

Kesäkuu 2018

ipsogen[®] BCR-ABL1 MbcR RGGQ RT-PCR Kit -käsikirja



Versio 1

IVD

Kvantitatiivinen in vitro -diagnostiikka

Käytettäväksi Rotor-Gene[®] Q MDx 5plex HRM -laitteen kanssa

CE

REF

670923



QIAGEN GmbH, QIAGEN Strasse 1, 40724 Hilden,
SAKSA

R4

MAT

1114278FI

Sisältö

Käyttötarkoitus.....	5
Yhteenveto ja selitykset.....	5
Tietoja kroonisesta myeloosisesta leukemiasta	5
Seuranta	6
Menetelmän toimintaperiaate.....	8
Toimitetut materiaalit.....	11
Sarjan sisältö	11
Tarvittavat materiaalit (jotka eivät kuulu toimitukseen).....	12
Varoitukset ja varotoimet	15
Turvallisuustiedot	15
Yleiset varotoimet	15
Reagenssien säilytys ja käsittely.....	17
Kuljetusolosuhteet	17
Säilytysolosuhteet	17
Stabiilius	18
Näytteen käsittely ja säilytys	18
Kokoverinäytteet.....	18
RNA-näytteet.....	19
Menetelmä.....	20
Erytrosyyttien lyysausprotokolla kokonaisleukosyyttien kokoverestä eristämistä varten	20
Kokonais-RNA:n eristäminen.....	22

RNA:n kvalifiointi ja kvantifiointi	25
RNA-pitoisuus	25
Käänteinen transkriptio	28
Manuaalinen analyysi: qPCR-ajo RGQ-ohjelmistolla ja Rotor-Gene Q MDx 5plex -laitteella, jossa on 72 putken roottori	31
Automaattinen analyysi: qPCR-ajo RGAM-ohjelmistolla ja Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM -laitteella, jossa on 72 putken roottori	37
Tulosten tulkinta RGQ Software -ohjelmassa	48
Tietojen analysointi	48
Raakatietoihin sovellettavat laatuksiteerit ja standardikäyrät	50
Tulosten tulkinta RGAM-ohjelmistolla	58
Ongelmien ratkaisu	64
Laadunvalvonta	66
Rajoitukset	66
Suorituskykyominaisuudet	68
LOB (Limit of Blank)	68
Havaitsemisraja	68
Lineaarisuus	68
Toistettavuus ja uusittavuus	69
Häiritsevät aineet	69
Kliininen validointi ja menetelmän vertailu	70
Yhdenmukaisuustutkimus: ERM-AD623 BCR-ABL1:n yhden plasmidin (IRMM) ja <i>ipsogenin</i> yhden plasmidin (QIAGEN) standardit	72
Lähdeviitteet	75
Merkinnät	77

Tilastiedot	78
Käsikirjan muutoshistoria	80

Käyttötarkoitus

ipsogen BCR-ABL1 Mbcr RGQ RT-PCR Kit on kvantitatiivinen diagnostinen *in vitro* -testi, joka on tarkoitettu BCR-ABL1 -fuusiogeenin b3a2 (e14a2)- ja b2a2 (e13a2) -transkriptien mittaamiseen kokoverestä eristetystä kokonais-RNA:sta.

ipsogen BCR-ABL1 Mbcr RGQ RT-PCR Kit -menetelmällä voidaan seurata syvää molekulaarista vastetta potilailla, joilla on Philadelphia-kromosomipositiivisen (Ph+), p210 kroonisen myeloosin leukemian (KML) krooninen vaihe.

Se on kalibroitu World Health Organization (WHO) International Genetic Reference Panel (Maailman terveysjärjestön kansainvälinen geenipaneeli) -paneelin perusteella.

Yhteenveto ja selitykset

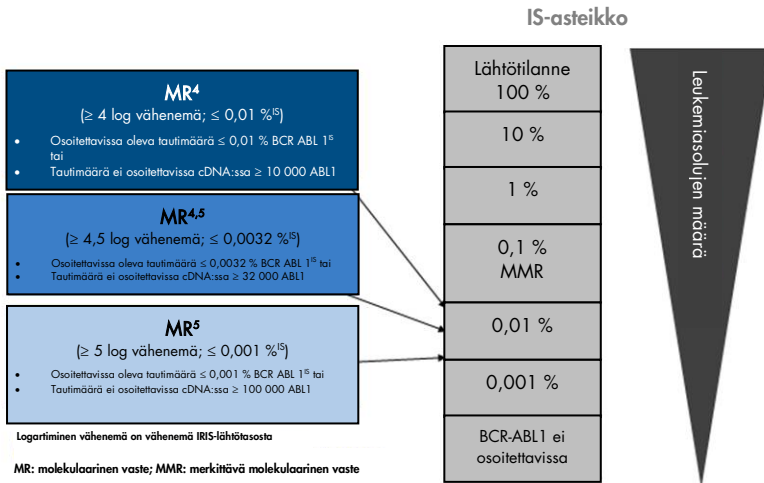
Tietoja kroonisesta myeloosisesta leukemiasta

KML kuuluu myeloproliferatiivisiin sairauksiin, ja Philadelphia-kromosomi todetaan yli 90 prosentilla KML-potilaista (Ph CHR5). Tämä kromosomi syntyy kromosomien 9 ja 22 pitkien haarojen translokaatioissa t(9;22). Sen BCR (Breakpoint Cluster Region) -alue paikantuu kromosomiin 22 ja c-ABL-onkogeeni sijaitsee kromosomissa 9. Vastaava fuusiogeeni BCR-ABL1 kopioituu 8,5 tuhannen nukleotidin pituiseksi mRNA:ksi. Tällä fuusiogeenillä on 2 lähettityyppiä: b2a2 (todetaan 40 prosentissa tapauksista) ja b3a2 (esiintyy 55 prosentissa tapauksista). Se koodaa kimeeriproteiinia p210, jolla on voimistunut tyrosiinikinaasiaktiivisuus. b2a3- ja b3a3-transkriptit liittyvät alle 5 prosenttiin tapauksista. Ph-kromosomi on havaittavissa myös 35 prosentilla akuuttista lymfaattista leukemiaa (ALL) sairastavista aikuispotilaista.

KML:n vuosittainen ilmaantuvuus on noin 1–2 / 100 000, ja KML:n osuus aikuisten kaikista leukemioista on 20 %. Taudille on tyypillistä luuytimen solujen lisääntynyt tuotanto. Nämä solut erilaistuvat ja toimivat normaalisti. 90–95 prosentilla KML-potilaista tauti todetaan sen kroonisessa eli rauhallisessa vaiheessa. Aiemmin tauti eteni keskimäärin 4–6 vuodessa blastikriisi-vaiheeseen ja kuolemaan johtavaksi akuutiksi leukemiaksi. Imatinibi ja sitä seuranneet toisen sukupolven tyrosiinikinaasin estäjät ovat muuttaneet luonnollista taudinkulkua merkittävästi. Nykyisin useimmilla potilailla tauti saadaan remissioon, ja he tarvitsevat pitkäaikaista seuranta.

Seuranta

KML:n hoidon tavoitteita ovat 100 %:n elossaolo ja Ph-kromosominegatiivisuus. Seurannassa arvioidaan hoitovastetta ja pyritään havaitsemaan relapsi mahdollisimman varhain. Tyrosiinikinaasin estäjillä hoidetuilla potilailla tauti saadaan yleensä hematologiseen, sytogeneettiseen ja lopulta molekulaariseen remissioon. Leukemiasolut ja BCR-ABL1-transkriptit vähenevät vastaavasti: Kuva 1.



Kuva 1. Molekulaarisen vasteen määrittäminen. Sovellettu viitteistä 1, 2 ja 9. MR: molekulaarinen vaste. MMR: merkittävä molekulaarinen vaste.

KML-potilaiden tautitaakan arviointiin käytettävä vertailtumenetelmä on tavanomainen luuytimen metafaasien sytogeneettinen analyysi (G-raitatutkimus). Sytogeneettistä vastetta tutkittiin vähintään 20 luuytimen metafaasista. Sytogeneettisen vasteen tasoa arvioitiin Ph-kromosomipositivisten metafaasien (3) prosenttiosuuden perusteella. Laboratorion suorituskyky ja asiantuntemus vaikuttivat kuitenkin arviointiin, eikä sen herkkyys, 5 %, ole erityisen hyvä 20 metafaasia tutkittaessa.

Molekulaarista vastetta mitataan reaaliaikaisella kvantitatiivisella polymeraasiketjureaktiolla (qPCR) ja BCR-ABL1 Mbc r mRNA:n kvantifiointilla perifeerisistä verinäytteistä, ja tämä kuuluu nyt KML:n seurantamenetelmiin. Se on herkempi ja vähemmän invasiivinen kuin tavanomainen luuytimen metafaasien sytogeneettinen analyysi.

KML:n seuranta koskeviin päivitettyihin suosituksiin on viime aikoina lisätty lääketutkimuksista saatu uusi kliininen näyttö, toisen sukupolven tyrosiini-kinasiin estäjien parempi kliininen teho ja BCR-ABL1:n kvantifiointin tekniset parannukset, jotka kaikki edistävät seurannan tavoitteita.

Erityisesti toisen sukupolven tyrosiinikinaasin estäjillä saadaan monilla KML-potilailla merkittävämpi molekulaarinen vaste, jolloin tuloksena on syvä molekulaarinen vaste eli BCR-ABL1-kuorma alle 0,01 % (MR 4,0) tai 0,0032 % (MR 4,5). Näiden hyvin pienten BCR-ABL1-kuormien tarkalla kvantifioinnilla voi olla kliinistä merkitystä, sillä havainnoivissa tutkimuksissa on osoitettu, että tyrosiinikinaasin estäjien antaminen voidaan lopettaa turvallisesti potilailla, joilla on pysyvä MR 4,5:n molekulaarinen vaste (4). Näiden löydösten varmistamiseksi tehdään kuitenkin edelleen kliinisiä tutkimuksia.

Tyrosiinikinaasin estäjiä saavien KML-potilaiden vasteen selvittämistä ja seurantaan koskevat tuoreimmat suositukset ovat ELN:n asiantuntijoiden laatimia (3).

Kansainväliset asiantuntijat ovat pyrkineet yhtenäistämään teknisesti BCR-ABL1 Mbc:n testausta ja raportointia (5–7). Maailman terveysjärjestön johdolla on myös äskettäin validoitu vertailupaneeli BCR-ABL1:n kvantifioinnin yksinkertaista standardointia varten (8).

Menetelmän toimintaperiaate

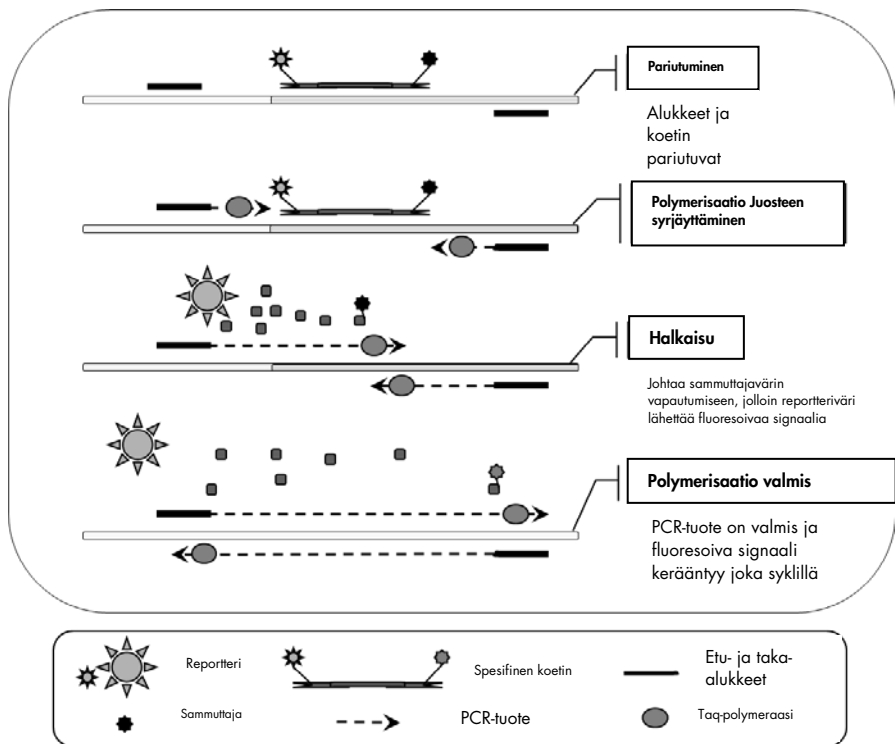
qPCR:n avulla PCR-tuotteet voidaan kvantifioida tarkasti PCR-monistumisprosessin eksponentiaalisessa vaiheessa. qPCR-tiedot saadaan nopeasti ilman PCR:n jälkeistä käsittelyä tunnistamalla fluoresenssisignaali reaaliaikaisesti PCR-syklin aikana ja/tai jälkeen, mikä vähentää merkittävästi PCR-tuotteen kontaminaation vaaraa. Tällä hetkellä qPCR-tekniikoissa on kolme päätyyppiä: qPCR-analyysi SYBR® Green I Dye -väriä käyttämällä, qPCR-analyysi hydrolyysikoettimia käyttämällä ja qPCR-analyysi hybridisaatiokoettimia käyttämällä.

Tämä testi hyödyntää kaksoisvärjättyä qPCR-oligonukleotidien hydrolyysiä. PCR:n aikana etu- ja taka-alkueet hybridisoituvat tiettyyn sekvenssiin. Samassa seoksessa on kaksoisvärjätty oligonukleotidi. Tämä koetin, joka koostuu 5'-reportterivärillä merkitystä oligonukleotidista ja alavirrassa sijaitsevasta 3'-sammuttajaväristä, hybridisoituu kohdesekvenssiin PCR-tuotteessa. qPCR-analyysi hydrolyysikoettimilla hyödyntää *Thermus aquaticus* (Taq) -DNA-polymeraasin 5'→3'-eksonukleasiaktiivisuutta. Koettimen ollessa ehjä reportterivärin läheisyys

sammuttajaan tukahduttaa reportterin fluoresenssin pääasiassa Förster-tyyppisellä energiansiirrolla.

Jos kohdesekvenssi on PCR-ajossa läsnä, etu- ja taka-alukkeet kiinnittyvät koettimen molemmin puolin. DNA-polymeraasin 5'→3'-eksonukleasiaktiivisuus leikkaa koettimen reportterin ja sammuttajan välistä vain, jos koetin hybridisoituu kohteeseen. Sen jälkeen koettimen palaset irtaavat kohteesta ja juosteen polymerisaatio jatkuu. Koettimen 3'-pää on estetty, jotta koetin ei pitenisi PCR:n aikana (Kuva 2). Tämä prosessi tapahtuu jokaisessa syklistä eikä se häiritse tuotteen eksponentiaalista kertymistä.

Fluoresenssisignaalin voimistuminen havaitaan vain, jos kohdesekvenssi on komplementaarinen koettimeen nähden ja siten monistuu PCR-ajon aikana. Näiden vaatimusten vuoksi epäspesifistä monistusta ei havaita. Siksi fluoresenssin lisääntyminen on suoraan suhteessa kohteen monistumiseen PCR:n aikana.



Kuva 2. Reaktioperiaate. Kokonais-RNA käänneitranskriptoidaan ja muodostunut cDNA monistetaan PCR:llä käyttämällä spesifisiä alukkeita ja spesifistä sisäistä kaksivärikoetinta (FAMTM-BHQ[®]-1). Koetin sitoutuu amplikoniin PCR:n kiinnittymisvaiheissa. Kun Taq laajenee amplikoniin sitoutuneesta alukkeesta, se korvaa koettimen 5'-päätä, jonka jälkeen Taq-DNA-polymeraasin 5'→3'-eksonukleaasiaktiivisuus hajottaa. Katkaiseminen jatkuu, kunnes jäljellä oleva koetin sulattaa amplikonin pois. Tämä prosessi vapauttaa fluoroforin ja sammuttajan liukseen, erottaa ne ja aiheuttaa FAM-fluoresenssin lisääntymisen ja BHQ-1-fluoresenssin vähenemisen.

Toimitetut materiaalit

Sarjan sisältö

ipsogen BCR-ABL1 MbcR RGQ RT-PCR Kit		(24)
Tuotenumero		670923
Reaktioiden määrä		24
Reagents for reverse transcription (RT) (Käänteistranskriptaasireagenssit [RT])		24 µl
Reverse transcriptase (Käänteistranskriptaasi)	Violetti	100 µl
RT Mix	Violetti	300 µl
Reagents for calibration (Kalibroitireagenssit)		
High Positive RNA Control (Voimakkaasti positiivinen RNA-kontrolli)	Valkoinen	15 µl x 3
Low Positive RNA Control (Heikosti positiivinen RNA-kontrolli)	Valkoinen	15 µl x 3
IS-MMR Calibrator (IS-MMR-kalibraattori)	Valkoinen	15 µl x 3
SP1-BCR-ABL MbcR and ABL: MbcR and ABL1 Single Plasmid Standard Dilution (10 ¹ kopiota / 5 µl)	Keltainen	35 µl
SP2-BCR-ABL MbcR and ABL: MbcR and ABL1 Single Plasmid Standard Dilution (10 ² kopiota / 5 µl)	Keltainen	35 µl
SP3-BCR-ABL MbcR and ABL: MbcR and ABL1 Single Plasmid Standard Dilution (10 ³ kopiota / 5 µl)	Keltainen	70 µl
SP4-BCR-ABL MbcR and ABL: MbcR and ABL1 Single Plasmid Standard Dilution (10 ⁴ kopiota / 5 µl)	Keltainen	35 µl
SP5-BCR-ABL MbcR and ABL: MbcR and ABL1 Single Plasmid Standard Dilution (10 ⁵ kopiota / 5 µl)	Keltainen	70 µl
SP6-BCR-ABL MbcR and ABL: MbcR and ABL1 Single Plasmid Standard Dilution (10 ⁶ kopiota / 5 µl)	Keltainen	70 µl

Taulukko jatkuu seuraavalla sivulla

Taulukko jatkuu edelliseltä sivulta

qPCR:n reagenssit			
Taq DNA polymerase (Taq DNA -polymeraasi)	Mintunvihreä	85 µl	
qPCR Mix ABL1* (qPCR-seos ABL1*)	Vihreä	720 µl x 3	
qPCR Mix Mbcr† (qPCR-seos Mbcr)	Punainen	720 µl x 3	
ipsogen <i>BCR-ABL1 Mbcr RGQ RT-PCR</i> -käsikirja		1	

* Sisältää spesifisten etu- ja taka-alkukkeiden seoksen ABL1-kontrolligeenille sekä spesifisen FAM-BHQ-1-koettimen.

† Sisältää spesifisten etu- ja taka-alkukkeiden seoksen BCR-ABL1 Mbcr -fuusiogeenille sekä spesifisen FAM-BHQ-1-koettimen.

Tarvittavat materiaalit (jotka eivät kuulu toimitukseen)

Työskennellessä kemikaalien kanssa on aina käytettävä asianmukaista laboratoriotakkaa, kertakäyttökäsineitä ja suojalaseja. Lisätietoja on tuotekohtaisissa käyttöturvallisuustiedotteissa, joita saa tuotteen toimittajalta.

