechny nezbytné komponenty a umístěte je na led.
2. Dobře promíchejte (ne ve vortexu) a krátce odstřed'ujte (přibližně 10 s, 10.000 ot/min pro shromáždění kapaliny na dně zkumavky). Pak uchovávejte na ledu.
3. Upravte vzorky RNA na 0,1 µg/µl. Pipetujte 10 µl (1 µg) každého vzorku RNA do samostatných, označených zkumavek. Pipetujte 10 µl vysoce pozitivní kontroly RNA, 10 µl kalibrátoru IS-MMR a 10 µl vody zbavené nukleázy (jako RT negativní kontrolu) do samostatných, označených zkumavek a zpracovávejte je paralelně se vzorky RNA, jak je dále popsáno.
4. Každý vzorek, kontrolu a kalibrátoru inkubujte (10 µl každý) po 5 min při 65°C a okamžitě chlad'te na ledu přibližně 5 min.

* Při práci s chemikáliemi vždy používejte vhodný laboratorní pláš't, rukavice na jedno použití a ochranné brýle.

† Optická hustota měřená při 260 a 280 nm: OD 1,0 při 260 nm je ekvivalentní přibližně 40 µg/ml jednovláknové RNA. Poměr A_{260}/A_{280} od 1,8 do 2,1 je známkou vysoce čištěné RNA.

5. Krátce odstřed'ujte (přibližně 10 sekund, 10.000 ot/min pro shromáždění kapaliny na dně zkumavky). Pak uchovávejte na ledu.
6. Připravte následující směs RT podle počtu zpracovávaných vzorků, kontrol a kalibrátoru (tabulka 1).

Tabulka 1. Příprava směsi RT

Komponenta	Objem na vzorek (μl)	Konečná koncentrace
Pufr prvního vlákna, 5X (dodávaný s reverzní transkriptázou SuperScript III)	5,0	1x
dNTP (10 mM každý, nutno připravit dříve a uchovávat při -20°C v alikvotních množstvích)	2,0	0,8 mM
Náhodný bezejmenný preparát (100 μM)	5,25	21 μM
RNaseOUT (40 U/μl)	0,5	0,8 U/μl
Reverzní transkriptáza SuperScript III (200 U/μl)	1,0	8 U/μl
DTT (dodávaný s reverzní transkriptázou SuperScript III)	1,25	–
Ohřátý vzorek RNA, kontrola, nebo kalibrátor IS-MMR (bude přidán v kroku 7)	10,0	40 ng/μl
Konečný objem	25,0	–

7. Do každé zkumavky PCR pipetujte 15 μl směsi RT. Pak přidejte 10 μl (1 μg) RNA vzorku, kontroly nebo kalibrátoru (od kroku 4).
8. Pečlivě promíchejte (ne ve vortexu) a krátce odstřed'ujte (přibližně 10 s, 10.000 ot/min pro shromáždění kapaliny na dně zkumavky).
9. Naprogramujte tepelný cyklovač pomocí programu reverzní transkripce, jak jsou uvedeny v tabulce 2.

Tabulka 2. Teplotní profil

Reverzní transkripce 1	Teplota: 25°C Čas: 10 min
Reverzní transkripce 2	Teplota: 50°C Čas: 60 min
Inaktivace	Teplota: 85°C Čas: 5 min
Chlazení	Teplota: 4°C Čas: 5 min

- 10. Vložte zkumavky do tepelného cyklovače a spusťte program tepelného cyklování, jak je uvedeno v tabulce 2.**
- 11. Po skončení programu odstřed'ujte krátce zkumavky (přibližně 10 s, 10.000 ot/min pro shromáždění kapaliny na dně zkumavky). Zkumavky uchovávejte na ledu nebo při -20°C, dokud nebude provede qPCR podle následujících protokolů v souladu se svým přístrojem qPCR.**

Poznámka: U přístrojů LightCycler 1.2, 1.5 a 2.0 každý preparát RT má cDNA pro dva chody qPCR.

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

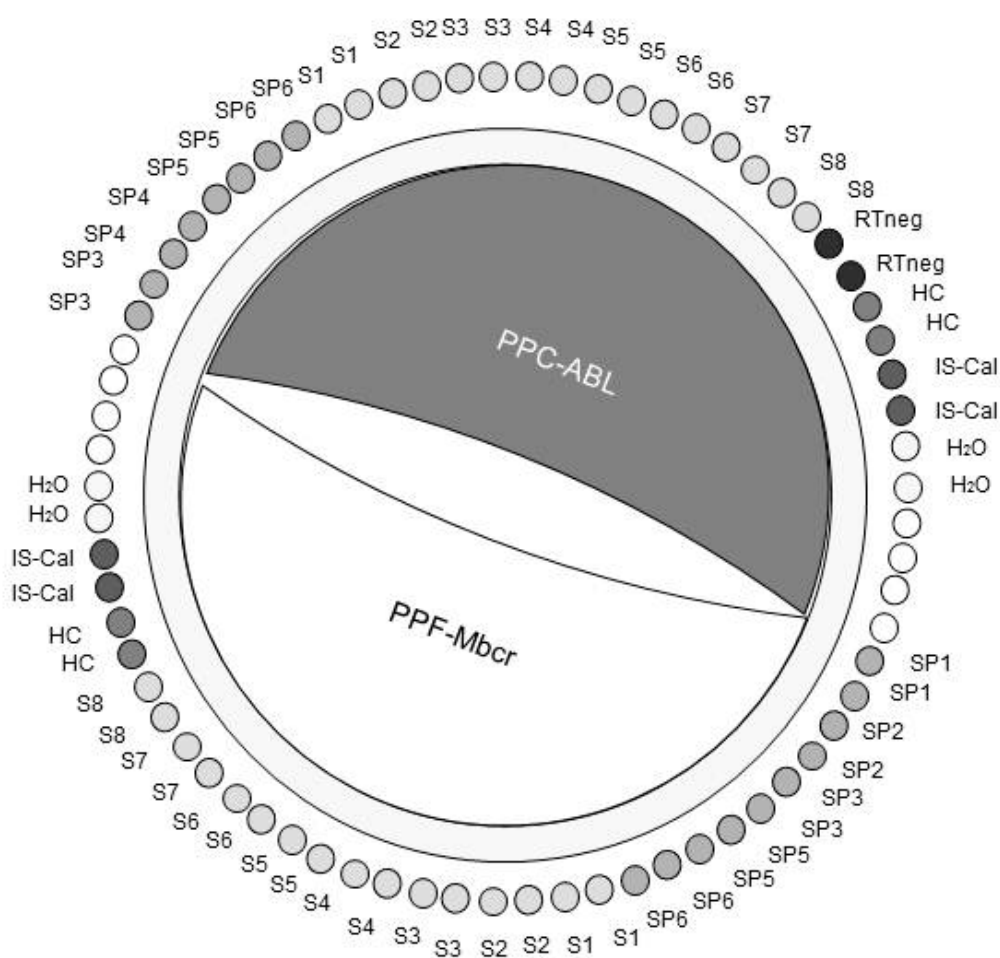
Při použití tohoto přístroje doporučujeme provádět všechna měření dvojmo, jak je uvedeno v tabulce 3. Sada je navržena pro 3 testování 8 různých vzorků cDNA ve stejném experimentu.

