

# **ipsogen<sup>®</sup> BCR-ABL1 Mbc** **komplekti käsiraamat**



1. versioon

**IVD**

Kvantitatiivne *in vitro* diagnostika

Kasutamiseks koos kaubamärke Rotor-Gene<sup>®</sup> Q, ABI PRISM<sup>®</sup>,  
LightCycler<sup>®</sup> ja SmartCycler<sup>®</sup> kandvate seadmetega.



**REF**

670123



QIAGEN GmbH, QIAGEN Strasse 1, 40724 Hilden,  
GERMANY

**R2**

**MAT**

1072507ET



## **QIAGEN Sample and Assay Technologies**

QIAGEN on uuenduslike proovi- ja analüüsimeetodite juhtiv tootja, kes loob võimalused mikroorganismide isoleerimiseks ja tuvastamiseks igasugusest bioloogilisest proovimaterjalist. Meie väljatöötatud kõrge kvaliteediga tooted ja teenused tagavad edu proovi analüüsimisel.

### **QIAGEN loob standardid järgmistes tegevustes:**

- DNA, RNA ja valkude puhastamine
- nukleiinhapete ja valkude analüüsimine
- microRNA uurimine ja RNAi
- proovi- ja analüüsimeetodite automatiseerimine

Meie missiooniks on aidata teil saavutada väljapaistvat edu ja läbimurret. Lisateavet saate meie kodulehelt [www.qiagen.com](http://www.qiagen.com).

# Sisu

<b>Sihtotstarve</b>	<b>5</b>
<b>Kokkuvõte ja selgitus</b>	<b>5</b>
Haiguse jälgimine	5
<b>Protseduuri põhimõte</b>	<b>7</b>
<b>Komplektis olevad materjalid</b>	<b>10</b>
Komplekti sisu	10
<b>Vajalikud, kuid komplektis mittesisalduvad materjalid</b>	<b>11</b>
<b>Hoiatused ja ettevaatusabinõud</b>	<b>12</b>
Üldised ettevaatusabinõud	12
<b>Reaktiivide säilitamine ja käitlemine</b>	<b>13</b>
<b>Läbiviimine</b>	<b>14</b>
Proovi RNA ettevalmistamine	14
Protokollid	
■ Soovitatud standardiseeritud EAC pöördtranskriptsioon	14
■ qPCR seadmel Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM või RotorGene Q 5plex HRM (rootor 72 katsuti jaoks)	17
■ qPCR seadmetel ABI PRISM 7000, 7700 ja 7900HT SDS ja LightCycler 48021	
■ qPCR seadmetel LightCycler 1.2 ja 2.0	26
■ qPCR seadmel SmartCycler	30
<b>Tulemuste tõlgendamine</b>	<b>33</b>
Andmeanalüüsi põhimõte	33
Tulemused	34
Tõrkeotsingu juhend	36
<b>Kvaliteedikontroll</b>	<b>39</b>
<b>Piirangud</b>	<b>40</b>
<b>Toimekarakteristikud</b>	<b>40</b>
Mittekliinilised uuringud	40
Kliinilised uuringud	43
<b>Viited</b>	<b>46</b>
<b>Sümbolid</b>	<b>47</b>
<b>Kontaktandmed</b>	<b>48</b>



## Sihtotstarve

*ipsogen* BCR-ABL1 Mbcr komplekt on mõeldud BCR-ABL p210 b2a2 või b3a2 transkriptsioonide kvantifitseerimiseks varem leitud BCR-ABL Mbcr fusioonigeeniga (FG) ägedat lümfoblastset leukeemiat (ALL) või kroonilist müeloidset leukeemiat (CML) põdevate patsientide luuüdist või verest võetud proovidest. Test on mõeldud molekulaarse vastuse määra hindamiseks; tulemusi saab kasutada minimaalse residuaalhaiguse jälgimiseks.

## Kokkuvõte ja selgitus

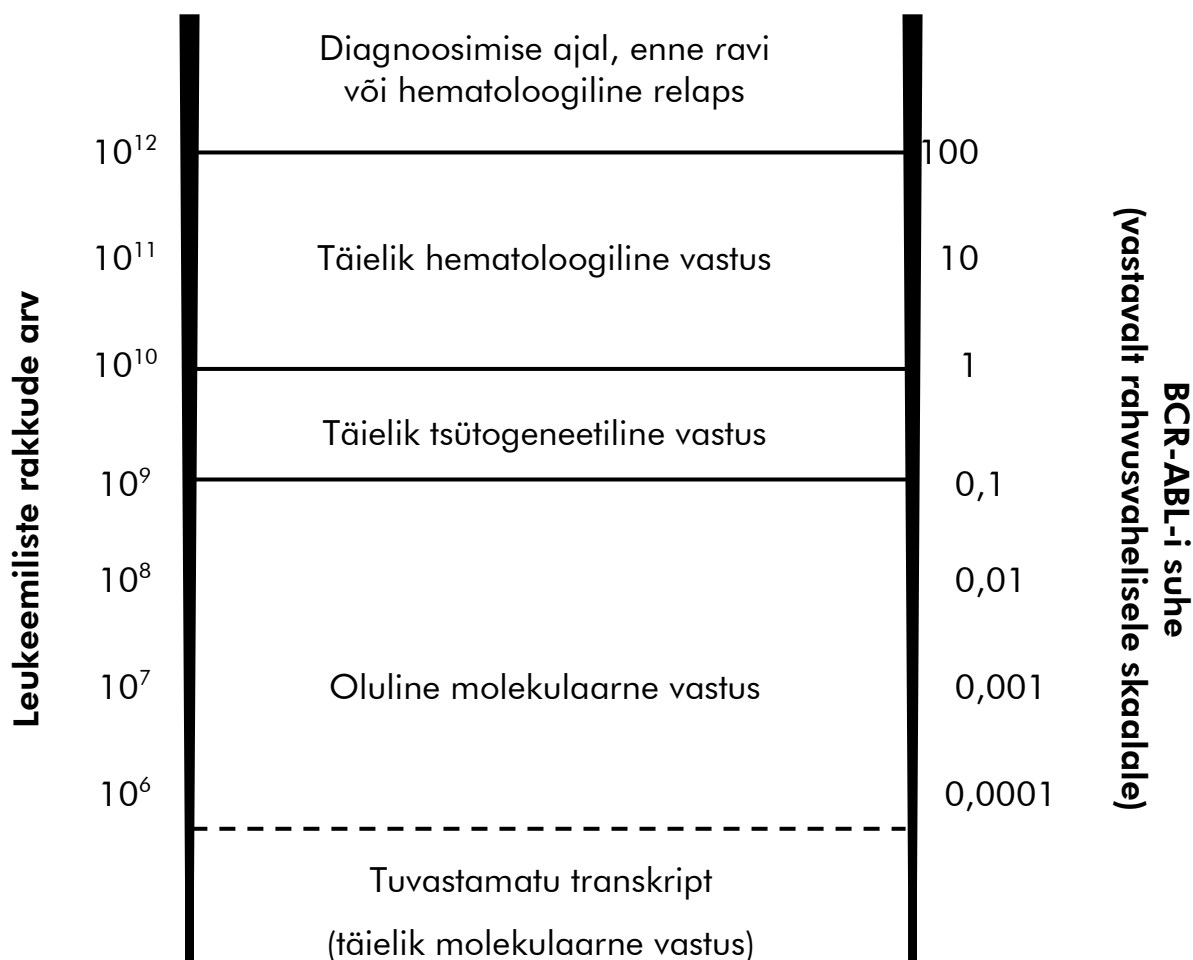
CML kuulub müeloproliferatiivsete kasvajate rühma ning rohkem kui 90%-l juhtudest iseloomustab seda Philadelphia kromosoomi (Ph CHR5) olemasolu.

See kromosoom on 9. ja 22. t(9;22) pikkade õlgade vahel toimunud retsiprookse translokatsiooni tulemus, kusjuures selle BCR (katkemiste klasteri piirkond) asub 22. kromosoomis ja c-ABL onkogeen pärineb 9. kromosoomist. Vastav fusioonigeen BCR-ABL transkribeeritakse 8,5 kb mRNA-ks, millel on 2 varianti: b2a2 (40% juhtudest) ja b3a2 (55% juhtudest). See kodeerib kimäärset valku p210, lisaks on tõusnud türosiini kinaasi aktiivsus. b2a3 ja b3a3 transkriptsioonid esinevad vähem kui 5%-l juhtudest. Ph-kromosoomi tuvastatakse ka 35%-l täiskasvanud ALL-i patsientidest.

CML-i diagnoosimissagedus on tavaliselt 1–2 juhtu 100 000 elaniku aastas, CML moodustab umbes 20% täiskasvanute leukeemiatest. Seda iseloomustab kliiniliselt liigne, normaalselt diferentseerunud ja normaalse funktsiooniga müeloidsete rakkude hulk. CML-i patsientidele pannakse 90–95%-l juhtudest diagnoos haiguse kroonilises või stabiilses faasis. Varem tekkis patsientidel keskmiselt 4 kuni 6 aasta möödudes aktseleereeritud faas, mis viis blastse kriisi ja ägeda leukeemiani, mis on alati surmav. Imanitiibi ja teiste hiljuti välja töötatud teise põlvkonna türosiini kinaasi inhibiitorite kasutuselevõtt muutis haiguse kulgu väga mõjusalt: enamik patsientidest jääb nüüd remissiooni ja nende jälgimine toimub pikaajaliselt.

## Haiguse jälgimine

Tänaseks on CML-i ravi eesmärgiks 100%-lise elulemuse ja Ph-negatiivsuse saavutamine. Haiguse jälgimine on seega ülioluline vahend ravivastuse hindamises ning varase relapsi tuvastamine iga patsiendi puhul eraldi. TKI ravi saavate patsientide puhul toimub tavaliselt hematoloogilisest remissioonist tsütogeneetilisse, seejärel molekulaarsesse remissiooni liikumine, mis tähenda leukeemiliste rakkude ja BCR-ABL-i transkriptide arvu vähenemine, nagu näidatud joonisel 1 allpool.



### Joonis 1. Kohandatud viite1 põhjal

Standardmeetod kasvajakoomuse hindamiseks CML-i patsientidel on konventsionaalne tsütogeneetiline analüüs (G-vöödid) luuüdi (BM) metafaasides). Tsütogeneetilist vastust hinnatakse vähemalt 20 luuüdimetafaasi põhjal. Tsütogeneetilise vastuse taset hinnatakse Ph-kromosoom-positiivsete metafaaside protsentuaalsel hulgal (vt tabel 1, viide 2). Siiski sõltub see hinnang labori jõudlusest ning sellel on madal tundlikkus, 20 metafaasi analüüsimisel 5%.

Reaalajaline kvantitatiivne polümeraasahela reaktsioon (qPCR), mille abil kvantifitseeritakse BCR-ABL M<sub>bcr</sub> mRNA perifeerse vere (PB) proovides on osa haiguse jälgimise meetodist CML-i ravist. See on vähem invasiivne kui konventsionaalne luuüdi metafaasi tsütogeneetika, ja tundlikum.

CML-haiguse jälgimise soovitusel on samuti hiljuti läbi vaadatud, et kasutada kliiniliste uuringute abil saadud uusi kliinilisi saavutusi ning uuenenud eesmärke ja vahendeid haiguse jälgimises. Uusimad soovitusel ravivastuse definitsiooni ja imatiniibi saavate patsientide jälgimise kohta pärinevad ELN-i ekspertidelt (2).

Tehnilisest vaatepunktist on rahvusvahelised eksperdid teinud jõupingutusi BCR-ABL M<sub>bcr</sub> testimise ja tulemuste väljastamise ühtlustamiseks (3–5). Lisaks on

WHO järelevalve hiljuti valideerinud referentspaneeli, mis võimaldab BCR-ABL-i kvantifitseerimise lihtsat standardiseerimist (6).

