

Listopad 2017

ipsogen[®] PML-RARA bcr1 Kit Příručka k soupravě



24

Verze 01

Kvantitativní in vitro diagnostikum

Pro použití s přístroji Rotor-Gene[®] Q, ABI PRISM[®], Applied Biosystems[®] 7500 Real-Time PCR System, LightCycler[®] a SmartCycler[®]



672123

QIAGEN GmbH
QIAGEN Strasse 1,
40724 Hilden
NĚMECKO



R5

1108718CS

Obsah

Použití.....	4
Shrnutí a vysvětlení.....	4
Princip metody	6
Materiál poskytovaný se soupravou.....	9
Obsah soupravy	9
Vyžadovaný materiál, který není součástí soupravy.....	10
Varování a bezpečnostní opatření	11
Všeobecná bezpečnostní opatření	12
Uchovávaní a nakládání s reagensy	14
Postup	15
Příprava vzorku RNA.....	15
Protokol: Doporučená standardizovaná reverzní transkripce EAC	15
Protokol: qPCR pro přístroje Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM nebo Rotor-Gene Q 5plex HRM s rotorem pro 72 zkumavek.....	18
Protokol: qPCR pro přístroje ABI PRISM 7000, 7700 a 7900HT SDS, Applied Biosystems 7500 Real-Time PCR System a LightCycler 480	22
Protokol: qPCR na přístrojích LightCycler 1.2 a 2.0.....	27
Protokol: qPCR pro přístroj SmartCycler.....	31
Interpretace výsledků.....	35
Princip analýzy dat.....	35
Výsledky.....	36

Řešení problémů	40
Kontrola kvality	43
Omezení	43
Výkonnostní charakteristiky.....	44
Neklinické studie	44
Klinické studie	47
Reference	51
Symbols	52
Informace pro objednávání.....	53

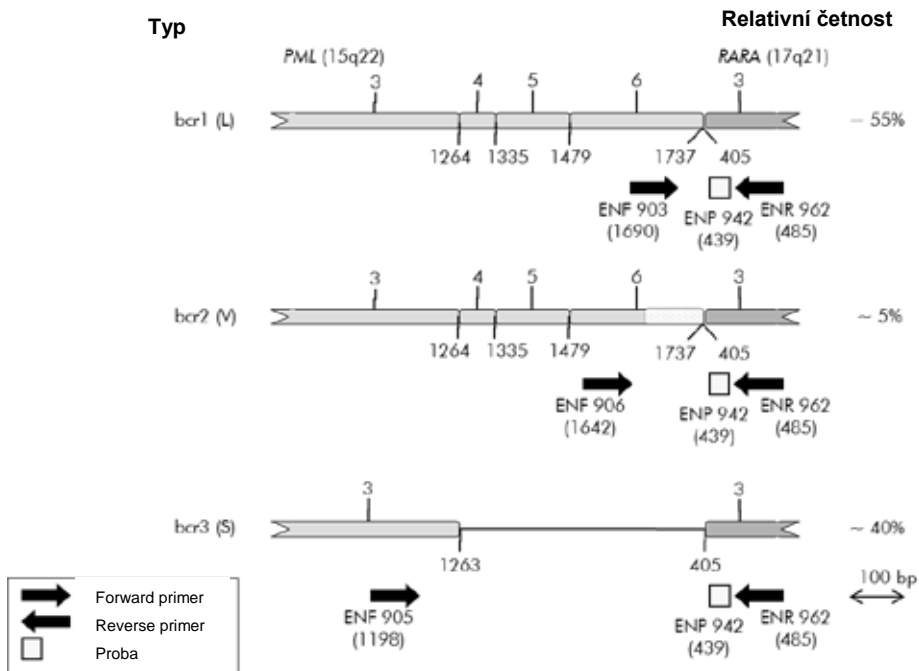
Použití

Souprava *ipsogen* PML-RARA bcr1 Kit je určena pro kvantifikaci fúzních transkriptů PML-RARA typu bcr1 v kostní dřeni nebo ve vzorcích periferní krve u podskupiny pacientů s akutní myeloidní leukémií (AML), u nichž byla diagnostikována M3 cytomorfologie a translokace t(15;17)(q22;q21), se zlomem v PML intronu 6. Získané výsledky jsou určeny pro vyhodnocení a monitoring účinnosti léčby pacientů podstupujících terapii a pro sledování minimální reziduální nemoci (MRD).

Shrnutí a vysvětlení

Genové fúzní (FG) transkripty PML-RARA, které jsou molekulárním výsledkem translokace t(15;17)(q22;q21), jsou spojeny s většinou akutních progranulocytických leukemických (APL) případů (> 90%) se zřetelnou podmnožinou AML s M3 cytomorfologií, která odpovídá za 10-15% všech případů AML. Vyvážená reciproční translokace t(15;17), vede k fúzi genu promyelocytární leukémie (PML) do alfa receptoru retinové kyseliny (RARA), což vede k vytvoření fúzního proteinu PML-RARA. Chimérický protein PML-RARA je transkripční represor, jehož exprese je spojena s poruchou myeloidní diferenciaci kvůli zvýšené afinitě k jadernému represorovému proteinovému komplexu (NcoR), alteraci struktury chromatinu histonovou deacetylázou (HDAC), a inhibici transkripce. Léčba pomocí all-trans retinové kyseliny (ATRA), je vysoce účinná při APL a působí jako diferencující činidlo tím, že podporuje uvolňování NCoR / HDAC komplexu, čímž dojde k obnově normální transkripce.

Zlomy v RARA se vždy vyskytují v intronu 2. V závislosti na umístění zlomů v rámci místa PML, intronu 6, exonu 6 a intronu 3 jsou příslušné subtypy PML-RARA transkriptů označovány jako dlouhé (L nebo bcr1), variantní (V nebo bcr2), a krátké (S nebo bcr3) (viz Obrázek 1). Tyto subtypy transkriptů představují 55%, 5%, respektive 40% případů.



Obrázek 1. Schematický diagram transkriptu PML-RARA FG zahrnující EAC qPCR primery a próby. Pro typ bcr1 (L): ENF903–ENP942–ENR962. Pro typ bcr2 (V): ENF906–ENP942–ENR962. Pro typ bcr3 (S): ENF905–ENP942–ENR962. Číslo pod primery a próbami odkazuje na jejich nukleotidovou pozici v normálním genovém transkriptu. Relativní frekvence odkazuje na rozložení každého typu transkriptu FG mezi různými variantami PML-RARA.