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

Vzorky	Reakce
S priméry ABL a směsí sond (PPC-ABL) (32 reakcí)	
8 vzorků cDNA	8 x 2 reakce
1 vysoce pozitivní kontrola cDNA	2 reakce
1 kalibrátor cDNA IS-MMR	2 reakce
Standardy jednotlivých plazmidů	2 x 4 reakce (SP3, SP4, SP5 a SP6, každý jednotlivě testován dvojmo)
Negativní kontrola RT	2 reakce
Kontrola vody	2 reakce
S priméry BCR-ABL Mbcr a směsí sond (PPF-Mbcr) (32 reakcí)	
8 vzorků cDNA	8 x 2 reakce
1 vysoce pozitivní kontrola cDNA	2 reakce
1 kalibrátor cDNA IS-MMR	2 reakce
Standardy jednotlivých plazmidů	2 x 5 reakcí (SP1, SP2, SP3, SP5 a SP6, každý jednotlivě testován dvojmo)
Kontrola vody	2 reakce

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

Doporučujeme testování nejméně 8 vzorků cDNA ve stejném experimentu s cílem optimalizovat použití standardů a primérů a směsí sond. Schéma rotoru na obrázku 4 ukazuje příklad takového experimentu.



Obrázek 4. Navrhované nastavení rotoru pro každý experiment se sadou *ipsogen* BCR-ABL1 Mbcr IS-MMR. SP1–SP6: BCR-ABL Mbcr a standardy ABL; HC: Vysoce pozitivní kontrola cDNA; IS-Cal: Kalibrátor IS-MMR; RTneg: Negativní kontrola RT; S: vzorek cDNA; H₂O: kontrola vody.

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

Všechny ostatní pozice zaplňte prázdnými zkumavkami.

Přístroje Rotor-Gene Q se 72zkumavkovým rotorem

Poznámka: Všechny úkony provádějte na ledu.

Postup

1. Nechte roztát všechny nezbytné komponenty a umístěte je na led.
2. Vortexujte standardy, PPF-Mbcr a zkumavky PPC-ABL a krátce odstředujte (přibližně 10 s, 10.000 ot/min pro shromáždění kapaliny na dně zkumavky).

3. Připravte následující směs qPCR podle počtu zpracovávaných vzorků.

Všechny koncentrace platí pro konečný objem reakce.

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

Tabulka 4. Příprava směsi qPCR

Komponenta	1 reakce (μ l)	ABL: 32+1 reakce (μ l)	BCR-ABL Mbcr: 32+1 reakce (μ l)	Konečná koncentrace
<i>Premix Ex Taq</i> , 2x	12,5	412,5	412,5	1x
Priméry a směs sond, 25x	1	33	33	1x
Voda pro PCR bez nukleázy	6,5	214,5	214,5	–
Vzorek (bude přidán v kroku 5)	5	5 každý	5 každý	–
Celkový objem	25	25 každý	25 každý	–

4. Dávkuje 20 μ l premixu qPCR na zkumavku.
5. V jiném místě v laboratoři a s vyčleněným zařízením přidejte 5 μ l produktu RT (cDNA, ekvivalent 200 ng RNA) získaného v rámci reverzní transkripce (viz “Protokol: Reverzní transkripce pomocí reverzní transkriptázy SuperScript III”, strana 13) v odpovídající zkumavce (celkový objem 25 μ l).
6. Jemně promíchejte pipetováním nahoru a dolů.
7. Uzavřete všechny zkumavky a vložte je do tepelného cyklovače podle doporučení výrobce.
8. Naprogramujte přístroj Rotor-Gene Q pomocí programu tepelných cyklů, jak jsou uvedeny v tabulce 5.

Tabulka 5. Teplotní profil

Režim analýzy	Kvantifikace
Držet 1	Teplota: 95°C Čas: 10 s
Cyklování	50krát 95°C po 5 s 62°C po 30 s se snímáním fluorescence FAM v kanálu Zelená: Jednotlivý
Držet 2	Teplota: 36°C Čas: 1 min

9. Klikněte na „Gain Optimisation“ (Optimalizace zisku) v dialogovém okně „New Run Wizard“ (Průvodce novým zpracováním), abyste otevřeli dialogové okno „Auto-Gain Optimisation Setup“ (Nastavení automatické optimalizace zisku). Nastavte rozsah pro zelený kanál od „5 FI“ pro „Min Reading“ až „10 FI“ pro „Max Reading“ a přijatelný rozsah zisku od -10 do 10.
10. Zaškrtněte políčko „Perform Optimisation Before 1st Acquisition“ (Provést optimalizaci před prvním pořízením) a uzavřete dialogové okno „Auto-Gain Optimisation Setup“ (Nastavení automatické optimalizace zisku).
11. Spusťte tepelné cyklování.
12. Pro analýzu zvolte „Slope Correct“ (Správný sklon). Doporučujeme nastavit prahovou hodnotu na 0,03.

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

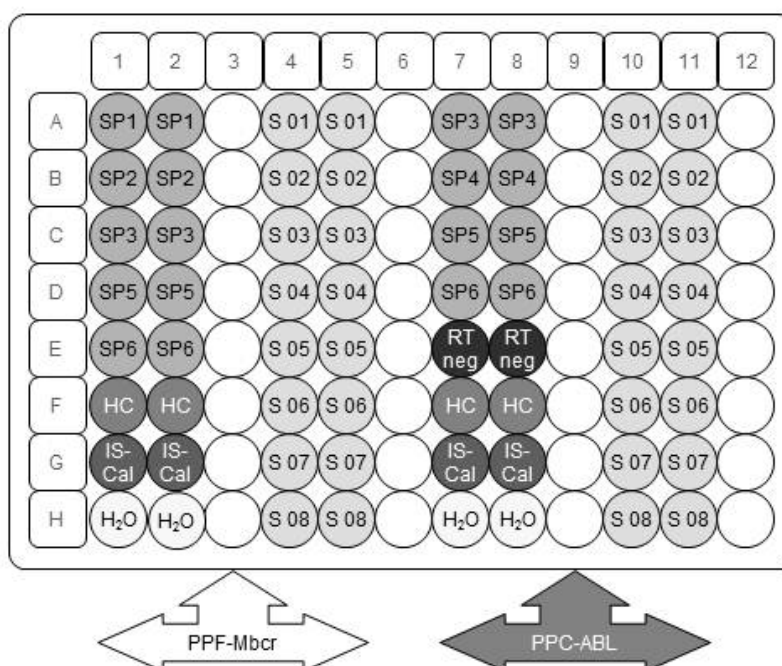
Při použití zařízení qPCR s deskou o 96 jamkách doporučujeme provádět všechna měření dvojnásobně, jak je uvedeno v tabulce 6. Sada je navržena pro 3 testování 8 různých vzorků cDNA ve stejném experimentu.