Erytrosyyttien lyysauksen reagenssit

- Erythrocyte Lysis (EL) Buffer (tuotenumero 79217)
- 14,3 M β-merkaptotaanoli*
- RNeasy® Midi Kit (tuotenumero 75144)

* Erytrosyyttien lyysausta ja RNA:n eristystä varten suositellut kemikaalit ja välineet voivat olla mahdollisesti tartuntavaarallisia. Sopivia henkilösuojaimia on käytettävä ja käyttöä edeltäviä turvaohjeita on noudatettava.

Kokonais-RNA:n eristyksen reagenssit

- RNeasy Midi Kit (tuotenumero 75144)
- Etanoli (70 %, 80 % ja 96–100 %)
- RNA:n puhdistus- ja konsentroitinvaihe: RNeasy MinElute® Cleanup Kit (tuotenumero 74204)
- Nukleasiton PCR-vesi

Tarvikkeet

- Nukleasittomia, aerosolisuojattuja, steriilejä PCR-pipettikärkiä, joissa on hydrofobinen suodatin
- RNAasiittomaan ruiskuun kiinnitetty 18–20 G:n neula*
- 0,5 ml:n tai 0,2 ml:n nukleasittomia putkia
- 1,5 ml:n tai 2 ml:n nukleasittomia putkia
- 50 ml:n sentrifugiputkia
- Liuskaputkia ja korkkeja, 0,1 ml, Rotor-Gene Q -laitetta varten (tuotenumerot 981103 tai 981106)
- Jäätä

Laitteet

- Pipettejä*, jotka on tarkoitettu PCR:ään (1–10 µl; 10–100 µl; 100–1 000 µl)
- Pöytämallinen sentrifugi*, jossa on roottori 0,2 ml:n ja 2 ml:n reaktioputkia varten (ja joka kykenee saavuttamaan nopeuden 8 000 x g tai 10 000 rpm)
- Spektrofotometri*

* Varmista, että välineet on tarkastettu ja kalibroitu valmistajan ohjeiden mukaan.

- Laboratoriosentrifugi*, jossa on roottori 15 ja 50 ml:n sentrifugiputkia varten (nopeus 3 000–5 000 x g mahdollinen) ja jolla voidaan sentrifugoida jäädytettynä (4 °C)
- Lämpösekoitin, kuumennettava ravistava inkubaattori, kuumennuslohko tai vesihaude (käänteistä transkriptiovaihetta varten)*
- Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM* (tuotenumero 9002032) ja lisävarusteet
Huomautus: Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM -laitetta ei voi käyttää käänteistä transkriptiovaihetta varten.

Välineet qPCR-ajoa ja manuaalista analyysiä varten

Rotor-Gene Q -ohjelmiston versio 2.1.0 tai uudempi versio Välineet qPCR-ajoa ja automaattista analyysiä varten

- Rotor-Gene AssayManager® -ohjelmiston versio 2.1.x (x ≥ 0)
- Rotor-Gene AssayManager Gamma Plug-in, versio 1.0.x (x ≥ 0)
- Testiprofiili ipsogen_BCR-ABL1Mbc(ABL)_blood_CE_V1_0_x.iap (x ≥ 1)

Varoitukset ja varotoimet

In vitro -diagnostiikkaan

Turvallisuustiedot

Kun käsittelet kemikaaleja, käytä aina asianmukaista suojavaatetusta, kertakäyttökäsineitä ja suojalaseja. Lisätietoa saa tuotekohtaisista käyttöturvatiedoista. Ne ovat saatavilla kätevässä ja kompaktissa PDF-muodossa osoitteessa www.qiagen.com/safety, jossa voi tarkastella ja tulostaa kaikkien QIAGEN®-sarjan ja sarjakomponentin käyttöturvallisuustiedotteita.

Kaikki kemikaalit ja biologiset aineet ovat mahdollisesti vaarallisia. Näytteet ovat mahdollisesti tartuntavaarallisia ja niitä on kohdeltava biologisesti vaarallisina materiaaleina. Verta pidetään tartuntavaarallisena. Kokoverta käsiteltäessä on noudatettava paikallisten määräysten mukaisia varotoimia.

Erytrosyyttien lyysausta ja RNA:n eristystä varten suositellut kemikaalit ja välineet voivat olla mahdollisesti tartuntavaarallisia. Sopivia henkilösuojaimia on käytettävä ja käyttöä edeltäviä turvaohjeita on noudatettava.

Yleiset varotoimet

qPCR-testit edellyttävät hyvien laboratoriokäytäntöjen noudattamista, kuten molekyylibiologiaan käytettävien laitteiden kunnossapitoa sovellettavien säädösten ja standardien mukaisesti. Tämän tuotteen osat riittävät 24 reaktion suorittamiseen testiä kohti.

- Hävitä näytteet ja testijäte paikallisten turvallisuuskäytäntöjen mukaisesti.

- *ipsogen* BCR-ABL1 MbcR RGQ RT-PCR Kit -sarjan sisältämät reagenssit on laimennettu optimaalisesti. Älä laimenna reagensseja enempää, koska seurauksena saattaa olla suorituskyvyn heikkeneminen.
- Kaikki *ipsogen* BCR-ABL1 MbcR RGQ RT-PCR Kit -sarjan mukana toimitetut reagenssit on tarkoitettu käytettäväksi ainoastaan muiden samaan sarjaan sisältyvien reagenssien kanssa. Älä vaihda mitään reagenssia toisen *ipsogen* BCR-ABL1 MbcR RGQ RT-PCR Kit -sarjan reagenssiin, koska se voi vaikuttaa suorituskykyyn.
- Lisätietoja varoituksista, varotoimista ja menettelytavoista on Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM -laitteen, Rotor-Gene AssayManager 2.1 -ohjelmiston ja Gamma plug-in -lisäosan käyttöoppaissa.
- Inkubaatioajan ja -lämpötilan muuttaminen voi tuottaa virheellisiä tai ristiriitaisia tietoja.
- Älä käytä vanhentuneita tai virheellisesti säilytettyjä komponentteja.
- Noudata äärimmäistä varovaisuutta, jotta positiivisia kontroleja käytettäessä ei tapahdu ristikontaminaatiota.
- Noudata äärimmäistä varovaisuutta, jotta cDNA tai PCR-tuote ei aiheuta kulkeutumiskontaminaatiota ja siitä seuraavaa väärää positiivista signaalia.
- Noudata äärimmäistä varovaisuutta RNAasi- ja DNAasi-kontaminaation välttämiseksi, sillä se voi hajottaa RNA- tai cDNA-mallin.
- Älä avaa Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM -laitetta, ennen kuin ajo on päättynyt.
- Varmista, että testaat oikean näytteen. Varo väärän näytteen käyttämistä, latausvirhettä ja pipetointivirheitä.
- Varmista näytteiden oikea tunnistus ja jäljitettävyyks käsittelemällä näytteitä järjestelmällisesti.

Siksi on suositeltavaa noudattaa seuraavia ohjeita:

- Käytä nukleasittomia laboratoriovälineitä (esimerkiksi pipettejä, pipettien kärkiä, reaktiopulloja).

- Käytä kaikissa pipetointivaiheissa uusia aerosolisuojattuja pipettikärkiä näytteiden ja reagenssien ristikontaminaation välttämiseksi.
- Valmista esi-PCR-päaseokset vain tarkoitukseen varatuilla materiaaleilla (pipetit, kärjet ja muut) erillisellä alueella, jonne ei tuoda DNA-matriiseja (DNA:ta, plasmideja tai PCR-tuotteita).
- Lisää malli erillisellä alueella (mieluiten erillisessä huoneessa), jolla on tarvittavat materiaalit (pipetit, kärjet ja muut).

Lue näytteiden valmistelussa käytettävien reagenssien ja sarjojen turvallisuuteen liittyvät tiedot vastaavista käsikirjoista. *RNeasy Midi/Maxi -käsikirja* sisältää RNeasy Midi Kit -sarjan (tuotenumero 75144) ja Buffer EL -puskurin (tuotenumero 79217) turvallisuuteen liittyvät tiedot ja *RNeasy MinElute Cleanup -käsikirja* sisältää RNeasy MinElute Cleanup Kit -sarjan (tuotenumero 74204) turvallisuuteen liittyvät tiedot.

Reagenssien säilytys ja käsittely

Kuljetusolosuhteet

ipsogen BCR-ABL1 MbcR RGQ RT-PCR Kit toimitetaan kuivajään päällä. Jos *ipsogen* BCR-ABL1 MbcR RGQ RT-PCR Kit ei ole toimitushetkellä jäässä, ulkopakkaus on avattu kuljetuksen aikana tai toimituspakkaus ei sisällä lähetysluetteloa tai reagensseja, ota yhteyttä QIAGENin paikalliseen tekniseen tukipalveluun tai jälleenmyyjään (katso yhteystiedot takakannesta tai osoitteesta www.qiagen.com).

Säilytysolosuhteet

ipsogen BCR-ABL1 MbcR RGQ RT-PCR Kit on varastoitava heti vastaanoton jälkeen tasaaisessa -30...-15 °C:n lämpötilassa olevaan pakastimeen. qPCR-seokset on suojattava valolta.

Näytteen valmistelussa käytettävien reagenssien ja sarjojen säilytystiedot: RNeasy Midi Kit -sarjan (tuotenumero 75144), Buffer EL -puskurin (tuotenumero 79217), RNeasy MinElute Cleanup Kit -sarjan (tuotenumero 74204) käsikirjat.

Stabiilius

Kyseisissä olosuhteissa säilytetty *ipsogen* BCR-ABL1 MbcR RGQ RT-PCR Kit on stabiili mainittuun viimeiseen käyttöpäivämäärään asti.

Avatut reagenssit voidaan säilyttää alkuperäispakkauksissaan $-30...-15$ °C:n lämpötilassa pakkauksessa ilmoitettuun vanhenemispäivään asti. Pakastamis- ja sulattamisjaksoja saa olla enintään viisi.

Näytteen valmistelussa käytettävien reagenssien ja sarjojen stabiiliutta koskevat tiedot: RNeasy Midi Kit -sarjan (tuotenumero 75144), Buffer EL -puskurin (tuotenumero 79217), RNeasy MinElute Cleanup Kit -sarjan (tuotenumero 74204) käsikirjat.

Näytteen käsittely ja säilytys

ipsogen BCR-ABL1 MbcR RGQ RT-PCR Kit on tarkoitettu käytettäväksi kokoverestä saatujen RNA-näytteiden kanssa. Kaikkia näytteitä on käsiteltävä mahdollisesti vaarallisina.

Kokoverinäytteet

- Kokoverinäytteiden hyytyminen on estettävä kalium-EDTA:lla (K₂-EDTA) ja näytteitä on säilytettävä $2-8$ °C:n lämpötilassa enintään 4 vuorokautta ennen RNA:n eristämistä.
- Pakastettua verta ei saa käyttää.
- Merkitse, käsittele ja säilytä verinäytteitä kontrolloidulla tavalla paikallisten käytäntöjen mukaan.

Huomautus: Kokoverinäytteet on kuljetettava samoissa olosuhteissa kuin missä ne säilytetään, jotta lämpötila pysyy vakaana.

RNA-näytteet

- Eristämisen jälkeen puhdistettua RNA:ta voidaan säilyttää $-30...-15$ °C:n lämpötilassa tai sitä kylmemmässä ($-90...-65$ °C), jos pitkäaikainen säilytys on tarpeen.
- Merkitse, käsittele ja säilytä RNA-näytteitä kontrolloidulla tavalla paikallisten käytäntöjen mukaan.

Huomautus: RNA-näytteet on kuljetettava samoissa olosuhteissa kuin missä ne säilytetään, jotta säilytyksen ja kuljetuksen aikana ei esiinny lämpötilanvaihtelua.

Menetelmä

Kokonais-RNA tulisi puhdistaa 10 millilitrasta perifeeristä kokoverta, joka on kerätty EDTA-putkiin.

- Varmista, että erytrosyyttien lyysauksessa, RNA:n eristyksessä ja RNA:n konsentroinnissa käytettävät reagenssit eivät ole vanhentuneet ja että ne on kuljetettu ja säilytetty oikeissa olosuhteissa.
- Käytä RNeasy Midi Kit -sarjaa (tuotenumero 75144) ja erytrosyyttien lyysauksen Buffer EL -puskuria (tuotenumero 79217) RNA:n puhdistamiseen perifeerisestä kokoverestä.

Erytrosyyttien lyysausprotokolla kokonaisleukosyyttien kokoverestä eristämistä varten

Tämä protokolla on suunniteltu kokonaisleukosyyttien eristämiseen 10 millilitrasta ihmisen kokoverta Buffer EL-puskurin (tuotenumero 79217) avulla.

Huomautus: Tätä protokollaa ei ole tarkoitettu pakastettuja kokoverinäytteitä varten.

Tärkeitä huomioita ennen kuin aloitat

- Ihmisen verta ja ruumiinnesteitä pidetään tartuntavaarallisina. Kokoverta käsiteltäessä on noudatettava paikallisten määräysten mukaisia varotoimia.
- RLT-puskuriin (Buffer RLT) voi muodostua saostuma säilytyksen aikana. Liuota se tarvittaessa lämmittämällä ja aseta sen jälkeen huoneenlämpöön.
- Erytrosyyttien lyysausvaihe tulisi tehdä jäähähteessä.
- Tämän protokollan sentrifugointivaiheet 3 ja 5 tulisi tehdä 4 °C:n lämpötilassa tavallisella laboratoriosentrifugilla.

Ennen aloittamista tehtävät valmistelut

- Valmista (RNeasy Midi Kit -sarjan mukana toimitettu) RLT-puskuri lisäämällä β -merkaptotoetanolia (β -ME): lisää 10 μ l β -ME:tä RLT-puskurin 1 millilitraa kohti.
- RLT-puskuri pysyy stabiilina 1 kuukauden ajan β -ME:n lisäämisen jälkeen.
Huomautus: β -ME on myrkyllistä; annostele vetokaapissa ja käytä suojavaatetusta.
Huomautus: RLT-puskuri sisältää guanidiini-isotiosyanaattia, joka valkaisuaineen kanssa yhdistettynä voi muodostaa herkästi reagoivia aineita. Älä lisää valkaisuainetta tai happamia liuoksia suoraan näytteen preparointijätteeseen.

Menetelmä

1. Lisää 40 ml Buffer EL-puskuria 10 millilitraan kokoverta yhdessä 50 ml:n sentrifugiputkessa. Sekoita kääntelemällä hetken aikaa.
2. Inkuboi 15 minuuttia jäähäuteessa. Sekoita kääntelemällä hetken aikaa kahdesti inkuboinnin aikana.
Huomautus: Samea suspensio muuttuu läpikuultavaksi inkuboinnin aikana punasolujen hajoamisen seurauksena.
3. Sentrifugoi nopeudella 400 x g 10 minuuttia 4 °C:n lämpötilassa. Poista supernatantti kokonaan. Säilytä leukosyyttipelletti.
Huomautus: Leukosyyteistä muodostuu pelletti sentrifugoinnin jälkeen. Huolehdi siitä, että supernatantti poistetaan kokonaan. Mahdolliset punasolujäämät poistetaan seuraavissa vaiheissa.
Jos supernatanttia ei poisteta kokonaan, se estää lyysausta ja laimentaa lysaattia, mikä vaikuttaa RNA:n RNeasy-kalvoon kiinnittymisen olosuhteisiin. Molemmat vaikutukset voivat vähentää RNA-saantoa.
4. Lisää leukosyyttipellettiin 20 ml Buffer EL-puskuria ja suspendoi uudelleen pipetoimalla ylös ja alas.

5. Sentrifugoi nopeudella 400 x g 10 minuuttia 4 °C:n lämpötilassa. Poista supernatantti kokonaan. Säilytä leukosyyttipelletti.

Huomautus: Seuraavat sentrifugointivaiheet (esimerkiksi RNA:n eristys) on tehtävä 20–25 °C:n lämpötilassa.

6. Löysää leukosyyttipellettiä liikuttamalla putkea 4 millilitrassa RLT-puskuria, johon on lisätty β-ME:tä. Sekoita vorteksoimalla tai pipetoimalla.

Huomautus: Varmista, että β-ME lisätään RLT-puskuriin ennen käyttöä.

7. Varmista hajoaminen käyttämällä tavallista roottori-staattori-homogenoijaa vähintään 45 sekuntia täydellä nopeudella, kunnes näyte on kauttaaltaan homogeeninen. Toinen vaihtoehto on vorteksoida näytettä 10 sekuntia ja viedä lysaatti vähintään 10 kertaa RNAasiin ruiskuun kiinnitetyn 18–20 G:n neulan läpi.

Huomautus: Epätäydellinen hajoaminen vähentää saantoa merkittävästi tukkimalla RNeasy-kolonnia. Kun hajottamiseen käytetään roottori-staattori-homogenoijaa, RNA-kokonaissaanto on yleensä suurempi kuin muilla homogenisointitavoilla.

Huomautus: Näytteitä voidaan säilyttää –90...–65 °C:n lämpötilassa lyysauspuskurissa hajottamisen jälkeen. Pakastetut näytteet pysyvät stabiileina kuukausia.

Kokonais-RNA:n eristäminen

Tämä protokolla on tarkoitettu solujen kokonais-RNA:n eristämiseen homogenisoidusta leukosyyttilyysaatista, joka on suspendoitu uudelleen 4 millilitrassa RLT/β-ME:tä.

Tärkeitä huomioita ennen kuin aloitat

- DNA:n hajotusta ei tarvita, koska RNeasy-piiksidikalvotekniikka poistaa tehokkaasti suurimman osan DNA:ta.
- RLT- ja RW1-puskurit (Buffer RW1) sisältävät guanidiinisuluaa, joten ne eivät sovellu käytettäväksi yhdessä valkaisuainetta sisältävien desinfioivien reagenssien kanssa. Guanidiini on ärsyttävää. Noudata varotoimia ja käytä käsineitä käsittelyn aikana.

- RNeasy-protokolla on suoritettava huoneenlämmössä. Työskentele nopeasti menetelmän aikana.
- Kaikki sentrifugointivaiheet tehdään 20–25 °C:n lämpötilassa. Varmista, ettei sentrifugi jäähydy alle 20 °C:n lämpötilaan.
- Jokaisessa sentrifugointivaiheessa koko määrän on kuljettava kolonnan läpi. Sentrifugoinnin toistaminen voi olla tarpeen.

Ennen aloittamista tehtävät valmistelut

- Sulata leukosyyttilysaatti tarvittaessa huoneenlämmössä ennen RNA:n eristysprotokollan aloittamista.
- Valmistele 4 ml 70-prosenttista etanolia näytettä kohti.
- RPE-puskuri toimitetaan konsentraattina. Lisää ennen ensimmäistä käyttökertaa 4 tilavuutta etanolia (96–100 %) pullon merkintöjen mukaan työskentelyliuosta varten.

Menetelmä

1. Lisää lysaattiin 4 ml 70-prosenttista etanolia ja sekoita huolellisesti ravistamalla. Älä sentrifugoi.

Huomautus: Etanolin lisäämisen jälkeen voi muodostua näkyvä saostuma. Liuota saostuma kokonaan ravistamalla ja siirry heti vaiheeseen 2. Saostuman epätäydellisestä liukenemisesta voi aiheutua DNA-kontaminaation takia epäpuhdas kokonais-RNA-näyte.

2. Lisää näyte, mahdollisesti muodostunut saostuma mukana, RNeasy Midi Column -putkeen, joka on asetettu 15 ml:n sentrifugiputkeen (sisältyy toimitukseen). Sulje putki varovasti ja sentrifugoi 5 minuuttia nopeudella 4 000 x g. Hävitä suodos.