**Tabel 1. Rahvusvahelised soovituselised CML-i põdevate patsientide raviks (kohandatud viite 2 põhjal)**

	<b>Hematoloogiline vastus</b>	<b>Tsütogeneetiline vastus</b>	<b>Molekulaarne vastus (BCR-ABL-i ja kontrolliva geeni suhe vastavalt rahvusvahelisele skaalale)</b>
<b>Definitsioonid</b>	<p>Täielik: Trombotsüüte &lt; <math>450 \times 10^9/l</math> Leukotsüüte &lt; <math>10 \times 10^9/l</math></p> <p>Diferentseeritud ilma ebaküpsete granulotsüütideta ja vähem kui 5% basofiilidega</p> <p>Mittepalpeeritav põrn</p>	<p>Täielik: Ph+ 0% Osaline: Ph+ 1–35% Vähene: Ph+ 36–65% Minimaalne: Ph+ 66–95% Puudub: Ph+ &gt; 95%</p>	<p>„Täielik“ tähendab, et transkriptid pole kvantifitseeritavad ega tuvastatavad Oluline: <math>\leq 0,1</math></p>
<b>Jälgimine</b>	<p>Kontrollida iga 2 nädala järel, kuni saavutatakse täielik vastus ning see on kinnitatud, seejärel kord 3 kuu järel (v.a juhul, kui on vajalik teisiti)</p>	<p>Kontrollida vähemalt iga 6 kuu järel, kuni saavutatakse täielik vastus ja see on kinnitatud, seejärel vähemalt kord 12 kuu järel.</p>	<p>Kontrollida iga 3 kuu järel Mutatsioonide analüüs ebaõnnestumise korral või kui vastus on suboptimaalne või transkriptide sisaldus tõuseb</p>

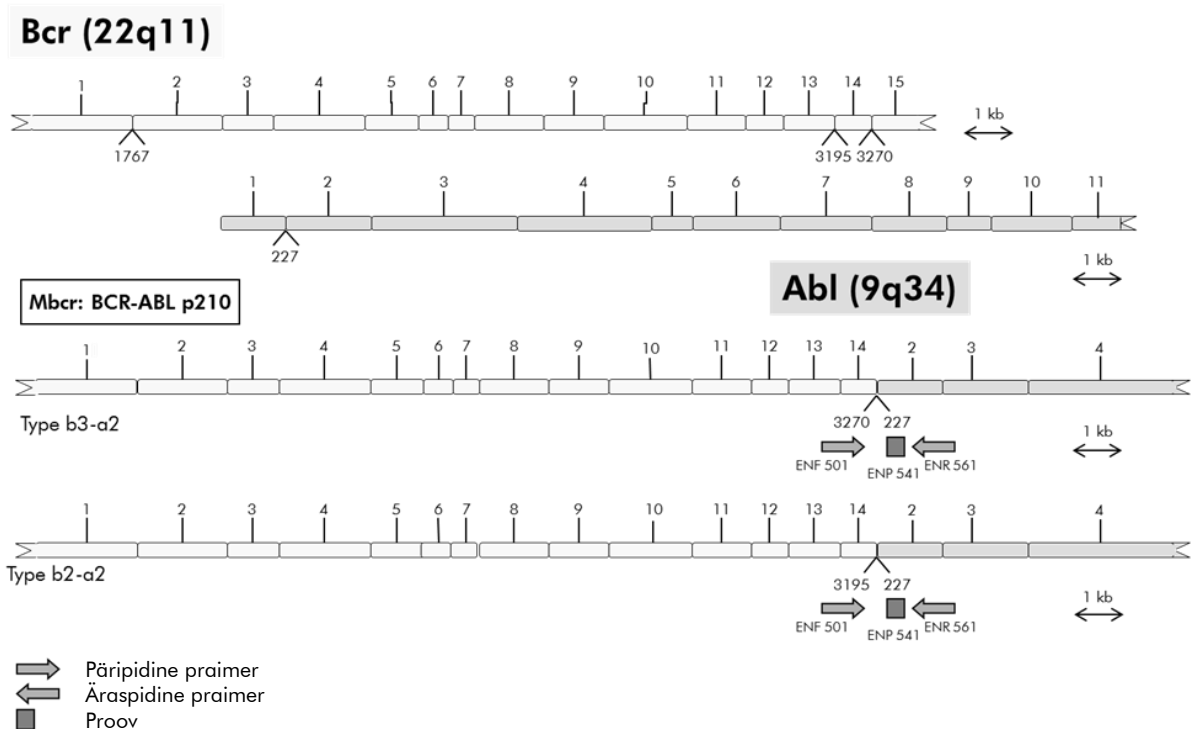
Täielik hematoloogiline vastus, tsütogeneetiline vastus ja molekulaarne vastus tuleb kinnitada kahe järjestikuse analüüsiga. Tsütogeneetilist vastust hinnatakse vähemalt 20 luuüdi metafasi morfoloogilise tsütogeneetilise uuringu abil. Perifeerse vere fluorestsentsi *in situ* hübriidatsiooni (FISH) tuleb kasutada vaid juhul, kui luuüdirakke pole võimalik saada. Molekulaarset vastust hinnatakse perifeerse vere rakkude põhjal.

## Protseduuri põhimõte

qPCR-meetod võimaldab PCR-produktide täpset kvantifitseerimist PCR-i amplifikatsiooniprotsessi eksponentsiaalse faasi ajal. Kvantitatiivsed PCR-

andmeid saab hankida kiiresti ilma PCR-järgse töötluseta, kasutades fluorestsentsete signaalide reaalaegset tuvastamist PCR-tsükli ajal ja/või selle järel, mistõttu PCR-toote saastumise risk drastiliselt väheneb. Hetkel on saadaval 3 peamist tüüpi qPCR-meetodit: qPCR-analüüs komplekti SYBR® värvi Green I (roheline I) abil, qPCR-analüüs hüdrolüüsiproovide abil ja qPCR-analüüs hübriidiseerimisproovide abil.

See analüüs kasutab qPCR-i topeltvärvinguga oligonukleotiidi hüdrolüüsi põhimõtet. PCR-i ajal hübriidiseerivad päri- ja äraspidi praimerid spetsiifilise järjestuse (joonis 2). Topeltvärvinguga oligonukleotiidid on samas segus. Proov, mis koosneb 5' reportervärviga märgistatud ja pärioolulise, 3' fluorestseerumist vähendava värviga märgistatud oligonukleotiidist, hübriidiseerib sihtjärjestust PCR-i toote piires. Hüdrolüüsiproovi qPCR-analüüsis kasutatakse *Thermus aquaticus*'e (*Taq*) DNA polümeraasi 5'→3' eksonukleaasi aktiivsust. Kui proov on intaktne, annab reportervärvi lähedus fluorestseerumist neelavale värvile tulemuseks reportervärvi fluorestseerumise peamiselt Förster-tüüpi energiaülekanne abil.

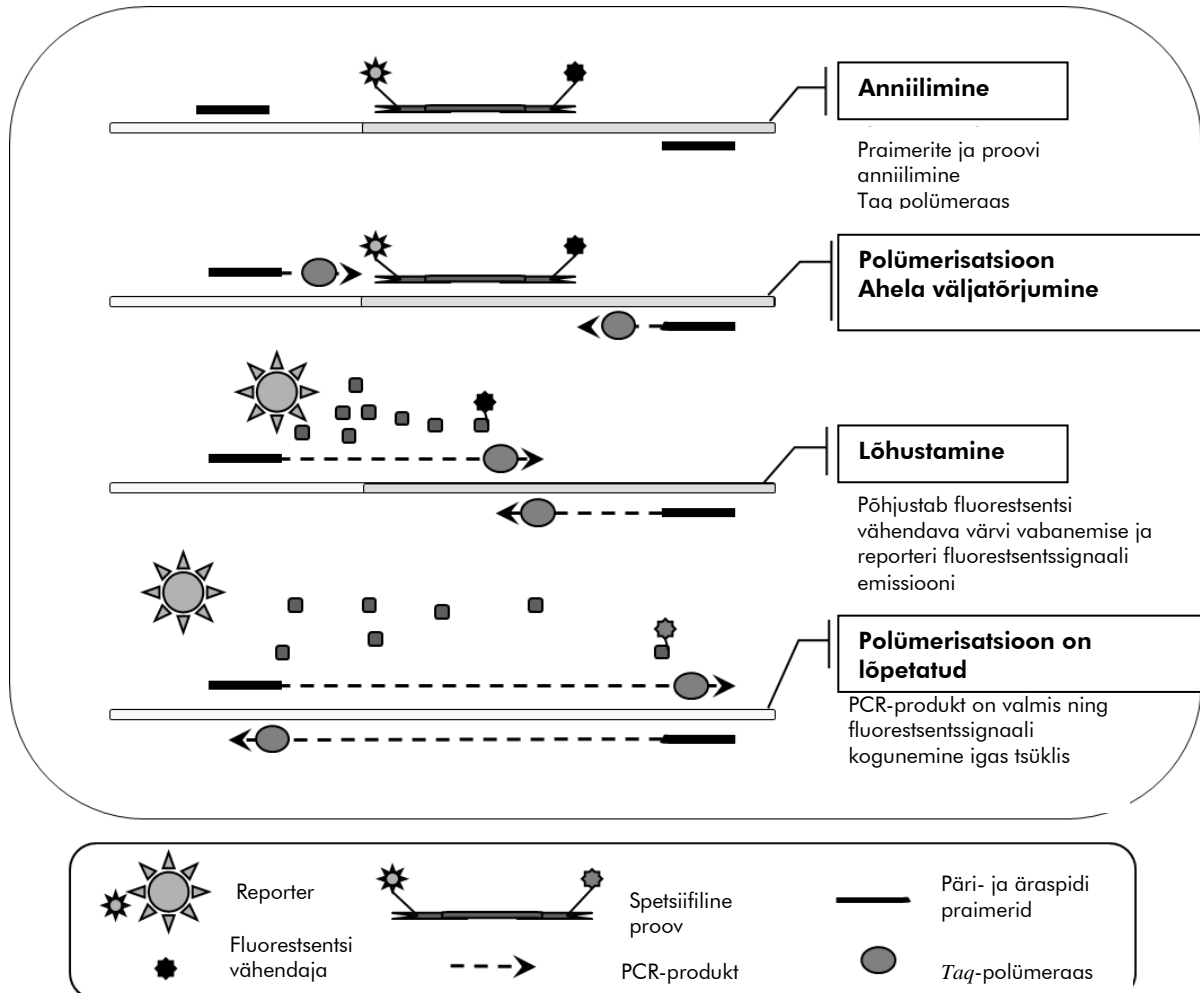


**Joonis 2. qPCR-praimerite ja prooviga kaetud BCR-ABL MbcR FG transkriptsiooni skemaatiline diagramm: ENF501–ENP541–ENR561.** Praimerite ja proovi all olev number tähistab nende nukleotiidset asukohta normaalse geeni transkriptsioonis.

Kui huvipakkuv sihtmärk on olemas, anniilib proov PCR-i ajal spetsiifiliselt äras- ja päripidised praimerid. DNA polümeraasi 5'→3' eksonukleaasi aktiivsus lõhestab proovi reporteri ja fluorestsentsi vähendaja vahel vaid juhul, kui proov hübriidiseerib sihtmärgi. Proovi fragmendid tõrjutakse seejärel sihtmärgist välja ning algab ahela polümerisatsioon. Proovi 3' ots blokeeritakse, et takistada proovi pikenemist PCR-i ajal (joonis 3). See protsess toimub igas tsükli ning ei sega toote eksponentsiaalset akumulatsiooni.



Fluorestsentsignaali tugevnemist tuvastatakse vaid juhul, kui sihtjärjestus on prooviga komplementaarne ning seega PCR-i ajal amplifitseeritud. Nende tingimuste tõttu ei tuvastata mittespetsiifilist amplifikatsiooni. Seega on fluorestsentsi tugevnemine otseselt proportsionaalne sihtmärgi amplifikatsiooniga PCR-i ajal.



**Joonis 3. Reaktsiooni põhimõte.** Toimub kogu RNA pöördtranskriptsioon ning saadud cDNA amplifitseeritakse PCR-i abil, kasutades spetsiifiliste praimerite paari ning spetsiifilist sisemist topeltvärvingu proovi (FAM™–TAMRA™). Proov seondub amplikoniga PCR-i iga anniilimisetapi ajal. Kui Taq DNA polümeraas laieneb amplikoniga seotud praimerist, tõrjub see välja proovi 5' otsa, mis seejärel lagundatakse Taq DNA polümeraasi 5'→3' eksonukleasi aktiivsuse abil. Lõhustamine jätkub, kuni allesjäänud proov amplikoni „ära sulatab“. Selle protsessi käigus vabaneb lahusesse fluorofoor ja fluorestsentsi vähendaja, need eraldatakse ruumiliselt ning see põhjustab FAM-i fluorestsentsi suurenemise ning TAMRA fluorestsentsi vähenemise.

# Komplektis olevad materjalid

## Komplekti sisu

<b>ipsogen BCR-ABL1 MbcR Kit</b>		<b>(24)</b>
<b>Kataloogi nr</b>		<b>670123</b>
<b>Reaktsioonide arv</b>		<b>24</b>
ABL Control Gene Standard Dilution (ABL-geeni kontroll-standardlahus) ( $10^3$ koopiat / $5 \mu\text{l}$ )	C1-ABL	50 $\mu\text{l}$
ABL Control Gene Standard Dilution (ABL-geeni kontroll-standardlahus) ( $10^4$ koopiat / $5 \mu\text{l}$ )	C2-ABL	50 $\mu\text{l}$
ABL Control Gene Standard Dilution (ABL-geeni kontroll-standardlahus) ( $10^5$ koopiat / $5 \mu\text{l}$ )	C3-ABL	50 $\mu\text{l}$
BCR-ABL MbcR Fusion Gene Standard Dilution (BCR-ABL MbcR-fusioonigeeni standardlahus) ( $10^1$ koopiat / $5 \mu\text{l}$ )	F1-BCR-ABL MbcR	50 $\mu\text{l}$
BCR-ABL MbcR Fusion Gene Standard Dilution (BCR-ABL MbcR-fusioonigeeni standardlahus) ( $10^2$ koopiat / $5 \mu\text{l}$ )	F2-BCR-ABL MbcR	50 $\mu\text{l}$
BCR-ABL MbcR Fusion Gene Standard Dilution (BCR-ABL MbcR-fusioonigeeni standardlahus) ( $10^3$ koopiat / $5 \mu\text{l}$ )	F3-BCR-ABL MbcR	50 $\mu\text{l}$
BCR-ABL MbcR Fusion Gene Standard Dilution (BCR-ABL MbcR-fusioonigeeni standardlahus) ( $10^5$ koopiat / $5 \mu\text{l}$ )	F4-BCR-ABL MbcR	50 $\mu\text{l}$
BCR-ABL MbcR Fusion Gene Standard Dilution (BCR-ABL MbcR-fusioonigeeni standardlahus) ( $10^6$ koopiat / $5 \mu\text{l}$ )	F5-BCR-ABL MbcR	50 $\mu\text{l}$
Primers and Probe Mix ABL* (Praimerite ja proovi segu ABL)	PPC-ABL 25 $\times$	90 $\mu\text{l}$
Primers and Probe Mix BCR-ABL MbcR Fusion Gene <sup>†</sup> (Praimerite ja proovi segu BCR-ABL MbcR fusioonigeeni)	PPF-MbcR 25 $\times$	110 $\mu\text{l}$
ipsogen BCR-ABL MbcR Kit Handbook (inglise keeles)		1

\* Segu spetsiifilistest päri- ja äraspidistest ABL-i kontrollgeeni (CG) praimeritest, lisaks spetsiifiline FAM-TAMRA proov.