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

Vzorky	Reakce
S priméry ABL a směsí sond (PPC-ABL) (32 reakcí)	
8 vzorků cDNA	8 x 2 reakce
1 vysoce pozitivní kontrola cDNA	2 reakce
1 kalibrátor cDNA IS-MMR	2 reakce
Standardy jednotlivých plazmidů	2 x 4 reakce (SP3, SP4, SP5 a SP6, každý jednotlivě testován dvojnásobně)
Negativní kontrola RT	2 reakce
Kontrola vody	2 reakce
S priméry BCR-ABL Mbc a směsí sond (PPF-Mbc) (32 reakcí)	
8 vzorků cDNA	8 x 2 reakce
1 vysoce pozitivní kontrola cDNA	2 reakce
1 kalibrátor cDNA IS-MMR	2 reakce
Standardy jednotlivých plazmidů	2 x 5 reakcí (SP1, SP2, SP3, SP5 a SP6, každý jednotlivě testován dvojnásobně)
Kontrola vody	2 reakce

Zpracování vzorků na přístrojích Applied Biosystems, ABI PRISM a LightCycler 480

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



Obrázek 5. Navrhované nastavení desky pro jeden experiment se sadou *ipsogen* BCR-ABL1 Mbcr IS-MMR. SP1–SP6: BCR-ABL Mbcr a standardy ABL; HC: Vysoce pozitivní kontrola cDNA; IS-Cal: Kalibrátor IS-MMR; RTneg: Negativní kontrola RT; S: vzorek cDNA; H₂O: kontrola vody.

qPCR na přístrojích Applied Biosystems, ABI PRISM a LightCycler 480

Poznámka: Všechny úkony provádějte na ledu.

Postup

1. Nechte roztát všechny nezbytné komponenty a umístěte je na led.
2. Vortexujte standardy, ROX, zkumavky PPF-Mbcr a PPC-ABL a krátce odstředujte (přibližně 10 s, 10.000 ot/min pro shromáždění kapaliny na dně zkumavky).
3. Připravte následující směs qPCR podle počtu zpracovávaných vzorků. Pokud použijete zařízení qPCR s 96 jamkami na desce, doporučujeme provádět všechna měření dvojmo.

Všechny koncentrace platí pro konečný objem reakce.

Tabulka 7 popisuje pipetovací schéma pro přípravu jedené směsi reagentů pro přístroje Applied Biosystems a ABI PRISM vypočítané pro dosažení konečného reakčního objemu 25 µl. Tabulka 8 popisuje pipetovací schéma pro přípravu jedené směsi reagentů pro přístroj LightCycler 480 vypočítané pro dosažení konečného reakčního objemu 25 µl. Premix lze připravit podle počtu reakcí pomocí stejných primérů a

směsi sond (buď PPC-ABL, nebo PPF-Mbcr). Zahrnuty jsou objemy navíc pro kompenzaci chyby při pipetování.

Tabulka 7. Příprava směsi qPCR pro přístroje Applied Biosystems a ABI PRISM

Komponenta	1 reakce (μl)	ABL: 32+1 reakce (μl)	BCR-ABL Mbcr: 32+1 reakce (μl)	Konečná koncentrace
<i>Premix Ex Taq, 2x</i>	12,5	412,5	412,5	1x
Priméry a směs sond, 25x	1	33	33	1x
Barvivo ROX I, 50x (ABI PRISM 7900HT) nebo barvivo ROX II, 50x (Applied Biosystems 7500)	0,5	16,5	16,5	1x
Voda pro PCR bez nukleázy	6	198	198	–
Vzorek (bude přidán v kroku 5)	5	5 každý	5 každý	–
Celkový objem	25	25 každý	25 každý	–

Tabulka 8. Příprava směsi qPCR pro LightCycler 480

Komponenta	1 reakce (μl)	ABL: 32+1 reakce (μl)	BCR-ABL Mbc: 32+1 reakce (μl)	Konečná koncentrace
<i>Premix Ex Taq, 2x</i>	12,5	412,5	412,5	1x
Priméry a směs sond, 25x	1	33	33	1x
Voda pro PCR bez nukleázy	6,5	214,5	214,5	–
Vzorek (bude přidán v kroku 5)	5	5 každý	5 každý	–
Celkový objem	25	25 každý	25 každý	–

4. **Dávkujte 20 μl premixu qPCR na jamku.**
5. **V jiném místě v laboratoři a s vyčleněným zařízením přidejte 5 μl produktu RT (cDNA, ekvivalent 200 ng RNA) získaného v rámci reverzní transkripce (viz “Protokol: Reverzní transkripce pomocí reverzní transkriptázy SuperScript III”, strana 13) v odpovídající jamce (celkový objem 25 μl).**
6. **Jemně promíchejte pipetováním nahoru a dolů.**
7. **Uzavřete desku a krátce odstřed'ujte (300 x g, přibližně 10 s).**
8. **Desku vložte do tepelného cyklovače podle doporučení výrobce. Naprogramujte tepelný cyklovač pomocí programu tepelného cyklování, jak je to uvedeno v tabulce 9 pro přístroje Applied Biosystems a ABI PRISM nebo v tabulce 10 pro přístroj LightCycler 480.**

Tabulka 9. Teplotní profil pro přístroje Applied Biosystems a ABI PRISM

Režim analýzy	Standardní křivka — absolutní kvantifikace
Držet 1	Teplota: 95°C Čas: 10 s
Cyklování	50krát 95°C po 5 s 60°C po 30 s se snímáním fluorescence FAM: Jednotlivý, zhášecí látka: TAMRA
Držet 2	Teplota: 36°C Čas: 1 min

Tabulka 10. Teplotní profil pro přístroj LightCycler 480

Režim analýzy	Absolutní kvantifikace ("Abs Quant")
Detekční formáty	Vyberte "Samostatná sonda" v okně Detekční formáty
Držet 1	Teplota: 95°C Čas: 10 s
Cyklování	50krát 95°C po 5 s 60°C po 30 s se snímáním fluorescence FAM odpovídající (483–533 nm) pro LC verzi 01 a (465–510 nm) pro LC verzi 02
Držet 2	Teplota: 36°C Čas: 1 min

- 9. U přístrojů Applied Biosystems 7500 a ABI PRISM 7900HT SDS postupujte podle kroku 9a. U přístroje LightCycler 480 postupujte podle kroku 9b.**
- 9a. Applied Biosystems a ABI PRISM: Doporučujeme nastavení prahu na 0,1 v analytickém kroku přístroje. Spust'ete program cyklování, jak je uvedeno v tabulce 9.**
- 9b. Přístroj LightCycler 480: Doporučujeme režim analýzy Bod vhodnosti s pozadím na 2,0 a prahovou hodnotou 2,0. Spust'ete program tepelného cyklování, jak je uvedeno v tabulce 10.**

Protokol: qPCR na přístrojích LightCycler 1.2, 1.5 a 2.0

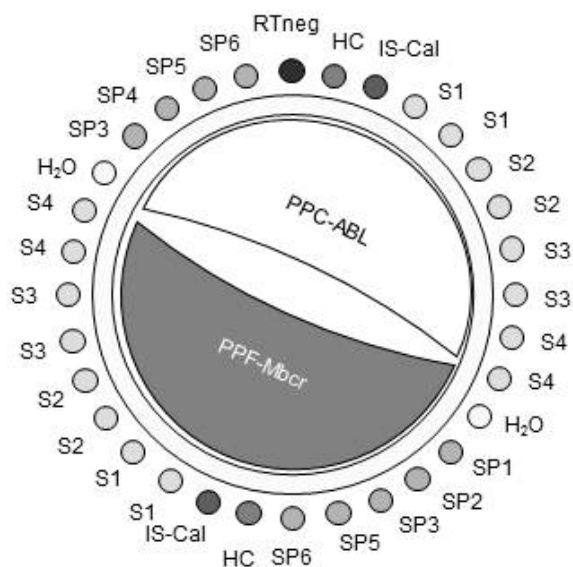
Při použití kapilárních přístrojů doporučujeme měřit vzorky dvojmo a kontroly pouze jednou, jak je uvedeno v tabulce 11. Sada je navržena pro 6 testování 4 různých vzorků cDNA ve stejném experimentu.