Kombinovaná léčba chemoterapií založené na anthracyklinu a ATRA je vysoce účinnou u onemocnění APL poskytující dlouhotrvající remisi a pravděpodobné vyléčení až u 70% nově diagnostikovaných pacientů. Nicméně, relaps a nízká míra přežití se stále týká 15-25% pacientů. Detekce unikátního fúzního genu PML-RARA pomocí konvenční metody kvalitativní reverzní transkripční polymerázové reakce (RT-PCR) byla široce používána pro rychlou diagnostiku a predikci odpovědi na terapii. Tato technika má však řadu nevýhod a její senzitivita je relativně nízká.

Kvantifikace počtu kopií PML-RARA pomocí kvantitativní real-time PCR (qPCR) představuje několik výhod. Jedná se o vysoce citlivou a reprodukovatelnou techniku, která také umožňuje posouzení kinetiky. Analýza prognostických hodnot dobře zavedeného standardizovaného qPCR protokolu (EAC Program) u pacientů s APL během různých fází léčby ukázala, že tento přístup je robustní alternativou pro posuzování MRD, a že stratifikace relapsových rizik mohou být stanoveny na základě normalizovaného počtu kopií PML-RARA. Při post-konsolidační analýze je pozitivní qPCR test silným prediktorem následného hematologického relapsu. V průběhu udržovací léčby a po skončení léčby je pozitivní qPCR test spojen s vyšším rizikem relapsu a nižší dobou přežití. Stratifikace relapsu rizik založená na kvantifikaci normalizovaného počtu kopií PML-RARA (NCN) rozděluje pacienty do 3 skupin: na ty s vysokým rizikem relapsu, pacienty se středním rizikem, a pacienty s nízkým rizikem relapsu (1). Monitoring PML-RARA pomocí citlivé detekce transkriptu je považován za nedílnou součást celkové strategie léčby APL (viz reference 2 a 3), přičemž typ léčby a intenzita jsou modulované u pacientů s různým rizikem relapsu během následné léčby.

Standardizace a validace metody kvantifikace MRD byly založeny na projektu několika center řízeném EAC a publikovaném v roce 2003 (4, 5). Souprava *ipsogen* PML-RARA bcr1 Kit je založena na této technice.

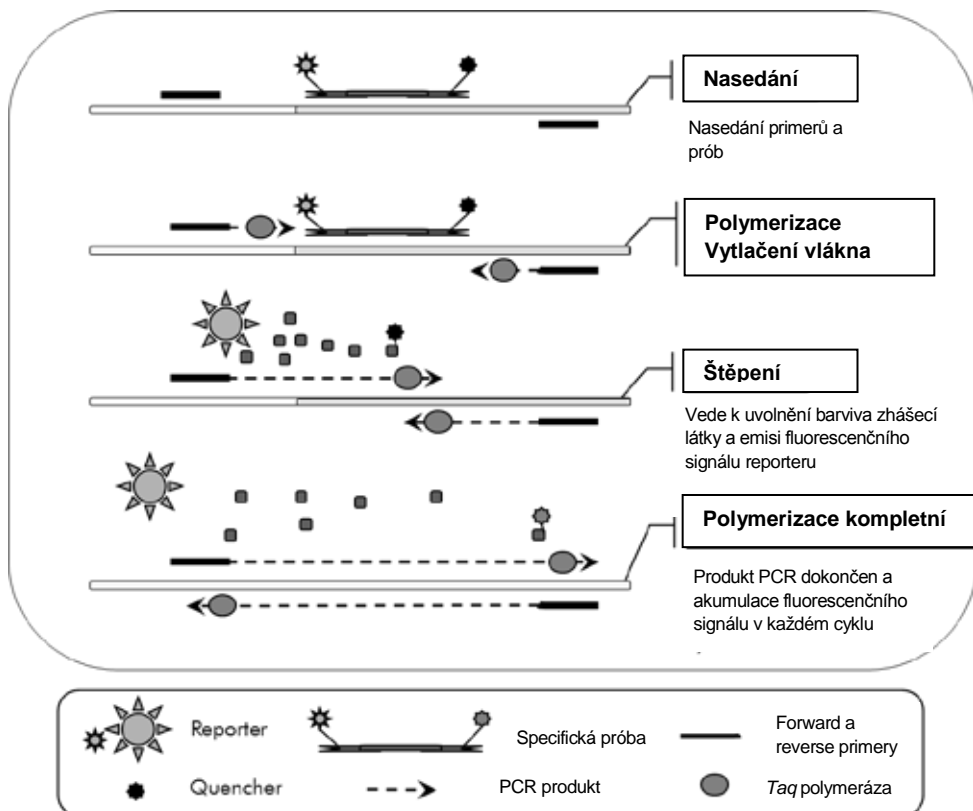
Princip metody

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

Tato analýza využívá princip hydrolýzy oligonukleotidu s dvojitým barvivem pro qPCR. Během PCR “forward” a “reverse” primery hybridizují se specifickou sekvencí. Ve stejné směsi je obsažen oligonukleotid s dvojitým barvivem. Tato sonda, která se skládá z oligonukleotidu označeného reportérovým barvivem na 5' konci a na 3' konci zhášecí látkou, hybridizuje do cílové sekvence v rámci produktu PCR. Analýza qPCR s hydrolyzačními sondami využívá exonukleázovou 5' → 3' aktivitu polymerázy DNA z *Thermus aquaticus* (Taq). Když je sonda nedotčená, blízkost reportérového barviva k zhášecí látce způsobuje potlačení fluorescence reporteru primárně převodem energie Försterova typu.

Pokud je během PCR přítomen zájmový cíl, sonda se specificky naváže do místa mezi forward a reverze primery. Aktivita exonukleázy 5' → 3' polymerázy DNA štěpí sondu mezi reporterem a zhášecí látkou pouze v případě, že sonda hybridizuje na cíl. Fragmenty sondy jsou poté z cíle vytlačeny a polymerizace vlákna pokračuje. 3' konec sondy je blokován, aby se zabránilo extenzi sondy během PCR (Obrázek 2). Tento proces nastane v každém cyklu a nenarušuje exponenciální akumulaci produktu.