Huomautus: Täyten enimmäismäärä on 4 ml. Jos määrä on yli 4,0 ml, täytä alikvootit peräkkäin RNeasy Column -putkeen ja sentrifugoi edellä annettujen ohjeiden mukaan. Hävitä suodos jokaisen sentrifugointivaiheen jälkeen.

Käytä sentrifugiputkea uudelleen vaiheessa 3.

3. Lisää 4 ml RW1-puskuria RNeasy Column -putkeen. Sulje sentrifugiputki varovasti ja pese kolonni sentrifugoimalla 5 minuuttia nopeudella 4 000 x g. Hävitä suodos.

Huomautus: Suodos sisältää RLT- tai RW1-puskuria, joten se ei ole yhteensopiva valkaisuaineen kanssa.

Käytä sentrifugiputkea uudelleen vaiheessa 4.

4. Lisää 2,5 ml RPE-puskuria (Buffer RPE) RNeasy Column -putkeen. Sulje sentrifugiputki varovasti ja pese kolonni sentrifugoimalla 2 minuuttia nopeudella 4 000 x g.

Huomautus: RPE-puskuri toimitetaan konsentraattina. Varmista, että RPE-puskuriin lisätään etanolia ennen käyttöä.

Käytä sentrifugiputkea uudelleen vaiheessa 5. Suodosta ei tarvitse hävittää.

5. Lisää taas 2,5 ml RPE-puskuria RNeasy Column -putkeen. Sulje sentrifugiputki varovasti ja sentrifugoi 5 minuuttia nopeudella 4 000 x g, jotta RNeasy-piiksidikalvo kuivuu.

Huomautus: RNeasy-kalvon kuivaaminen on tärkeää, sillä etanolijäämä voi haitata myöhempiä reaktioita. Tällä sentrifugoinnilla varmistetaan, ettei eluoinnin aikana kulkeudu etanolia.

Huomautus: Ota RNeasy Column -putki sentrifugoinnin jälkeen varovasti pois sentrifugiputkesta, niin ettei se koske suodokseen ja aiheuta etanolin kulkeutumista.

6. Siirrä eluointia varten RNeasy Column -putki uuteen 15 ml:n nöyteputkeen (sisältyy toimitukseen). Pipetoi 200 µl RNAasitonta vettä suoraan RNeasy-piiksidikalvolle. Sulje putki varovasti. Anna sen vaikuttaa 1 minuutti ja sentrifugoi sitten 3 minuuttia nopeudella 4 000 x g.

7. Toista eluointivaihe (vaihe 6) käyttämällä vaiheen 6 eluaattia ja sentrifugoi sitten 5 minuuttia nopeudella 4 000 x g.

Huomautus: Pitkäaikaista säilytystä varten RNA voidaan säilyttää -90...-65 °C:n lämpötilassa.

RNA:n kvalifiointi ja kvantifiointi

RNA-syötteen laatu vaikuttaa merkittävästi testin laatuun. Suosittelemme arvioimaan puhdistettua RNA:ta spektrofotometrillä tai agarosigeelielektroforeesilla ennen analyysyä.

- Spektrofotometrin kalibroinnissa on käytettävä nukleasitonta PCR-vettä.
- 1,0:n optinen tiheys 260 nm:ssä vastaa noin 40 µg/ml yksisäikeistä RNA:ta.
- OD₂₆₀/OD₂₈₀-suhde välillä 1,8 ja 2,1 on merkki erittäin puhtaasta RNA:sta.

RT-vaihetta varten tarvittava RNA-pitoisuus on 200 ng/µl. Jos eluaatin RNA-pitoisuus on alle 200 ng/µl, eluaatin RNA-pitoisuutta tulisi lisätä RNeasy MinElute Cleanup Kit -sarjalla (QIAGEN, tuotenumero 74204).

Jos eluaatin RNA-pitoisuus on sallitun alueen yläpuolella, pitoisuudeksi tulisi muuttaa 200 ng/µl RNAsittomalla vedellä.

Huomautus: Tarkista RNA-pitoisuus normalisoinnin jälkeen.

RNA-pitoisuus

Tämä protokolla on optimoitu RNA:n konsentroitua varten.

Tärkeitä huomioita ennen kuin aloitat

- DNAasin hajotusta ei tarvita, koska RNeasy MinElute -piioksidikalvotekniikka poistaa tehokkaasti suurimman osan DNA:ta.
- RLT-puskuri sisältää guanidiinisuluaa, joten se ei sovellu käytettäväksi yhdessä valkaisuainetta sisältävien desinfioiden reagenssien kanssa.
- Tee menetelmän kaikki vaiheet huoneenlämmössä (15–25 °C). Työskentele nopeasti menetelmän aikana.

- Tee kaikki sentrifugointivaiheet 20–25 °C:n lämpötilassa tavallisella mikrosentrifugilla. Varmista, ettei sentrifugi jäähydy alle 20 °C:n lämpötilaan.
- RLT-puskuriin voi muodostua saostuma säilytyksen aikana. Liuota se tarvittaessa lämmittämällä ja aseta sen jälkeen huoneenlämpöön (15–25 °C).

Ennen aloittamista tehtävät valmistelut

- Valmistele 500 µl 80-prosenttista etanolia konsentroitavaa RNA-näytettä kohti.
- RPE-puskuri toimitetaan konsentraattina. Lisää ennen ensimmäistä käyttökertaa 4 tilavuutta etanolia (96–100 %) pullon merkintöjen mukaan työskentelyliuosta varten.
- Aseta putket huoneenlämpöön ennen aloittamista.
- Mittaa käsiteltävien näytteiden tilavuus ja muuta sitä niin, että näytteen lopullinen tilavuus on 200 µl.

Menetelmä

1. Kun näytteen tilavuudeksi on muutettu 200 µl RNA-sittomalla vedellä, lisää 700 µl RLT-puskuria ja sekoita hyvin.
2. Lisää laimennettuun RNA:han 500 µl 96–100-prosenttista etanolia ja sekoita hyvin pipetoimalla. Älä sentrifugoi. Siirry heti vaiheeseen 3.
3. Siirrä enintään 700 µl näytettä RNeasy MinElute Spin Column -putkeen, joka on asetettu 2 ml:n näyteputkeen (sisältyy toimitukseen). Sulje korkki varovasti ja sentrifugoi 15 sekuntia nopeudella $\geq 8\ 000 \times g$ ($\geq 10\ 000$ rpm). Hävitä suodos. Siirrä mahdollisesti jäljelle jäänyt näyte (enintään 700 µl) ja toista sentrifugointi. Hävitä suodos.

Huomautus: Suodos sisältää RLT-puskuria, joten se ei ole yhteensopiva valkaisuaineen kanssa. Lue turvallisuustiedot kohdasta Varoitukset ja varotoimet, sivulta 15.

4. Aseta RNeasy MinElute Spin Column -putki uuteen 2 ml:n näyteputkeen (sisältyy toimitukseen).

5. Lisää Spin Column -putkeen 500 µl RPE-puskuria. Sulje korkki varovasti ja sentrifugoi 15 sekuntia nopeudella $\geq 8\ 000 \times g$ ($\geq 10\ 000$ rpm) kalvon pesua varten. Hävitä suodos.

Huomautus: RPE-puskuri toimitetaan konsentraattina. Varmista, että RPE-puskuriin lisätään etanolia ennen käyttöä.

Käytä näyteputkea uudelleen vaiheessa 6.

6. Lisää RNeasy MinElute Spin Column -putkeen 500 µl 80-prosenttista etanolia. Sulje korkki varovasti ja sentrifugoi 2 minuuttia nopeudella $\geq 8\ 000 \times g$ ($\geq 10\ 000$ rpm) kalvon pesua varten. Hävitä suodos ja näyteputki.

Huomautus: Suodos sisältää RLT-puskuria, joten se ei ole yhteensopiva valkaisuaineen kanssa.

Huomautus: Ota RNeasy MinElute Spin Column -putki sentrifugoinnin jälkeen varovasti pois näyteputkesta, niin ettei se koske suodokseen ja aiheuta etanolin kulkeutumista.

7. Aseta RNeasy MinElute Spin Column -putki uuteen 2 ml:n näyteputkeen (sisältyy toimitukseen).
8. Avaa Spin Column -putken korkki ja sentrifugoi täydellä nopeudella 5 minuutin ajan. Hävitä suodos ja näyteputki.

Jotta Spin Column -putkien korkit pysyvät ehjinä, aseta putket sentrifugiin niin, että niiden välillä on vähintään yksi tyhjä paikka. Suuntaa korkit niin, että ne osoittavat päinvastaiseen suuntaan roottorin pyörimiseen nähden (jos esimerkiksi roottori pyörii myötäpäivään, aseta korkit vastapäivään).

Spin Column -kalvon kuivaaminen on tärkeää, sillä etanolijäämä voi haitata myöhempiä reaktioita. Sentrifugoimalla Spin Column -putket korkki auki varmistetaan, ettei etanolia siirry RNA:n eluoinnin aikana.

9. Aseta RNeasy MinElute Spin Column -putki uuteen 1,5 ml:n näyteputkeen (sisältyy toimitukseen).
10. Lisää 20 µl RNA-sitontaa vettä suoraan Spin Column -kalvon keskelle. Sulje korkki varovasti ja sentrifugoi 1 minuutti täydellä nopeudella RNA:n eluointia varten.
11. Aseta näytteet jäähäuteeseen eluointivaiheen jälkeen.

12. Mittaa käsiteltävien näytteiden tilavuus ja muuta sitä niin, että lopullinen pitoisuus on 200 ng/µl.

Lisätietoja on kohdassa RNA:n kvalifiointi ja kvantifiointi, sivulla 25.

Käänteinen transkriptio

Ennen aloittamista tehtävät valmistelut

- Sulata kaikki tarvittavat komponentit paitsi käänteistranskriptaasi, jota on säilytettävä pakastimessa, kun sitä ei käytetä. Aseta putket, joissa sulatettavat komponentit ovat, jäähauteeseen.
Huomautus: Älä anna komponenttien sulaa yli 30 minuuttia, jotta materiaali ei pilaannu.
- Vältä mallin ja nukleasin kontaminaatio: puhdista työpöydän alue, jolla käänteisen transkription (RT) seos valmistetaan.
- Sekoita hyvin pipetoimalla käänteisen transkription reagenssit, RNA-näytteet, positiiviset kontrollit ja IS-MMR-kalibraattorin sisältäviä putkia 10 kertaa ylös ja alas ja sentrifugoi niitä hetken aikaa ennen käyttöä. Aseta ne sitten jäähauteeseen.
- RT-negatiivinen kontrolli luodaan käänteisen transkriptiovaiheen aikana nukleasittoman PCR-veden avulla.
- Tarvittava määrä on 3 µg RNA:ta näytettä kohti.
- *ipsogen* BCR-ABL1 MbcR RGQ RT-PCR Kit sisältää tarpeeksi reagensseja kahdeksan näytteen kolmea ajoa varten.

Menetelmä

1. Inkuboi 15 µl kutakin näytettä, positiivisia kontrolleja (voimakkaasti ja heikosti positiivisia kontrolleja), vettä (jota käytetään RT-negatiivisen kontrollin luontiin) ja IS-MMR-kalibraattoria 5 minuuttia 65 °C:n lämpötilassa. Jäähdytä niitä sitten heti jäähauteessa vähintään 5 minuuttia.

- Käytä niitä hetken aikaa (noin 5 sekuntia) sentrifugissa, jotta neste kertyy putken pohjalle. Aseta ne sitten jäähautteeseen.
- Valmista seuraava RT-seos käsiteltävien näytteiden, kontrollien ja kalibraattoreiden määrän mukaan (Taulukko 1).

Huomautus: lopullisen reaktiokohtaisen tilavuuden on oltava 25 µl.

Taulukko 1. RT-seoksen valmistus

Komponentti	Näytekohtainen tilavuus (µl)	RT-seos: 12 + 1 reaktiota (µl)	Lopullinen määrä
RT-seos, 3,33x	7,5	97,5	1x
Käänteistranskriptaasi, 10x	2,5	32,5	1x
RT-seoksen lopullinen tilavuus (lisätään vaiheesta 4)	10	130	–
Näyte, positiiviset kontrollit, IS-MMR-kalibraattori tai vesi (vaiheesta 1)	15	15 kutakin	–
Kokonaismäärä	25	25 kutakin	–

- Pipetoi 10 µl RT-seosta jokaiseen merkittyyn RNA-näytettä, positiivisia kontrolleja, vettä tai kalibraattoria sisältävään putkeen (vaiheesta 3).
- Sekoita hyvin pipetoimalla 10 kertaa ylös ja alas ja sentrifugoi hetken aikaa (noin 5 sekuntia), jotta neste kertyy putken pohjalle.

Huomautus: Vie kaikki *ipsogen* BCR-ABL1 MbcR RGQ RT-PCR Kit -sarjan käänteisen transkription reagenssit takaisin pakastimeen reaktioiden valmistelun jälkeen, jotta materiaali ei pilaannu.

- Aseta putket PCR-laitteeseen ja määritä käänteisen transkription ohjelma (Taulukko 2).

Taulukko 2. Käänteisen transkription lämpötilaprofiili

Vaihe	Parametrit
Reverse transcription 1 (Käänteinen transkriptio 1)	Temperature (Lämpötila): 25 °C Time (Aika): 10 minuuttia
Reverse transcription 2 (Käänteinen transkriptio 2)	Temperature (Lämpötila): 46 °C Time (Aika): 45 minuuttia
Inactivation (Inaktivaatio)	Temperature (Lämpötila): 85 °C Time (Aika): 5 minuuttia
Cooling (Jäähdytys)	Temperature (Lämpötila): 4 °C Time (Aika): 5 minuuttia

7. Kun ohjelma on päättynyt, käytä putkia hetken aikaa sentrifugissa (noin 5 sekuntia), jotta neste kertyy putken pohjalle. Pidä putkia jäähähteessä tai -20 °C:ssa qPCR-testiin asti.

Manuaalinen analyysi: qPCR-ajo RGQ-ohjelmistolla ja Rotor-Gene Q MDx 5plex -laitteella, jossa on 72 putken roottori

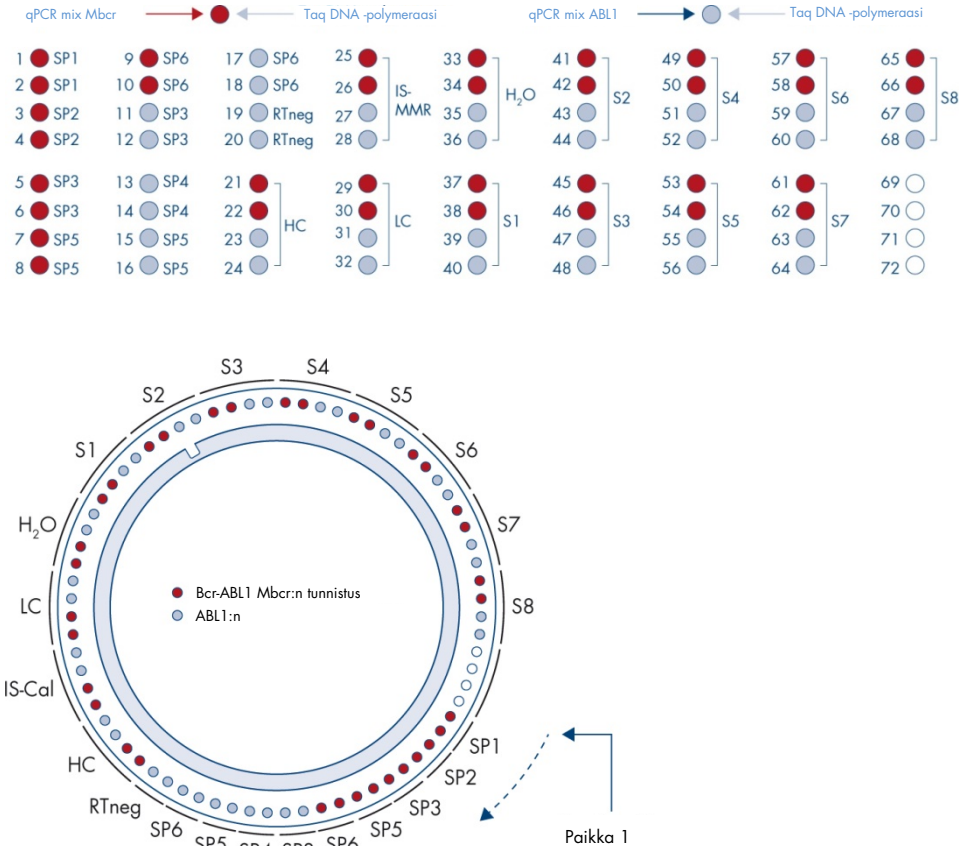
Suosittelemme tekemään kaikki mittaukset kahtena (Taulukko 3). Tämän sarjan avulla samassa kokeessa voidaan testata kahdesti kahdeksan cDNA-näytettä. *ipsogen* BCR-ABL1 MbcR RGQ RT-PCR Kit -sarjalla voidaan tehdä kolme koetta.

Taulukko 3. Reaktioiden määrä Rotor-Gene Q -laitteella, jossa on 72 putken roottori

Näyte	Reaktiot
qPCR Mix ABL1:llä (34 reaktiota)	
8 cDNA-näytettä	8 x 2 reaktiota
1 cDNA:n voimakkaasti positiivinen kontrolli	2 reaktiota
1 cDNA:n heikosti positiivinen kontrolli	2 reaktiota
1 cDNA:n IS-MMR-kalibraattori	2 reaktiota
Yhden plasmidin standardit	4 x 2 reaktiota (SP3, SP4, SP5 ja SP6)
RT-negatiivinen kontrolli	2 reaktiota
Vesikontrolli	2 reaktiota
qPCR Mix MbcR:llä (34 reaktiota)	
8 cDNA-näytettä	8 x 2 reaktiota
1 cDNA:n voimakkaasti positiivinen kontrolli	2 reaktiota
1 cDNA:n heikosti positiivinen kontrolli	2 reaktiota
1 cDNA:n IS-MMR-kalibraattori	2 reaktiota
Yhden plasmidin standardit	5 x 2 reaktiota (SP1, SP2, SP3, SP5 ja SP6)
Vesikontrolli	2 reaktiota

Levyn ja roottorin järjestys

Samassa kokeessa on suositeltavaa testata vähintään kahdeksan cDNA:n näytettä, jotta standardien, alukkeiden ja koettimien seokset voidaan optimoida. Kuva 3 sisältää esimerkkikokeen roottorin järjestyksen.



Kuva 3. Kokeiden roottorin järjestys. SP1–SP6: BCR-ABL1 MbcR- ja ABL1-standardit; RTneg: RT-negatiivinen kontrolli; IS-Cal: IS-MMR-kalibraattori; HC: Voimakkaasti positiivinen kontrolli; LC: Heikosti positiivinen kontrolli; H₂O: Vesikontrolli; S1–S8: cDNA-näytteet.

Huomautus: Täytä kaikki tyhjät paikat tyhjiillä putkilla. Numerot ilmaisevat sijainnit latauslohkossa sekä roottorin loppuasennon.

qPCR-ajon asettaminen

Ennen aloittamista tehtävät valmistelut

- Sulata kaikki tarvittavat komponentit paitsi *Taq*-DNA-polymeraasi; kyseistä entsyymiä on säilytettävä pakastimessa, kun sitä ei käytetä. Aseta putket, joissa sulatettavat komponentit ovat, jäähäuteeseen.