Tabulka 11. Počet reakcí pro přístroje LightCycler 1.2, 1.5 a 2.0

Vzorky	Reakce
S priméry ABL a směsí sond (PPC-ABL) (16 reakcí)	
4 vzorků cDNA	4 x 2 reakce
1 vysoce pozitivní kontrola cDNA	1 reakce
1 kalibrátor cDNA IS-MMR	1 reakce
Standardy jednotlivých plazmidů	1 x 4 reakce (SP3, SP4, SP5 a SP6)
Negativní kontrola RT	1 reakce
Kontrola vody	1 reakce
S priméry BCR-ABL Mbc r a směsí sond (PPF-Mbc r) (16 reakcí)	
4 vzorků cDNA	4 x 2 reakce
1 vysoce pozitivní kontrola cDNA	1 reakce
1 kalibrátor cDNA IS-MMR	1 reakce
Standardy jednotlivých plazmidů	1 x 5 reakce (SP1, SP2, SP3, SP5 a SP6)
Kontrola vody	1 reakce

Zpracování vzorku na přístrojích LightCycler 1.2, 1.5 a 2.0

Doporučujeme testování nejméně 4 vzorků cDNA ve stejném experimentu s cílem optimalizovat použití standardů a primérů a směsí sond. Kapilární schéma na obrázku 6 ukazuje příklad experimentu.



Obrázek 6. Navrhované nastavení rotoru pro každý experiment se sadou *ipsogen* BCR-ABL1 Mbcr IS-MMR. SP1–SP6: BCR-ABL Mbcr a standardy ABL; HC: Vysoce pozitivní kontrola cDNA; IS-Cal: Kalibrátor IS-MMR; RTneg: Negativní kontrola RT; S: vzorek cDNA; H₂O: kontrola vody.

qPCR na přístrojích LightCycler 1.2, 1.5 a 2.0

Poznámka: Všechny úkony provádějte na ledu.

Postup

1. Nechte roztát všechny nezbytné komponenty a umístěte je na led.
2. Vortexujte standardy, PPF-Mbcr a zkumavky PPC-ABL a krátce odstředujte (přibližně 10 s, 10.000 ot/min pro shromáždění kapaliny na dně zkumavky).
3. Připravte následující směs qPCR podle počtu zpracovávaných vzorků.

Všechny koncentrace platí pro konečný objem reakce.

Tabulka 12 popisuje pipetovací schéma pro přípravu jedené směsi reagensů vypočítané pro dosažení konečného reakčního objemu 20 µl. Premix lze připravit podle počtu reakcí pomocí stejných primérů a směsi sond (buď PPC-ABL, nebo PPF-Mbcr). Zahrnutý jsou objemy navíc pro kompenzaci chyby při pipetování.

Tabulka 12. Příprava směsi qPCR pro přístroje LightCycler 1.2, 1.5 a 2.0

Komponenta	1 reakce (μl)	ABL: 16+1 reakce (μl)	BCR-ABL Mbc: 16+1 reakce (μl)	Konečná koncentrace
Premix Ex Taq, 2x	10	170	170	1x
Priméry a směs sond, 25x	0,8	13,6	13,6	1x
Voda pro PCR bez nukleázy	4,2	71,4	71,4	–
Vzorek (bude přidán v kroku 5)	5	5 každý	5 každý	–
Celkový objem	20	20 každý	20 každý	–

4. **Dávkujte 15 μl premixu qPCR na kapiláru.**
5. **V jiném místě v laboratoři a s vyčleněným zařízením přidejte 5 μl produktu RT (cDNA, ekvivalent 200 ng RNA) získaného v rámci reverzní transkripce (viz “Protokol: Reverzní transkripce pomocí reverzní transkriptázy SuperScript III”, strana 13) v odpovídající kapiláře (celkový objem 20 μl).**
6. **Jemně promíchejte pipetováním nahoru a dolů.**
7. **Umístěte kapiláry do adaptérů dodávaných s přístrojem, krátce odstředujte (700 x g, přibližně 10 s).**
8. **Kapiláry vložte do tepelného cyklovače podle doporučení výrobce.**
9. **Naprogramujte přístroje LightCycler 1.2, 1.5 nebo 2.0 pomocí programu tepelných cyklů, jak jsou uvedeny v tabulce 13.**

Tabulka 13. Teplotní profil

Režim analýzy	Kvantifikace
Držet 1	Teplota: 95°C Čas: 10 s Nárůst: 20
Cyklování	50 krát 95°C po 5 s; nárůst: 20 60°C po 30 s; nárůst: 20; se snímáním fluorescence FAM: Jednotlivý
Držet 2	Teplota: 36°C Čas: 1 min Nárůst: 20

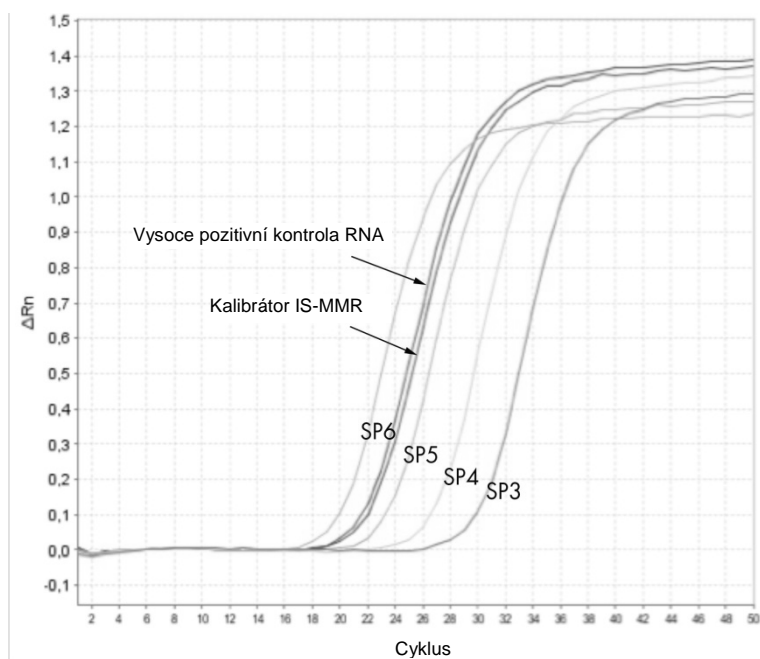
- 10. U přístrojů LightCycler 1.2 a 1.5 postupujte podle kroku 10a. U přístroje LightCycler 2.0 postupujte podle kroku 10b.**
- 10a. LightCycler 1.2 a 1.5: Doporučuje se F1/F2 a režim "analýzy založené na 2. derivaci". Spust'te program tepelného cyklování, jak je uvedeno v tabulce 13.**
- 10b. LightCycler 2,0: Doporučujeme použití Automatické analýzy (F''max) na softwaru LightCycler 2.0, verze 4.0 pro získání reprodukovatelných výsledků. Spust'te program tepelného cyklování, jak je uvedeno v tabulce 13.**