Zvýšení fluorescenčního signálu je detekováno pouze v případě, že bude cílová sekvence komplementární se sondou, a tím bude během PCR amplifikována. Kvůli těmto požadavkům není nespecifická amplifikace detekována. Tím je zvýšení fluorescence přímo úměrné cílové amplifikaci během PCR.



Obrázek 2. Princip reakce. Celková RNA se reverzně přepisována a vytvořená cDNA je amplifikována pomocí PCR při využití páru specifických primerů a specifické vnitřní sondy s duálním barvivem (FAM™–TAMRA™). Sonda se váže na amplicon během každého kroku amplifikace PCR. Když se *Taq* rozšíří z primerové vazby k ampliconu, vytlačí 5' konec sondy, který je poté degradován aktivitou 5'→ 3' exonukleázy polymerázy *Taq* DNA. Štěpení pokračuje, dokud zbývající sonda neodpadne z ampliconu. Tento proces uvolňuje do roztoku fluorofor a zhášecí látku, prostorově je odděluje a vede ke zvýšení fluorescence z FAM a poklesem fluorescence pocházejícím z TAMRA.

Materiál poskytovaný se soupravou

Obsah soupravy

<i>ipsogen</i> PML-RARA bcr1 Kit		(24)
Katalogové číslo.		672123
Počet reakcí		24
Component	Name	Amount
ABL Control Gene Standard Dilution (10 ³ kopií/5 µl)	C1-ABL	50 µl
ABL Control Gene Standard Dilution (10 ⁴ kopií/5 µl)	C2-ABL	50 µl
ABL Control Gene Standard Dilution (10 ⁵ kopií/5 µl)	C3-ABL	50 µl
PML-RARA bcr1 Fusion Gene Standard Dilution (10 ¹ kopií/5 µl)	F1-PML-RARA bcr1	50 µl
PML-RARA bcr1 Fusion Gene Standard Dilution (10 ² kopií/5 µl)	F2-PML-RARA bcr1	50 µl
PML-RARA bcr1 Fusion Gene Standard Dilution (10 ³ kopií/5 µl)	F3-PML-RARA bcr1	50 µl
PML-RARA bcr1 Fusion Gene Standard Dilution (10 ⁵ kopií/5 µl)	F4-PML-RARA bcr1	50 µl
PML-RARA bcr1 Fusion Gene Standard Dilution (10 ⁶ kopií/5 µl)	F5-PML-RARA bcr1	50 µl
Mix primerů a prób ABL*	PPC-ABL 25x	90 µl
Mix Primerů a Prób PML-RARA bcr1 Fusion Gene†	PPF-PML-RARA bcr1 25x	110 µl
<i>ipsogen</i> PML-RARA bcr1 Kit Příručka (Čeština)		1

* Směs specifických forward a reverse primerů pro kontrolní gen ABL (CG) plus specifická sonda FAM-TAMRA.

† Směs specifických forward a reverse primerů pro fúzní gen BCR-ABL Mbcf (FG) plus specifická sonda FAM-TAMRA.

Poznámka: Standardní ředění a směsi primerů a sond před použitím krátce odstřed'ujte.

Vyžadovaný materiál, který není součástí soupravy

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

Ujistěte se, že přístroje byly řádně zkontrolovány a kalibrovány podle doporučení výrobce.

Reagencie

- | Voda pro PCR bez nukleáz
- | Reagencie pro reverzní transkripci: Validovanou reagensií je reverzní transkriptáza Superscript® II (nebo Superscript) obsahující 5x pufr pro první vlákno, 100 mM DDT (Life Technologies, katalogové číslo 18064-022)
- | Inhibitor RNázy: Validovanou reagensií je RNaseOUT™ (Life Technologies, katalogové číslo 10777-019)
- | Sada dNTP pro PCR
- | Random hexamery
- | MgCl₂
- | Pufr a Taq DNA polymeráza: Validovanými reagensiemi jsou TaqMan® Universal PCR Master Mix (Master Mix PCR 2x) (Life Technologies, katalogové číslo 4304437) a LightCycler TaqMan Master (Master Mix PCR 5x) (Roche, katalogové číslo 04535286001)

Spotřební materiál

- I Sterilní pipetovací špičky PCR odolné proti tvorbě aerosolu bez nukleáz s hydrofobními filtry
- I 0.5 ml nebo 0.2 ml RNase- a PCR zkumavky bez nukleáz
- I Led

Vybavení

- I Mikrolitrová pipeta* vyčleněná pro PCR (1–10 µl; 10–100 µl; 100–1000 µl)
- I Stolní centrifuga* s rotorem pro 0,2 ml/0,5 ml reakční zkumavky (schopná dosáhnout 13,000 / 14,000 rpm)
- I Přístroje PCR pro real-time:* Systém Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM nebo jiný přístroj Rotor-Gene; LightCycler 1.2, 2.0 nebo 480; ABI PRISM 7000, 7700 nebo 7900HT SDS, Applied Biosystems 7500 Real-Time PCR System nebo přístroj SmartCycler a s tím spojený specifický materiál
- I Termocyklér nebo vodní lázeň (krok reverzní transkripce)

Doplňkové reagensie

- I Souprava kontrol *ipsogen* PML-RARA bcr1 Controls Kit (kat. č. 672091) pouze pro výzkum, sestávající z buněčných linií s negativní, vysoce a mírně pozitivní expresí fúzního genu PML-RARA bcr1 pro kvalitativní validaci extrakce RNA a reverzní transkripci.

Varování a bezpečnostní opatření

Pro diagnostické použití in vitro.

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

Odpad ze vzorků a rozborů likvidujte podle místních bezpečnostních předpisů.

Všeobecná bezpečnostní opatření

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

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

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

Postupujte s maximální opatrností, aby nedošlo k následujícímu:

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

Proto doporučujeme následující.