<sup>†</sup> Segu spetsiifilistest päri- ja äraspidistest BCR-ABL MbcR fusioonigeeni praimeritest, lisaks spetsiifiline FAM-TAMRA proov.

**Märkus.** Enne kasutamist tsentrifuugige standardlahuseid, praimerite ja proovi segusid lühiajaliselt.

## Vajalikud, kuid komplektis mittesisalduvad materjalid

Kemikaalidega töötamisel kandke alati sobivat laborikitlit, ühekordseid kindaid ja kaitseprille. Lisateavet saate vastavatelt ohutuslehtedelt, mis on saadaval toote tarnija juures.

### Reaktiivid

- Nukleaasivaba ja PCR-i jaoks vajaliku kvaliteediga vesi
- Reaktiivid pöördtranskriptsiooni jaoks: valideeritud reaktiiviks on Superscript® II (ehk Superscript) Reverse Transcriptase (pöördtranskriptaas), mis sisaldab 5× standardpuhvrit, 100 mM DTT (Life Technologies, kataloogi nr 18064-022)
- RNAasi inhibiitor: valideeritud reaktiiv on RNaseOUT™ (Life Technologies, kataloogi nr 10777-019)
- Komplekt dNTP-sid, PCR-i jaoks sobiva kvaliteediga
- Suvaline heksameer
- MgCl<sub>2</sub>
- Puhver ja Taq DNA polümeraas: valideeritud reaktiivideks on TaqMan® Universal PCR Master Mix (põhisegu PCR 2×) (Life Technologies, kataloogi nr 4304437) ja LightCycler TaqMan Master (põhisegu PCR 5×) (Roche, kataloogi nr 04535286001)

### Tarvikud

- Nukleaasivabad aerosoolide suhtes resistentsed steriilsed PCR-pipetiotsikud hüdrofoobsete filtritega
- 0,5 ml või 0,2 ml RNAasi- ja DNAasivabad PCR-katsutid
- Jää

### Vahend

- Mikroliitri-pipett\* mõeldud spetsiaalselt PCR-i jaoks (1–10 µl; 10–100 µl; 100–1000 µl)
- Lauatsentrifuug,\* millel on rootor 0,2 ml / 0,5 ml reaktsioonikatsutite jaoks (suudab saavutada 10.000 pööret minutis)

\* Veenduge, et seadmed on kontrollitud ja kalibreeritud tootja soovitude kohaselt.

- Seade PCR-i reaalaajaliseks määramiseks:\* Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM® või muu Rotor Gene seade; LightCycler 1.2, 2.0 või 480; või ABI PRISM 7000, 7700 või 7900HT SDS; või SmartCycler seade ja seotud spetsiifiline materjal.
- Termotsükler\* või vesivann\* (pöördtranskriptsiooni etapp)

### Sobivad reaktiivid

- Kontroll-lahuste komplekt *ipsogen BCR-ABL1 Mbc*r Controls Kit (kataloogi nr 670191), mis koosneb rakuliinidest, mis on negatiivsed, kõrgelt ja madalalt positiivse ekspressiooniga BCR-ABL Mbc r fusioonigeeni suhtes, lahused on mõeldud RNA ekstraktsiooni ja pöördtranskriptsiooni kvalitatiivse valideerimise jaoks.

## Hoiatused ja ettevaatusabinõud

*In vitro* diagnostiliseks kasutamiseks

Kemikaalidega töötamisel kandke alati sobivat laborikitlit, ühekordseid kindaid ja kaitseprille. Lisateavet saate vastavate andmelehtedelt. Need on saadaval internetis ja kompaktses PDF-vormingus kodulehel [www.qiagen.com/safety](http://www.qiagen.com/safety), kus saate vaadata ja printida ohutuslehti QIAGENi iga komplekti ja komplekti osa kohta.

Hävitage proovide ja analüüside jäätmed vastavalt kohalikele ohutuseeskirjadele.

## Üldised ettevaatusabinõud

qPCR-testide kasutamisel on vaja järgida häid laboritavasid, sh molekulaarbioloogia seadmete hooldus, mis vastab kehtivatele eeskirjadele ja asjakohastele standarditele.

Komplekt on mõeldud *in vitro* diagnostiliseks kasutamiseks. Komplektis olevad reaktiivid ja juhtnõõrid on optimaalse töökindluse osas valideeritud. Reaktiivide edasine lahjendamine või inkubatsiooniaegade ja temperatuuride muutmine võib anda ekslikud või sobimatud tulemused. PPC- ja PPF-reaktiivid võivad valgusega kokku puutudes muunduda. Kõik reaktiivid on kokku pandud spetsiaalselt selle testiga kasutamiseks. Testi optimaalse töökindluse tagamiseks ei tohi neid muude reaktiividega asendada.

Transkriptsiooni tasemete määramisel qPCR-i abil on vaja nii mRNA pöördtranskriptsiooni kui saadud cDNA amplifikatsiooni PCR-i abil. Seetõttu

\* Veenduge, et seadmed on kontrollitud ja kalibreeritud tootja soovitude kohaselt.

tuleb kogu analüüsiprotseduur sooritada RNAasi- ja DNAasivabades tingimustes.

Olge äärmiselt ettevaatlik, et ei juhtuks järgmist:

- saastumine RNAasi/DNAasiga, mis võib põhjustada matriits-mRNA ja saadud cDNA lagunemist
- mRNA või PCR-i ülekandesaaste, mis annab valepositiivse signaali

Seetõttu soovitame järgmist.

- Kasutage nukleasivabasid laborivahendeid (nt pipetid, pipetiotsikud, reaktsioonivahendid) ja kandke analüüsi sooritamisel kindaid.
- Proovide ja reaktiivide ristsaaste vältimiseks kasutage kõikide pipeteerimisprotseduuride ajal värskeid aerosoolide suhtes resistentseid pipetiotsikuid.
- Valmistage ette PCR-i eelne põhisegu spetsiaalsete vahenditega (pipetid, pipetiotsikud jne) spetsiaalses piirkonnas, kus DNA matriiksite (cDNA, DNA, plasmiidid) sattumine lahusesse pole võimalik. Lisage matriits eraldi tsooni (eelistatavalt eraldi ruumis), kasutades spetsiaalseid vahendeid (pipetid, pipetiotsikud jne).
- Käideldes standardlahuseid (C1–3 ja F1–5) eraldi ruumis.

## Reaktiivide säilitamine ja käitlemine

Komplektid saadetakse kuival jääl ning neid tuleb pärast kättesaamist säilitada temperatuuril –30...–15 °C.

- Minimeerige praimerite ja proovi segude kokkupuudet valgusega (PPC- ja PPF-katsutid).
- Enne avamist segage ja tsentrifuugige katsuteid veidi.
- Säilitage kõiki komplekti komponente originaalpakendites.

Need säilitustingimused kehtivad nii avatud kui ka avamata pakendiga komponentide kohta. Muudel tingimustel säilitatud komponendid ei pruugi õigesti toimida ning need võivad analüüsitulemusi rikkuda.

Kõikide reaktiivide kõlblikkusajad on näidatud üksikute komponentide etikettidel. Õigete säilitustingimuste korral säilitab toode töökindluse kuni etiketil trükitud kõlblikkusaja lõpuni.

Toote ebastabiilsust ei näita ükski selgelt eristatav märk. Siiski tuleb positiivseid ja negatiivseid kontrollproove analüüsida samaaegselt tundmatu kontsentratsiooniga proovidega.

# Läbiviimine

## Proovi RNA ettevalmistamine

Patsiendi proovides (veres või luuüdis) oleva RNA tuleb ette valmistada valideeritud protseduuri järgides. Analüüsi kvaliteet sõltub suuresti sisend-RNA kvaliteedist. Seetõttu soovitame tõsta puhastatud RNA kvaliteeti enne analüüsimist elektroforeesi abil agar-agar\* geelil või kasutada vahendit Agilent® Bioanalyzer®.

## Protokoll: soovitatud standardiseeritud EAC pöördtranskriptsioon

**Enne alustamist tehke järgmist.**

- Valmistage ette dNTP-d, igaüks 10 mM. Säilitage võrdsete osadena temperatuuril  $-20\text{ °C}$ .

### Läbiviimine

1. Sulatage kõik vajalikud komponendid ning asetage need jääle.
2. Inkubeerige 1  $\mu\text{g}$  RNA-d (1–4  $\mu\text{l}$ ) 10 minutit temperatuuril  $70\text{ °C}$  ja jahutage kohe jääle 5 minutit.
3. Tsentrifugeerige veidi (u 10 sekundit, 10.000 pööret minutis), et koguda vedelik katsuti põhja. Seejärel hoidke seda jääle.
4. Valmistage järgmine RT-segu vastavalt analüüsitava proovide arvule (tabel 2).

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

**Tabel 2. RT-segu valmistamine**

<b>Komponent</b>	<b>Maht proovi kohta (<math>\mu\text{l}</math>)</b>	<b>Lõppkontsentratsioon</b>
First-Strand Buffer (komplektis Superscript II Reverse Transcriptase (pöördtranskriptaas)), 5 $\times$	4,0	1 $\times$
MgCl <sub>2</sub> (50 mM)	2,0	5 mM
dNTP-d (igaüks 10 mM, peavad olema varem ette valmistatud ning säilitatud võrdsete osadena temperatuuril -20 °C)	2,0	1 mM
DTT (100 mM, komplektis Superscript II Reverse Transcriptase)	2,0	10 mM
RNAasi inhibiitor (40 U/ $\mu\text{l}$ )	0,5	1 U/ $\mu\text{l}$
Suvaline heksameer (100 $\mu\text{M}$ )	5,0	25 $\mu\text{M}$
Superscript II või Superscript Reverse Transcriptase (pöördtranskriptaas) (200 U/ $\mu\text{l}$ )	0,5	5 U/ $\mu\text{l}$
Soojendatud RNA proov (lisatakse etapis 5)	1,0–4,0	50 ng/ $\mu\text{l}$
Nukleasivaba PCR-i jaoks sobiva kvaliteediga vesi (lisatakse etapis 5)	0,0–3,0	–
Lõppmaht	20,0	–

**5. Pipeteerige igasse PCR-i katsutisse 16  $\mu\text{l}$  RT-segu. Seejärel lisage 1–4  $\mu\text{l}$  (1  $\mu\text{g}$ ) RNA-d (etapist 3) ja lisage nukleasivaba PCR-i jaoks sobiva kvaliteediga vett kuni mahuni 20  $\mu\text{l}$  (vt tabel 3).**

**Tabel 3. Pöördtranskriptsioonireaktsiooni ettevalmistamine**

<b>Komponent</b>	<b>Maht (<math>\mu</math>l)</b>
RT-segu	16
Soojendatud proovist võetud RNA (1 $\mu$ g)	1–4
Nukleaasivaba ja PCR-i jaoks vajaliku kvaliteediga vesi	0–3
Lõppmaht	20

6. Segage hästi ja tsentrifuugige veidi (u 10 sekundit, 10.000 pööret minutis), et koguda vedelik katsuti põhja.
7. Inkubeerige 10 minutit temperatuuril 20 °C.
8. Inkubeerige 45 minutit termotsükleril temperatuuril 42 °C, seejärel kohe 3 minutit temperatuuril 99 °C.
9. Jahutage jääl (reaktsiooni peatamiseks) 5 minutit.
10. Tsentrifugeerige veidi (u 10 sekundit, 10.000 pööret minutis), et koguda vedelik katsuti põhja. Seejärel hoidke seda jääl.
11. Lahjendage lõplik cDNA 30  $\mu$ l nukleaasivaba PCR-i jaoks sobiva veega, nii et lõplik maht on 50  $\mu$ l.
12. Sooritage PCR vastavalt protokollidele, mis on kaasas teie qPCR-seadmega.