Interpretace výsledků

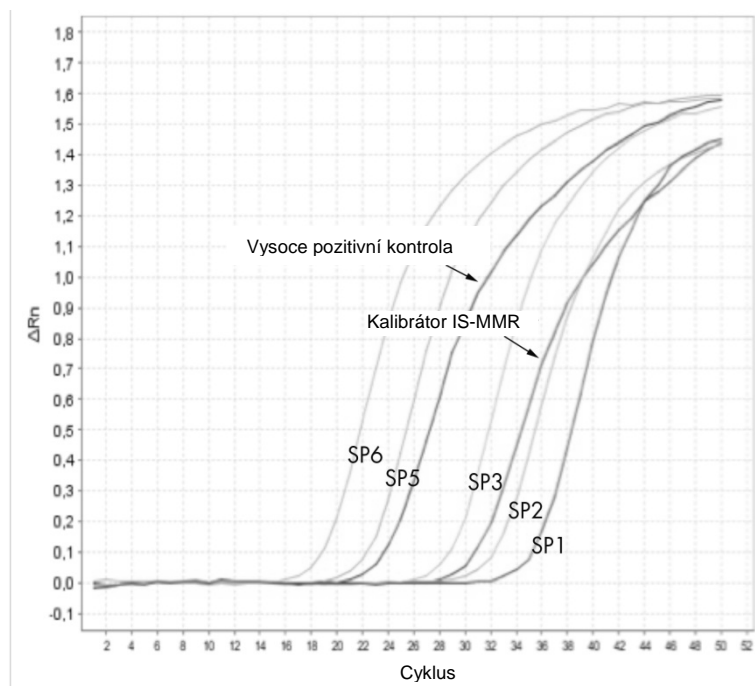
Princip datové analýzy

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

Pomocí standardů se známým počtem molekul můžete vytvořit standardní křivku a stanovit přesné množství cílové látky přítomné v testovacím vzorku. Standardní křivky *ipsogen* jsou založeny na plazmidu. Aby se zajistily přesné standardní křivky, používáme 4 standardní ředění pro ABL a 5 standardních ředění Mbc. Sada rovněž obsahuje kalibrátor IS-MMR umožňující konverzi výsledků podle mezinárodní stupnice. Obrázky 7 a 8 ukazují příklady amplifikačních křivek TaqMan získaných pro standardy, kalibrátor IS-MMR a vysoce pozitivní kontrolu RNA se sadou *ipsogen* BCR-ABL1 Mbc IS-MMR.



Obrázek 7. Detekce ABL pomocí standardů SP3, SP4, SP5 a SP6. 10^3 , 10^4 , 10^5 a 10^6 kopií/5 μ l.



Obrázek 8. Detekce BCR-ABL MbcR pomocí standardů SP1, SP2, SP3, SP5 a SP6. 10^1 , 10^2 , 10^3 , 10^5 , 10^6 kopií/5 μ l.

Standardní křivky a kritéria jakosti platná pro surová data

Reprodukovatelnost mezi replikáty

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

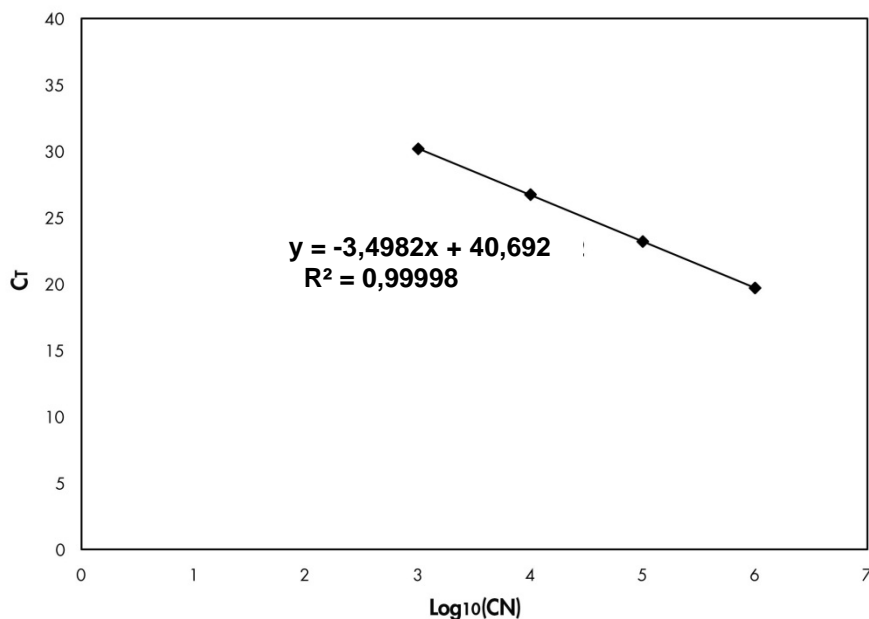
Variace hodnot C_T mezi replikáty je obecně $<1,5$, pokud bude hodnota C_T replikátů <36 (7).

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

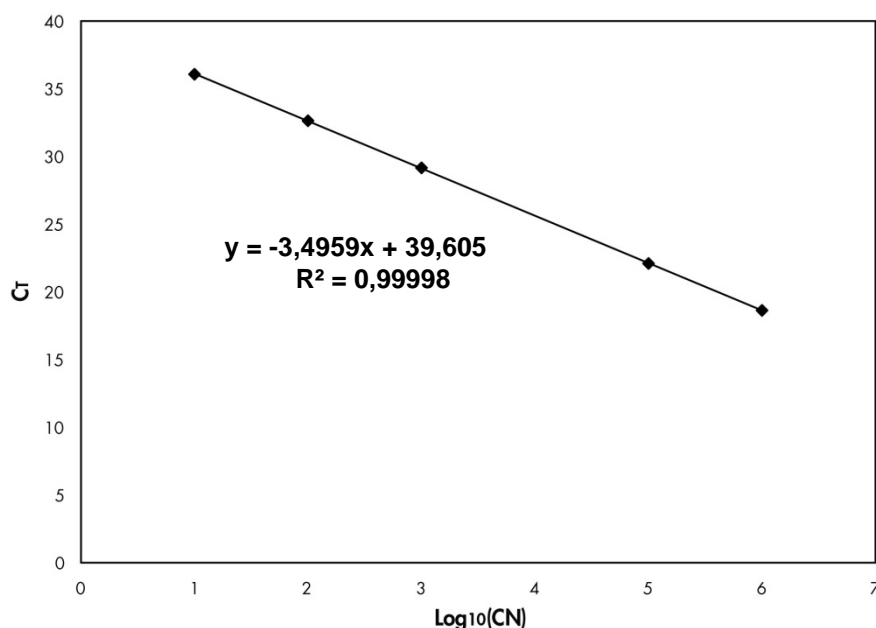
Standardní křivky

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

Pro každý gen (ABL a BCR-ABL) se surové hodnoty C_T získané z naředění plazmidových standardů vynášejí podle logaritmu počtu kopií (3, 4, 5 a 6 pro SP3, SP4, SP5 a SP6; 1, 2, 3, 5 a 6 pro SP1, SP2, SP3, SP5 a SP6). Obrázek 9 ukazuje příklad teoretické standardní křivky ABL vypočítané ze 4 standardních ředění. Obrázek 10 ukazuje příklad teoretické standardní křivky BCR-ABL vypočítané ze 5 standardních ředění.



Obrázek 9. Teoretická standardní křivka pro ABL vypočítaná ze 4 standardních ředění. Vypočítá se přímka lineární regrese ($y = ax + b$), kde a je sklon přímky a b je průsečík s osou y , což je souřadnice y bodu, kdy přímka protíná osu y . Její rovnice a koeficient stanovení (R^2) se vytiskne do grafu.