- I Použijte laboratorní vybavení zbavené nukleázy (např. pipety, pipetovací špičky, reakční lahvičky) a při provádění analýzy mějte nasazené rukavice.
- I Použijte čerstvé pipetovací špičky odolné vůči aerosolu pro všechny pipetovací kroky, aby se zabránilo zkřížené kontaminaci vzorků a reagentů.
- I Připravte hlavní směs před PCR s vyčleněnými materiály (pipety, špičky atd.) ve vyhrazeném místě, kam nebyly zavlečeny žádné matrice DNA (cDNA, DNA, plazmid). Dejte templát do samostatné zóny (nejlépe do samostatné místnosti) se specifickým materiálem (pipety, špičky atd.).
- I Se standardními roztoky (C1–3 a F1–5) pracujte v oddělené místnosti.

Uchovávání a nakládání s reagensy

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

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

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

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

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

Postup

Příprava vzorku RNA

Příprava RNA ze vzorků pacienta (kost nebo kostní dřeň) se musí být provedena validovaným postupem. Kvalita rozboru do velké míře závisí na kvalitě vstupní RNA. Proto doporučujeme kvalifikovat před analýzou čištěnou RNA elektroforézou agarózového* gelu nebo pomocí Agilent® Bioanalyzer®.

Protokol: Doporučená standardizovaná reverzní transkripce EAC

Věci, které je nutno udělat před zahájením

- I Připravte dNTPs, 10 mM každý. Skladujte v alikvótních množstvích v -20°C .
- I Připravte random hexamery, 100 μM . Skladujte v -20°C v alikvótách.
- I Připravte MgCl_2 , 50 mM. Skladujte v -20°C v alikvótách.

Postup

1. Rozmrazte všechny komponenty a umístěte je na led.
2. Inkubujte 1 μg RNA (1–4 μl) po dobu 10 minut při 70°C a ihned zchladte na ledu po dobu 5 minut.
3. Krátce zcentrifugujte (přibližně 10 sekund, 10,000 rpm) pro shromáždění kapaliny na dno zkumavky. Pak uchovávejte na ledu.
4. Připravte následující RT mix podle počtu zpracovávaných vzorků (Tabulka 1).

* Při práci s chemikáliemi vždy používejte vhodný laboratorní plášť, rukavice na jedno použití a ochranné brýle.

Tabulka 1. Příprava RT mixu

Komponenta	Objem na vzorek (μl)	Finální koncentrace
First-Strand pufr (dodávaný se Superscript II Reverse Transcriptase), 5x	4.0	1x
MgCl ₂ (50 mM)	2.0	5 mM
dNTPs (10 mM každý, nutno předem připravit a být skladován při -20°C v alikvótách)	2.0	1 mM
DTT (100 mM, dodávaný se Superscript II Reverse Transcriptase)	2.0	10 mM
RNase inhibitor (40 U/μl)	0.5	1 U/μl
RNase inhibitor (40 U/μl)	0.5	1 U/μl
Random hexamery (100 μM)	5.0	25 μM
Superscript II nebo Superscript Reverse Transcriptase (200 U/μl)	0.5	5 U/μl
Zahřátý vzorek RNA (bude přidán v kroku 5)	1.0–4.0	50 ng/μl
Voda pro PCR bez nukleáz (bude přidána v kroku 5)	0.0–3.0	–
Celkový objem	20.0	–

5. Do každé zkumavky PCR pipetujte 16 μl směsi RT. Pak přidejte 1–4 μl (1 μg) RNA (z kroku 3) a upravte objem na 20 μl vodou vhodnou pro PCR bez nukleázy (viz Tabulka 2).

Tabulka 2. Příprava reverzně transkripční reakce

Komponenta	Objem (μl)
RT mix	16
Zahřátý vzorek RNA (1 μg)	1–4
Voda pro PCR bez nukleáz	0–3
Celkový objem	20

-
6. Dobře promíchejte a krátce odstředíte (přibližně 10 sekund, 10.000 rpm) pro shromáždění kapaliny na dně zkumavky.
 7. Inkubujte při 20°C 10 minut.
 8. Inkubujte při 42°C termocykléru po dobu 45 minut, pak neprodleně při 99°C po 3 minuty.
 9. Zchladte na ledu (pro zastavení reakce) po dobu 5 minut.
 10. Krátce odstředíte (přibližně 10 sekund, 10.000 rpm) pro shromáždění kapaliny na dně zkumavky). Pak uchovávejte na ledu.
 11. Naředte výslednou cDNA pomocí 30 μ l vody vhodné pro PCR zbavené nukleáz na konečný objem 50 μ l.
 12. Proveďte PCR podle následujících protokolů podle svého přístroje qPCR.

Protokol: qPCR pro přístroje Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM nebo Rotor-Gene Q 5plex HRM s rotorem pro 72 zkumavek

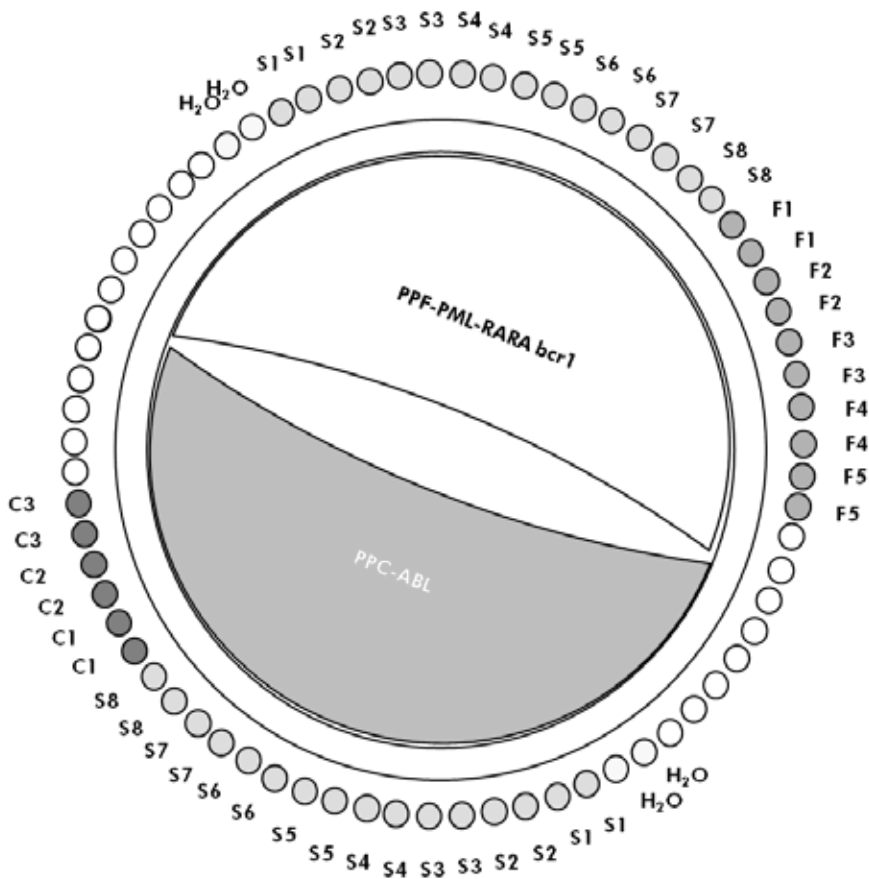
Při použití tohoto přístroje doporučujeme provádět všechna měření v duplikátech, jak je uvedeno v Tabulce 3.