## Protokoll: qPCR seadmel Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM või RotorGene Q 5plex HRM (rootor 72 katsuti jaoks)

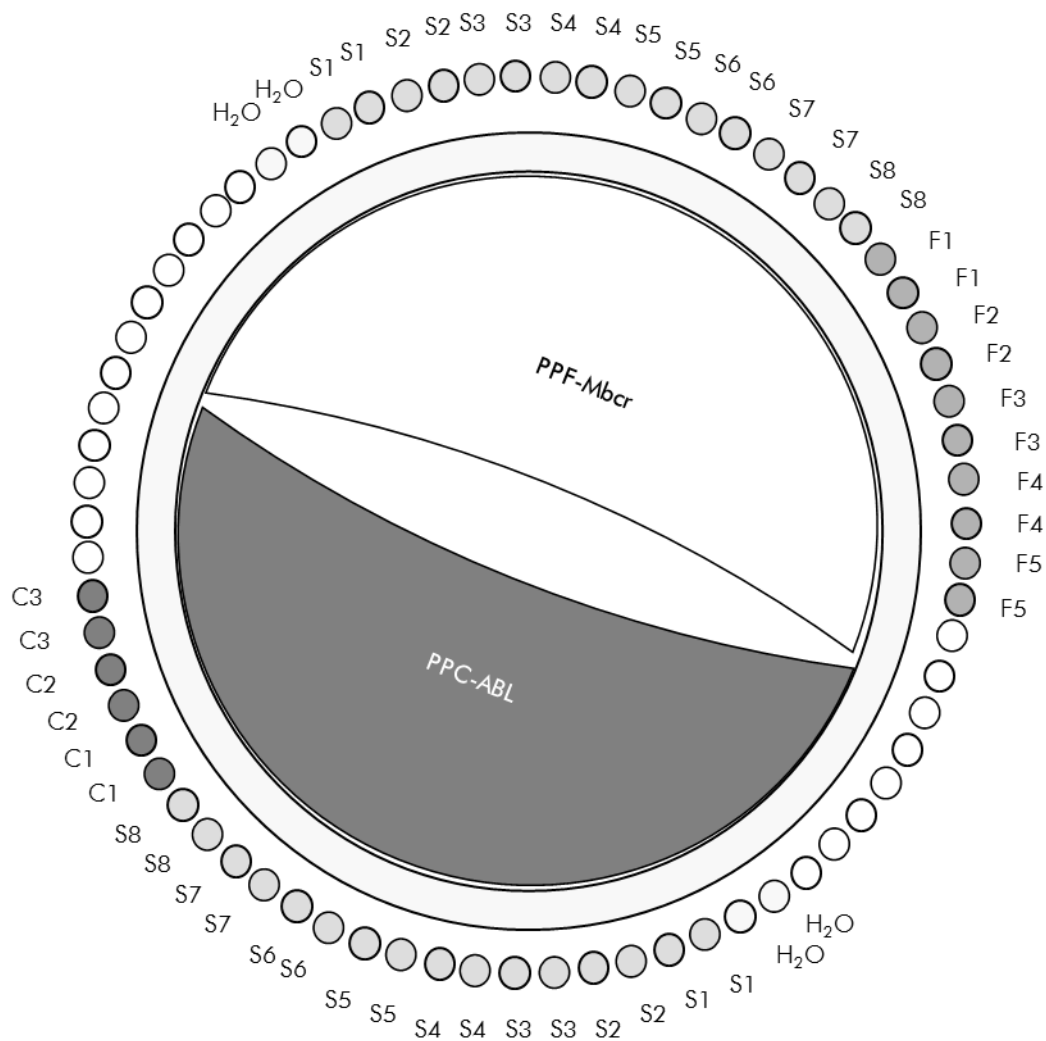
Selle seadme kasutamisel soovitame teha kõik mõõtmised kahekordselt, nagu näidatud tabelis 4.

**Tabel 4. Reaktsioonide arv, kui kasutatakse 72 katsuti jaoks mõeldud rootoriga seadet Rotor**

Proovid	Reaktsioonid
<b>ABL-praimerite ja proovi seguga (PPC-ABL)</b>	
n cDNA koeproovid	n × 2 reaktsiooni
ABL-i standard	2 × 3 reaktsiooni (3 lahjendust, kõik topelttestitud)
Vesi – kontroll	2 reaktsiooni
<b>BCR-ABL Mbc r primerite ja proovi seguga (PPF-Mbc r)</b>	
n cDNA koeproovid	n × 2 reaktsiooni
Mbc r standard	2 × 5 reaktsiooni (5 lahjendust, kõik topelttestitud)
Vesi – kontroll	2 reaktsiooni

### Proovi töötlemine seadmel Rotor-Gene Q (rootor 72 katsuti jaoks)

Soovitame ühe katse käigus testida vähemalt 8 cDNA proovi, et optimeerida standardlahuste, primerite ja proovi segude kasutamist. Igas *ipsogen* BCR-ABL1 Mbc r komplektis on piisavalt reaktiive, et sooritada 8 prooviga katset 72 katsutiga rootoril 3 korda.



**Joonis 4. Rootori soovitatud seadistus, kui katses kasutatakse komplekti *ipsogen BCR-ABL1 MbcR*. F1–5: BCR-ABL MbcR standardlahused; C1–3: ABL-i standardid; S: cDNA proov; H<sub>2</sub>O: vesi – kontroll.**

**Märkus.** Olge tähelepanelik, et paneksite testitava proovi alati rootori asendisse 1. Vastasel korral ei soorita seade kalibreerimist korralikult ning fluorestseerumise kohta saadakse valeandmed.

Täitke kõik muud kohad tühjade katsutitega.

### qPCR seadmel Rotor-Gene Q (rootor 72 katsuti jaoks)

**Märkus.** Kõik etapid tuleb sooritada jääl.

### Läbiviimine

1. Sulatage kõik vajalikud komponendid ning asetage need jääle.
2. Valmistage järgmine qPCR-segu vastavalt analüüsitavate proovide arvule.

Kõik kontsentratsioonid kehtivad reaktsioonisaaduse lõppmahu kohta.

Tabel 5 kirjeldab ühe reaktiivisegu ettevalmistamiseks vajalikku pipeteerimisprotseduuri, kus lõplik reaktsioonisaaduse maht on 25 µl. Segu saab ette valmistada reaktsioonide arvu järgi, kasutades samu praimerit ja proovi segusid (kas PPC-ABL või PPF-Mbcr). Lisamahud on mõeldud pipeteerimisvigade kompenseerimiseks.

**Tabel 5. qPCR-segu valmistamine**

<b>Komponent</b>	<b>1 reaktsioon (µl)</b>	<b>ABL: 24+1 reaktsiooni (µl)</b>	<b>BCR-ABL Mbcr: 28+1 reaktsiooni (µl)</b>	<b>Lõppkontsentratsioon</b>
TaqMan Universal PCR Master Mix, 2x	12,5	312,5	362,5	1x
Praimerite ja proovi segu, 25x	1	25	29	1x
Nukleaasi-vaba ja PCR-i jaoks vajaliku kvaliteediga vesi	6,5	162,5	188,5	–
Proov (lisatakse etapis 4)	5	igaüht 5	igaüht 5	–
Kogumaht	25	igaüht 25	igaüht 25	–

- 3. Pipeteerige 20 µl qPCR-i eellahust katsuti kohta.**
- 4. Lisage 5 µl RT-saadust (cDNA, ekvivalentne 100 ng RNA-ga), mis saadi pöördtranskriptsiooni käigus (vt „Protokoll: soovitatud standardiseeritud EAC pöördtranskriptsioon“, lk 14) vastavas katsutis (kogumaht 25 µl).**
- 5. Segage õrnalt, pipeteerides üles ja alla.**
- 6. Asetage katsutid termotsüklerisse tootja soovitude kohaselt.**
- 7. Programmeerige seade Rotor–Gene Q koos termotsükleri programmiga, nagu näidatud tabelis 6.**

**Tabel 6. Temperatuuriprofiil**

<b>Analüüsirežiim</b>	Kvantifitseerimine
<b>Hoidmine</b>	Temperatuur: 50 °C Kestus: 2 min
<b>Hoidmine 2</b>	Temperatuur: 95 °C Kestus: 10 min
<b>Tsükkel</b>	50 korda 95 °C 15 sekundi jooksul 60 °C 1 min jooksul, saadakse FAM-i fluorestsents kanalil Roheline: Single

- 8. Seadmel Rotor-Gene Q valige analüüsimiseks „Slope Correct” (Kõver on õige). Soovitame läve seada väärtusele 0,03. Termotsükli programm käivitage nii, nagu näidatud tabelis 6.**

## Protokoll: qPCR seadmetel ABI PRISM 7000, 7700 ja 7900HT SDS ja LightCycler 480

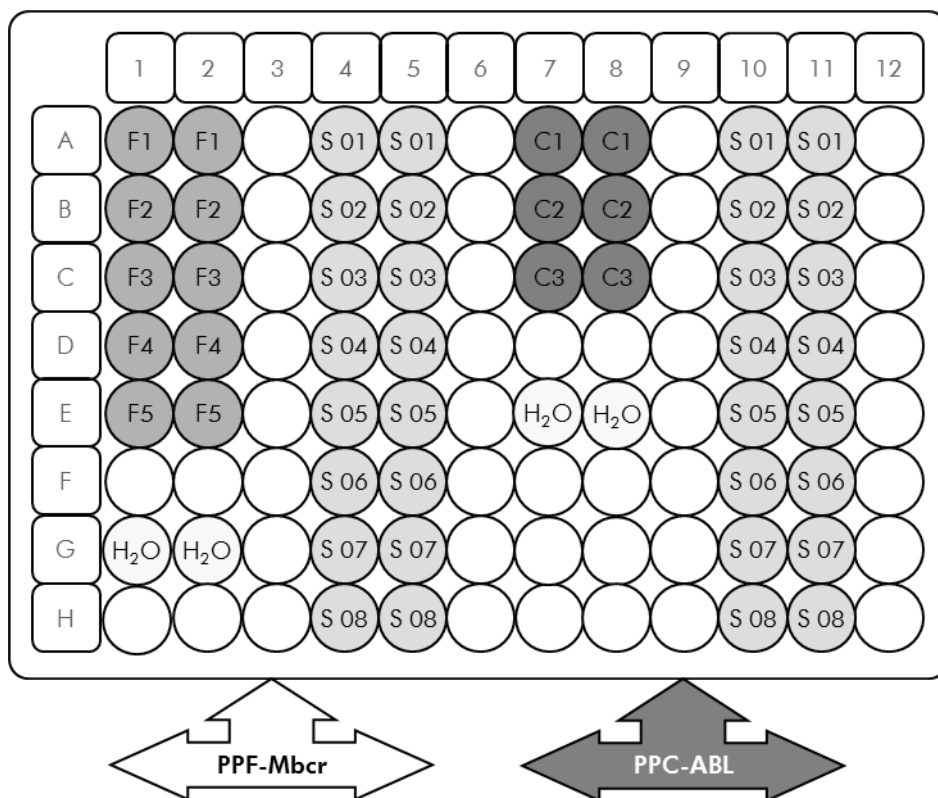
96 lohuga plaadiga qPCR-seadme kasutamisel soovitame teha kõik mõõtmised kahekordselt, nagu näidatud tabelis 7.

**Tabel 7. Reaktsioonide arv 96 lohuga plaadiga qPCR-seadme kasutamisel**

<b>Proovid</b>	<b>Reaktsioonid</b>
<b>ABL-praimerite ja proovi seguga (PPC-ABL)</b>	
n cDNA koeproovid	n × 2 reaktsiooni
ABL-i standard	2 × 3 reaktsiooni (3 lahjendust, kõik topelttestitud)
Vesi – kontroll	2 reaktsiooni
<b>BCR-ABL Mbc r primerite ja proovi seguga (PPF-Mbc r)</b>	
n cDNA koeproovid	n × 2 reaktsiooni
Mbc r standard	2 × 5 reaktsiooni (5 lahjendust, kõik topelttestitud)
Vesi – kontroll	2 reaktsiooni

### Proovi töötlemine seadmetel ABI PRISM 7000, 7700 ja 7900HT SDS ja LightCycler 480

Soovitame ühe katse käigus testida vähemalt 8 cDNA proovi, et optimeerida standardlahuste, primerite ja proovi segude kasutamist. Plaadi skeemil joonisel 5 on toodud näide sellisest katsest.



**Joonis 5. Plaadi soovitatav seadistus ühe eksperimendi puhul. S:** cDNA proov; **F1–5:** BCR-ABL Mbcr standardlahused; **C1–3:** ABL-i standardid; **H<sub>2</sub>O:** vesi – kontroll.

## qPCR seadmetel ABI PRISM 7000, 7700 ja 7900 SDS ja LightCycler 480

**Märkus.** Kõik etapid tuleb sooritada jääl.

### Läbiviimine

1. Sulatage kõik vajalikud komponendid ning asetage need jääle.
2. Valmistage järgmine qPCR-segu vastavalt analüüsitava proovide arvule. Kui kasutatakse 96 lohuga plaadiga qPCR-seadet, soovitame kõik mõõtmised teha kahekordselt.

Kõik kontsentratsioonid kehtivad reaktsioonisaaduse lõppmahu kohta.

Tabel 8 kirjeldab ühe reaktiivisegu ettevalmistamiseks vajalikku pipeteerimisprotseduuri, kus lõplik reaktsioonisaaduse maht on 25 µl. Segu saab ette valmistada reaktsioonide arvu järgi, kasutades samu praimerit ja proovi segusid (kas PPC-ABL või PPF-Mbcr). Lisamahud on mõeldud pipeteerimisvigade kompenseerimiseks.

**Tabel 8. qPCR-segu valmistamine**

<b>Komponent</b>	<b>1 reaktsioon (μl)</b>	<b>ABL: 24+1 reaktsiooni (μl)</b>	<b>BCR-ABL Mbc: 28+1 reaktsiooni (μl)</b>	<b>Lõppkontsentratsioon</b>
TaqMan Universal PCR Master Mix, 2×	12,5	312,5	362,5	1×
Praimerite ja proovi segu, 25×	1	25	29	1×
Nukleaasivaba ja PCR-i jaoks vajaliku kvaliteediga vesi	6,5	162,5	188,5	–
Proov (lisatakse etapis 4)	5	igaüht 5	igaüht 5	–
Kogumaht	25	igaüht 25	igaüht 25	–

3. Pipeteerige 20 μl qPCR-i eellahust lohu kohta.
4. Lisage 5 μl RT-saadust (cDNA, ekvivalentne 100 ng RNA-ga), mis saadi pöördtranskriptsiooni käigus (vt „Protokoll: soovitatud standardiseeritud EAC pöördtranskriptsioon“, lk 14) vastavas lohus (kogumaht 25 μl).
5. Segage õrnalt, pipeteerides üles ja alla.
6. Sulgege plaat ja tsentrifuugige veidi (300 × g, umbes 10 sekundit).
7. Asetage plaat termotsüklerisse tootja soovitude kohaselt. Programmeerige termotsüklerile programm, mis on näidatud tabelis 9 seadme ABI PRISM 7000, 7700, 7900HT SDS kohta või tabelis 10 seadme LightCycler 480 kohta.