Obrázek 10. Teoretická standardní křivka pro BCR-ABL vypočítaná ze 5 standardních ředění. Vypočítá se přímka lineární regrese ($y = ax + b$), kde a je sklon přímky a b je průsečík s osou y , což je souřadnice y bodu, kdy přímka protíná osu y . Její rovnice a koeficient stanovení (R^2) se vytiskne do grafu.

Jako standardy slouží 10násobná ředění, teoretický sklon křivky je -3,3. Sklon od -3,0 do -3,9 je přijatelný, pokud je $R^2 > 0,95$ (7). Ovšem hodnota $R^2 > 0,98$ je žádoucí pro přesné výsledky (3).

Poznámka: Standardní ředění SP1 (plazmid BCR-ABL, 10 kopií) se musí detekovat a zahrnout do standardní křivky BCR-ABL.

Kontrola kvality u všech hodnot ABL

Špatná kvalita RNA nebo problémy během kroků qPCR má za následek nízký počet kopií ABL (ABL_{CN}). Optimální citlivosti se dosahuje vzorky poskytujícími $ABL_{CN} \geq 10.000$ kopií. Toto kritérium pro ABL_{CN} se rovněž vztahuje na vysoce pozitivní kontrolu RNA a kalibrátor IS-MMR.

Negativní kontroly RT a kontroly vody

Žádné kontroly templátů (NTC) pro krok PCR (kontrola vody) a krok reverzní transkripce (negativní kontrola RT) by neměly dávat nulovou CN jak pro ABL, tak pro BCR-ABL M_{bcr}. Pozitivní výsledek pro tyto NTC signalizují zkříženou kontaminací během reverzní transkripce a/nebo aPCR.

Normalizovaný počet kopií (NCN)

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

Standardní rovnice křivky BCR-ABL by se měla použít pro transformaci surových hodnot C_T (získaných pomocí PPF-M_{bcr}) pro neznámé vzorky do počtu kopií ABL (BCR-ABL M_{bcr} $_{CN}$).

Poměr těchto hodnot CN dává normalizovaný počet kopií (NCN):

$$NCN = \frac{BCR-ABL M_{bcr}_{CN}}{ABL_{CN}} \times 100$$

Vypočítejte výsledek NCN pro vysoce pozitivní kontrolu RNA (NCN_{HC}), kalibrátor ISMMR (NCN_{cal}) a každý vzorek (NCN_{vzorek}).

Vysoce pozitivní kontrola RNA a kalibrátor IS-MMR

Tyto kontroly umožňují sledování kroku reverzní transkripce a amplifikace ABL a BCR-ABL M_{bcr} během kvantifikace transkripce.

Kontrola kvality u výsledku NCN_{cal}

Poznámka: Výsledek NCN získaný pro kalibrátor IS-MMR, testovaný sadou *ipsogen* BCR-ABL M_{bcr} IS-MMR v kombinaci s validovanými reagenciemi a přístroji (viz "Dodávané materiály", strana 9, a "Požadované materiály, které nejsou součástí dodávky", strana 10), musí ležet v intervalu 0,05-0,3. Jinak hodnoty NCN nelze konvertovat do mezinárodní stupnice. Navíc se celý experiment musí odmítnout, pokud nebude detekována vysoce pozitivní kontrola RNA.

Konverze IS a hlášení MMR

Poznámka: Před interpretací se seznamte s hodnotami vyznačenými na štítku zkumavky kalibrátoru IS-MMR nebo na osvědčení o analýze dodávanému se sadou.

Použijte experimentální NCN výsledek kalibrátoru IS-MMR (NCN_{cal}) a jeho přiřazenou hodnotu (hodnota IS-Cal) vyznačenou na osvědčení o analýze pro výpočet normalizovaného počtu kopií na mezinárodní stupnici (IS- NCN_{vzorek}).

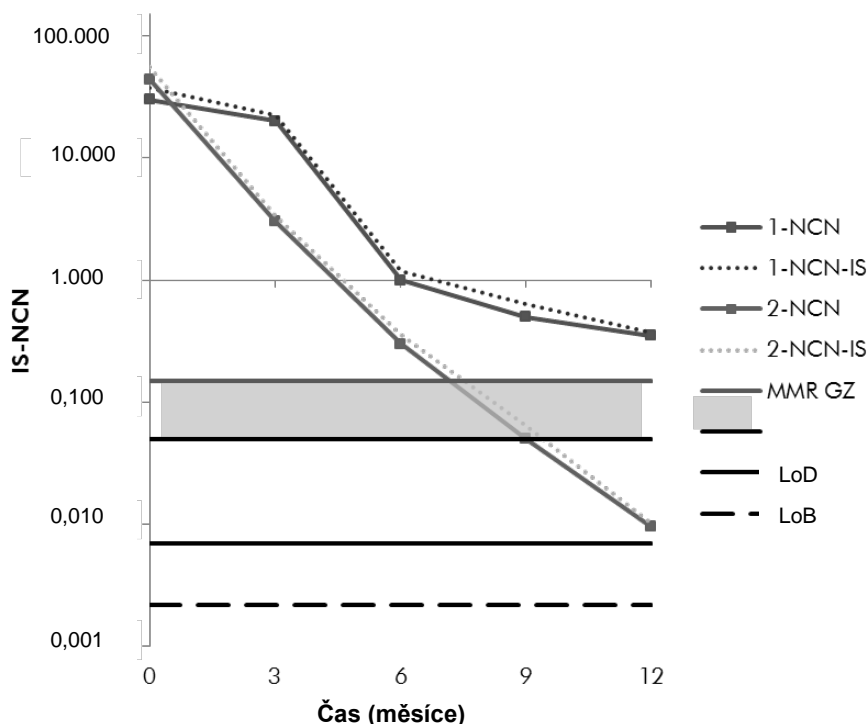
$$IS-NCN_{vzorek} = \frac{NCN_{vzorek} \times \text{hodnota IS-Cal}}{NCN_{cal}}$$

Určete stav MMR každého vzorku podle následujících kritérií.

- **IS- $NCN_{vzorek} \leq 0,05$:** Hlavní molekulární odezva
- **$0,05 < IS-NCN_{vzorek} < 0,15$:** Šedá zóna okolo doregulování MMR, nejednoznačný výsledek
- **IS- $NCN_{vzorek} \geq 0,15$:** Žádná hlavní molekulární odezva

Výsledek IS- NCN_{HC} (NCN na mezinárodní stupnici pro vysoce pozitivní kontrolu RNA) by neměl poskytnout hlavní molekulární odezvu.

Obrázek 11 ukazuje příklad sledování pacienta pomocí výsledků NCN a IS-NCN.



Obrázek 11. Sledování křivek pro stav pacienta MMR pomocí sady *ipsogen* BCR-ABL1 Mbcr IS-MMR. NCN: normalizovaný počet kopií; **NCN-IS:** mezinárodní stupnic normalizovaného počtu kopií; **MMR GZ:** Nejednoznačný výsledek (GZ) šedé zóny MMR; **LoD:** mez detekce; **LoB:** úroveň pozadí.

Souhrn kritérií jakosti

Tabulka 14 shrnuje různá kritéria jakosti a související hodnoty nebo výsledky.