Huomautus: Älä anna komponenttien sulaa yli 30 minuuttia, jotta materiaali ei pilaannu.

- Vältä mallin ja nukleasin kontaminaatio: puhdista työpöydän alue, jolla PCR-seos valmistetaan.
- Sekoita hyvin pipetoimalla qPCR Mix ABL1- ja qPCR Mix Mbcr -seosta sisältäviä putkia 10 kertaa ylös ja alas ja sentrifugoi niitä hetken aikaa ennen käyttöä. Aseta ne sitten jäähäuteeseen.

Menetelmä

1. Valmista PCR-päaseos käsiteltävien näytteiden määrän mukaan.

Taulukko 4 sisältää pipetointijärjestyksen yhden reagenssiseoksen valmistusta varten. Laskelma perustuu lopulliseen reaktioon, jonka määrä on 25 µl. Esiseos valmistetaan reaktioiden määrän mukaan samalla aluke- ja koetinseoksella (qPCR Mix ABL1 tai qPCR Mix Mbcr). Mukaan on sisällytetty lisätilavuutta pipetointivirheen kompensoimista varten.

Huomautus: Älä käytä alle 25 µl:n reaktiotilavuuksia (reaktioseos + näyte).

Taulukko 4. PCR-päaseoksen valmistaminen

Komponentti	1 reaktio (µl)	Esiseos ABL1 tai Mbcr: 34 +2 reaktiota (µl)	Lopullinen määrä
qPCR-seos (qPCR Mix ABL1 tai qPCR Mix Mbcr)	19,75	711	1x
Taq DNA -polymeraasi	0,25	9	1x
Näyte, standardi, kontrolli tai IS-MMR-kalibraattori (lisätään vaiheessa 3)	5	5 kutakin	–
Kokonaismäärä	25	25 kutakin	–

2. Annostele 20 µl qPCR-esiseosta jokaiseen 0,1 ml:n Rotor-Gene Q -putkeen.
3. Lisää 5 µl RT-tuotetta (cDNA), joka saatiin käänteisen transkriptiovaiheen jälkeen (Käänteinen transkriptio, sivu 28), 5 µl standardeja, 5 µl kontroleja tai IS-MMR-kalibraattoria kuvassa esitetyn näytteen valmistelun mukaan (Kuva 4, kokonaismäärä 25 µl).
4. Sekoita varovasti pipetoimalla ylös ja alas.

Rotor-Gene MDx -instrumentin valmistelu ja qPCR-ajon aloittaminen

1. Aseta putket laitteen mukana tulleeseen sovittimeen.

Huomautus: Käyttämättömät paikat on täytettävä tyhjiillä putkilla.

2. Aseta lukitusrenas putkien päälle ja lukitse se painamalla.
3. Aseta täysi sovitin Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM -laitteeseen.
4. Ohjelmoi Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM -laitteeseen PCR-ohjelma ohjeen mukaan: Taulukko 5.

Huomautus: Vie kaikki *ipsogen* BCR-ABL1 Mbcr RGQ RT-PCR Kit -sarjan komponentit takaisin pakastimeen, jotta materiaali ei pilaannu.

Taulukko 5. qPCR-ajon lämpötilaprofiili

Vaihe	Parametrit
Mode of analysis (Analyysi)	Quantitation (Kvantitointi)
Hold (Pito) 1	Temperature (Lämpötila): 95°C Time (Aika): 15 minuuttia
Cycling (Syklit)	50 sykliä 94 °C; 15 sekuntia 60 °C; 60 sekuntia, FAM-fluoresenssin tunnistus Green (Vihreä) -kanavalla.

5. Valitse New Run Wizard (Ohjattu uusi ajo) -valintaikkunasta Gain Optimisation (Vahvistuksen optimointi). Näyttöön tulee Auto-Gain Optimisation Setup (Automaattisen vahvistuksen optimoinnin asetukset) -valintaikkuna. Tarkista Green (Vihreä) -kanavan arvoväli Min Reading (Vähimmäisarvo) 5 FI - Max Reading (Enimmäisarvo) 10 FI ja hyväksyttävä vahvistusalue –10...10.
6. Tarkista, että Perform Optimisation Before 1st Acquisition (Suorita optimointi ennen 1. keruuta) -asetus on valittu, ja sulje Auto-Gain Optimisation Setup (Automaattisen vahvistuksen optimoinnin asetukset) -valintaikkuna.
7. Käynnistä PCR-ohjelma.
8. Luo molemmat ABL1- ja Mbcr-ryhmät, täytä Edit samples (Muokkaa näytteitä) -ikkuna.
9. Kun PCR on päättynyt, valitse Options (Asetukset) ja Crop Start Cycles (Rajaa aloitusykyliit). Poista sykliä 10 edeltävät tiedot. Valitse sitten Analysis (Analyysi) ja Cycling A. Green from 10 (Vihreä jakso 10:stä) raportin mukaan: left threshold = 10.00 (vasen kynnysarvo = 10.00).

10. Jatka seuraavalla tavalla ABL1- ja Mbc-ryhmälle:

- Jos näyttöön tulee Calculate Automatic Threshold (Laske automaattinen kynnyisarvo) -ikkuna, valitse Cancel (Peruuta).
- Määritä kynnyisarvoksi 0,03 (ikkunan oikeassa alareunassa).
- Valitse raportin normalisointitavaksi Dynamic Tube (Dynaaminen putki) ja valitse Slope Correct (Kulmakertoimen korjaus) kohinan korjausta varten.
- Tarkista, että Outlier Removal (Poikkeavan arvon poisto) -asetukseksi on määritetty 0 % (vastaa NTC-kynnyisarvoa) ja Reaction Efficiency Threshold (Reaktion tehokkuuden kynnyisarvo) -asetusta ei ole valittu.
- Määritä kaaviolle lineaarinen asteikko ja Auto-Scale (Automaattinen asteikko).
- Napsauta monistumiskäyriä sisältävää ikkunaa hiiren kakkospainikkeella ja tarkista, että Digital filter (Digitaalinen suodatin) -asetuksen arvoksi on määritetty Light (Kevyt).
- Valitse ikkunan oikealta puolelta named on (nimetty) -asetus, jotta kaikki näytteet varmasti näkyvät.

Kun kaikki vaiheet on tehty, varmista raakatietojen tallennus ja siirry tulosten analysointiin (Tietojen analysointi, sivu 48).

Automaattinen analyysi: qPCR-ajo RGAM-ohjelmistolla ja Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM -laitteella, jossa on 72 putken roottori

Suosittelemme tekemään kaikki mittaukset kahtena (Taulukko 6). Tämän sarjan avulla samassa kokeessa voidaan testata kahdesti kahdeksan cDNA-näytettä. *ipsogen* BCR-ABL1 MbcR RGQ RT-PCR Kit -sarjalla voidaan tehdä kolme koetta.

Taulukko 6. Reaktioiden määrä Rotor-Gene Q -laitteella, jossa on 72 putken roottori

Näyte	Reaktiot
qPCR Mix ABL1:llä (34 reaktiota)	
8 cDNA-näytettä	8 x 2 reaktiota
1 cDNA:n voimakkaasti positiivinen kontrolli	2 reaktiota
1 cDNA:n heikosti positiivinen kontrolli	2 reaktiota
1 cDNA:n IS-MMR-kalibraattori	2 reaktiota
Yhden plasmidin standardit	4 x 2 reaktiota (SP3, SP4, SP5 ja SP6)
RT-negatiivinen kontrolli	2 reaktiota
Vesikontrolli	2 reaktiota
qPCR Mix MbcR:llä (34 reaktiota)	
8 cDNA-näytettä	8 x 2 reaktiota
1 cDNA:n voimakkaasti positiivinen kontrolli	2 reaktiota
1 cDNA:n heikosti positiivinen kontrolli	2 reaktiota
1 cDNA:n IS-MMR-kalibraattori	2 reaktiota
Yhden plasmidin standardit	5 x 2 reaktiota (SP1, SP2, SP3, SP5 ja SP6)
Vesikontrolli	2 reaktiota

Tärkeitä huomioita ennen kuin aloitat

ipsogen BCR-ABL1 MbcR RGQ RT-PCR Kit -sarja on ajettava Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM -laitteella ja Rotor-Gene AssayManager v2.1 -ohjelmistolla. Tutustu huolellisesti Rotor-Gene Q

MDx -laitteen käyttöön ennen protokollan suorittamista. Lisätietoja on laitteen, Rotor-Gene AssayManager 2.1 -ohjelmiston ja Gamma Plug-in -lisäosan käyttöoppaissa.

Rotor-Gene AssayManager v2.1 mahdollistaa PCR-tulosten automaattisen tulkinnan. Sykliparametrit ovat lukittuina ajon aikana.

Ennen aloittamista tehtävät valmistelut

Rotor-Gene AssayManager 2.1 -ohjelmisto on asennettava Rotor-Gene Q -laitteeseen liitettyyn tietokoneeseen. Sen voi ladata QIAGENin verkkosivuilta osoitteesta http://www.qiagen.com/Products/Rotor-GeneAssayManager_v2.1.aspx. Lisätietoja Rotor-Gene AssayManager v2.1 -ydinohjelmistosta on *Rotor-Gene AssayManager v2.1 Core Application -käyttöoppaassa*.

- *ipsogen* BCR-ABL1 MbcR RGQ RT-PCR Kit edellyttää erityistä Gamma Plug-in -lisäosaa. Tämän lisäosan voi ladata QIAGEN-verkkosivuilta:
<https://www.qiagen.com/resources/resourcedetail?id=bf8c9a8-245b-4ab4-99ea-1b39e2c243a0&lang=en>. Tämä lisäosa on asennettava tietokoneeseen, johon on jo asennettu Rotor-Gene AssayManager -ohjelmiston versio 2.1.
- *ipsogen* BCR-ABL1 MbcR RGQ RT-PCR Kit -sarjan kanssa tarvitaan myös testiprofiilia. Testiprofiili (*.iap-tiedosto) sisältää kaikki parametrit, joita tarvitaan qPCR-testin sykleihin ja analyysiin. Sen voi ladata *ipsogen* BCR-ABL1 MbcR RGQ RT-PCR Kit -sarjaan liittyviltä QIAGEN-verkkosivuilta <https://www.qiagen.com/shop/detection-solutions/personalized-healthcare/ipsogen-bcr-abl1-mbcR-rgq-rt-pcr-kit-ce/#resources>. Testiprofiili on tuotava Rotor-Gene AssayManager 2.1 -ohjelmistoon.

Huomautus: *ipsogen* BCR-ABL1 MbcR RGQ RT-PCR Kit voidaan ajaa vain, jos tietyt asetukset on määritetty Rotor-Gene AssayManager 2.1 -ohjelmistossa.

Järjestelmänlaajuisen prosessiturvallisuuden vuoksi seuraavat pakolliset asetukset on asetettava suljetun tilan mukaisiksi:

- Material number required (Materiaalinumero pakollinen)
- Valid expiry date required (Kelvollinen vanhenemispäivä pakollinen)
- Lot number required (Eränumero pakollinen)

Gamma Plug-in -lisäosan asentaminen ja testiprofiilin tuominen

Gamma Plug-in -lisäosan ja testiprofiilin asennus- ja tuontiohjeet esitetään Rotor-Gene AssayManager 2.1 -ohjelmiston ja Gamma Plug-in -lisäosan käyttöoppaissa: *Rotor-Gene AssayManager v2.1 Core Application -käyttöopas* ja *Gamma Plug-in -käyttöopas*.

- Lataa Gamma Plug-in ja ipsogen_BCR-ABL1 MbcR(ABL)_blood_CE-testiprofiilin tuorein versio QIAGENin verkkosivuilta.
- Aloita asennus kaksoisnapsauttamalla RGAM_V2_1_Gamma_Plug-in.Installation.V1_0_0.msi-tiedostoa. Noudata näyttöön tulevia asennusohjeita. Lisätietoja tästä prosessista on *Rotor-Gene AssayManager v2.1 Core Application -käyttöoppaan* osassa Installing Plug-ins (Lisäosien asentaminen).

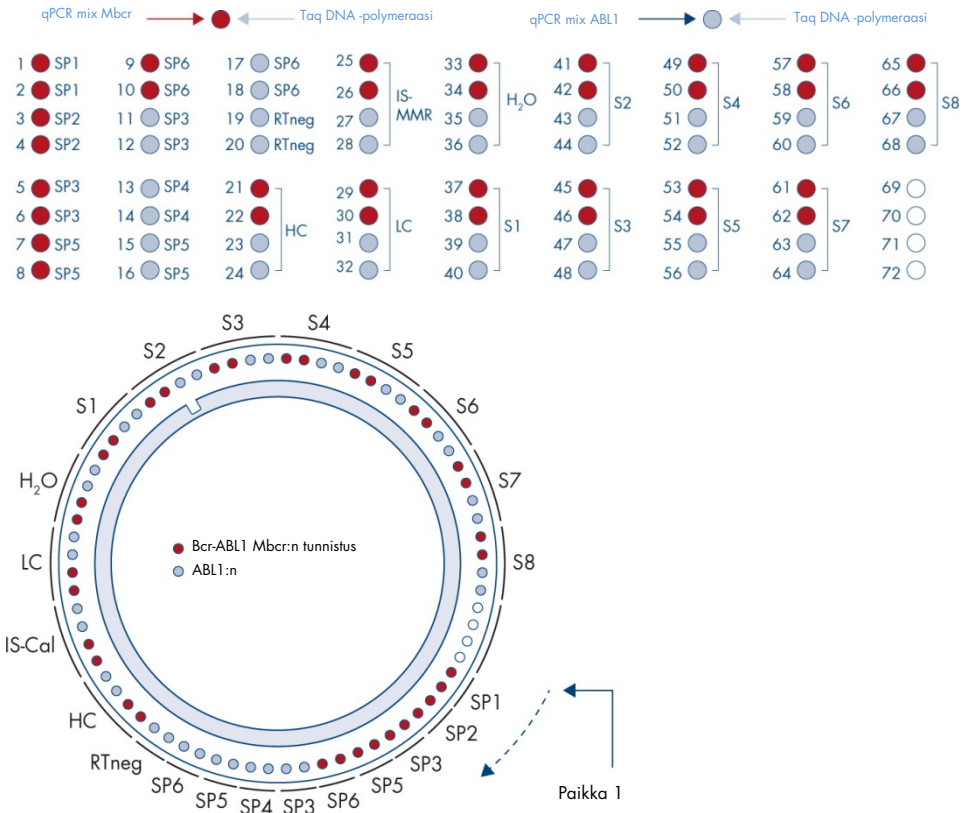
Huomautus: Järjestelmänlaajuisen prosessiturvallisuuden vuoksi valitse Settings (Asetukset) -välilehdestä valintaruudut Material number required (Materiaalinumero pakollinen), Valid expiry date required (Kelvollinen vanhenemispäivä pakollinen) ja Lot number required (Eränumero pakollinen) suljettua tilaa varten (osasta Work list [Työluettelo]). Jos nämä eivät ole valittu, valitse ne napsauttamalla.

-
- Lisäosan onnistuneen asennuksen jälkeen henkilön, jolla on Rotor-Gene AssayManager -ohjelmiston järjestelmänvalvojan oikeudet, on tuotava ipsogen_BCR-ABL1Mbc(ABL)_blood_CE-testiprofiili seuraavalla tavalla:
 1. Kirjautu Rotor-Gene AssayManager 2.1 -ohjelmistoon käyttäjänä, jolla on järjestelmänvalvojan oikeudet.
 2. Valitse määritysympäristö.
 3. Valitse Assay Profiles (Testiprofiilit) -välilehti.
 4. Napsauta Import (Tuo) -painiketta.
 5. Valitse tuotava testiprofiili ipsogen_BCR-ABL1Mbc(ABL)_blood_CE ja valitse Open (Avaa).
 6. Kun testiprofiili on tuotu, sitä voidaan käyttää Setup (Asetukset) -ympäristössä.

Huomautus: Testiprofiilin samaa versiota ei voi tuoda kahdesti.

Levyn ja roottorin järjestys

Samassa kokeessa on suositeltavaa testata vähintään kahdeksan cDNA:n näytettä, jotta standardien, alukkeiden ja koettimen seokset voidaan optimoida. Kuva 4 sisältää esimerkkikokeen roottorin järjestyksen.



Kuva 4. Kokeiden roottorin järjestys. SP1–SP6: BCR-ABL1 MbcR- ja ABL1-standardit; **RTneg:** RT-negatiivinen kontrolli; **IS-Cal:** IS-MMR-kalibraattori; **HC:** Voimakkaasti positiivinen kontrolli; **LC:** Heikosti positiivinen kontrolli; **H₂O:** Vesikontrolli; **S1–S8:** cDNA-näytteet. **Huomautus:** Täytyä kaikki tyhjät paikat tyhjiä putkilla. Numerot ilmaisevat sijainnit latauslohkossa sekä roottorin loppuasennon.



Putket on asetettava roottoriin kuvan mukaisesti (Kuva 4), koska testiprofiilissa määritetty automaattinen analyysi perustuu tähän järjestykseen. Jos käytetään eri asettelua, tuloksista tulee poikkeavia.

Huomautus: täytä kaikki lepopaikat tyhjiillä putkilla.

Työluettelon luominen

Luo käsiteltävistä näytteistä työluettelo seuraavasti.

1. Käynnistä Rotor-Gene Q MDx -instrumentti.
2. Avaa Rotor-Gene AssayManager 2.1 -ohjelmisto ja kirjaudu Operator (Käyttäjä) -rooliin kuuluvana käyttäjänä suljetussa toimintatilassa.
3. Napsauta työluettelon hallinnan New manual work list (Uusi manuaalinen työluettelo) -painiketta (Setup [Asetukset] -ympäristö).
4. Valitse Assay (Testi) -vaiheen käytettävissä olevien testiprofiilien luettelosta ipsogen_BCR-ABL1Mbc(ABL)_blood_CE-testiprofiili.
5. Siirrä valittu testiprofiili Selected assay profiles (Valitut testiprofiilit) -luetteloon Add assay to work list (Lisää testi työluetteloon) -painikkeella. Testiprofiilin pitäisi nyt näkyä Selected assay profiles (Valitut testiprofiilit) -luettelossa.
6. Kirjoita näytteiden lukumäärä vastaavaan kenttään.
7. Valitse Kit information (Sarjan tiedot) -joukko ja lisää seuraavat *ipsogen* BCR-ABL1 Mbc RGG RT-PCR -sarjan tiedot, jotka on painettu laatikon kanteen.
 - Materiaalinumero: 0670923
 - Kelvollinen vanhenemispäivä
 - Eränumero.
8. Valitse Samples (Näytteet) -vaihe. Näkyviin tulee luettelo näytteen tiedoista. Luettelo edustaa roottorin odotettua asettelua.