**Tabel 9. Seadmete ABI PRISM 7000, 7700 ja 7900HT SDS temperatuuriprofiil**

<b>Analüüsirežiim</b>	Standardköver – absoluutne kvantifitseerimine
<b>Hoidmine</b>	Temperatuur: 50 °C Kestus: 2 minutit
<b>Hoidmine 2</b>	Temperatuur: 95 °C Kestus: 10 minutit
<b>Tsükkel</b>	50 korda 95 °C 15 sekundit 60 °C 1 minut, saavutatakse FAM-i fluorestsents; fluorestsentsi vähendaja: TAMRA

**Tabel 10. Temperatuuriprofiil seadmel LightCycler 480**

<b>Analüüsirežiim</b>	Absoluutne kvantifitseerimine („Abs Quant“)
<b>Tuvastamise vormingud</b>	Aknas Detection formats valige „Simple Probe“ (Lihtne proov)
<b>Hoidmine</b>	Temperatuur: 50 °C Kestus: 2 minutit
<b>Hoidmine 2</b>	Temperatuur: 95 °C Kestus: 10 minutit
<b>Tsükkel</b>	50 korda 95 °C 15 sekundit 60 °C 1 minuti jooksul FAM-i fluorestsentsi saavutamiseks, mis vastab LC versioonile 01 (483–533 nm) ja LC versioonile 02 (465–510 nm).

**8. Seadmete ABI PRISM 7000, 7700 ja 7900HT SDS kasutamisel jätkake sammust 8a. Seadmel LightCycler 480 jätkake etapist 8b.**

**8a. ABI PRISM 7000, 7700 ja 7900HT SDS: soovitame läve seada väärtusele 0,1, nagu on kirjeldatud analüüsi etapi EAC protokollis ABI PRISM SDS etapis, algväärtuse seada 3. ja 15. tsükli vahele. Alustage tsükliprogrammi vastavalt tabelile 9.**



**8b. Seade LightCycler 480: soovitame analüüsirežiimi Fit point, mille taustväärtuseks oleks 2,0 ja läviväärtus 2,0. Termotsükli programm käivitage nii, nagu näidatud tabelis 10.**

## Protokoll: qPCR seadmetel LightCycler 1.2 ja 2.0

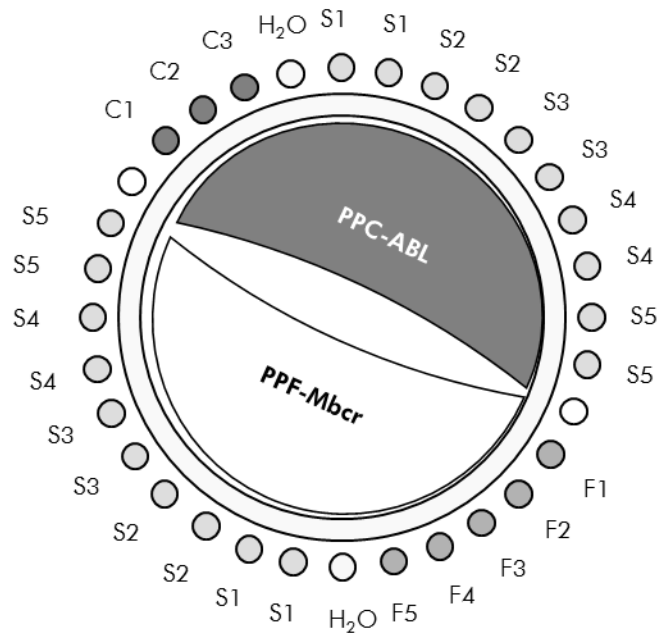
Kapillaarsete instrumentide kasutamisel soovitame mõõta proove kaks korda ja kontroll-lahuseid vaid korra, nagu näidatud tabelis 11.

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

Proovid	Reaktsioonid
<b>ABL-praimerite ja proovi seguga (PPC-ABL)</b>	
n cDNA koeproovid	n × 2 reaktsiooni
ABL-i standard	1 × 3 reaktsiooni (3 standardlahjendust, kõik ühe korra testitud)
Vesi – kontroll	1 reaktsioon
<b>BCR-ABL Mbc r primerite ja proovi seguga (PPF-Mbc r)</b>	
n cDNA koeproovid	n × 2 reaktsiooni
Mbc r standard	1 × 5 reaktsiooni (5 standardlahjendust, kõik ühe korra testitud)
Vesi – kontroll	1 reaktsioon

### Proovi analüüsimine seadmetel LightCycler 1.2 ja 2.0

Soovitame ühe katse käigus testida vähemalt 5 cDNA proovi, et optimeerida standardlahuste, primerite ja proovi segude kasutamist. Kapillaari skeemil joonisel 6 on toodud näide sellisest katsest.



**Joonis 6. Rootori soovitatud seadistus, kui katses kasutatakse komplekti *ipsogen BCR-ABL1 MbcR*. F1–5: BCR-ABL MbcR standardlahused; C1–3: ABL-i standardid; S: analüüsimiseks tundmatu DNA proov; H<sub>2</sub>O: vesi – kontroll.**

### qPCR seadmetel LightCycler 1.2 ja 2.0

**Märkus.** Teatud tehniliste nõudmiste tõttu tuleb katsed seadmel LightCycler sooritada kindlaid reaktiive kasutades. Soovitame Master Mix 5× (5× põhisegu) valmistamiseks kasutada LightCycler TaqMan Masteri komplekti ning järgida tootja juhtnööre.

**Märkus.** Kõik etapid tuleb sooritada jääl.

### Läbiviimine

1. Sulatage kõik vajalikud komponendid ning asetage need jääle.
2. Valmistage järgmine qPCR-segu vastavalt analüüsitavate proovide arvule.

Kõik kontsentratsioonid kehtivad reaktsioonisaaduse lõppmahu kohta.

Tabel 12 kirjeldab ühe reaktiivisegu ettevalmistamiseks vajalikku pipeteerimisprotseduuri, kus lõplik reaktsioonisaaduse maht on 20 µl. Segu saab ette valmistada reaktsioonide arvu järgi, kasutades samu praimerit ja proovi segusid (kas PPC-ABL või PPF-MbcR). Lisamahud on mõeldud pipeteerimisvigade kompenseerimiseks.

**Tabel 12. qPCR-segu valmistamine**

<b>Komponent</b>	<b>1 reaktsioon (µl)</b>	<b>ABL: 14+1 reaktsiooni (µl)</b>	<b>BCR-ABL Mbc: 16+1 reaktsiooni (µl)</b>	<b>Lõppkontsentratsioon</b>
TaqMan Universal PCR Master Mix, 2×	4,0	60	68,0	1x
Praimerite ja proovi segu, 25×	0,8	12	13,6	1x
Nukleaasivaba ja PCR-i jaoks vajaliku kvaliteediga vesi	10,2	153	173,4	–
Proov (lisatakse etapis 4)	5,0	igaüht 5	igaüht 5,0	–
Kogumaht	20,0	igaüht 20	igaüht 20,0	–

- 3. Pipeteerige 15 µl qPCR-i eellahust kapillaari kohta.**
- 4. Lisage 5 µl RT-saadust (cDNA, ekvivalentne 100 ng RNA-ga), mis saadi pöördtranskriptsiooni käigus (vt „Protokoll: soovitatud standardiseeritud EAC pöördtranskriptsioon“, lk 14) vastavas katsutis (kogumaht 20 µl).**
- 5. Segage õrnalt, pipeteerides üles ja alla.**
- 6. Asetage kapillaarid aparaadiga kaasas olevatesse adapteritesse ning tsentrifuugige veidi (700 × g, u 10 sekundit).**
- 7. Asetage kapillaarid termotsüklerisse tootja soovitude kohaselt.**
- 8. Programmeerige seade LightCycler 1.2 või 2.0 koos termotsükleri programmiga, nagu näidatud tabelis 13.**

**Tabel 13. Temperatuuriprofiil**

<b>Analüüsirežiim</b>	Kvantifitseerimine
<b>Hoidmine</b>	Temperatuur: 95 °C Kestus: 10 minutit Ramp: 20
<b>Tsükl</b>	50 korda 95 °C 10 sekundit; ramp: 20 60 °C 1 minut; ramp: 20; FAM-i fluorestsentsi saavutamiseks: Single
<b>Hoidmine 2</b>	45 °C 1 minut; ramp: 20

9. Seadmel LightCycler 1.2 jätkake etapist 9a. Seadmel LightCycler 2.0 jätkake etapist 9b.
- 9a. Seade LightCycler 1,2: soovitatav režiim on F1/F2 ja „2<sup>nd</sup> derivative analysis” (2. tuletatud analüüs). Termotsükli programm käivitage nii, nagu näidatud tabelis 13.
- 9b. Seade LightCycler 2.0: seadmel LightCycler 2.0 tarkvaraversiooniga 4.0 soovitate korratavate tulemuste saamiseks kasutada analüüsi Automated (F''max). Termotsükli programm käivitage nii, nagu näidatud tabelis 13.

## Protokoll: qPCR seadmel SmartCycler

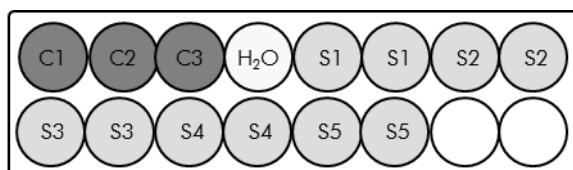
Selle seadme kasutamisel soovitame mõõta proove kaks korda ja kontrolllahuseid vaid korra, nagu näidatud tabelis 14.

**Tabel 14. Reaktsioonide arv seadmel SmartCycler**

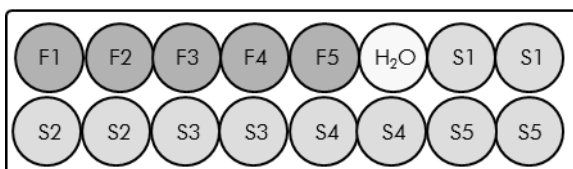
Proovid	Reaktsioonid
<b>ABL-praimerite ja proovi seguga (PPC-ABL)</b>	
n cDNA koeproovid	n × 2 reaktsiooni
ABL-i standard	1 × 3 reaktsiooni (3 standardlahjendust, kõik ühe korra testitud)
Vesi – kontroll	1 reaktsioon
<b>BCR-ABL Mbcpraimerite ja proovi seguga (PPF-Mbcpr)</b>	
n cDNA koeproovid	n × 2 reaktsiooni
Mbcpr standard	1 × 5 reaktsiooni (5 standardlahjendust, kõik ühe korra testitud)
Vesi – kontroll	1 reaktsioon

### Proovi töötlemine seadmel SmartCycler

Soovitame ühe katse käigus testida vähemalt 5 cDNA proovi, et optimeerida standardlahuste, praimerite ja proovi segude kasutamist. Heaks näiteks on skeem joonisel 7.



Kõik selle esimese bloki analüüsid tehakse PPC-ABL-iga.



Kõik teise bloki analüüsid tehakse PPF-Mbcpr-iga.

**Joonis 7. Plaadi soovitatav seadistus ühe eksperimendi puhul. S:** cDNA proov; **F1–5:** BCR-ABL Mbcpr standardlahused; **C1–3:** ABL-i standardid; **H<sub>2</sub>O:** vesi – kontroll.

## qPCR seadmel SmartCycler

**Märkus.** Kõik etapid tuleb sooritada jääl.

### Läbiviimine

1. Sulatage kõik vajalikud komponendid ning asetage need jääle.
2. Valmistage järgmine qPCR-segu vastavalt analüüsitava proovide arvule.

Kõik kontsentratsioonid kehtivad reaktsioonisaaduse lõppmahu kohta.

Tabel 15 kirjeldab ühe reaktiivisegu ettevalmistamiseks vajalikku pipeteerimisprotseduuri, kus lõplik reaktsioonisaaduse maht on 25 µl. Segu saab ette valmistada reaktsioonide arvu järgi, kasutades samu praimerit ja proovi segusid (kas PPC-ABL või PPF-Mbcr). Lisamahud on mõeldud pipeteerimisvigade kompenseerimiseks.

**Tabel 15. qPCR-segu valmistamine**

Komponent	1 reaktsioon (µl)	ABL: 14+1 reaktsiooni (µl)	BCR-ABL Mbcr: 16+1 reaktsiooni (µl)	Lõppkontsentratsioon
TaqMan Universal PCR Master Mix, 2×	12,5	187,5	212,5	1×
Praimerite ja proovi segu, 25×	1	15	17	1×
Nukleaasi-vaba ja PCR-i jaoks vajaliku kvaliteediga vesi	6,5	97,5	110,5	–
Proov (lisatakse etapis 4)	5	igaüht 5	igaüht 5	–
Kogumaht	25	igaüht 25	igaüht 25	–

3. Pipeteerige 20 µl qPCR-i eellahust lohu kohta.
4. Lisage 5 µl RT-saadust (cDNA, ekvivalentne 100 ng RNA-ga), mis saadi pöördtranskriptsiooni käigus (vt „Protokoll: soovitatud standardiseeritud EAC pöördtranskriptsioon“, lk 14) vastavas lohus (kogumaht 25 µl).
5. Segage õrnalt, pipeteerides üles ja alla.
6. Asetage proovid termotsüklerisse tootja soovitude kohaselt.
7. Programmeerige seade SmartCycler koos termotsükleri programmiga, nagu näidatud tabelis 16.