Tabulka 14. Souhrn kritérií jakosti

Kritéria	Přijatelné hodnoty/výsledky
Odchyšky v hodnotách C_T mezi replikáty	$\leq 2 C_T$, pokud průměrná hodnota $C_T > 36$ $\leq 1,5 C_T$, pokud průměrná hodnota $C_T \leq 36$
Sklon standardních křivek	Od -3,0 do -3,9
R^2 pro standardní křivky	Přinejmenším $> 0,95$ lepší, pokud $> 0,98$
Standardní ředění SP1 (10 kopií plazmidu BCR-ABL)	Musí se detekovat a zahrnout do standardní křivky
Kontrola kvality u hodnoty ABL_{CN} pro vzorky pacientů, vysoce pozitivní kontrola RNA a kalibrátor IS-MMR	$ABL_{CN} > 10,000$ kopií ABL pro dosažení optimální citlivosti
Kontrola PCR (voda) a kontroly reverzní transkripce (RT negativní)	Pro každé $ABL_{CN} = 0$ a $Mbcr_{CN} = 0$
NCN získané pro kalibrátor IS-MMR (NCN_{cal})	Musí ležet v intervalu 0,05-0,3
Vysoce pozitivní kontrola RNA	Musí být detekován
NCN získané pro vysoce pozitivní kontrolu RNA konvertovaný do mezinárodní stupnice ($IS-NCN_{HC}$)	Stav: Žádná hlavní molekulární odezva

Odstraňování poruch

Více informací lze získat na internetové stránce naší technické podpory: www.qiagen.com/FAQ/FAQList.aspx. Vědci z technické podpory QIAGEN vždy rádi zodpoví Vaše otázky ohledně informací a protokolu v tomto manuálu nebo přípravy vzorků a jejich technologií rozborů (možnosti navázání kontaktu viz "Kontaktní informace", strana 41).

Řízení jakosti

V souladu s certifikovaným systémem ISO řízení jakosti výrobků společnosti QIAGEN je každá výrobní šarže souprav *ipsogen* BCR-ABL1 Mbc IS-MMR Kit testována podle předem stanovených specifikací, aby byla zajištěna konzistentní kvalita produktu. Certifikáty analýzy jsou k dispozici na požádání na stránkách www.qiagen.com/support/.

Omezení

Uživatelé musí být školeni a obeznámeni s touto technologií před použitím tohoto zařízení.

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

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

Poznámka: Sada byla navržena podle studií "Europe Against Cancer" (EAC - Evropa proti rakovině) (8, 9) a je ve shodě s aktualizovanými mezinárodními doporučeními. Sada obsahuje kalibrátor IS-MMR standardizovaný podle mezinárodní stupnice, která umožňuje konvertovat výsledky NCN do mezinárodní stupnice a vykazovat stav MMR (hlavní molekulární odezva).

Každá šarže kalibrátoru IS-MMR má přiřazenou hodnotu přímo odvozenou z kalibrace vůči primárnímu referenčnímu materiálu certifikovanému NIBSC WHO (Mezinárodní genetický referenční panel pro kvantifikaci translokace BCR-aBL pomocí RQ-PCR (1. I.S.), ref. 09/138).

S každou sadou se dodává osvědčení o analýze uvádějící přiřazenou hodnotu kalibrátoru IS-MMR.

Sada by se měla použít podle pokynů uvedených v této příručce v kombinaci s validovanými reagentiemi a přístroji (viz "Požadované materiály, které nejsou součástí dodávky", strana 10). Jakékoliv použití tohoto výrobku mimo schválené indikace a/nebo úprava komponent zneplatní závazky QIAGEN.

Výkonnostní charakteristiky

Poznámka: Charakteristiky chování byly zjištěny pomocí Applied Biosystems 7500 Real-Time PCR System v kombinaci se sadou *ipsogen* BCR-ABL Mbc IS-MMR a validovanými přídatnými reagentiemi (viz "Požadované materiály, které nejsou součástí dodávky", strana 10).

Mez slepého pokusu a mez detekce

Mez slepého pokusu (LoB) a mez detekce (LoD) byly stanoveny podle směrnice CLSI/NCCLS EP17-A.

Úroveň pozadí (LoB) byla stanovena na negativních vzorcích od zdravých dárců (11 vzorků, 69 měření) a bylo zjištěno, že je rovna 0,0022 BCR-ABL Mbcr NCN.

Mez detekce (LoD nebo analytická citlivost) byla stanovena u známých nízkých pozitivních vzorků (n = 8, 74 měření) a je rovna 0,0069 BCR-ABL Mbcr NCN.

- **NCN ≤LoB:** BCR-ABL Mbcr nebyla stanovena
- **LoB <NCN <LoD:** BCR-ABL Mbcr stanovena ale nekvantifikována
- **NCN ≥LoD:** BCR-ABL Mbcr kvantifikována

Linearita

Linearita byla stanovena podle směrnice CLSI/NCCLS EP6-A.

Studie byla provedena ve směsích pozitivní a negativní RNA extrahované z buněčných linií. Jedenáct různých úrovní bylo testováno trojmo. Výsledky získané u těchto vzorků ukazují, že rozbor *ipsogen* BCR-ABL Mbcr IS-MMR je lineární v rozsahu od 0,003 do 65 BCR-ABL Mbcr NCN.

Vstupy

Pro studii bylo vybráno pět různých RNA s různými hladinami NCN BCR-ABL Mbcr. Byla testována různá množství RNA a cDNA pro vyhodnocení dopadu vstupu na výsledky NCN. Výsledky ukázaly, že odchylka vstupu RNA má omezený dopad na výsledky NCN, zatímco vstup cDNA je mnohem senzitivnějším faktorem, pokud se použije více či méně materiálu. Proto se k provedení testu doporučuje vstup 1 µg RNA a 5 µl cDNA.

Přesnost

Přesnost byla stanovena podle směrnice CLSI/NCCLS EP5-A2.

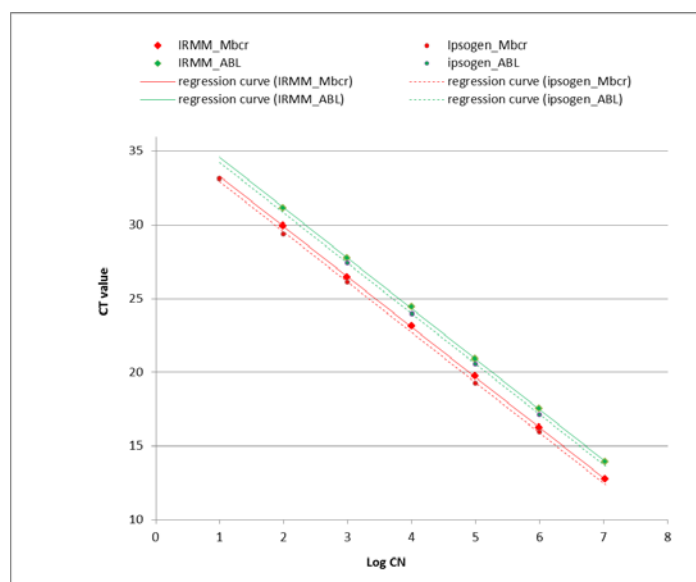
Studie přesnosti byla provedena na 13 různých vzorcích testovaných 42krát dvojmo (n = 84). Tyto vzorky představovaly různou úroveň exprese BCR-ABL Mbcr ve vzorcích pacientů okolo hodnoty MMR a nad ní. Globální variační koeficient pro hodnotu MMR by roven 25 %.