Tabulka 3. Počet reakcí pro přístroje Rotor-Gene Q s rotorem pro 72 zkumavek

Vzorky	Reakce
S mixem ABL primerů a prób (PPC-ABL)	
n cDNA vzorků	n x 2 reakcí
ABL standard	2 x 3 reakcí (3 ředění, každé testováno v duplikátech)
Kontrola s vodou	2 reakcí
S mixem PML-RARA bcr1 primerů a prób (PPF-PML-RARA bcr1)	
n cDNA vzorků	n x 2 reakcí
PML-RARA standard	2 x 5 reakcí (5 ředění, každé testováno v duplikátech)
Kontrola s vodou	2 reakcí

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

Doporučujeme testování nejméně 8 vzorků cDNA ve stejném experimentu s cílem optimalizovat použití standardů a primérů a směsí sond.



Obrázek 3. Navrhované nastavení rotoru pro každý experiment se sadou ipsogen PML-RARA bcr1
F1–5: PML-RARA bcr1 standardy; **C1–3:** ABL standardy; **S:** vzorek cDNA; **H₂O:** kontrola s vodou.

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

Všechny ostatní pozice zaplňte prázdnými zkumavkami.

qPCR na přístrojích Rotor-Gene Q s rotorem pro 72 zkumavek

Poznámka: Všechny kroky provádějte na ledu.

Postup

1. Nechte roztát všechny nezbytné komponenty a umístěte je na led.
2. Připravte následující směs qPCR podle počtu zpracovávaných vzorků.

Všechny koncentrace platí pro konečný objem reakce.

Tabulka 4 popisuje pipetovací schéma pro přípravu jedené směsi reagentů vypočítané pro dosažení konečného reakčního objemu 25 μ l. Premix lze připravit podle počtu reakcí pomocí stejných primerů a směsi sond (buď PPC-ABL nebo PPF-PML-RARA bcr1). Zahrnuty jsou objemy navíc pro kompenzaci chyby při pipetování.

Tabulka 4. Příprava mixu qPCR

Komponenta	1 reakce (μ l)	ABL: 24 + 1 reakcí (μ l)	PML-RARA bcr1: 28 + 1 reakcí (μ l)	Finální koncentrace
TaqMan Universal PCR Master Mix, 2x	12.5	312.5	362.5	1x
Mix Primerů a Prób, 25x	1	25	29	1x
PCR voda bez nukleáz	6.5	162.5	188.5	–
Vzorek (bude přidán v kroku 4)	5	5 každý	5 každý	–
Celkový objem	25	25 každý	25 každý	–

3. Dávkujte 20 µl směsi qPCR do zkumavky.
4. Přidejte 5 µl produktu RT (cDNA, ekvivalent 100 ng RNA) získaného v rámci reverzní transkripce (viz "Protokol: Doporučená standardizovaná zpětná transkripce EAC", strana 15) do odpovídající zkumavky (celkový objem 25 µl).
5. Jemně promíchejte pipetováním nahoru a dolů.
6. Zkumavky vložte do termocykléru podle doporučení výrobce.
7. Naprogramujte přístroj Rotor-Gene Q pomocí programu tepelných cyklů, jak jsou uvedeny v Tabulce 5.

Tabulka 5. Teplotní profil

Režim analýzy	Kvantifikace
Hold	Teplota: 50 stupňů Čas: 2 min
Hold 2	Teplota: 95 stupňů Čas: 10 min
Cyklování	50 krát 95 stupňů po dobu 15 sec 60 stupňů po dobu 1 min s akvizicí FAM fluorescence v zeleném kanále: Jednotlivě

8. Spustíte program teplotního cyklování podle programu uvedeného v Tabulce 5.
9. Pro přístroje Rotor-Gene Q vyberte "Slope Correct" pro analýzu. Doporučujeme nastavení prahové hodnoty na 0.03.

Protokol: qPCR pro přístroje ABI PRISM 7000, 7700 a 7900HT SDS, Applied Biosystems 7500 Real-Time PCR System a LightCycler 480

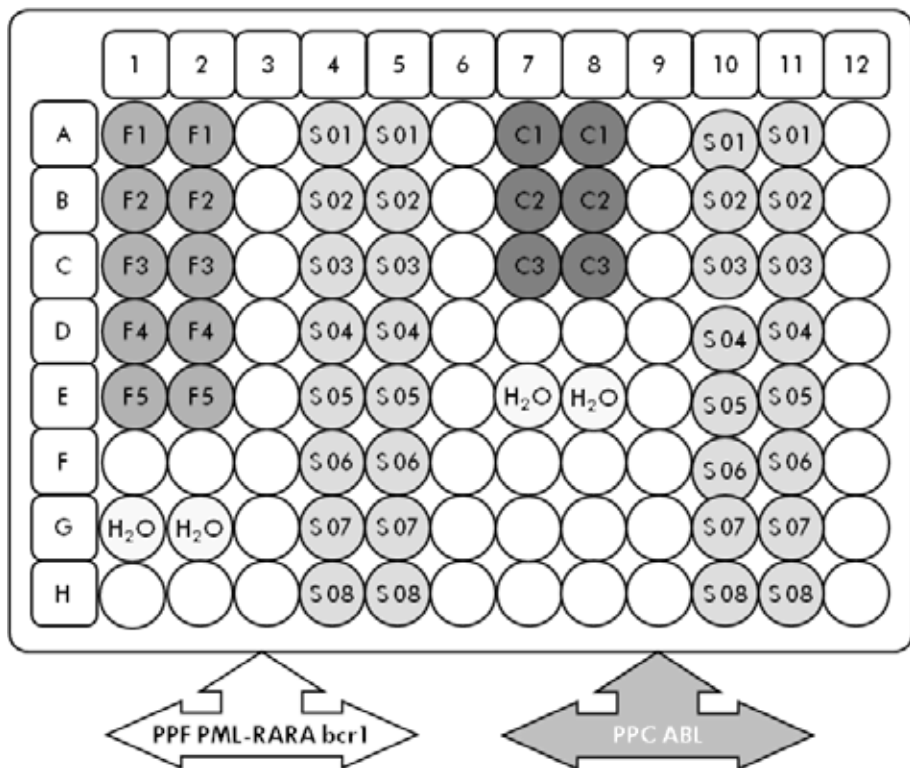
Při použití zařízení qPCR pro destičky o 96 jamkách doporučujeme provádět všechna měření v duplikátech, jak je uvedeno v Tabulce 6.