**Tabel 16. Temperatuuriprofiil**

<b>Hoidmine</b>	Temperatuur: 50 °C Kestus: 2 minutit
<b>Hoidmine 2</b>	Temperatuur: 95 °C Kestus: 10 minutit
<b>Tsükkel</b>	50 korda 95 °C 15 sekundit 60 °C 1 minuti jooksul koos valmendamisega: Single

8. Soovitame läve seada väärtusele 30. Käivitage termotsükleri programm, nagu näidatud tabelis 16.

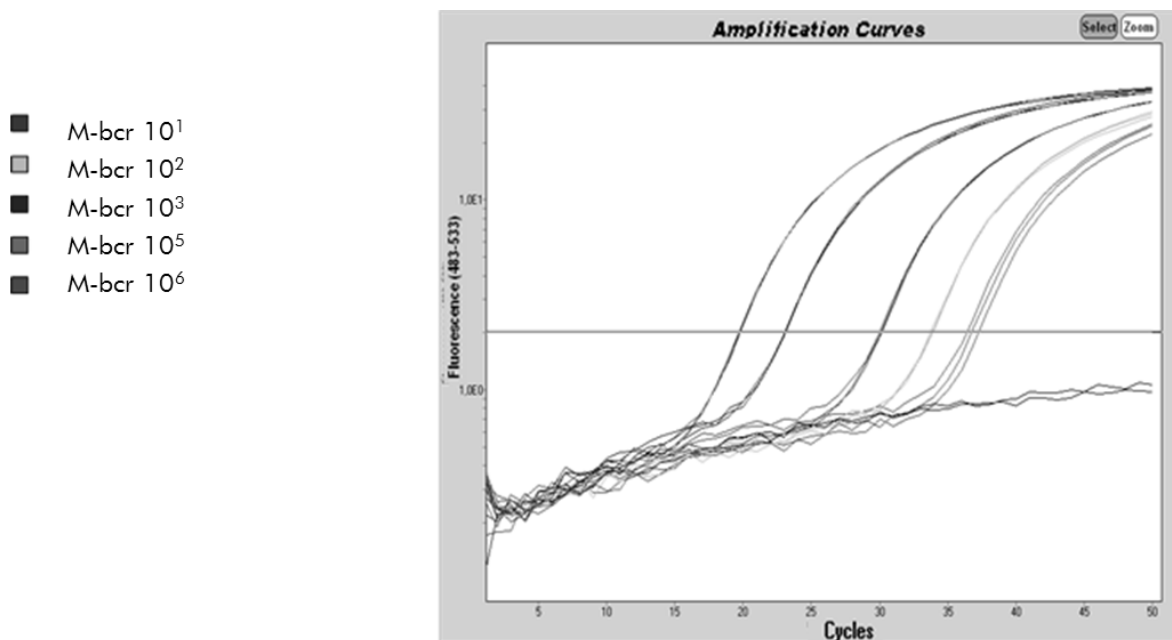


# Tulemuste tõlgendamine

## Andmeanalüüsi põhimõte

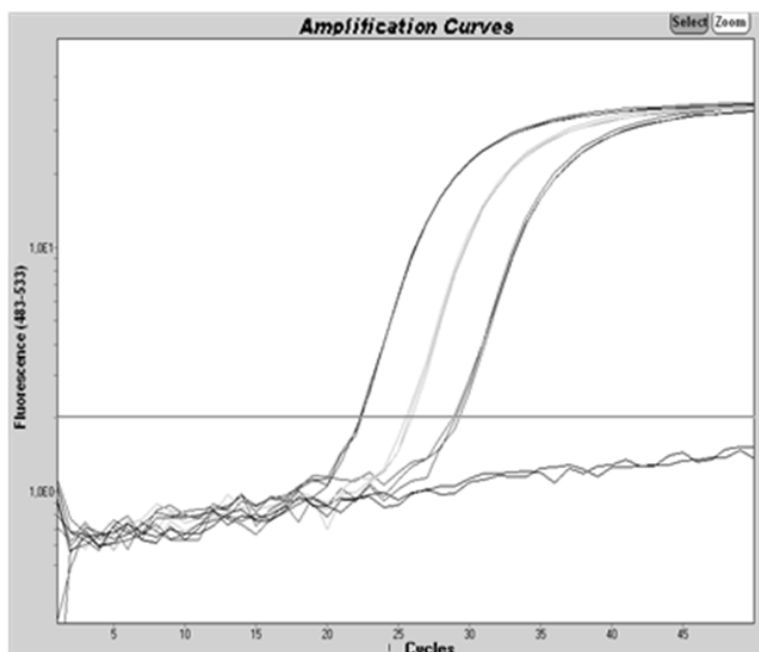
TaqMani meetodi kasutamisel nimetatakse läve ületava signaali tuvastamiseks vajalike PCR-tsüklite arvu lävitsükliks  $C_T$  ja see on otseselt proportsionaalne sihtmärgi hulgaga reaktsiooni alguses.

Teadaoleva arvu molekulidega standardlahuste kasutamisel saab luua standardkõvera ning määrata proovis oleva sihtmärgi väga täpse koguse. *ipsogen*'i standardkõverad on plasmiidipõhised ning nende puhul kasutatakse täpsete standardkõverate saamiseks plasmidi 3 standardlahjendust CG puhul ning 5 standardlahjendust FG puhul. Joonistel 8 ja 9 on kujutatud näide TaqMani amplifikatsioonikõverast, mis on saadud komplektiga *ipsogen* BCR-ABL Mbc.



**Joonis 8. BCR-ABL Mbc standardlahuste (F1–F5) tuvastamine. 10<sup>1</sup>, 10<sup>2</sup>, 10<sup>3</sup>, 10<sup>5</sup>, 10<sup>6</sup> koopiat / 5  $\mu$ l.**

- ABL 10<sup>3</sup>
- ABL 10<sup>4</sup>
- ABL 10<sup>5</sup>



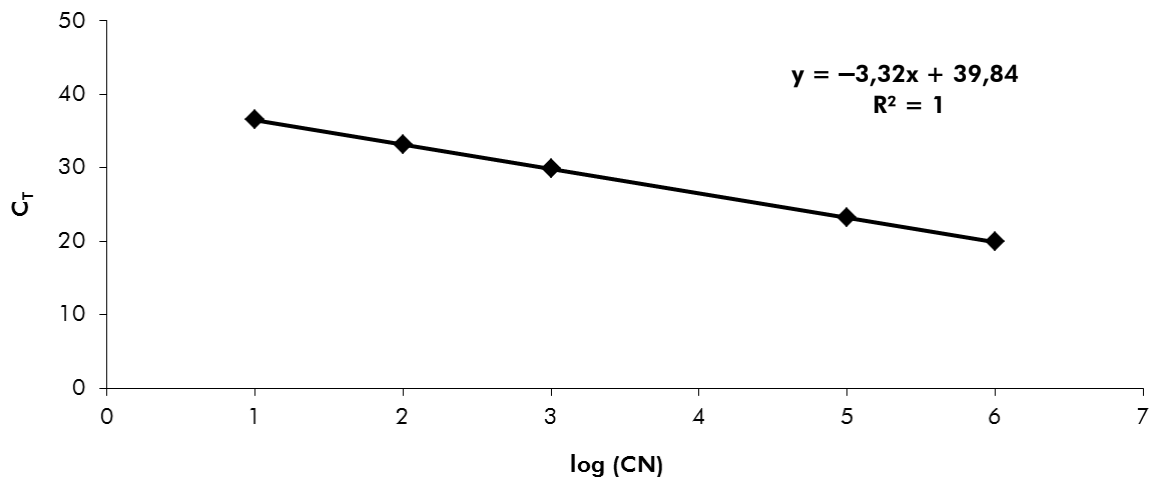
Joonis 9. ABL-i standardite (C1, C2, C3) tuvastamine. 10<sup>3</sup>, 10<sup>4</sup> ja 10<sup>5</sup> koopiat / 5  $\mu$ l.

## Tulemused

### Standardkõver ja kvaliteedi kriteeriumid

Töötlemata andmed saab analüüsimiseks kleepida Excel®-i faili.

Kummagi geeni (ABL ja BCR-ABL) kohta saadud töötlemata C<sub>T</sub> plasmidi standardlahjenduste andmeid analüüsitakse logis olevate koopiate arvuga (3, 4 ja 5 koopiat C1, C2 ja C3 puhul; 1, 2, 3, 5 ja 6 koopiat F1, F2, F3, F4 ja F5 puhul). Joonisel 10 on toodud näide 5 standardlahjenduse põhjal arvutatud teoreetilisest kõverast.



**Joonis 10. Teoreetiline kõver, mis on arvutatud 5 standardlahjenduse põhjal.**

Kummagi geeni (ABL ja BCR-ABL) kohta arvutatakse lineaarne regressioonikõver ( $y = ax + b$ ), kus  $a$  on joone kõver ja  $b$  on  $y$ -lõikaja, mis on selle punkti  $y$ -koordinaat, kus joon ületab  $y$ -telge. Selle võrrand ja määramiskordaja ( $R^2$ ) prinditakse graafikule.

Kuna standardlahused on 10-kordsed lahjendused, on kõvera teoreetiline kalle  $-3,3$ . Vahemikku  $-3,0$  ja  $-3,9$  jääv kalle on aktsepteeritav, kuni  $R^2 > 0,95$ . (7) Siiski on täpsete tulemuste saamiseks soovitatav  $R^2 > 0,98$ . (3)

**Normalized copy number (NCN, normaliseeritud koopiate arv)**

Tundmatu proovi töötlemata  $C_T$ -väärtuste (saadud PPC-ABL-iga) teisendamiseks ABL-i koopiate arvuks ( $ABL_{CN}$ ) tuleks kasutada ABL-i standardkõvera võrrandit.

Tundmatu proovi töötlemata  $C_T$ -väärtuste (saadud PPF-Mbcr-iga) teisendamiseks BCR-ABL-i koopiate arvuks ( $BCR-ABL Mbcr_{CN}$ ) tuleks kasutada BCR-ABL-i standardkõvera võrrandit.

Nende CN-väärtuste suhe annab tulemuseks normaliseeritud koopiate arvu (NCN):

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

**MRD-väärtus**

Minimaalse residuaalhaiguse (MRD) väärtus on FG ja CG normaliseeritud ekspressiooni mõõtmiste suhe järelkontrolli ajal  $(FG_{CN}/CG_{CN})_{FUP}$  ja diagnostilistes proovides  $(FG_{CN}/CG_{CN})_{DX}$ .

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

## Tundlikkus

Tundlikkus (SENS<sub>v</sub>) arvutatakse FG suhtelise ekspressiooni järgi diagnoosimise hetkel (FG<sub>CN</sub>/CG<sub>CN</sub>)<sub>DX</sub> ja CG ekspressiooni järgi (CG<sub>CN,FUP</sub>) järelkontrolli ajal võetud proovides.

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

## ABL-i väärtuste kvaliteedikontroll

RNA halb kvaliteet või qPCR-i ajal tekkinud probleemid annavad tulemuseks madala ABL<sub>CN</sub>. Me soovitame kõrvale jätta proovid, mis annavad tulemuseks ABL<sub>CN</sub> < 4.246,2 (madalaim 95% CI-väärtus CML-i patsientidelt võetud proovides EAC uuringus, viide 8).

## Replikaatidevaheline korratavus

Varieeruvus C<sub>T</sub>-väärtustes replikaatide vahel peab olema < 2, mis vastab koopiate arvu 4-kordsele muutusele.

Varieeruvus replikaatide C<sub>T</sub>-väärtustes on tavaliselt < 1,5, kui replikaatide keskmine C<sub>T</sub>-väärtus on < 36. (7)

**Märkus.** Iga kasutaja peab oma laboris korratavust mõõtma.

## Vesi – kontroll-lahused

Negatiivsed kontrollid peaksid andma tulemuseks CN-i puudumise.

Positiivne kontroll-lahus tähendab ristsaastumist. Lahenduse leiate lõigust „Törkeotsingu juhend“ allpool.

## Törkeotsingu juhend

Käesolev törkeotsing võib abiks olla tekkivate probleemide puhul. Lisateavet saate ka meie tehnilise toe leheküljelt *Frequently Asked Questions* (Korduma kippuvad küsimused): [www.qiagen.com/FAQ/FAQList.aspx](http://www.qiagen.com/FAQ/FAQList.aspx). QIAGENi tehnilise toe teadlased vastad rõõmuga kõikidele küsimustele, mis teil tekivad käesolevas käsiraamatus oleva teabe ja protokolliga kohta või proovi ja analüüsimeetodite kohta (kontaktandmeid vt „Kontaktandmed“, lk 48).

## Kommentaariid ja soovitused

---

### Kontrollgeeni (ABL) ja BCR-ABL Mbcr negatiivne tulemus kõikides proovides – tavaliselt normis

- a) RNA halb kvaliteet      Enne alustamist kontrollige alati RNA kvaliteeti ja kontsentratsiooni.  
Käivitage paralleelselt rakuliini RNA suhtes positiivne kontroll (komplekt *ipsogen BCR-ABL1 Mbcr Controls* (kataloogi nr 670191)).
- b) Pöördtranskriptsiooni ebaõnnestumine      Enne alustamist kontrollige alati RNA kvaliteeti ja kontsentratsiooni.  
Käivitage paralleelselt rakuliini RNA suhtes positiivne kontroll (komplekt *ipsogen BCR-ABL1 Mbcr Controls* (kataloogi nr 670191)).