9. Kirjoita tähän luetteloon näytteen tunnistenumero(t) sekä mahdolliset muut valinnaiset näytetiedot kommenttina jokaisen näytteen kohdalle.
10. Valitse Properties (Ominaisuudet) -vaihe ja kirjoita työluettelon nimi.
11. Valitse is applicable (on soveltuva) -valintaruutu.
12. Tallenna työluettelo.
13. Työluettelo voidaan tulostaa ja tämä voi auttaa qPCR:n valmistelussa ja asetusten määrittämisessä. Tulosta työluettelo painamalla Print work list (Tulosta työluettelo) -painiketta. Näytteen tiedot ovat osa työluetteloa.
Huomautus: Työluettelo voidaan luoda, kun koe on määritetty laitteessa tai ennen näytteiden lisäämistä laitteeseen, koska työluettelotiedosto voidaan tallentaa.

qPCR-ajon asettaminen

Ennen aloittamista tehtävät valmistelut

- Sulata kaikki tarvittavat komponentit paitsi *Taq*-DNA-polymeraasi; kyseistä entsyymiä on säilytettävä pakastimessa, kun sitä ei käytetä. Aseta putket, joissa sulatettavat komponentit ovat, jäähauteeseen.
Huomautus: Älä anna komponenttien sulaa yli 30 minuuttia, jotta materiaali ei pilaannu.
- Vältä mallin ja nukleasin kontaminaatio: puhdista työpöydän alue, jolla PCR-seos valmistetaan.
- Sekoita hyvin pipetoimalla qPCR Mix ABL1- ja qPCR Mix Mbcr -seosta sisältäviä putkia 10 kertaa ylös ja alas ja sentrifugoi niitä hetken aikaa ennen käyttöä. Aseta ne sitten jäähauteeseen.

Menetelmä

1. Valmista PCR-päaseos käsiteltävien näytteiden määrän mukaan.

Taulukko 7 sisältää pipetointijärjestyksen yhden reagenssiseoksen valmistusta varten. Laskelma perustuu lopulliseen reaktioon, jonka määrä on 25 µl. Esiseos valmistetaan reaktioiden määrän mukaan samalla aluke- ja koetinseoksella (qPCR Mix ABL1 tai qPCR Mix Mbcr). Mukaan on sisällytetty lisätilavuutta pipetointivirheen kompensoimista varten.

Huomautus: Älä käytä alle 25 µl:n reaktiutilavuuksia (reaktioseos + näyte).

Taulukko 7. PCR-päaseoksen valmistaminen

Komponentti	1 reaktio (µl)	Esiseos ABL1 tai Mbcr: 34 +2 reaktiota (µl)	Lopullinen määrä
qPCR-seos (qPCR Mix ABL1 tai qPCR Mix Mbcr)	19,75	711	1x
Taq DNA -polymeraasi	0,25	9	1x
Näyte, standardi, kontrolli tai IS-MMR-kalibraattori (lisätään vaiheessa 3)	5	5 kutakin	–
Kokonaismäärä	25	25 kutakin	–

2. Annostele 20 µl qPCR-esiseosta jokaiseen 0,1 ml:n Rotor-Gene Q -putkeen.
3. Lisää 5 µl RT-tuotetta (cDNA), joka saatiin käänteisen transkriptiovaiheen jälkeen (Käänteinen transkriptio, sivu 28), 5 µl standardeja, 5 µl kontrolleja tai IS-MMR-kalibraattoria kuvassa esitetyn näytteen valmistelun mukaan (Kuva 4, kokonaismäärä 25 µl).
4. Sekoita varovasti pipetoimalla ylös ja alas.

Rotor-Gene MDx -instrumentin valmistelu ja qPCR-ajon aloittaminen

1. Aseta 72-kuoppainen roottori Rotor-Gene Q MDx -roottoriipitimeen.
2. Aseta liuskaputket roottoriin oikeisiin paikkoihin; aloita paikasta 1 kuvassa esitetyllä tavalla (Kuva 4). Aseta kaikkiin käyttämättömiin paikkoihin tyhjä korkilla suljettu putki.
Huomautus: varmista, että ensimmäinen putki on asetettu sijaintiin 1, ja että liuskaputket on asetettu oikeisiin suuntiin ja sijainteihin kuvan Kuva 4 esittämällä tavalla.
3. Kiinnitä lukitusrengas.
4. Lataa roottori ja lukitusrengas Rotor-Gene Q MDx -laitteeseen ja sulje laitteen kansi.
5. Valitse Rotor-Gene AssayManager 2.1 -ohjelmistossa vastaava työluettelo työluetteloiden hallinnasta ja napsauta Apply (Käytä) -painiketta tai, jos työluettelo on vielä auki, napsauta Apply (Käytä) -painiketta.
Huomautus: jos kokeen omaa työluetteloa ei ole luotu, kirjaudu Rotor-Gene AssayManager 2.1 -ohjelmistoon ja noudata kohdan Työluettelon luominen, sivu 42 ohjeita ennen kuin jatkat seuraavien ohjeiden mukaan.
6. Kirjoita testin nimi.
7. Valitse käytettävä sykleri Cyler selection (Syklerin valinta) -ikkunassa.
8. Valitse oikea lukitusrenkaan kiinnitys ja vahvista näytössä, että lukitusrengas on kiinnitetty.
9. Napsauta Start run (Käynnistä ajo) -painiketta. *ipsogen* BCR-ABL1 MbcR RGQ RT-PCR -ajon pitäisi alkaa.

Vapauta ja raportoï qPCR-tulokset

1. Kun ajo on päättynyt, valitse Finish run (Lopeta ajo).
2. Vapauta ja hyväksy ajo:
 - Approver (Hyväksyjä) -roolissanä sisäänkirjautuneet henkilöt: Valitse Release and go to approval (Vapauta ja siirry hyväksyntään).

- Operator (Käyttäjä)nä -roolissasisäänkirjautuneet henkilöt: Valitse Release (Vapauta).
3. Release and go to approval (Vapauta ja siirry hyväksyntään) -vaihtoehdon valinta tuo testin tulokset näkyviin.
 4. Jos käyttäjäroolissa oleva käyttäjä napsauttaa Release (Vapauta) -vaihtoehtoa, jonkun toisen käyttäjän on kirjauduttava sisään Approver (Hyväksyjä) -roolissa ja valittava Approval (Hyväksyntä) -ympäristö.
 - a. Suodata hyväksyttävä testi valitsemalla suodatinvaihtoehdot ja napsauttamalla Apply (Käytä) -painiketta.
 - b. Valitse sen kokeen viereinen valintaruutu, jonka aiot hyväksyä.
 - c. Napsauta Start approval (Aloita hyväksyntä) -painiketta.

Koska koe sisältää yhden kalibraattorin, Calibrator (Kalibraattori) -välilehteen on lisättävä pakolliset kalibraattoritiedot, jotta näytteet voidaan lopuksi hyväksyä.

5. Napsauta Use calibrator (Käytä kalibraattoria) -painiketta ja lisää vastaava arvo (joka on IS-MMR-kalibraattorin putkessa tai analyysin sertifiikaatissa).

Huomautus: Tämä arvo on lisättävä kahdesti Enter calibrator value (Lisää kalibraattorin arvo)- ja Reenter calibrator value (Lisää kalibraattorin arvo uudelleen) -kenttään.

Vahvista lisätyt arvot Apply (Käytä) -painikkeella, niin tulokset päivittyvät.

Huomautus: Kun vähintään yksi näyte on vapautettu, kalibraattoria ei enää tarvitse muuttaa.

6. Tarkista tulokset ja napsauta Release/Report data (Vapauta/raportoi tiedot) -painiketta. Valitse OK. Järjestelmä luo *.pdf-muotoisen raportin ja tallentaa sen automaattisesti ennalta määritettyyn kansioon.

Tämä kansiopolku on oletusarvoisesti: **QIAGEN > Rotor-Gene AssayManager > Export > Reports (QIAGEN > Rotor-Gene AssayManager > Vie > Raportit)**

Huomautus: tätä polkua ja kansiota voi muuttaa Configuration (Kokoonpano) -ympäristössä.

Huomautus: vianmäärittystä varten tarvitaan tukipaketti ajosta. Tukipaketteja voidaan luoda hyväksyntä- tai arkistoympäristössä (*Rotor-Gene AssayManager 2.1 Core Application -käyttöopas*, osa 1.8, Troubleshooting (Vianmäärittäminen) > Creating a support package (Tukipaketin luonti)). Auditointiloki tapahtumahetkeltä ± 1 päivä voi myös olla hyödyllinen. Auditointilokin voi hakea Service (Huolto) -ympäristöstä (*Rotor-Gene AssayManager v2.1 Core Application -käyttöopas*, osa 1.5.5.5).

7. Poista Rotor-Gene Q MDx -laitteeseen ladatut materiaalit ja hävitä liuskaputket paikallisten turvallisuussäädösten mukaan.

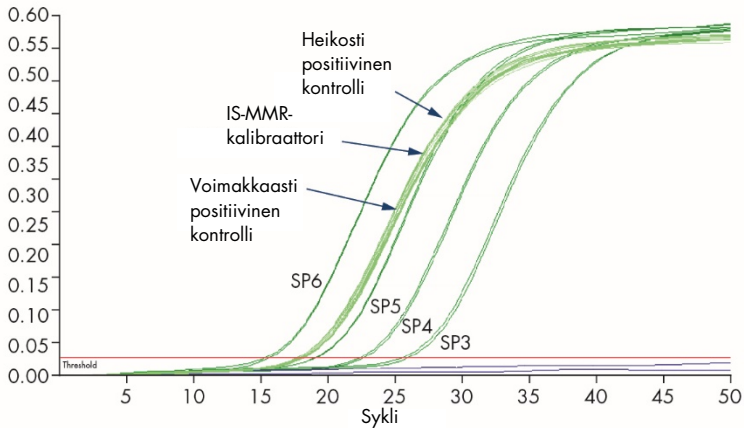
Tulosten tulkinta RGQ Software -ohjelmassa

Tietojen analysointi

TaqMan®-tekniikkaa käytettäessä kynnyksarvon ylittävän signaalin tunnistamiseen tarvittavien PCR-sykliden määrä eli sykliden kynnyksarvo (C_T) on suoraan verrannollinen reaktion alussa olevan kohteen määrään.

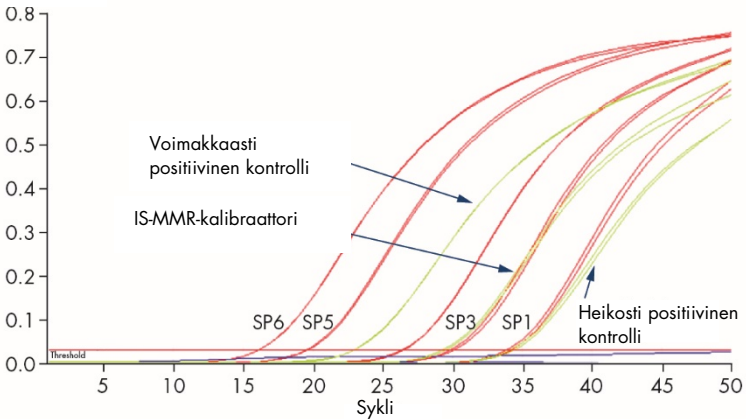
Käyttämällä standardeja, joissa on tunnettu määrä molekyyliä, voidaan määrittää standardikäyrä ja selvittää testinäytteessä olevan kohteen tarkka määrä. Standardikäyrät perustuvat plasmideihin. Virheettömien standardikäyrien varmistamiseksi ABL1-testiä varten käytetään neljää standardilaimennosta ja MbcR-testiä varten viittä standardilaimennosta. Sarja sisältää myös IS-kalibraattorin, jonka avulla tulokset voidaan esittää IS-asteikolla. Kuva 5 ja Kuva 6 sisältävät esimerkkejä TaqMan-monistumiskäyristä, jotka muistuttavat *ipsogen* BCR-ABL1 MbcR RGQ RT-PCR Kit -sarjalla standardeille, IS-MMR-kalibraattorille sekä voimakkaasti ja heikosti positiivisille kontrolleille luotuja käyriä.

Norm. Fluoro.



Kuva 5. ABL1:n tunnistaminen kontrollien ja standardien SP3, SP4, SP5 ja SP6 avulla. 10^3 , 10^4 , 10^5 ja 10^6 kopiota/reaktio.

Norm. Fluoro.



Kuva 6. BCR-ABL1 Mbcr:n tunnistaminen kontrollien ja standardien SP1, SP2, SP3, SP5 ja SP6 avulla. 10^1 , 10^2 , 10^3 , 10^5 ja 10^6 kopiota/reaktio.

Raakatietoihin sovellettavat laatuksiteerit ja standardikäyrät

Toistettavuus replikaattien välillä

Toistojen välisen C_T -arvojen vaihtelun pitäisi olla ≤ 2 tai toistotesti tulisi mitätöidä seuraavia tapauksia lukuun ottamatta:

Jos keskimääräinen $C_T \geq 36$ tai jos $C_{T_a} \geq 36$ ja C_{T_b} -tulos on not detected (ei havaittu), ΔC_T -kriteerejä ei sovelleta; toistotesti on määritysten mukainen. Tällöin C_{T_a} :lle laskettu kopiomäärä (CN) tulisi jakaa kahdella.

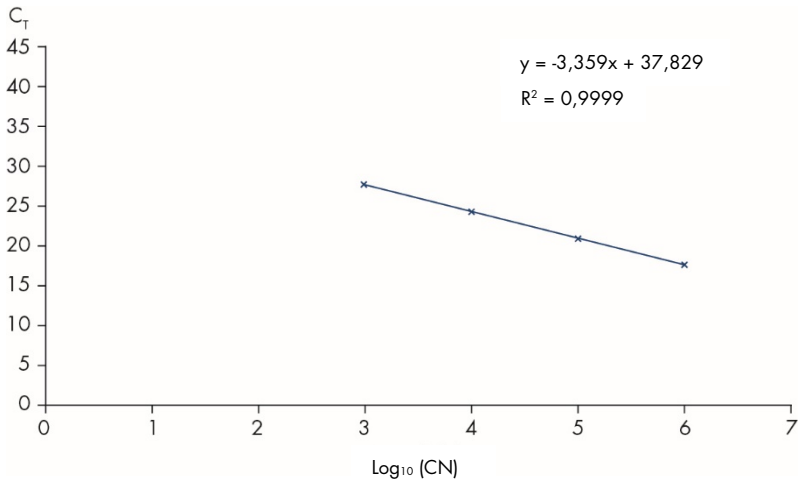
Huomautus: käyttäjien tulisi mitata toistettavuus omassa laboratoriossaan.

Standardikäyrät

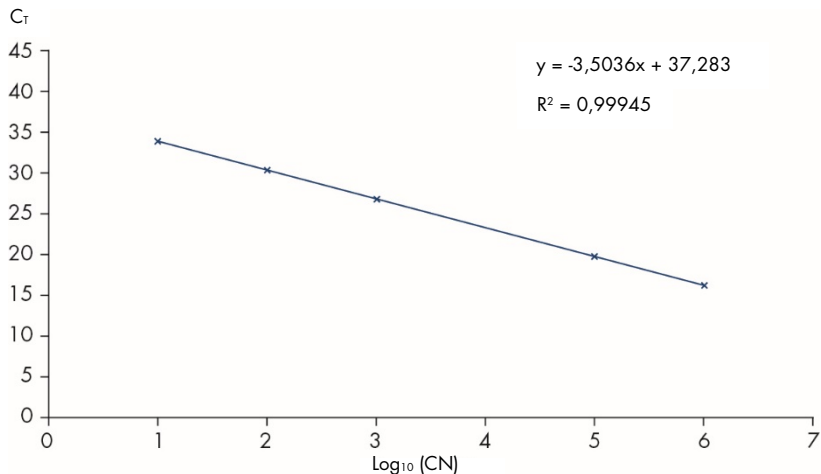
Raakatiedot voidaan liittää Excel®-tiedostoon analysointia varten.

Kunakin geenin (ABL1 ja BCR-ABL1 Mbc) plasmidin standardilaimennoksista saadut C_T -arvot lasketaan logaritmisin kopiomäärän mukaan (3, 4, 5 ja 6 standardeille SP3, SP4, SP5 ja SP6; 1, 2, 3, 5 ja 6 standardeille SP1, SP2, SP3, SP5 ja SP6). Kuva 7 sisältää esimerkin neljällä standardilaimennoksella lasketusta ABL1-käyrästä. Kuva 8 sisältää esimerkin viidellä standardilaimennoksella lasketusta BCR-ABL1 Mbc -käyrästä.

T



Kuva 7. Neljästä standardilaimennoksesta laskettu ABL1-geenin standardikäyrä. Ohjelma laskee lineaarisen regressiosuoran ($y = ax + b$), jossa a on viivan kulmakerroin ja b on y -leikkauspiste eli y -koordinaatti, jonka kohdalla viiva leikkaa y -akselin. Yhtälö ja determinaatikerroin (R^2) näkyvät kaaviossa.



Kuva 8. Viidestä standardilaimennoksesta laskettu BCR-ABL1 MbcR -geenin standardikäyrä. Ohjelma laskee lineaarisen regressiosuoran ($y = ax + b$), jossa a on viivan kulmakerroin ja b on y -leikkauspiste eli y -koordinaatti, jonka kohdalla viiva leikkaa y -akselin. Yhtälö ja determinaatikerroin (R^2) näkyvät kaaviossa.

Koska standardit ovat kymmenkertaisia laimennoksia, käyrän teoreettinen kulmakerroin on –3,3. Kulmakerroin välillä –3,1 ja –3,6 on hyväksyttävä, kunhan R^2 on $> 0,95$. Täsmällisiä tuloksia ajatellen $R^2 > 0,98$ on kuitenkin toivottava arvo.

Huomautus: SP1-standardilaimennos (BCR-ABL1-geenin plasmidi, 10 kopiota) on tunnistettava BCR-ABL Mbc_r-standardikäyrän määrittämistä varten.

Kopiomäärä (CN)

ABL1- tai BCR-ABL1 Mbc_r-standardikäyrän yhtälöä tulisi käyttää, kun raakadatan C_T-arvoja (jotka on saatu tuntemattomien näytteiden qPCR Mix ABL1:n tai qPCR Mix Mbc_r:n avulla) muunnetaan ABL1:n tai BCR-ABL1:n kopiomääräksi (ABL1_{CN} tai BCR-ABL1 Mbc_rCN).

$$\text{Log}_{10} \text{ näyte ABL1CN} = \frac{\text{Keskimääräinen ABL C}_T - \text{ABL1 -standardikäyrän leikkauspiste}}{\text{ABL-standardikäyrän kulmakerroin}}$$

$$\text{Log}_{10} \text{ näyte BCR-ABL1 Mbc}_{CN} = \frac{\text{Keskimääräinen BCR-ABL1 Mbc}_r \text{ C}_T - \text{BCR-ABL1 Mbc}_r \text{ -standardikäyrän leikkauspiste}}{\text{BCR-ABL1 Mbc}_r \text{-standardikäyrän kulmakerroin}}$$

Kaikkien ABL1_{CN}-arvojen laadunvalvonta

Jos RNA:n laatu on huono tai RT-qPCR-ajossa on ongelmia, tuloksena saadut ABL1-kopiomäärät voivat ovat pieniä.

Jotta testi olisi mahdollisimman herkkä, ABL1_{CN}:n pitäisi olla suurempi tai yhtä suuri kuin 100 000 voimakkaasti positiivisella RNA-kontrollilla, heikosti positiivisella RNA-kontrollilla ja IS-MMR-kalibraattorilla.