Tabulka 6. Počet reakcí při využití zařízení qPCR pro 96-jamkové destičky

Vzorky	Reakce
S mixem ABL primerů a prób (PPC-ABL)	
n cDNA vzorků	n x 2 reakcí
ABL standard	2 x 3 reakcí (3 ředění, každé testováno v duplikátech)
Kontrola s vodou	2 reakcí
S mixem PML-RARA bcr1 primerů a prób (PPF-PML-RARA bcr1)	
n cDNA vzorků	n x 2 reakcí
PML-RARA bcr1 standard	2 x 5 reakcí (5 ředění, každé testováno v duplikátech)
Kontrola s vodou	2 reakcí

Zpracování na ABI PRISM 7000, 7700 a 7900 SDS, Applied Biosystems 7500 Real-Time PCR System a přístroji LightCycler480

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



Obrázek 4. Navrhované rozložení destičky pro jeden experiment. S: vzorek cDNA; F1–5: PML-RARA bcr1 standardy; C1–3: ABL standardy; H₂O: kontrola s vodou.

qPCR na přístrojích ABI PRISM 7000, 7700 a 7900 SDS, Applied Biosystems 7500 Real-Time PCR System a LightCycler 480

Poznámka: Všechny kroky provádějte na ledu.

Postup

1. Nechte roztát všechny nezbytné komponenty a umístěte je na led.
2. Připravte následující směs qPCR podle počtu zpracovávaných vzorků.

Všechny koncentrace platí pro konečný objem reakce.

Tabulka 7 popisuje pipetovací schéma pro přípravu jedené směsi reagensií vypočítané pro dosažení konečného reakčního objemu 25 μ l. Premix lze připravit podle počtu reakcí pomocí stejných primerů a směsi sond (buď PPC-ABL nebo PPF-PML-RARA bcr1). Zahrnutý jsou objemy navíc pro kompenzaci chyby při pipetování.

Tabulka 7. Příprava mixu qPCR.

Komponenta	1 reakce (μl)	ABL: 24 +1 reakcí (μl)	PML-RARA bcr1: 28 +1 reakcí (μl)	Finální koncentrace
TaqMan Universal PCR Master Mix, 2x	12.5	312.5	362.5	1x
Mix Primerů a Prób, 25x	1	25	29	1x
PCR voda bez nukleáz	6.5	162.5	188.5	–
Vzorek (bude přidán v kroku 4)	5	5 každý	5 každý	–
Celkový objem	25	25 každý	25 každý	–

3. Dávkujte 20 μ l premixu qPCR na jamku.
4. Přidejte 5 μ l produktu RT (cDNA, ekvivalent 100 ng RNA) získaného v rámci reverzní transkripce (viz “ Protokol: Doporučená standardizovaná zpětná transkripce EAC”, strana 13 v odpovídající jamce (celkový objem 25 μ l).
5. Jemně promíchejte pipetováním nahoru a dolů.
6. Uzavřete desku a krátce odstředujte (300 x g, přibližně 10 sekund).

7. Destičku vložte do termocykléru podle doporučení výrobce. Naprogramujte termocyklér pomocí programu tepelného cyklování, jak je to uvedeno v Tabulce 8 pro přístroje ABI PRISM 7000, 7700 a 7900HT SDS a Applied Biosystems 7500 Real-Time PCR System nebo v tabulce 9 pro přístroj LightCycler 480.

Tabulka 8. Teplotní profil pro přístroje ABI PRISM 7000, 7700 a 7900HT SDS, a Applied Biosystems 7500 Real-Time PCR System

Režim analýzy	Standardní křivka — Absolutní kvantifikace
Hold	Teplota: 50°C Čas: 2 min
Hold 2	Teplota: 95°C Čas: 10 min
Cyklování	50 krát 95°C po dobu 15 sec 60°C po dobu 1 min s akvizicí FAM fluorescence; quencher: TAMRA

Tabulka 9. Teplotní profil pro přístroj LightCycler 480

Režim analýzy	Absolutní kvantifikace ("Abs Quant")
Detekční formát	Vyberte "Simple Probe" v okně Detekční formáty
Hold	Teplota: 50°C Čas: 2 min
Hold 2	Teplota: 95°C Čas: 10 min
Cyklování	50 krát 95°C po dobu 15 sec 60°C po dobu 1 min s akvizicí FAM fluorescence odpovídající (483–533 nm) pro LC verzi 01 a (465–510 nm) pro LC verzi 02

-
8. U přístrojů ABI PRISM 7000, 7700 a 7900HT SDS a Applied Biosystems 7500 Real-Time PCR System postupujte podle kroku 8a. Pro přístroj LightCycler 480 instrument postupujte podle kroku 8b.
- 8a. ABI PRISM 7000, 7700 a 7900HT SDS a Applied Biosystems 7500 Real-Time PCR System: Doporučujeme nastavit práh na 0.1, jak je popsáno v protokolu EAC v kroku analýzy a ve výchozím nastavení mezi cykly 3 a 15. Spusťte program cyklování, jak je uvedeno v Tabulce 8.
- 8b. Přístroj LightCycler 480 instrument: Doporučujeme režim analýzy Bod vhodnosti s pozadím nastaveným na hodnotu 2.0 a prahovou hodnotou 2.0. Spusťte program cyklování, jak je uvedeno v Tabulce 9.