### Kontrollgeeni (ABL) negatiivne tulemus proovides – tavaliselt normis.

- a) RNA halb kvaliteet      Enne alustamist kontrollige alati RNA kvaliteeti ja kontsentratsiooni.  
Käivitage paralleelselt rakuliini RNA suhtes positiivne kontroll (komplekt *ipsogen BCR-ABL1 Mbcr Controls* (kataloogi nr 670191)).
- b) Pöördtranskriptsiooni ebaõnnestumine      Enne alustamist kontrollige alati RNA kvaliteeti ja kontsentratsiooni.  
Käivitage paralleelselt rakuliini RNA suhtes positiivne kontroll (komplekt *ipsogen BCR-ABL1 Mbcr Controls* (kataloogi nr 670191)).

### Standardsignaali negatiivne

- a) Pipeteerimisviga      Kontrollige pipeteerimisskeemi ja reaktsiooni seadistust.  
Korrake PCR-i tsükli.
- b) Komplekti komponente on valesti säilitatud      Säilitage komplekti *ipsogen BCR-ABL1 Mbcr Kit* temperatuuril –15 ... –30 °C ning hoidke praimerite ja proovi segusid (PPC ja PPP) valguse eest kaitstuna. Vt „Reaktiivide säilitamine ja käitlemine“, lk 13.  
Vältige korduvat külmutamist ja sulatamist.  
Säilitamisel jagage reaktiivid osadeks.

## Kommentaariid ja soovitusid

---

### Negatiivsed kontroll-lahused annavad positiivse vastuse

Ristsaastumine	Asendage kõik olulised reaktiivid. Korrake katset uuesti pipeteeritud reaktiividega. Ristsaastumise vältimiseks käsitsege proove, komplekti komponente ja tarvikuid alati üldiselt tunnustatud praktika kohaselt.
----------------	---

### Puudub signaal, isegi standardsetes kontroll-lahustes

a) Pipeteerimisviga või puuduv reaktiiv	Kontrollige pipeteerimisskeemi ja reaktsiooni seadistust. Korrake PCR-i tsüklit.
b) Proovimaterjali inhibitsioon, mida põhjustab ebapiisav puhastamine	Korrake RNA ettevalmistust.
c) LightCycler: valitud on vale tuvastuskanal	Seadistage parameeter Channel Setting (Kanali seadistus) väärtusele F1/F2 või 530 nm / 640 nm.
d) LightCycler: andmevalmendus on programmeerimata	Kontrollige tsükliprogramme. PCR-programmi iga anniilimissegmendi lõpus valige valmendusrežiimiks „single“ (üksik).

### Proovide signaal puudub või on nõrk, kuid kontroll-lahuste signaaliga on kõik korras

a) Halva kvaliteediga või liiga madala kontsentratsiooniga RNA	Enne alustamist kontrollige alati RNA kvaliteeti ja kontsentratsiooni. Käivitage paralleelselt rakuliini RNA suhtes positiivne kontroll (komplekt <i>ipsogen</i> BCR-ABL1 Mbc Controls (kataloogi nr 670191).
b) Pöördtranskriptsiooni ebaõnnestumine	Enne alustamist kontrollige alati RNA kvaliteeti ja kontsentratsiooni. Käivitage paralleelselt rakuliini RNA suhtes positiivne kontroll (komplekt <i>ipsogen</i> BCR-ABL1 Mbc Controls (kataloogi nr 670191).

## Kommentaariid ja soovitused

---

### Fluorestsentsi intensiivsus on liiga madal

- a) Komplekti komponente on valesti säilitatud Säilitage komplekti *ipsogen* BCR-ABL1 MbcR Kit temperatuuril –15 ... –30 °C ning hoidke praimerite ja proovi segusid (PPC ja PPP) valguse eest kaitstuna. Vt „Reaktiivide säilitamine ja käitlemine“, lk 13. Vältige korduvat külmutamist ja sulatamist. Säilitamisel jagage reaktiivid osadeks.
- b) Siht-RNA-d on väga väike kogus Suurendage proovi RNA kogust.  
**Märkus.** Sõltuvalt RNA ettevalmistusmeetodi valikust võib tekkida RNA inhibitsioon.

### LightCycler: fluorestsentsi intensiivsus varieerub

- a) Pipeteerimisviga Nn pipeteerimisveast tingitud varieeruvust saab vähendada, kui analüüsida andmeid režiimis F1/F2 või 530 nm / 640 nm.
- b) Kapillaaride ebapiisav tsentrifugimine Ettevalmistatud PCR-segu võib endiselt olla kapillaari ülemises osas, kapillaaris võib olla õhumull. Tsentrifugige kapillaarid reaktsiooniseguga alati nii, nagu on soovitatud seadme kasutusjuhendis.
- c) Kapillaariotsa välispind on määrdunud Kandke kapillaaride käsitsemisel alati kindaid.

### LightCycler: standardkõvera tõrge

- Pipeteerimisviga Nn pipeteerimisveast tingitud varieeruvust saab vähendada, kui analüüsida andmeid režiimis F1/F2 või 530 nm / 640 nm.

## Kvaliteedikontroll

Kogu komplekti kvaliteedikontroll on läbi viidud seadmel LightCycler 480. Komplekt on toodetud vastavalt standardile ISO 13485:2003. Analüüsi sertifikaate saate tellida aadressil [www.qiagen.com/support/](http://www.qiagen.com/support/).

## Piirangud

Enne seadme kasutamist peab kasutaja olema koolitatud ning meetodit tundma.

Kõiki saadud diagnostilisi tulemusi tuleb tõlgendada koos muude kliiniliste või laboratoorsete näitajatega. Kasutaja vastutusele jääb süsteemi töökindluse valideerimine vastavas laboris kasutatud protseduuride korral, kui need pole kaetud ettevõtte QIAGEN töökindluse uuringutega.

Tähelepanu tuleb pöörata kõikide komponentide karpidele ja etikettidele trükitud kõlblikusaegadele. Aegunud komponente ärge kasutage.

**Märkus.** Komplekt on loodud vastavalt uuringutele, mis on läbi viinud organisatsioon „Europe Against Cancer“ (EAC, Euroopa Vähi Vastu) (8), ja see vastab uusimatele rahvusvahelistele soovitudele (3, 5). Seda tuleb kasutada käesoleva käsiraamatu juhtnõõride järgi koos valideeritud reaktiivide ja instrumentidega (vt „Vajalikud, kuid komplektis mittesisalduvad materjalid“ lk 11). Igasugune toote mittesihipärane kasutamine ja/või selle komponentide muutmine muudab ettevõtte QIAGEN vastutuse kehtetuks.

## Toimekarakteristikud

### Mittekliinilised uuringud

#### Materjalid ja meetodid

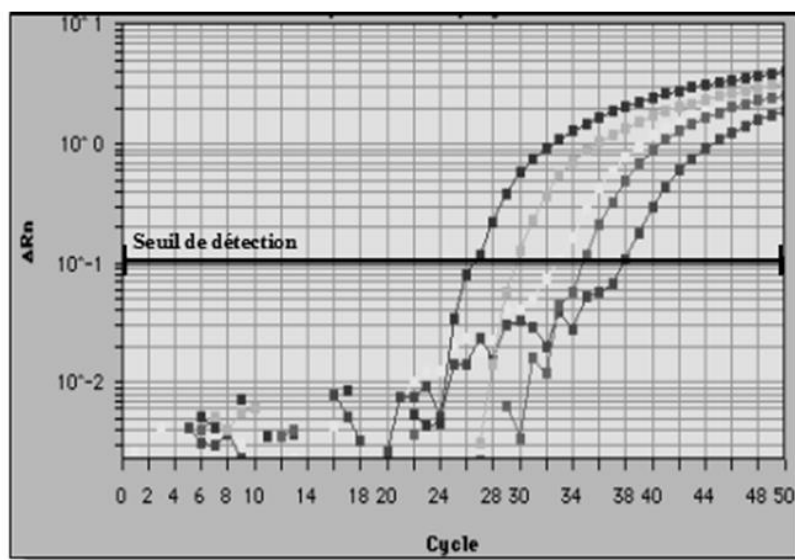
Jõudluse hinnang sooritati seadmel ABI PRISM 7700 SDS koos reaktiividega, mida nimetab lõik „Vajalikud, kuid komplektis mittesisalduvad materjalid“ lk 11. Ekvivalentsuse uuringud valideerisid selle kasutamise järgmistel seadmetel: ABI PRISM 7000 ja 7900HT SDS, LightCycler 1.2 ja 480, Rotor

Komplekti *ipsogen* BCR-ABL1 Mbc Kit analüütilise jõudluse leidmiseks viidi läbi mittekliinilised uuringud. Need mittekliinilised laboriuuringud viidi läbi kogu RNA-l, mis saadi K562 rakuliinist, mis lahjendati MV4-11 rakuliini kogu RNA püsivas lõppkoguses.

Analüüsi korratavuse määramiseks lahjendati K562 kogu RNA 5 erinevat kontsentratsiooni (5 ng, 500 pg, 50 pg, 5 pg ja 0,5 pg) MV4-11 konstantses lõppkoguses 200 ng ja neid analüüsiti 5 korda 4 erineva protseduuri käigus (joonis 11).



- K562  $2,5 \times 10^{-2}$
- ▣ K562  $2,5 \times 10^{-3}$
- K562  $2,5 \times 10^{-4}$
- K562  $2,5 \times 10^{-5}$
- K562  $2,5 \times 10^{-6}$



**Joonis 11. Lahus: K562 kogu RNA MV4-11-negatiivses kogu RNA-s,  $2,5 \times 10^{-2}$  (5 ng),  $2,5 \times 10^{-4}$  (0,05 ng),  $2,5 \times 10^{-5}$  (0,005 ng), ja  $2,5 \times 10^{-6}$  (0,0005 ng) lahjenduste amplifikatsioonigrupid.**

### Analüüsi andmed

Tabelites 17-20 on näidatud analüüsidevahelised analüüsid keskmise lävitsükliga ( $C_T$ ), standardhälbega (SD), proovide arvuga (n), variatsioonikoefitsiendiga (CV), keskmise koopiade arvuga (CN) ja keskmise normaliseeritud koopiade arvuga (NCN).

**Tabel 17. Analüüsidevaheline analüüs – rakuliinid BCR-ABL Mbcr ja ABL**

Rakuliin	Lahjendus	Keskmine			CV (%)
		$C_T$	SD	n	
BCR-ABL Mbcr:	$2,5 \times 10^{-2}$ (5 ng / 200 ng)	26,18	0,40	20	1,54
	$2,5 \times 10^{-3}$ (0,5 ng / 200 ng)	29,32	0,53	19	1,82
	$2,5 \times 10^{-4}$ (0,05 ng / 200 ng)	32,62	0,62	20	1,91
ABL:	–	23,59	0,20	95	0,83

**Tabel 18. Analüüsidevaheline analüüs – plasmiidid**

Geen	Plasmiid	Keskmine C <sub>T</sub>	SD	n	CV (%)
BCR-ABL Mbcr:	F1 (10 <sup>1</sup> koopiat)	34,47	1,25	8	3,64
	F2 (10 <sup>2</sup> koopiat)	31,48	0,54	8	1,71
	F3 (10 <sup>3</sup> koopiat)	28,17	1,11	7	3,95
	F4 (10 <sup>5</sup> koopiat)	21,20	0,65	8	3,06
	F5 (10 <sup>6</sup> koopiat)	18,22	0,09	6	0,49
ABL:	C1 (10 <sup>3</sup> koopiat)	28,47	0,34	8	1,18
	C2 (10 <sup>4</sup> koopiat)	25,25	0,31	8	1,22
	C3 (10 <sup>5</sup> koopiat)	21,92	0,70	8	3,19

**Tabel 19. Analüüsidevaheline analüüs – rakuliinid BCR-ABL Mbcr ja ABL (keskmine CN)**

Rakuliin	Lahjendus	Keskmine CN	SD	n	CV (%)
BCR-ABL Mbcr:	2,5 × 10 <sup>-2</sup> (5 ng / 200 ng)	4.134,27	2.512,40	20	60,77
	2,5 × 10 <sup>-3</sup> (0,5 ng / 200 ng)	512,8	479,51	19	93,51
	2,5 × 10 <sup>-4</sup> (0,05 ng / 200 ng)	42,94	22,05	20	51,36
ABL:	–	33.831,51	13.637,7	94	40,31

**Tabel 20. Analüüsidevaheline analüüs – rakuliinid BCR-ABL Mbcr (keskmise NCN)**

Rakuliin	Lahjendus	Keskmine NCN*	SD	n	CV (%)
BCR-ABL Mbcr:	$2,5 \times 10^{-2}$ (5 ng / 200 ng)	12,6338	532,79	20	42,17
	$2,5 \times 10^{-3}$ (0,5 ng / 200 ng)	1,1605	94,69	19	81,61
	$2,5 \times 10^{-4}$ (0,05 ng / 200 ng)	0,1782	10,73	20	60,23

\* Ainult nende uuringutulemuste puhul on NCN-i all mõeldud  $\frac{M_{bcrcn}}{ABL_{cn}} \times 100$ .