Studie pro vyhodnocení shody: Jednoplazmidový standard ERM-AD623 BCR-ABL1 (IRMM) ve srovnání s jednoplazmidovým standardem *ipsogen* (QIAGEN)

Nejnovější pracovní definice molekulární odpovědi BCR-ABL1 Mbcr u chronické myeloidní leukémie (CML) podává ELN/EUTOS Molecular Monitoring Steering Group, která doporučuje použití plazmidu ERM-AD623 BCR-ABL1 (IRMM, Belgie): Cross, N.C., et al. Laboratory recommendations for scoring deep molecular responses following treatment for chronic myeloid leukemia (2015) *Leukemia*. **29**, 999.

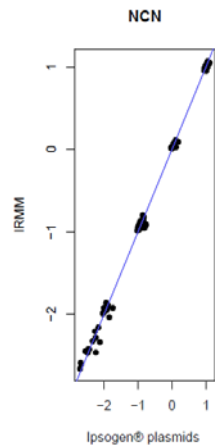
Aby bylo možné vyhovět tomuto doporučení, společnost QIAGEN provedla studii pro vyhodnocení shody, ve které srovnala vícecílový jednoplazmidový standard *ipsogen* používaný v soupravě *ipsogen* BCR-ABL1 Mbcr IS-MMR (24) CE (kat. č. 670723) s plazmidem ERM-AD623 BCR-ABL1 (IRMM).

Srovnání bylo založeno na poměru normalizovaného počtu kopií BCR-ABL1 Mbcr/ABL1 (NCN) dosaženého testováním jednoho z ředění standardů (*ipsogen* nebo ERM-AD623 BCR-ABL1) na kontrolních vzorcích zařazených do souprav *ipsogen* a na certifikovaném kontrolním materiálu od NIBSC: 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.



Regresní křivka
Hodnota C_T
Log CN

Obrázek 12. Srovnání křivek plazmidových standardů *ipsogen* a ERM-AD623 BCR-ABL1.



NCN
IRMM
Plazmidy *ipsogen*®

Souprava *ipsogen* BCR-ABL1 Mbcr IS-MMR.

Obrázek 13. Hodnoty ERM-AD623 BCR-ABL1 ve srovnání s hodnotami *ipsogen* NCN.

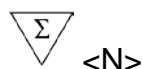
Závěrem studie QIAGEN je, že neexistuje žádný statistický rozdíl: jednoplazmidový standard ERM-AD623 BCR-ABL1 a jednoplazmidový standard *ipsogen* vykazují stejné výsledky.

Literatura

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., 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.
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. 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.

Symbols

On labels and stickers you may find the following symbols:



Contains reagents for <N> reactions



Use for



Reagents for in vitro diagnostic techniques



Catalog number



Batch number



Material number



International trade item number GTIN



Temperature range



Manufacturer



Further information see user manual

Contact information

For technical support and more information, visit the technical support center at the address www.qiagen.com/Support, call 00800-22-44-6000, contact one of the technical service departments of QIAGEN or our local distributors (see the last page of the package or visit www.qiagen.com).

Informace o způsobu objednávání

Produkt	Obsah	Kat. č.
<i>ipsogen</i> BCR-ABL1 Mbcr IS-MMR Kit (24)	Pro 24 reakcí: Jednotlivé plazmidové standardy Mbcr a ABL, vysoká pozitivní kontrola RNA, kalibrátor IS-MMR, priméry a směs sond ABL, priméry a směs sond BCR-ABL Mbcr Fusion Gene	670723
Rotor-Gene Q MDx — pro analýzu PCR v reálném čase validované IVD v klinických aplikacích		
Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM Platform	Cyklovač PCR v reálném čase a analyzátor taveniny s vysokým rozlišením s 5 kanály (zelený, žlutý, oranžový, červený, nachový) plus kanál HRM, laptop, software, příslušenství, 1letá záruka na díly a práci, instalace a školení není zahrnuto	9002032
Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM System	Real-time PCR cyklér a analyzátor křivek tání s vysokým rozlišením (High Resolution Melt - HRM) s 5 kanály (zelený, žlutý, oranžový, červený, purpurový) plus HRM kanál, notebook počítač, software, příslušenství, roční záruka na součásti a servis včetně instalace a školení	9002033
Sada <i>ipsogen</i> RT — pro reverzní transkripci		
<i>ipsogen</i> RT Kit	Reverzní transkriptáza, náhodný primér, dNTP, inhibitor RNázy, pufr RT	679923
Sady RNeasy — pro čištění celkové RNA		
RNeasy Midi Kit (50)	Na 50 stanovení RNA: 50 kolonek RNeasy Midi Spin, odběrové zkumavky (15 ml), reagentie a pufr bez RNázy	75144

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

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

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

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

Ochranné známky: QIAGEN[®], Sample to Insight[®], *ipsogen*[®], RNeasy[®], Rotor-Gene[®] (QIAGEN Group); ABI PRISM[®], Applied Biosystems[®], FAM[™], RNaseOUT[™], ROX[™], SuperScript[®], SYBR[®], TAMRA[™], TRIzol[®] (Thermo Fisher Scientific Inc.); Agilent[®], Bioanalyzer[®] (Agilent Technologies, Inc.); Excel[®] (Microsoft Corporation); LightCycler[®], TaqMan[®] (Roche Group); Premix Ex Taq[™] (Takara Bio, Inc.).

Omezená licenční smlouva

Použitím produktu vyjadřuje kupující nebo uživatel sady *ipsogen* BCR-ABL1 Mbc IS-MMR souhlas s následujícími podmínkami:

1. Sada *ipsogen* BCR-ABL1 Mbc IS-MMR smí být používána výhradně v souladu s *Příručkou pro sadu ipsogen BCR-ABL1 Mbc IS-MMR* a pouze s komponenty obsaženými v sadě. QIAGEN neposkytuje žádnou licenci v rámci kteréhokoliv svého duševního vlastnictví k použití nebo k začlenění přiložených komponent sady s komponenty, které nejsou zahrnuty v této soupravě, s výjimkou případů uvedených v *Příručce sady ipsogen BCR-ABL1 Mbc IS-MMR* a dodatečných protokolech dostupných na www.qiagen.com.
2. QIAGEN neposkytuje žádnou jinou záruku než výslovně stanovené licence v tom smyslu, že tato sada a/nebo její použití nenarušuje práva třetích stran.
3. Tato sada a její díly jsou licencovány k jednorázovému použití a nesmí se používat opakovaně, přepracována ani opakovaně prodávat.
4. QIAGEN specificky odmítá jakékoliv další výslovné nebo nepřímé licence s výjimkou těch, které jsou uvedeny výslovně.
5. Kupující a uživatel této sady souhlasí s tím, že neposkytne a nepovolí nikomu jinému provádět žádné kroky, které by mohly vést nebo by usnadnily jakékoliv shora zakázané činnosti. QIAGEN může zakazy tohoto Omezeného licenčního ujednání prosadit u každého soudu a vyžadovat úhradu všech vyšetřovacích a soudních poplatků, vč. poplatků za advokáta, v rámci jakéhokoliv postupu k prosazení tohoto Omezeného licenčního ujednání nebo jakýchkoliv jiných práv duševního vlastnictví vztahujících se na tuto soupravu a/nebo její komponenty.

Pro aktualizovaná licenční ustanovení viz www.qiagen.com.

HB-1362-003 © 2013–2016 QIAGEN, všechna práva vyhrazena.

www.qiagen.com