Protokol: qPCR na přístrojích LightCycler 1.2 a 2.0

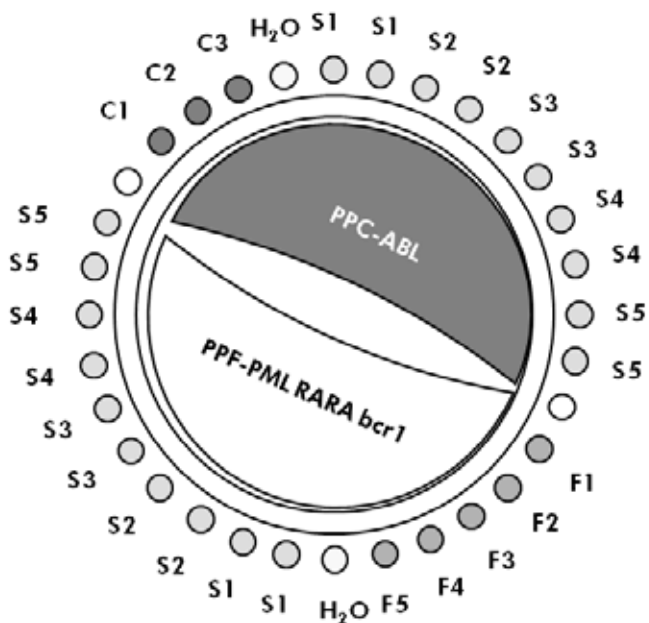
Při použití kapilárních přístrojů doporučujeme měřit vzorky v duplikátech a kontroly pouze jednou, jak je uvedeno v Tabulce 10.

Tabulka 10. Počet reakcí pro přístroje LightCycler 1.2 a 2.0

Vzorky	Reakce
Se směsí ABL primerů a prób (PPC-ABL)	
n cDNA vzorků	n x 2 reakcí
ABL standard	1 x 3 reakcí (3 ředění standardu, každý testován jednou)
Kontrola s vodou	1 reakce
Se směsí PML-RARA bcr1 primerů a prób (PPF-PML-RARA bcr1)	
n cDNA vzorků	n x 2 reakcí
PML-RARA bcr1 standard	1 x 5 reakcí (5 ředění standard, každý testován jednou)
Kontrola s vodou	1 reakce

Zpracování vzorku na přístrojích LightCycler 1.2 a 2.0

Doporučujeme testování nejméně 5 vzorků cDNA ve stejném experimentu s cílem optimalizovat použití standardů a primerů a směsí sond. Kapilární schéma na Obrázku 5 ukazuje příklad experimentu.



Obrázek 5. Navrhované nastavení rotoru pro každý experiment se sadou *ipsogen* PML-RARA bcr1 Kit. F1–5: PML-RARA bcr1 standardy; C1–3: ABL standardy; S: neznámý vzorek DNA, který bude analyzován; H₂O: Kontrola s vodou.

qPCR na přístrojích LightCycler 1.2 a 2.0

Poznámka: Kvůli konkrétním technologickým požadavkům se musí experimenty s přístrojem LightCycler provádět při použití specifických reagensí. Doporučujeme používat LightCycler TaqMan Master a dodržovat pokyny výrobce pro přípravu Master Mixu 5x.

Poznámka: Všechny kroky provádějte na ledu.

Postup

1. Nechte roztát všechny nezbytné komponenty a umístěte je na led.
2. Připravte následující směs qPCR podle počtu zpracovávaných vzorků.

Všechny koncentrace platí pro konečný objem reakce.

Tabulka 11 popisuje pipetovací schéma pro přípravu jedné směsi reagensů vypočítané pro dosažení konečného reakčního objemu 20 µl. Premix lze připravit podle počtu reakcí pomocí stejných primerů a směsi sond (buď PPC-ABL nebo PPF-PML-RARA bcr1). Zahrnuty jsou i objemy navíc pro kompenzaci chyby při pipetování.

Tabulka 11. Příprava qPCR mixu

Komponenta	1 reakce (µl)	ABL: 14 + 1 reakcí (µl)	PML-RARA bcr1: 16 + 1 reakcí (µl)	Finální koncentrace
Čerstvě připravený LightCycler TaqMan Master Mix, 5x	4.0	60	68	1x
Mix Primerů a Prób, 25x	0.8	12	13.6	1x
PCR voda bez nukleáz	10.2	153	173.4	–
Vzorek (bude přidán v kroku 4)	5	5 každý	5 každý	–
Celkový objem	20	20 každý	20 každý	–

3. Dávkujte 15 µl premixu qPCR na kapiláru.
4. Přidejte 5 µl produktu RT (cDNA, ekvivalent 100 ng RNA) získaného v rámci reverzní transkripce (viz "Protokol: Doporučená standardizovaná reverzní transkripce EAC", strana 13) v odpovídající zkumavce (celkový objem 20 µl).
5. Jemně promíchejte pipetováním nahoru a dolů.

6. Umístěte kapiláry do adaptérů dodávaných s přístrojem, krátce odstředujte (700 x g, přibližně 10 sekund).
7. Kapiláry vložte do termocykléru podle doporučení výrobce.
8. Naprogramujte přístroje LightCycler 1.2 nebo 2.0 pomocí programu tepelných cyklů, jak jsou uvedeny v Tabulce 12.

Tabulka 12. Teplotní profil

Režim analýzy	Kvantifikace
Hold	Teplota: 95°C Čas: 10 min Ramp: 20
Cyklování	50 krát 95°C po dobu 10 sec; ramp: 20 60°C po dobu 1 min; ramp: 20; s akvizicí FAM fluorescence: Jednotlivě
Hold 2	45°C po dobu 1 min; ramp: 20

9. U přístroje LightCycler 1.2 postupujte podle kroku 9a. U přístroje LightCycler 2.0 postupujte podle kroku 9b.
 - 9a. LightCycler 1.2: Doporučuje se F1/F2 a režim "Analýzy založené na druhé derivaci". Spustte program tepelného cyklování, jak je uvedeno v Tabulce 12.
 - 9b. LightCycler 2.0: Doporučujeme použití Automatické analýzy (F"max) v softwaru LightCycler 2.0 verze 4.0 pro získání reprodukovatelných výsledků. Spustte program tepelného cyklování, jak je uvedeno v Tabulce 12.