RT-negatiivinen kontrolli ja vesikontrolli

Käänteisen transkriptiovaiheen (RT-negatiivinen kontrolli) ja PCR-vaiheen (vesikontrolli) mallittoman kontrollin (NTC) tuloksena pitäisi olla nolla CN sekä ABL1- että BCR-ABL1 Mbcr -geenille. Sen vuoksi tuloksiin ei pitäisi sisältyä C_T-arvoa tai C_T-arvo on standardikäyrien leikkauspisteen yläpuolella. Näiden NTC-kontrollien positiivinen tulos on merkki käänteisen transkription tai qPCR-ajon tai molempien aikana tapahtuneesta ristikontaminaatiosta.

Normalisoitu kopiomäärä (NCN)

Näiden CN-arvojen suhteesta saadaan normalisoitu kopiomäärä (NCN):

$$\text{NCN} = \frac{\text{BCR-ABL1 Mbc}_{\text{CN}}}{\text{ABL1}_{\text{CN}}} \times 100$$

Laske normalisoidun kopiomäärän (NCN) tulos voimakkaasti positiiviselle RNA-kontrollille (NCN_{HC}), heikosti positiiviselle RNA-kontrollille (NCN_{LC}), IS MMR -kalibraattorille (NCN_{cal}) ja kullekin näytteelle (NCN_{sample}).

Normalisoidun kopiomäärän arvojen laadunvalvonta

Voimakkaasti ja heikosti positiivisten kontrollien sekä IS-MMR-kalibraattorin avulla voidaan valvoa ABL1- ja BCR-ABL1 Mbc -testin monistumisvaihetta ja käänteistä transkriptiovaihetta transkriptin kvantifioinnin aikana.

- *ipsogen* BCR-ABL1 Mbc RGG RT-PCR Kit -sarjalla testatulle IS-MMR-kalibraattorille lasketun NCN-tuloksen on oltava arvovälillä 0,05–0,3, sillä muuten NCN-arvoja ei voi muuntaa IS-asteikon arvoiksi.
- Testin herkkyyttä voidaan arvioida vain, jos heikosti positiivinen RNA-kontrolli tunnistetaan.

Muuntaminen IS-asteikon arvoiksi

Huomautus: Katso ennen tulkintaa arvo IS-MMR-kalibraattorin putken etiketistä tai sarjan mukana toimitetusta analyysin sertifikaatista. (Tarkista, että sekä etiketissä että sertifikaatissa on sama arvo.)

Laske IS-asteikon mukainen normalisoitu kopiomäärä (IS-NCN_{sample}) käyttämällä kokeellista IS-MMR-kalibraattorin NCN-tulosta (NCN_{cal}) ja sille määritettyä arvoa (IS-Cal-arvo), joka on ilmoitettu analyysin sertifiikaatissa.

$$\text{IS-NCN}_{\text{sample}} = \frac{\text{NCN}_{\text{sample}} \times \text{IS-Cal-arvo}}{\text{NCN}_{\text{cal}}}$$

IS-NCN-arvojen laadunvalvonta

- IS-NCN_{HC}-tuloksen (voimakkaasti positiivisen RNA-kontrollin NCN IS-asteikolla) pitäisi olla ei merkittävää molekulaarista vastetta (No MMR [Ei MMR], lisätietoja on jäljempänä kohdassa Molekulaarisen vasteen raportointi).
- IS-NCN_{LC}-tuloksen (heikosti positiivisen RNA-kontrollin NCN IS-asteikolla) pitäisi olla < 0,01 (MR4), jotta MR 4,5 voidaan varmasti määrittää luotettavasti.

Molekulaarisen vasteen raportointi

Määritä kunkin näytteen molekulaarinen vaste seuraavan tulkinnan mukaisesti: Taulukko 8.

Taulukko 8. Molekulaarisen vasteen raportointi

Case (Tapaus)	ABL CN	BCR-ABL1 Mbcr CN	IS-NCN%	Status (Tila)
1	$< 10\ 000$	< 10	–	Poor quality sample (Huonolaatuinen näyte)
2	$< 10\ 000$	≥ 10	$> 0,1$	No MMR (Ei MMR)
		≥ 10	$\leq 0,1$	Inconclusive (Epäselvä)
3	$10\ 000 \leq CN_{ABL} < 32\ 000$	$\geq LOD$	$> 0,1$	No MMR (Ei MMR)
			$\leq 0,1$	MMR
		LOB<CN<LOD Replace CN by LOD (Korvaa CN LOD:lla)	$> 0,1$	No MMR (Ei MMR)
			$\leq 0,1$	MMR
		$\leq LOB$	–	Not detected (Ei havaittu)/MR4
		$\geq LOD$	$> 0,1$	No MMR (Ei MMR)
4	$32\ 000 \leq CN_{ABL} < 100\ 000$		$0,01 < IS \leq 0,1$	MMR
			$\leq 0,01$	MR4
		LOB<CN<LOD Replace CN by LOD (Korvaa CN LOD:lla)	$> 0,1$	No MMR (Ei MMR)
			$0,01 < IS \leq 0,1$	MMR
			$\leq 0,01$	MR4
		$\leq LOB$	–	Not detected (Ei havaittu)/MR4.5
5	$100\ 000 \leq CN_{ABL}$	$\geq LOD$	$> 0,1$	No MMR (Ei MMR)
			$0,01 < IS \leq 0,1$	MMR
			$0,0032 < IS \leq 0,01$	MR4
			$\leq 0,0032$	MR4.5
		LOB<CN<LOD Replace CN by LOD (Korvaa CN LOD:lla)	$> 0,1$	No MMR (Ei MMR)
			$0,01 < IS \leq 0,1$	MMR
	$0,0032 < IS \leq 0,01$	MR4		
	$\leq 0,0032$	MR4.5		
$\leq LOB$	–	Not detected (Ei havaittu)/MR5		

LOB: Limit of Blank (Tyhjän raja) -arvo; LOD: Limit of Detection (havaitsemisraja); MR: molecular response (molekulaarinen vaste); MMR: major molecular response (merkittävä molekulaarinen vaste).

Laatukriteerien yhteenveto

Taulukko 9 sisältää yhteenvedon laatukriteereistä sekä niihin liittyvistä arvoista ja tuloksista.

Taulukko 10. Laatukriteerien yhteenveto

Kriteerit	Hyväksyttävät arvot tai tulokset
C_T -arvojen vaihtelua toistojen välillä	$\leq 2 C_T$ Paitsi jos keskimääräinen $C_T \geq 36$ tai jos $C_{T_0} \geq 36$ ja C_{T_0} -tulos on not detected (ei havaittu): toistotesti on määritysten mukainen. C_{T_0} :lle laskettu kopiomäärä (CN) tulisi jakaa kahdella.
Standardikäyrien kulmakerto	Arvovälillä $-3,1$ ja $-3,6$
Standardikäyrien R^2	Vähintään $> 0,95$ (ja mieluiten $> 0,98$)
SP1-standardilaimennos (BCR-ABL1 10 kopiota, plasmidi)	On tunnistettava standardikäyrän määrittämistä varten
Biologisten näytteiden ABL_{CN} -arvon laadunvalvonta	Katso Taulukko 8
Voimakkaasti positiivinen RNA-kontrolli, heikosti positiivinen RNA-kontrolli ja IS-MMR-kalibraattori	$ABL_{CN} \geq 100\ 000$
NTC (vesi)- ja RTneg-kontrollit	Kummallekin $ABL_{CN} = 0$ ja $Mbcr_{CN} = 0$ (ei C_T -arvoa tai $C_T >$ standardikäyrän leikkauspiste)
IS-MMR-kalibraattorille laskettu NCN (NCN_{cal})	On oltava alueella $0,05-0,3$
Voimakkaasti positiivinen RNA-kontrolli	On tunnistettava
Heikosti positiivinen RNA-kontrolli	On tunnistettava
IS- NCN_{HC}	Tila: ei merkittävää molekulaarista vastetta
IS- NCN_{LC}	$IS-NCN_{LC} \leq 0,01$ (MR4) On tunnistettava, jotta MR 4,5 voidaan varmasti määrittää luotettavasti.

C_T : threshold cycle (syklien kynnyсарvo); **HC**: high control (voimakkaasti positiivinen kontrolli); **IS**: International Standard (IS-asteikko); **LC**: low control (heikosti positiivinen kontrolli); **MR**: molecular response (molekulaarinen vaste); **MMR**: major molecular response (merkittävä molekulaarinen vaste); **NCN**: normalized copy number (normalisoitu kopiomäärä); **NTC**: No Template Control (malliton kontrolli); **RTneg**: reverse transcription negative (käänteistranskriptio negatiivinen).

Tulosten tulkinta RGAM-ohjelmistolla

Analyysi on täysin automaattista.

Rotor-Gene AssayManager 2.1 analysoi ensin monistumiskäyriä ja voi merkitä epäyhteensopivat käyrät virheellisiksi niiden muodon ja kohina-amplitudin mukaan. Tällaiset käyrät on merkitty erityisellä merkinnällä.

Approver (Hyväksyjä) -roolilla varustetun käyttäjän on hyväksyttävä ja vapautettava Rotor-Gene AssayManager 2.1 -ohjelmiston automaattisesti analysoimat ja määrittämät testitulokset. Hyväksyttävissä näytetuloksissa on kolme hyväksyntäpainiketta vastaavan rivin perässä. Näillä painikkeilla voidaan hyväksyä tai hylätä näytetulokset. Lisätietoja on julkaisussa *Gamma Plug-in -käyttöopas*.

Rotor-Gene AssayManager v2.1 analysoi sitten ajon kontrollit:

- NTC:stä (RT-neg ja H2O) tarkistetaan spesifisen monistumisen (ABL1 ja BCR-ABL1 Mbc) puuttuminen.
- ABL1 ja BCR-ABL1 Mbc SP: Validointi perustuu kummankin R²- ja kulmakerroin-arvoihin.
- HC: ABL1-kopiomäärän on oltava tarpeeksi suuri, jotta tämä kontrolli voidaan tulkita. Jos näin on, ohjelmisto laskee IS-NCN-prosentin. Tämä ajon kontrolli validoidaan, jos sen tila on testin mukaan No MMR (Ei merkittävää moleulaarista vastetta).
- LC: ABL1-kopiomäärän on oltava tarpeeksi suuri, jotta tämä kontrolli voidaan tulkita. Jos näin on, ohjelmisto laskee IS-NCN-prosentin. Tämä ajon kontrolli validoidaan, jos sen tila on testin mukaan MR4.
- IS-MMR-kalibraattori: ABL1-kopiomäärän on oltava tarpeeksi suuri, jotta tämä kontrolli voidaan tulkita. Jos näin on, ohjelmisto laskee NCN-arvon. Tämä ajon kontrolli validoidaan, jos sen NCN on testin mukaan sallitulla arvovälillä.

Huomautus: Ajon päätteeksi generoitunut raportti esittää ajon kontroleista saadut tulokset. Epäkelpovillisten tietojen edessä on epäkelpoisuuden merkki.

Jos kaikki ajon kontrollit noudattavat määrittämiä, Rotor-Gene AssayManager v2.1 analysoi tuntemattomat näytteet.

Näytteessä toistojen välisen C_T -arvojen vaihtelun on oltava tarpeeksi vähäistä, jotta tulokset voidaan tulkita. IS-NCN-prosentti lasketaan sen jälkeen ja näytteen tila tulee näkyviin.

Huomautus: jos sekä ajon kontrollit että näytteen tulokset ovat valideja, raportissa esitetään kunkin näytteen ABL1:n ja BCR-ABL1 Mbc:n kopiomäärät, NCN (%), IS-NCN (%) ja molekulaarinen vaste.

Taulukko 11 ja Taulukko 12 sisältävät näytteiden hylkäykseen ja varoituksiin liittyvät merkinnät, jotka voidaan määrittää yksittäiselle putkelle Rotor-Gene AssayManager 2.1 -ohjelmiston analyysissä, sekä niiden merkityksen.

Taulukko 11. Epäkelvollisen näytteen merkinnät ja termien kuvaus

Merkintä	Kuvaus
ANALYSIS_FAILED (ANALYYSI_EPÄONNISTUI)	Testi on määritetty virheelliseksi, koska analyysi epäonnistui. Ota yhteys QIAGENin tekniseen palveluun.
ASSAY_INVALID (MÄÄRITYS_VIRHEELLINEN)	Testi on virheellinen, sillä vähintään yksi ulkoinen kontrolli on virheellinen.
CONSECUTIVE_FAULT (PERÄKKÄINEN_VIKA)	Tämän kohteen laskennassa käytetty kohde on virheellinen.
CURVE_SHAPE_ANOMALY (KÄYRÄN_MUODON_POIKKEAMA)	Raakadatan monistumiskäyrän muoto poikkeaa tämän testin tyypillisestä käyttäytymistavasta. Virheellisten tulosten tai tulosten virheellisen tulkinnan todennäköisyys on suuri.
FLAT_BUMP (LITTEÄ_TÖYSSY)	Raakadatan monistumiskäyrän muoto on litteä töyssy, mikä poikkeaa tämän testin tyypillisestä käyttäytymistavasta. Virheellisten tulosten tai tulosten virheellisen tulkinnan todennäköisyys on suuri (esimerkiksi C _T -arvon määrittäminen on virheellinen).
HIGH_PC_HIGH_DELTA_CT (KORKEA_PC_KORKEA_MUUTOS_CT) (ABL tai Mbcf)	Voimakkaasti positiivisen kontrollin toistojen C _T -arvojen välillä on liikaa vaihtelua kontrolligeenin seoksessa.
HIGH_PC_HIGH_DELTA_CT (KORKEA_PC_KORKEA_MUUTOS_CT) (Mbcf)	Voimakkaasti positiivisen kontrollin toistojen C _T -arvojen välillä on liikaa vaihtelua fuusiogeenin seoksessa.
HIGH_PC_LOW_ABL_CN (KORKEA_PC_MATALA_ABL_CN)	Voimakkaasti positiivisen kontrollin kontrolligeenin kopiomäärä on liian pieni.
HIGH_PC_LOW_IS-NCN (KORKEA_PC_MATALA_IS-NCN)	Voimakkaasti positiivisen kontrollin normalisoitu kopiomäärä on liian pieni (IS-asteikolla).
HIGH_PC_NO_CT (KORKEA_PC_EI_CT) (ABL)	Voimakkaasti positiiviselle kontrollille ei havaittu C _T -arvoa kontrolligeenin seoksessa.
HIGH_PC_NO_CT (KORKEA_PC_EI_CT) (Mbcf)	Voimakkaasti positiiviselle kontrollille ei havaittu C _T -arvoa fuusiogeenin seoksessa.
HIGH_PC_REPLICATE_NO_CT (KORKEA_PC_REPLIKAATTI_EI_CT) (ABL)	Yhtä voimakkaasti positiivisen kontrollin replikaateista ei havaittu kontrolligeenin seoksessa.
HIGH_PC_REPLICATE_NO_CT (KORKEA_PC_REPLIKAATTI_EI_CT) (Mbcf)	Yhtä voimakkaasti positiivisen kontrollin replikaateista ei havaittu fuusiogeenin seoksessa.
INVALID_CALCULATION (VIRHEELLINEN_LASKENTA)	Tämän kohteen laskelma epäonnistui.
IS-CAL_HIGH_DELTA_CT (IS-KAL_KORKEA_MUUTOS_CT) (ABL)	IS-MMR-kalibraattorin positiivisen kontrollin replikaattien C _T -arvojen välillä on liikaa vaihtelua kontrolligeenin seoksessa.

Merkintä	Kuvaus
IS-CAL_HIGH_DELTA_CT (IS-KAL_KORKEA_MUUTOS_CT) (Mbc _r)	IS-MMR-kalibraattorin replikaattien C _T -arvojen välillä on liikaa vaihtelua fuusiogeenin seoksessa.
IS-CAL_HIGH_NCN (IS-KAL_KORKEA_NCN)	IS-MMR-kalibraattorin normalisoitu kopiomäärä on liian suuri.
IS-CAL_LOW_ABL_CN (IS-KAL_MATALA_ABL_CN)	IS-MMR-kalibraattorin kontrolligeenin kopiomäärä on liian pieni.
IS-CAL_LOW_NCN (IS-KAL_MATALA_NCN)	IS-MMR-kalibraattorin normalisoitu kopiomäärä on liian pieni.
IS-CAL_REPLICATE_NO_CT (IS-KAL_REPLIKAATTI_EI_CT) (ABL)	Yhtä IS-MMR-kalibraattorin replikaateista ei havaittu kontrolligeenin seoksessa.
IS-CAL_REPLICATE_NO_CT (IS-KAL_REPLIKAATTI_EI_CT) (Mbc _r)	Yhtä IS-MMR-kalibraattorin replikaateista ei havaittu fuusiogeenin seoksessa.
LOW_PC_HIGH_DELTA_CT (MATALA_PC_KORKEA_MUUTOS_CT) (ABL)	Heikosti positiivisen kontrollin replikaattien C _T -arvojen välillä on liikaa vaihtelua kontrolligeenin seoksessa.
LOW_PC_HIGH_DELTA_CT (MATALA_PC_KORKEA_MUUTOS_CT) (Mbc _r)	Heikosti positiivisen kontrollin replikaattien C _T -arvojen välillä on liikaa vaihtelua fuusiogeenin seoksessa.
LOW_PC_HIGH_IS_NCN (MATALA_PC_KORKEA_IS_NCN)	Heikosti positiivisen kontrollin normalisoitu kopiomäärä on liian suuri (IS-asteikolla).
LOW_PC_LOW_ABL_CN (MATALA_PC_MATALA_ABL_CN)	Heikosti positiivisen kontrollin kontrolligeenin kopiomäärä on liian pieni.
LOW_PC_NO_CT (MATALA_PC_EI_CT) (ABL)	Heikosti positiiviselle kontrollille ei havaittu C _T -arvoa kontrolligeenin seoksessa.
LOW_PC_NO_CT (MATALA_PC_EI_CT) (Mbc _r)	Heikosti positiiviselle kontrollille ei havaittu C _T -arvoa fuusiogeenin seoksessa.
LOW_PC_REPLICATE_NO_CT (MATALA_PC_REPLIKAATTI_EI_CT) (ABL)	Yhtä heikosti positiivisen kontrollin replikaateista ei havaittu kontrolligeenin seoksessa.
LOW_PC_REPLICATE_NO_CT (MATALA_PC_REPLIKAATTI_EI_CT) (Mbc _r)	Yhtä heikosti positiivisen kontrollin replikaateista ei havaittu fuusiogeenin seoksessa.
MULTIPLE_THRESHOLD_CROSSING (USEAN_KYNNYKSEN_YLITYS)	Monistuskäyrä ylittää kynnysarvon useammin kuin kerran. Selvää C _T -arvoa ei voida määrittää.
NO_BASELINE (EI_LÄHTÖTASOA)	Lähtötasoa ei löydy. Jatkoanalyysiä ei voi tehdä.
NTC_UNEXPECTED_VALUE (NTC_ODOTTAMATON_ARVO)	C _T on havaittu mallittomassa kontrollissa.
OTHER_TARGET_INVALID (TOINEN_KOHDE_KELVOTON)	Saman näytteen toinen kohde on kelvoton.
OUT_OF_COMPUTATION_RANGE (LASKENTA-ALUEEN_ULKOPUOLELLA)	Tämän näytteen laskettu pitoisuus ylittää teknisen rajan.