## Kliinilised uuringud

Jõudluse hinnang sooritati seadmel ABI PRISM 7700 SDS koos reaktiividega, mida nimetab lõik „Vajalikud, kuid komplektis mittesisalduvad materjalid“ lk 11. Ekvivalentsuse uuringud valideerisid selle kasutamise järgmistel seadmetel: ABI PRISM 7000 ja 7900HT SDS, LightCycler 1.2 ja 480, Rotor

Kümnes Euroopa riigis asuvad 26 laborit osalesid organisatsiooni Europe Against Cancer (EAC) juhitud uuringus, kus kasutati IPSOGENi toodetud plasmide, et luua standardiseeritud protokoll olulisemate leukeemiaga seotud geenide qPCR-analüüsi jaoks kliinilises keskkonnas. BCR-ABL p210 transkript oli üks uuringus kasutatud fusioonigeenidest (FG). Esitame siin selle valideerimisuuringu kokkuvõtte, täielikud tulemused on avaldatud (8,10).

## CG ja FG plasmide standardlahuste laboritevaheline korratavus

Üksteist laborit osalesid laboritevahelises korratavuse eksperimendis, et hinnata CG ja FG plasmide standardlahuste mõõtmise varieeruvust. Igas asutuses tehti kaks lahjendust. Tabelis 21 on esitatud iga lahjenduse keskmine, standardhälve ja CV (%).

**Tabel 21. CG ja FG plasmiidide standardlahuste laboritevaheline korratavus**

Geen	Lahjendus	Keskmine	C <sub>T</sub> SD	CV (%)
ABL-i kontrollgeen	C1	29,59	1,34	4,54
	C2	26,33	1,02	3,90
	C3	22,75	1,59	6,97
BCR-ABL p210 fusioonigeen	F1	41,11	2,26	5,50
	F2	37,43	1,51	4,04
	F3	33,76	1,28	3,81
	F4	26,50	1,03	3,90
	F5	22,98	0,97	4,21

### BCR-ABL Mbc FG transkripti ekspressiooni väärtused

Tabelites 22 ja 23 on näidatud BCR-ABL Mbc FG transkripti ja ABL CG transkripti ekspressiooni väärtused K562 rakuliinil, hinnati ALL-i patsiente diagnoosimise hetkel ning terveid patsiente.

**Tabel 22. BCR-ABL Mbc FG transkripti ja ABL CG ekspressiooni väärtused – C<sub>T</sub>-väärtused**

	C <sub>T</sub> -väärtused (vahemik 95%)	
	BCR-ABL Mbc:	ABL:
<b>K562 rakuliin</b>	20,5	20,7
<b>CML-i patsientide proovid</b>		
BM (n = 15)	25,1 (21,5–27,0)	25,2 (20,7–26,8)
PB (n = 14)	23,1 (21,9–25,8)	23,7 (22,6–26,7)
<b>ALL-i patsientidelt võetud proovid</b>		
BM ja PB (n = 17)	24,1 (21,5–29,9)	24,0 (21,6–26,4)
<b>Tervete patsientide proovid</b>		
BM (n = 26)	–	25,35 (24,68–26,02)
PB (n = 74)	–	25,15 (24,83–25,48)

**Tabel 23. BCR-ABL Mbcr FG transkripti ja ABL CG ekspressiooni väärtused – CN-i ja suhte väärtused**

	CN-väärtused (vahemik 95%)		Suhte väärtused (vahemik 95%)*
	BCR-ABL Mbcr:	ABL:	CN BCR-ABL Mbcr/CN ABL
<b>CML-i patsientide proovid</b>			
BM (n = 15)	8710 (2.089–112.202)	10.115,8 (4.786,3–37.153,52)	0,86 (0,44–3,02)
PB (n = 14)	17.783 (2.042–112.202)	15.237 (4.246,2–25.568,3)	1,17 (0,48–4,41)
<b>Tervete patsientide proovid</b>			
BM (n = 26)	–	19.201 (12.922–25.480)	–
PB (n = 74)	–	21.136 (17.834–24.437)	–

\* Tulemused väljendatakse lihtsa BCR-ABL/ABL suhtena.

ABL-i C<sub>T</sub>-väärtused ei olnud tervete ja leukeemiahaigete patsientide proovides oluliselt erinevad, samuti mitte erinevates proovitüüpides (PB või BM) või leukeemiahaigete proovides (ALL, AML, CML).

### Valepositiivsete ja valenegatiivsete tulemuste hulk

Valenegatiivsete ja valepositiivsete proovide tulemused arvutati järgmiste kontroll-lahuste abil.

- Positiivsed kontroll-lahused: K562 rakud (rakuliin, mille puhul on hästi teada selle positiivsus BCR)
- Negatiivsed kontroll-lahused: RNA-negatiivsed proovid; amplifikatsioonita kontroll-lahused (NAC) olid valmistatud *E. coli* RNA-st, mitte inimese RNA-st, et kontrollida PCR-i saastumist, ja matriitsi mittesisaldavad kontroll-lahused (NTC), mis sisaldasid inimese RNA asemel vett.

FG RNA proovide amplifikatsioon viidi läbi kolmekordselt ning CG oma kahekordselt.

Valenegatiivne proov loeti positiivseks RNA suhtes vähem kui 50% positiivsete tulemustega lohkudes (0/2, 0/3 või 1/3).

Valepositiivne proov loeti negatiivseks vähemalt 50% positiivsete tulemustega lohkudes (1/2, 2/3 või 3/3).

Tabelis 24 näidatakse valenegatiivsete ja valepositiivsete tulemuste arv ja protsent.

**Tabel 24. Valenegatiivsed ja valepositiivsed tulemused**

Valenegatiivsus		Valepositiivsus	
10 <sup>-3</sup>	10 <sup>-4</sup>	FG negatiivne kontroll-lahus	NAC/NTC
0% (0/33)	6,1% (2/33)	10,9% (6/55)	4,1% (14/340)

## Viited

QIAGENi suur ajakohane veebiandmebaas sisaldab teaduspublikatsioone, mis on tehtud ettevõtte QIAGEN toodete kohta. Nüüdisaegsed otsinguvõimalused võimaldavad teil leida vajalikke artikleid kas lihtsa võtmesõna otsimise abil või rakenduse, uurimisala, pealkirja jne järgi.

Täieliku viidete loendi leiate andmebaasist QIAGEN Reference Database (QIAGENi viidete andmebaas) veebis [www.qiagen.com/RefDB/search.asp](http://www.qiagen.com/RefDB/search.asp); võite võtta ühendust ka QIAGENi tehnilise teeninduse või kohaliku edasimüüjaga.

## Tsiteeritud viited

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

5. Hughes, T. et al. (2006) Monitoring CML patients responding to treatment with tyrosine kinase inhibitors: review and recommendations for harmonizing current methodology for detecting BCR-ABL transcripts and kinase domain mutations and for expressing results. *Blood* **108**, 28.
6. White, H.E. et al. (2010) Establishment of the first World Health Organization International Genetic Reference Panel for quantitation of BCR-ABL mRNA. *Blood* **116**, e111.
7. van der Velden, V.H., 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. 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.
10. Beillard, E. et al. (2003) Evaluation of candidate control genes for diagnosis and residual disease detection in leukemic patients using 'real-time' quantitative reverse-transcriptase polymerase chain reaction (RQ-PCR) - a Europe against cancer program. *Leukemia* **17**, 2474.

## Sümbolid

Pakenditel ja etiketidel võivad esineda järgmised sümbolid.



<N>

Sisaldab reaktiivi <N> reaktsiooni jaoks



Kõlblik kuni



*In vitro* diagnostiline meditsiiniseade



Kataloogi nr



Partii number



Materjali number

**GTIN**

Globaalne kaubaartikli number (GTIN)



Temperatuuripiirang



Tootja



Vt kasutusjuhendit

## Kontaktandmed

Tehnilist ja muud teavet saate meie tehnilise toe leheküljelt veebis [www.qiagen.com/Support](http://www.qiagen.com/Support) või telefonil 00800-22-44-6000; võite ühendust võtta QIAGENi tehnilise teeninduse osakonna või kohaliku edasimüüjaga (vt tagakaant või külastage veebilehte [www.qiagen.com](http://www.qiagen.com)).



## Tellimisinfo

Toode	Sisu	Kat nr
<i>ipsogen</i> BCR-ABL1 Mbc Kit (24)	24 reaktsiooni jaoks: ABL Control Gene Standards (kontrollgeeni standardlahused), BCR-ABL Mbc Fusion Gene Standards (fusioonigeeni standardlahused), Primer and Probe Mix ABL (ABL-i praimeri ja proovi segu), Primer and Probe Mix BCR-ABL Mbc Fusion Gene (BCR-ABL Mbc fusioonigeeni praimeri ja proovi segu)	670123
<b>Rotor-Gene Q MDx – IVD-valideeritud reaalaajaliseks PCR-analüüsiks kliinilistes rakendustes</b>		
Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM Platform	Reaalaajaline PCR-tsükler ja High Resolution Melt analüsaator 5 kanaliga (roheline, kollane, oranž, punane, lilla), lisaks HRM-kanal, sülearvuti, tarkvara, lisatarvikud, 1-aastane garantii osade ja töö osas, paigaldamist ja koolitust ei sisalda.	9002032
Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM System	Reaalaajaline PCR-tsükler ja High Resolution Melt analüsaator 5 kanaliga (roheline, kollane, oranž, punane, lilla), lisaks HRM-kanal, sülearvuti, tarkvara, lisatarvikud, 1-aastane garantii osade ja töö osas, sisaldab paigaldamist ja koolitust.	9002033
<b>Kontroll-lahuste komplekt <i>ipsogen</i> BCR-ABL1 Mbc Controls Kit – RNA ekstraktsiooni ja BCL-ABL Mbc fusioonigeeni pöördtranskriptsiooni kvalitatiivseks valideerimiseks</b>		
<i>ipsogen</i> BCR-ABL1 Mbc Controls Kit	Rakuliinid, kus BCR-ABL Mbc fusioonigeeni ekspressioon on negatiivne, kõrgelt ja madalalt positiivne	670191

Ajakohase litsentseerimisteabe ja tootespetsiifiliste kaebuste puhul vt vastava QIAGENi komplekti käsiraamatut või kasutusjuhendit. QIAGENi komplektide käsiraamatud ja kasutusjuhendid on saadaval veebilehel [www.qiagen.com](http://www.qiagen.com) ja neid saab tellida QIAGENi tehnilise teeninduse osakonnast või teie kohaliku edasimüüja käest.

See leht on teadlikult tühjaks jäetud

See leht on teadlikult tühjaks jäetud



Käesolev toode on mõeldud *in vitro* diagnostiliseks kasutamiseks. *ipsogen*’i tooteid ei või edasi müüa, edasimüügiks muuta ega kasutada komertstoodete tootmiseks ilma ettevõtte QIAGEN kirjaliku loata.

Selles dokumendis sisalduvat teavet võidakse ilma etteatamata muuta. QIAGEN ei vastuta käesolevas dokumendis esineda võivate vigade eest. Me usume, et dokument oli avaldamise hetkel täielik ja täpne. Mingil juhul ei vastuta QIAGEN juhuslike, sihilike, korduvate või põhjuslike kahjustuste eest, mis võivad tekkida selle dokumendi tõttu.

*ipsogen*’i toodete puhul on garanteeritud vastavus märgitud tehnilistele nõuetele. QIAGENi ainsaks kohustuseks kliendi ees ja kohustuse ainsaks vahendiks on toote tasuta asendamine juhul, kui toode ei toimi vastavalt garantiile.

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

#### **Piiratud litsentsileping**

Komplekti *ipsogen* BCL-ABL1 Mbcr ostja või kasutaja nõustub selle toote kasutamisel alljärgnevate tingimustega.

1. *ipsogen* BCR-ABL1 Mbcr komplekti võib kasutada vaid vastavalt *ipsogen* BCR-ABL1 Mbcr komplekti käsiraamatule ja ainult koos komplektis sisalduvate komponentidega. QIAGEN ei anna luba enda intellektuaalomandi piires ega luba kasutada komplektis olevaid komponente muude komplektis mittedisaldavate komponentidega, v.a juhtudel, mis on kirjeldatud *ipsogen* BCR-ABL1 Mbcr komplekti käsiraamatus ja aadressil [www.qiagen.com](http://www.qiagen.com) leiduvates lisaprotokollides.
2. QIAGEN ei anna mingit garantiid, et komplekt ja/või selle kasutusala ei riku kolmandate osaliste õigusi, v.a selgesõnalistes litsentsides mainitud juhtudel.
3. Komplekt ja selle komponendid on litsentseeritud ühekordseks kasutamiseks ning neid ei tohi uuesti kasutada, värskendada ega edasi müüa.
4. QIAGEN keeldub kõikidest muudest otsestest või kaudsetest litsentsidest, v.a neist, mida on selgesõnaliselt väljendatud.
5. Komplekti ostja ja kasutaja nõustub mitte lubama kellelgi teisel teha midagi, mis võib põhjustada või soodustada mõnda ülaltoodud keelatud toimingutest. QIAGEN võib piiratud litsentsilepingu keelud kinnitada suvalises kohtus ning tagab kõik uurimisega seotud ja kohtukulud, sh advokaaditasud, iga kord, kui on vaja piiratud litsentsilepingut või enda õigust intellektuaalomandile (mis on seotud komplekti ja/või selle komponentidega) jõustada.

Värskeid litsentsitingimusi vt [www.qiagen.com](http://www.qiagen.com).

HB-1360-002 © 2013–2015 QIAGEN, kõik õigused kaitstud.

---

**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