Merkintä	Kuvaus
RUN_FAILED (AJO_EPÄONNISTUI)	Testi määritettiin virheelliseksi, koska syklerissä tai sen liitännässä ilmeni ongelma.
RUN_STOPPED (AJO_PYSÄYTETTY)	Testi määritettiin virheelliseksi, koska ajo lopetettiin manuaalisesti.
SAMPLE_HIGH_DELTA_CT (NÄYTE_KORKEA_MUUTOS_CT) (ABL)	Testinäytteen replikaatin C _T -arvojen välillä on liikaa vaihtelua kontrolligeenin seoksessa.
SAMPLE_HIGH_DELTA_CT (NÄYTE_KORKEA_MUUTOS_CT) (Mbc _r)	Testinäytteen replikaatin C _T -arvojen välillä on liikaa vaihtelua fuusiogeenin seoksessa.
SAMPLE_REPLICATE_NO_CT (NÄYTE_REPLIKAATTI_EI_CT) (ABL)	Yhtä testinäytteen replikaateista ei havaittu kontrolligeenin seoksessa.
SAMPLE_REPLICATE_NO_CT (NÄYTE_REPLIKAATTI_EI_CT) (Mbc _r)	Yhtä testinäytteen replikaateista ei havaittu fuusiogeenin seoksessa.
SATURATION (SATURAATIO)	Fluoresenssin raakadata saturoitu voimakkaasti ennen monistumiskäyrän taipumispiikettä.
SPIKE_CLOSE_TO_CT (PIIKKI_LÄHELLÄ_CT:TÄ)	Monistumiskäyrässä havaittiin piikki lähellä C _T -arvoa.
SP_HIGH_SLOPE (SP_KORKEA_KULMAKERROIN) (ABL)	Kontrolligeenin kulmakertoimen yläraja on ylittynyt.
SP_HIGH_SLOPE (SP_KORKEA_KULMAKERROIN) (Mbc _r)	Fuusiogeenin kulmakertoimen yläraja on ylittynyt.
SP_LOW_RSQUARED (SP_MATALA_RNELIÖ) (ABL)	Kontrolligeenin R ² :n alarajaa ei saavutettu.
SP_LOW_RSQUARED (SP_MATALA_RNELIÖ) (Mbc _r)	Fuusiogeenin R ² :n alarajaa ei saavutettu.
SP_LOW_SLOPE (SP_MATALA_KULMAKERROIN) (ABL)	Kontrolligeenin kulmakertoimen alarajaa ei saavutettu.
SP_LOW_SLOPE (SP_MATALA_KULMAKERROIN) (Mbc _r)	Fuusiogeenin kulmakertoimen alarajaa ei saavutettu.
SP1_NO_CT (SP1_EI_CT) (Mbc _r)	Standardin plasmidille 1 ei havaittu C _T -arvoa fuusiogeenin seoksessa.
STANDARD_HIGH_DELTA_CT (STANDARDI_KORKEA_MUUTOS_CT) (ABL)	Standardin replikaattien C _T -arvojen välillä on liikaa vaihtelua kontrolligeenin seoksessa.
STANDARD_HIGH_DELTA_CT (STANDARDI_KORKEA_MUUTOS_CT) (Mbc _r)	Standardin replikaattien C _T -arvojen välillä on liikaa vaihtelua fuusiogeenin seoksessa.
STANDARD_REPLICATE_NO_CT (STANDARDI_REPLIKAATTI_EI_CT) (ABL)	Yhtä standardin replikaateista ei havaittu kontrolligeenin seoksessa.
STANDARD_REPLICATE_NO_CT (STANDARDI_REPLIKAATTI_EI_CT) (Mbc _r)	Yhtä standardin replikaateista ei havaittu fuusiogeenin seoksessa.
STEEP_BASELINE (JYRKKÄ_PERUSTASO)	Monistumiskäyrässä havaittiin fluoresenssin raakadatassa jyrkästi nouseva perustaso.

Merkintä	Kuvaus
STRONG_BASELINE_DIP (VOIMAKAS_PERUSTASON_PUDOTUS)	Monistumiskäyrässä havaittiin fluoresenssin raakadatassa voimakas pudotus perustasossa.
STRONG_NOISE (VOIMAKAS_KOHINA)	Monistumiskäyrän kasvuvaiheen ulkopuolella havaittiin voimakasta kohinaa.
STRONG_NOISE_IN_GROWTH_PHASE (VOIMAKAS_KOHINA_KASVUVAIHEESSA)	Monistumiskäyrän kasvuvaiheessa (eksponentiaalisessa vaiheessa) havaittiin voimakasta kohinaa.
WAVY_BASE_FLUORESCENCE (AALTOILEVA_PERUSTASO_FLUORESENSSISSÄ)	Monistumiskäyrässä havaittiin fluoresenssin raakadatassa aaltoileva perustaso.

Taulukko 12. Näytteen varoitusmerkinnät ja termien kuvaus

Merkintä	Kuvaus
CN Mbc Between LOB and LOD (CN Mbcr LOB:n ja LOD:n välillä)	Testinäytteen fuusiogeenin kopiomäärä on LOB- ja LOD-arvojen välillä ja se korvataan LOD-arvolla.
CN Mbc Single Replicate (CN Mbcr yksittäinen replikaatti)	Testinäytteen fuusiogeenin kopiomäärä lasketaan vain yhdestä replikaatista ja jaetaan kahdella.
CN Mbc Single Replicate Between LOB and LOD (CN Mbcr yksittäinen replikaatti LOB:n ja LOD:n välillä)	Testinäytteen fuusiogeenin kopiomäärä (joka lasketaan vain yhdestä replikaatista ja jaetaan kahdella) on LOB- ja LOD-arvojen välillä ja se korvataan LOD-arvolla.
IS-NCN (%) Between LOB and LOD (IS-NCN [%] LOB:n ja LOD:n välillä)	Testinäytteen normalisoitu kopiomäärä (IS-asteikolla) saadaan LOB- ja LOD-arvojen välillä olevan fuusiogeenin kopiomääräarvon perusteella.
IS-NCN (%) Single Replicate (IS-NCN [%] yksittäinen replikaatti)	Testinäytteen normalisoitu kopiomäärä (IS-asteikolla) saadaan vain yhdestä replikaatista lasketun fuusiogeenin kopiomäärän perusteella.
IS-NCN (%) Single Replicate Between LOB and LOD (IS NCN [%] yksittäinen replikaatti LOB:n ja LOD:n välillä)	Testin normalisoitu kopiomäärä (IS-asteikolla) saadaan LOB- ja LOD-arvojen välillä olevan (vain yhdestä replikaatista lasketun) fuusiogeenin kopiomääräarvon perusteella.
LOW_FLUORESCENCE_CHANGE (PIENI_FLUORESENSSIN_MUUTOS)	Tämän näytteen fluoresenssin muutos suhteessa putkeen, jossa tapahtui suurin fluoresenssin muutos, on pienempi kuin määritetty alaraja.
LOW_REACTION_EFFICIENCY (HEIKKO_REAKTIOHOKKUUS)	Tämän näytteen reaktiotehokkuus ei ole yltenyt määritettyyn raja-arvoon.
NCN (%) Between LOB and LOD (NCN [%] LOB:n ja LOD:n välillä)	Testinäytteen normalisoitu kopiomäärä saadaan LOB- ja LOD-arvojen välillä olevan fuusiogeenin kopiomääräarvon perusteella.
NCN (%) Single Replicate (NCN [%] yksittäinen replikaatti)	Testinäytteen normalisoitu kopiomäärä saadaan vain yhdestä replikaatista lasketun fuusiogeenin kopiomäärän perusteella.
NCN (%) Single Replicate Between LOB and LOD (NCN [%] yksittäinen replikaatti LOB:n ja LOD:n välillä)	Testinäytteen normalisoitu kopiomäärä saadaan LOB- ja LOD-arvojen välillä olevan (vain yhdestä replikaatista lasketun) fuusiogeenin kopiomääräarvon perusteella.
SPIKE (PIIKKI)	Monistumiskäyrässä havaittiin fluoresenssin raakadatassa piikki, mutta se on C _T -määrittämisalueen ulkopuolella.

Ongelmien ratkaisu

Tämä ongelmien ratkaisuopas voi auttaa mahdollisissa esiin tulevissa ongelmissa. Lisätietoja on saatavissa myös teknisen tuen sivustostamme usein kysytyjen kysymysten osiosta: www.qiagen.com/FAQ/FAQList.aspx. QIAGENin teknisen palvelun asiantuntijat vastaavat aina mielellään kysymyksiisi koskivatpa ne sitten tämän käsikirjan tietoja tai tässä käsikirjassa esiteltyjä protokollia tai näytteisiin ja testeihin liittyviä tekniikoita. (Katso yhteystiedot tämän käsikirjan takakannesta tai osoitteesta www.qiagen.com.)

Huomautuksia ja ehdotuksia

RNA:n eristäminen

Jos RNA:n puhdistamisessa kokoverestä RNeasy Midi Kit -sarjan ja Buffer EL-puskurin avulla on ongelmia, hae ohjeita sarjan käsikirjasta.

Eluaatissa ei ole tarpeeksi RNA:ta

Käytettävää verta ei ollut tarpeeksi

Tee RNA:n eristys uudelleen ja käytä useampia näytteitä. Harkitse molempien eluaattien yhdistämistä samaan ryhmään ja RNA:n konsentrointia RNeasy MinElute Cleanup Kit -sarjalla (tuotenumero 74204).

Eluaatissa ei ole tarpeeksi RNA:ta

RNA:n pitoisuuden on oltava 200 ng/μ, jotta testin paras herkkyys saavutetaan

Käytä näytteen konsentroiintiin RNeasy MinElute Cleanup Kit -sarjaa (tuotenumero 74204) ja muuta pitoisuudeksi 200 ng/μl.

Standardia, kontrollia tai IS-kalibraattoria ei tunnistettu

- Pipetointivirhe tai puuttuva reagenssi; putket tai kuopat ovat vaihtuneet keskenään
Tarkista pipetointijärjestys ja reaktion järjestely. Suorita PCR-ajo uudelleen.
- Sarjan osien väärä säilytys
Säilytä *ipsogen* BCR-ABL1 Mbcr RGQ RT-PCR Kit -sarjaa -30...-15 °C:n lämpötilassa ja suojaa qPCR Mix ABL1 ja qPCR Mix Mbcr valolta.
Pakastamis- ja sulattamisjaksoja saa olla enintään kolme.
- ipsogen* BCR-ABL1 Mbcr RGQ RT-PCR Kit on vanhentunut
Tarkista reagenssien säilytysolosuhteet ja viimeinen käyttöpäivämäärä (etiketissä) ja käytä tarvittaessa uutta sarjaa.

Huomautuksia ja ehdotuksia

Ei signaalia edes kontroleista

- a) Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM -laitteen paikassa 1 ei ole reaktioputkea Muista asettaa näyte aina roottorin paikkaan 1. Muutoin laite ei tee kalibrointia ja testistä saadaan virheellisiä fluoresenssitietoja.
- b) Pipetointivirhe tai puuttuva reagenssi; putket tai kuopat ovat vaihtuneet keskenään Tarkista pipetointijärjestys ja reaktion järjestely. Suorita PCR-ajo uudelleen.
- c) Sarjan osien väärä säilytys Säilytä *ipsogen* BCR-ABL1 MbcR RGQ RT-PCR Kit -sarjaa $-30...-15$ °C:n lämpötilassa ja pidä aluke- ja koetinsekset valolta suojattuina. Pakastamis- ja sulattamisjaksoja saa olla enintään kolme.
- d) *ipsogen* BCR-ABL1 MbcR RGQ RT-PCR Kit on vanhentunut Tarkista reagenssien säilytysolosuhteet ja viimeinen käyttöpäivämäärä (etiketissä) ja käytä tarvittaessa uutta sarjaa.
- e) Väärä tunnistuskanava on valittu Määritä tunnistuskanavaksi Cycling Green (Syklit vihreä) tai 470 nm/510 nm.
- f) Tiedonkeruuta ei ole ohjelmoitu Tarkista sykliohjelma. Lisätietoja: Taulukko 5, sivu 35. Valitse keruun menetelmäksi Single (Yksi) PCR-ohjelman kunkin kiinnittymissegmentin lopussa.

Fluoresenssin voimakkuus vaihtelee.

- Pipetointivirhe tai puuttuva reagenssi; putket tai kuopat ovat vaihtuneet keskenään Tarkista pipetointijärjestys ja reaktion järjestely. Suorita PCR-ajo uudelleen.

Fluoresenssin voimakkuus ei riitä

- a) Sarjan osien väärä säilytys Säilytä *ipsogen* BCR-ABL1 MbcR RGQ RT-PCR Kit -sarjaa $-30...-15$ °C:n lämpötilassa ja suoja qPCR Mix ABL1 ja qPCR Mix MbcR valolta. Pakastamis- ja sulattamisjaksoja saa olla enintään kolme.
- b) *ipsogen* BCR-ABL1 MbcR RGQ RT-PCR Kit on vanhentunut Tarkista reagenssien säilytysolosuhteet ja viimeinen käyttöpäivämäärä (etiketissä) ja käytä tarvittaessa uutta sarjaa.
- c) Kohde-RNA:n hyvin pieni määrä Tarkista aina RNA:n pitoisuus ennen aloittamista.

Huomautuksia ja ehdotuksia

Negatiivisesta kontrollista (H₂O) saadaan positiivinen tulos

Ristikontaminaatio,
reagenssin kontaminaatio,
laitteen virhe, kuoppien tai
kapillaarien vaihtuminen
keskenään tai koettimen
pilaantuminen

Vaihda kaikki kriittiset reagenssit tai käytä uutta sarjaa.

Vältä ristikontaminaatiot käsittelemällä näytteitä, sarjan osia ja tarvikkeita aina hyvien käytäntöjen mukaisesti.

Pidä qPCR Mix ABL1 ja qPCR Mix Mbcr valolta suojattuina.

Tarkista, näkykö fluoresenssikäyrässä vääriä positiivisia tuloksia.

Tarkista reaktion järjestely.

Tulosten tulkinta

Rotor-Gene Q MDx -laitteen ja Rotor-Gene Q- tai Rotor-Gene AssayManager 2.1 -ohjelmiston vianmäärittystä koskevia tietoja on niiden käyttöoppaissa.

Laadunvalvonta

Valmiin sarjan laadunvarmistus on tehty Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM -instrumentilla. Tämä sarja on valmistettu ISO 13485 -standardin mukaisesti. Analyysin sertifikaatit ovat saatavana pyydettyessä osoitteessa www.qiagen.com/support/.

Rajoitukset

Tämä sarja on tarkoitettu ammattikäyttöön.

Tuotetta saavat käyttää vain asianmukaisesti opastetut, molekyylibiologian tekniikoihin koulutetut ja tämän nimenomaisen tekniikan tuntevat henkilöt.

Tätä sarjaa on käytettävä tämän käyttöoppaan ohjeiden mukaisesti yhdessä validoidun, kohdassa Tarvittavat materiaalit (jotka eivät kuulu toimitukseen) sivulla 12 esitetyn laitteen kanssa.

Ota huomioon pakkauksen etiketissä ilmoitetut vanhenemispäivämäärät. Älä käytä vanhentuneita komponentteja.

Kaikki *ipsogen* BCR-ABL1 MbcR RGQ RT-PCR Kit -sarjan mukana toimitetut reagenssit on tarkoitettu käytettäväksi ainoastaan muiden samaan sarjaan sisältyvien reagenssien kanssa. Muiden reagenssien tai muista eristä saatuja reagenssien käyttö voi haitata testin toimintaa.

ipsogen BCR-ABL1 MbcR RGQ RT-PCR Kit on validoitu vain Philadelphia-kromosomiposiitivista (Ph+) p210 kroonista myeloista leukemiaa sairastavien, taudin kroonisessa vaiheessa olevien potilaiden kokoverelle, jonka antikoagulanttina on kalium-EDTA (K₂EDTA).

ipsogen BCR-ABL1 MbcR RGQ RT-PCR Kit -sarjan suorituskyky määritettiin RNeasy Midi Kit -sarjalla (tuotenumero 75144), Buffer EL-puskurilla (tuotenumero 79217) ja RNA:n puhdistus- ja konsentroituvaiheessa RNeasy MinElute Cleanup Kit -sarjalla (tuotenumero 74204).

Vain Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM -laite on validoitu käytettäväksi PCR:ssä tämän sarjan kanssa.

Tämän tuotteen off label -käyttö ja/tai osien muokkaaminen mitätöi QIAGENin vastuun.

Saatu diagnostinen tulos on tulkittava yhdessä muiden kliinisten löydösten tai laboratoriolöydösten kanssa.

Käyttäjän vastuulla on validoida järjestelmän suorituskyky kaikissa niissä laboratoriossa käytetyissä menetelmissä, joita QIAGENin tekemät suorituskykytutkimukset eivät kata.

Suorituskykyominaisuudet

LOB (Limit of Blank)

Limit of blank (Tyhjän raja, LOB) -arvo määritettiin CLSI/NCCLS EP17-2A -standardin mukaisesti terveiltä luovuttajilta otetuista kokoverinäytteistä (seitsemän näytettä, 12 mittausta / kaksi erää).

LOB-arvoksi saatiin BCR-ABL1 Mbc -transkriptin 1,02 kopiota.

Toteamisraja

Toteamisraja (LOD tai analyttinen herkkyys) määritettiin tavanomaisella menetelmällä, joka esitetään standardissa CLSI/NCCLS EP17-2A. Tässä tutkimuksessa analysoitiin tunnettuja heikosti positiivisia näytteitä (seitsemän näytettä, 12 mittausta / kaksi erää).

Toteamisrajaksi saatiin BCR-ABL1 Mbc -transkriptin 3,21 kopiota eli 0,0030 % IS-NCN.

Lineaarisuus

Lineaarisuus määritettiin CLSI/NCCLS EP6-A -standardin mukaan *ipsogen* BCR-ABL1 Mbc RGQ RT-PCR Kit -sarjan yhdellä erällä ja yhdeksällä erilaisella näytteellä, jotka valmisteltiin peräkkäisillä laimennoksilla solulinjasta eristetystä positiivisesta RNA:sta ja terveiltä luovuttajilta saadulla negatiivisella RNA:lla. Määrittäminen tehtiin kolmelle erilaiselle RNA-syötteelle.

BCR-ABL1 Mbc -transkriptin kvantifiointi on lineaarista LOD-arvosta 56 prosentin IS-NCN-arvoon, kunhan kvantifioitun RNA-näytteen pitoisuus on noin 200 ng/μl eli testin suositeltu syöte (syöte yhteensä 3 μg).

Pienemmällä RNA-syötteellä lineaarinen alue saattaa olla pienempi.

Toistettavuus ja uusittavuus

Tarkkuustutkimus tehtiin standardin CLSI/NCCLS EP5-A2 mukaisesti. Testaus tehtiin kahtena yhdeksälle erilaiselle näytteelle 45 kertaa 45 ajossa 23 päivän aikana, mikä tuotti 90 mittausta näytettä kohti.

Tarkkuustulosten yhteenveto: Taulukko 13.

Taulukko 13. Tarkkuustulokset

Näyte	Keskimääräinen BCR-ABL1 Mbc IS-NCN	SDR+	SDRUN++	SDTOTAL+++	CV _{YHT}
S1	64,5243	4,3105	12,3610	13,0910	20,29 %
S2	36,1684	1,7104	5,9078	6,8581	18,96 %
S3	6,4876	0,4231	0,7857	1,0941	16,86 %
S4	0,7305	0,0512	0,0779	0,1178	16,12 %
S5	0,0754	0,0068	0,0073	0,0133	17,62 %
S6	0,0075	0,0016	0,0009	0,0022	28,81 %
S7	0,0036	0,0014	0,0002	0,0014	38,64 %
S8	0,0020	0,0010	0,0000	0,0010	48,71 %
S9	0,0011	0,0007	0,0000	0,0007	63,32 %

CV_{YHT}: Coefficient of variation for the total precision (Kokonaistarkkuuden vaihteluserroin) (BCR-ABL1 Mbc IS-NCN);
SD: standard deviation (Keskihajonta); **R+**: Repeatability (Toistettavuus); **RUN++**: Ajojen välinen toistettavuus; **S**: standard (Standardi); **TOTAL+++**: Kokonaistarkkuus (mukaan lukien laitteiden, käyttäjien ja erien välinen tarkkuus).

Häiritsevät aineet

Tutkimusjärjestely perustui NCCLS-standardissa EP7-A2 kuvattuihin suosituksiin häiritsevien aineiden testaamisessa kliinisessä kemiassa. Seuraavat verinäytteissä mahdollisesti olevat tai RNA:n puhdistuksessa mahdollisesti lisätyt aineet valittiin niiden PCR-vaikutuksen tutkimiseksi (konjugoitumaton bilirubiini, konjugoitunut bilirubiini, hemoglobiini [ihmisen], seerumin albumiini [ihmisen], kalium-EDTA [K2-EDTA], etanoli).

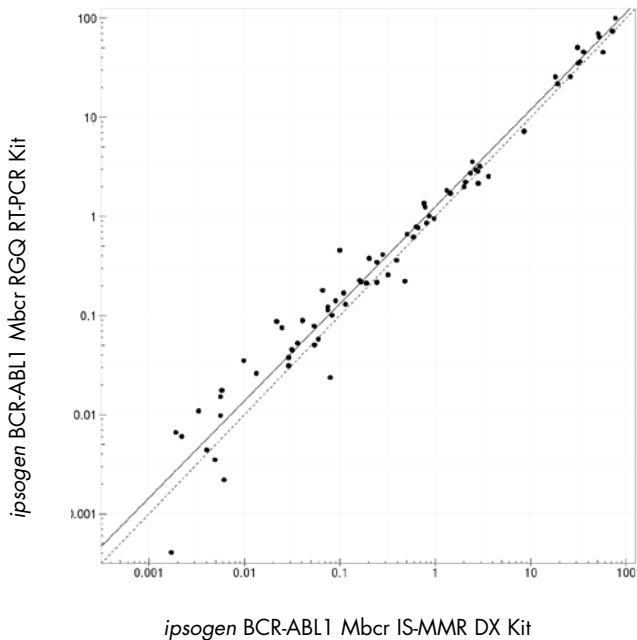
Saaduissa tuloksissa ei näkynyt häiritsevää vaikutusta näistä aineista.

Kliininen validointi ja menetelmän vertailu

ipsogen BCR-ABL1 MbcR RGQ RT-PCR Kit -sarjaa verrattiin vaihtoehtoisin menetelmiin kahdessa tutkimuksessa.

Tutkimus 1: 76 perifeerisestä verestä eristettyä RNA-näytettä analysoitiin *ipsogen* BCR-ABL1 MbcR RGQ RT-PCR Kit- ja *ipsogen* BCR-ABL1 MbcR IS-MMR DX Kit -sarjalla.

Demingin regressiolla verrattiin kummallakin menetelmällä mitattuja IS-NCN-arvoja. *ipsogen* BCR-ABL1 MbcR RGQ RT-PCR Kit- ja *ipsogen* BCR-ABL1 MbcR IS-MMR DX -sarjan välillä oli vahva korrelaatio ($R^2 = 0,97$): Kuva 9.



Kuva 9. Pistekaavio: ipsogen BCR-ABL1 MbcR RGQ RT-PCR Kit- ja ipsogen BCR-ABL1 MbcR IS-MMR DX Kit -sarjalla saatu IS-NCN.

Tutkimus 2: Philadelphia-kromosomipositiivista kroonista myelooista leukemiaa sairastavilta, tyrosiinikinaasin estäjähoitoa saavilta potilailta eristettiin perifeerisestä verestä 39 RNA-näytettä, joita analysoitiin Ranskassa *ipsogen* BCR-ABL1 MbcR RGQ RT-PCR Kit -sarjalla ja laboratorion kehittämällä testillä (vertailumenetelmä). Vertailumenetelmällä saadut tulokset standardoitiin IS-asteikon mukaisiksi muuntokertoimella.

Seuraavaan yhtäpitävyystaulukkoon koottiin kummallakin menetelmällä määritetyn kliinisen tilan vertailu. *ipsogen* BCR-ABL1 MbcR RGQ RT-PCR Kit -sarjan ja vertailumenetelmän välillä oli selvä yhtäpitävyys (kokonaisyhtäpitävyys = 97,4 %): Kuva 10.

Vertailumenetelmä

<i>ipsogen</i> BCR-ABL1 Mbc RGQ RT-PCR Kit		Ei MR 4	Enintään MR 4	n
	Ei MR 4	15	1	16
	Enintään MR 4	0	23	23
	n	15	24	39

Kuva 10. *ipsogen* BCR-ABL1 Mbc RGQ RT-PCR Kit -sarjan ja laboratorion kehittämän testin välinen yhtäpitävyys IS-asteikolla.

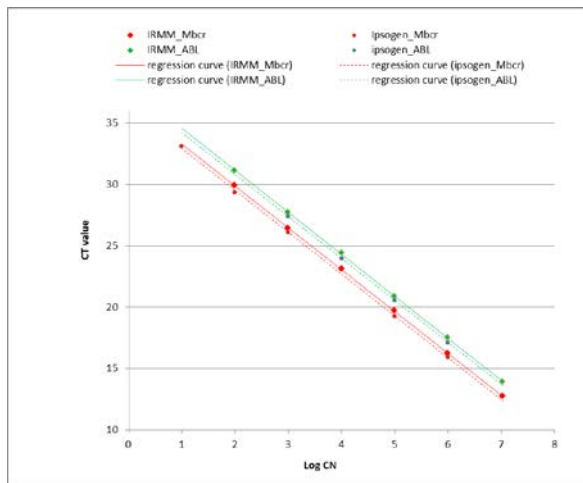
Yhdenmukaisuustutkimus: ERM-AD623 BCR-ABL1:n yhden plasmidin (IRMM) ja *ipsogenin* yhden plasmidin (QIAGEN) standardit

European LeukemiaNet/European Treatment Outcome Study (ELN/EUTOS) Molecular Monitoring Steering Group on laatinut tuoreimmat määritelmät BCR-ABL1 Mbc:n molekulaariselle vasteelle kroonisessa myeloisessa leukemiassa ja suosittelee käyttämään belgialaisen IRMM:n (Institute for Reference Materials and Measurements) ERM-AD623 BCR-ABL1:n plasmidia (9).

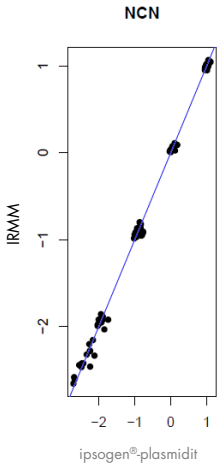
Tämän suosituksen mukaisesti QIAGEN teki yhdenmukaisuustutkimuksen, jossa verrattiin *ipsogen* BCR-ABL1 Mbc RGQ RT-PCR Kit (24) CE -sarjassa käytettävää *ipsogenin* monikohteista plasmidia (tuotenumero 670923) ja ERM-AD623 BCR-ABL1:n plasmidia (IRMM).

Vertailu perustui BCR-ABL1 Mbc/ABL1:n normalisoidun kopiomäärän suhteeseen (NCN). Siinä analysoitiin kahden standardin laimennoksia (*ipsogen* ja ERM-AD623 BCR-ABL1) *ipsogen*-sarjoihin kuuluvilla kontrollinäytteillä ja NIBSC:n (National Institute for Biological

Standards and Control) sertifioidulla vertailumateriaalilla (8). Tulokset osoittavat, että nämä kaksi standardikäyrää ovat yhdenmukaisia (Kuva 11) ja NCN-suhteet vertailukelpoisia (Kuva 12).



Kuva 11. *ipsogenin* ja ERM-AD623 BCR-ABL1:n plasmidien vertailusta nähdään, että standardikäyrät ovat yhdenmukaisia.



Kuva 12. *ipsogenin* ja ERM-AD623:n plasmidien NCN-arvot ovat vertailukelpoisia.

QIAGENin tutkimuksessa todettiin, ettei tilastollisesti merkitsevää eroa ole: ERM-AD623 BCR-ABL1:n plasmidin ja *ipsogenin* plasmidin standardeilla saadaan yhdenmukaiset tulokset.

Lähdeviitteet

Siteeratut viitteet

1. Cross, N.C., White, H.E., Müller, M.C., Saglio, G., Hochhaus, A. (2012) Standardized definitions of molecular response in chronic myeloid leukemia. *Leukemia* **26**, 2172.
2. Mahon, F.X., Etienne, G. (2013) Deep molecular response in chronic myeloid leukemia: the new goal of therapy? *Clin. Cancer Res.* **20**, 310.
3. Baccarani, M., Deininger, M.W., Rosti, G., et al. (2013) European LeukemiaNet recommendations for the management of chronic myeloid leukemia: 2013. *Blood* **122**, 872.
4. Rousselot, P., Charbonnier, A., Cony-Makhoul, P., et al. (2014) Loss of major molecular response as a trigger for restarting tyrosine kinase inhibitor therapy in patients with chronic-phase chronic myelogenous leukemia who have stopped imatinib after durable undetectable disease. *J. Clin. Oncol.* **32**, 424.
5. Branford, S., Cross, N.C., Hochhaus, A., 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.
6. Branford, S., Fletcher, L., Cross, N.C., 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.
7. Hughes, T., Deininger, M., Hochhaus, A., 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.
8. White, H.E., Matejtschuk, P., Rigsby, P., et al. (2010) Establishment of the first World Health Organization International Genetic Reference Panel for quantitation of BCR-ABL mRNA. *Blood* **116**, e1111.
9. Cross, N.C., White, H.E., Colomer, D., et al. (2015) Laboratory recommendations for scoring deep molecular responses following treatment for chronic myeloid leukemia. *Leukemia* **29**, 999.

Hyödyllisiä viitteitä

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.












Beillard, E., V.H., 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.

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.

van der Velden, V.H., et al. (2003) Detection of minimal residual disease in hematologic malignancies by real-time qPCR: principles, approaches, and laboratory aspects. *Leukemia* **17**, 1013.

Merkinnät

Pakkauksessa ja etiketeissä saattaa näkyä seuraavia symboleita:

Merkintä	Symbolin määritelmä
	Viimeinen käyttöpäivämäärä
	Diagnostinen in vitro -lääkintälaite
	Luettelonumero
	Eränumero
	Materiaalinumero
	GTIN-numero
	Lämpötilarajoitus
	Valmistaja
	Suojaa auringonvalolta
	Katso käyttöohjeet
	Huomio

Tilaustiedot

Tuote	Sisältö	Tuotenro
<i>ipsogen</i> BCR-ABL1 MbcR RGQ RT-PCR Kit (24)	24 reaktiota varten: ABL1:n ja BCR-ABL1 MbcR:n kvantitatiiviset yhden plasmidin standardit, heikosti ja voimakkaasti positiiviset kontrollit, IS-MMR-kalibraattori, qPCR-seos ABL1, qPCR-seos MbcR, käänteisen transkription ja qPCR:n reagenssit.	670923
Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM -laite – IVD-validoituun reaaliaikaiseen PCR-analyysiin kliinisessä käytössä		
Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM Platform	Reaaliaikainen PCR-laite ja High Resolution Melt -analysointilaite, jossa on 5 kanavaa (vihreä, keltainen, oranssi, punainen, karmiini) sekä HRM-kanava, kannettava tietokone, ohjelmisto, lisävarusteet: sisältää 1-vuotisen takuun osille ja työlle. Ei sisällä asennusta ja koulutusta.	9002032
Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM System	Reaaliaikainen PCR-laite ja HRM-analysointilaite, jossa on 5 kanavaa (vihreä, keltainen, oranssi, punainen ja karmiini) sekä HRM-kanava, kannettava tietokone, ohjelmisto ja lisävarusteet: sisältää 1-vuotisen takuun osille ja työlle, asennuksen ja koulutuksen.	9002033
Rotor-Gene Assay Manager 2.1 Software	Ohjelmisto rutiinitestaukseen yhdessä Rotor-Gene Q -laitteen kanssa	9024203

Rotor-Gene Assay Manager 2.1 License	Yksi ohjelmistolisenssi asennettavaksi yhdelle tietokoneelle	9025620
Loading Block 72 x 0.1 ml Tubes	Alumiinilevy manuaaliseen reaktion valmisteluun yksikanavaisella pipetillä, 72 x 0,1 ml:n putki.	9018901
Strip Tubes and Caps, 0.1 ml (250)	250 neliputkista liuskaa sekä korkit 1 000 reaktiota varten.	981103
Strip Tubes and Caps, 0.1 ml (2500)	10 x 250 neliputkista liuskaa sekä korkit 10 000 reaktiota varten.	981106
RNA:n eristäminen		
RNeasy Midi Kit	50 RNeasy Midi Spin Column -putkea, näyteputket (15 ml), RNAasittomat reagenssit ja puskurit. Kokonais-RNA:n puhdistamiseen.	75144
Buffer EL	1 000 ml erytrosyyttien lyysauspuskuria.	79217
RNeasy MinElute Cleanup Kit	50 RNeasy MinElute Spin Column -putkea, näyteputket (1,5 ml ja 2 ml), RNAasittomat reagenssit ja puskurit. RNA:n puhdistamiseen ja konsentroiintiin pienillä eluutiomäärillä.	74204

Voimassa olevat lisenssitiedot ja tuotekohtaiset vastuuvapauslausekkeet ovat saatavilla tuotekohtaisista QIAGEN-sarjojen käyttöoppaista tai käsikirjoista. QIAGEN-sarjojen käsikirjat ja käyttöoppaat ovat saatavilla osoitteessa www.qiagen.com tai niitä voi tiedustella QIAGENin teknisestä huollosta tai paikalliselta jälleenmyyjältä.

Käsikirjan muutoshistoria

Asiakirja	Muutokset	Date (Päivämäärä)
HB-1904_005	Lisätty kohdat Automaattinen analyysi: qPCR-ajo RGAM-ohjelmistolla ja Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM -laitteella, jossa on 72 putken roottori ja Tulosten tulkinta RGAM-ohjelmistolla.	Kesäkuu 2018

Tämä tuote on tarkoitettu käytettäväksi in vitro -diagnostiikassa. QIAGEN-tuotteiden jälleenmyynti, muokkaus jälleenmyyntiä varten tai käyttö kaupallisten tuotteiden valmistukseen on kielletty ilman QIAGENin kirjallista lupaa.

Tässä asiakirjassa olevia tietoja saatetaan muuttaa ilman erillistä ilmoitusta. QIAGEN ei ole vastuussa mistään tässä asiakirjassa mahdollisesti olevista virheistä. Tämän asiakirjan uskotaan olevan julkaisuohjelmaa kattava ja tarkka. QIAGEN ei missään tapauksessa ole vastuussa satunnaisista, erityisistä, moninkertaisista tai seurannaisvahingoista, jotka liittyvät tämän asiakirjan käyttöön tai ovat seurausta sen käytöstä.

QIAGEN-tuotteille on myönnetty takuu siitä, että ne ovat ilmoitettujen ominaisuuksiensa mukaisia. QIAGENin ainoa velvollisuus ja asiakkaan saama ainoa korvaus rajoittuvat tuotteiden vaihtamiseen veloituksetta tuotevirhetapauksissa tai jos tuote ei toimi takuussa kerrotulla tavalla.

Hankittuaan tämän tuotteen ostajalla on oikeus käyttää sitä diagnostisiin palveluihin ihmisten in vitro -diagnostiikassa. Tämän erityisen käyttöoikeuden lisäksi osti ei oikeuta mihinkään muuhun yleiseen patenttiin tai käyttöoikeuteen.

Tavaramerkit: QIAGEN[®], *ipsogen*[®], MinElute[®], RNeasy[®], Rotor-Gene[®], Rotor-Gene AssayManager[®] (QIAGEN Group); FAM[™], SYBR[®] (Thermo Fisher Scientific Inc.); BHQ-1[®] (Biosearch Technologies, Inc); Exce[®] (Microsoft Corporation); TaqMan[®] (Roche Group).

***ipsogen* BCR-ABL1 Mbcr RGQ RT-PCR Kit -sarjaa koskeva rajoitettu lisensissopimus**

Tämän tuotteen käyttö tarkoittaa ostajan tai käyttäjän suostumusta noudattaa seuraavia ehtoja:

1. Tuotetta saa käyttää ainoastaan tuotteen mukana toimitettujen asiakirjojen ja tämän käyttöoppaan ohjeiden mukaan, ja sen kanssa saa käyttää vain sarjan sisältämiä komponentteja. QIAGEN ei myönnä lisenssiä mihinkään aineettomaan omaisuuteensa, eikä tämän sarjan oheisia komponentteja saa käyttää tai liittää muihin komponentteihin, jotka eivät sisälly tähän sarjaan, kuten tuotteen mukana toimitetuissa asiakirjoissa, tässä käyttöoppaassa ja lisämateriaalissa mainitaan. Ne ovat saatavilla osoitteesta www.qiagen.com. Osa lisämateriaalista on QIAGEN-käyttäjien toisille QIAGEN-käyttäjille laittomia. QIAGEN ei ole testannut tai tarkistanut kyseistä materiaalia. QIAGEN ei anna takuuta lisämateriaalille eikä takaa, ettei se loukkaa kolmansien osapuolten oikeuksia.
2. Muutoin kuin nimenomaisesti ilmoitettujen käyttöoikeuksien osalta QIAGEN ei takaa, että tämä sarja ja/tai sen käyttäjät eivät loukkaa kolmansien osapuolten oikeuksia.
3. Tämä sarja ja sen komponentit on lisensoitu kertakäyttöön, eikä niitä saa käyttää uudelleen, kunnostaa tai myydä eteenpäin.
4. QIAGEN kiistää nimenomaisesti kaikki käyttöoikeudet, suorat tai epäsuorat, joita ei ole tässä nimenomaisesti ilmoitettu.
5. Sarjan ostaja ja käyttäjä suostuvat siihen, että he eivät ryhdy tai anna kenellekään toiselle lupaa ryhtyä toimenpiteisiin, jotka saattavat aiheuttaa tai edistää mitään yllä kiellettyä toimintaa. QIAGEN voi käännyä minkä tahansa tuomioistuimen puoleen pannaakseen täytäntöön tämän rajoitetun lisensissopimuksen kiellot ja saada hyötyksen kaikista valmistelu- ja oikeuskuluisista (asianajopalkkiot mukaan lukien), kun tarkoituksena on tämän rajoitetun lisensissopimuksen tai sarjan ja/tai sen komponentteihin liittyvien immateriaalioikeuksien täytäntöönpano.

Katso päivitetty käyttöoikeusehdot osoitteesta www.qiagen.com.

1114278F1 06/2018 HB-1904-005 © 2016 QIAGEN, kaikki oikeudet pidätetään.

Tilaukset: www.qiagen.com/contact | Tekninen tuki: support.qiagen.com | Verkkosivusto: www.qiagen.com