Protokol: qPCR pro přístroj SmartCycler

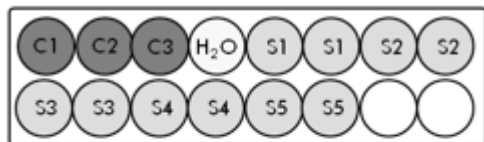
Při použití tohoto přístroje doporučujeme měřit vzorky dvojmo a kontroly pouze jednou, jak je uvedeno v Tabulce 13.

Tabulka 13. Počet reakcí pro přístroj SmartCycler

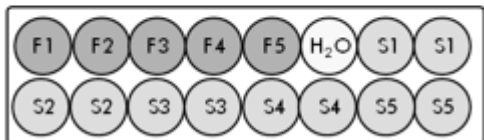
Vzorky	Reakce
Se směsí ABL primerů a prób (PPC-ABL)	
n cDNA vzorků	n x 2 reakcí
ABL standard	1 x 3 reakcí (3 ředění standardu, každý testován jednou)
Kontrola s vodou	1 reakce
Se směsí PML-RARA bcr1 primerů a prób (PPF-PML-RARA bcr1)	
n cDNA vzorků	n x 2 reakcí
PML-RARA bcr1 standard	1 x 5 reakcí (5 ředění standardu, každý testován jednou)
Kontrola s vodou	1 reakce

Zpracování vzorku na přístroji SmartCycler

Doporučujeme testování nejméně 5 vzorků cDNA ve stejném experimentu s cílem optimalizovat použití standardů a primerů a směsí sond. Dvoublokové schéma na Obrázku 6 ukazuje příklad.



Všechny rozборы na prvním bloku se provádí pomocí PPC - ABL



Všechny rozборы na druhém bloku se provádí pomocí PPF – PML-RARA bcr1

Obrázek 6. Navrhované nastavení pro jeden experiment. S: vzorek cDNA ; **F1–5:** PML-RARA bcr1 standardy; **C1–3:** ABL standardy; **H₂O:** Kontrola s vodou.

qPCR na přístroji SmartCycler

Poznámka: Všechny kroky provádějte na ledu.

Postup

1. Nechte roztát všechny nezbytné komponenty a umístěte je na led.
2. Připravte následující směs qPCR podle počtu zpracovávaných vzorků.

Všechny koncentrace platí pro konečný objem reakce.

Tabulka 14 popisuje pipetovací schéma pro přípravu jedné směsi reagentů vypočítané pro dosažení konečného reakčního objemu 25 µl. Premix lze připravit podle počtu reakcí pomocí stejných primerů a směsi sond (buď PPC-ABL nebo PPF-PML-RARA bcr1). Zahmuty jsou objemy navíc pro kompenzaci chyby při pipetování.

Tabulka 14. Příprava qPCR mixu

Komponenta	1 reakce (μl)	ABL: 14 + 1 reakcí (μl)	PML-RARA bcr1: 16 + 1 reakcí (μl)	Finální koncentrace
TaqMan Universal PCR Master Mix, 2x	12.5	187.5	212.5	1x
Mix Primerů a Prób, 25x	1	15	17	1x
PCR voda bez nukleáz	6.5	97.5	110.5	–
Vzorek (bude přidán v kroku 4)	5	5 každý	5 každý	–
Celkový objem	25	25 každý	25 každý	–

3. Dávkujte 20 μ l premix qPCR na jamku.
4. Přidejte 5 μ l produktu RT (cDNA, ekvivalent 100 ng RNA) získaného v rámci reverzní transkripce (viz "Protokol: Doporučená standardizovaná reverzní transkripce EAC", strana 15) v odpovídající jamce (celkový objem 25 μ l).
5. Jemně promíchejte pipetováním nahoru a dolů.
6. Vzorky vložte do termocykléru podle doporučení výrobce.
7. Naprogramujte přístroj SmartCycler pomocí program tepelných cyklů jak je uvedeno v Tabulce 15.

Tabulka 15. Teplotní profil

Hold	Teplota: 50°C Čas: 2 min
Hold 2	Teplota: 95°C Čas: 10 min
Cyklování	50 krát 95°C po dobu 15 sec 60°C po dobu 1 min s akvizicí: Jednotlivě

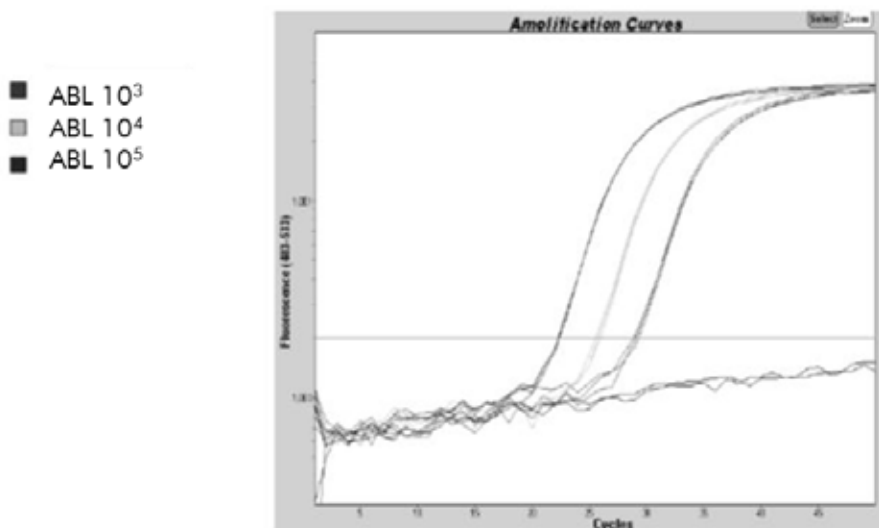
8. Doporučujeme nastavení prahové hodnoty na 30. Spusťte program tepelného cyklování, jak je uvedeno v Tabulce 15.

Interpretace výsledků

Princip analýzy dat

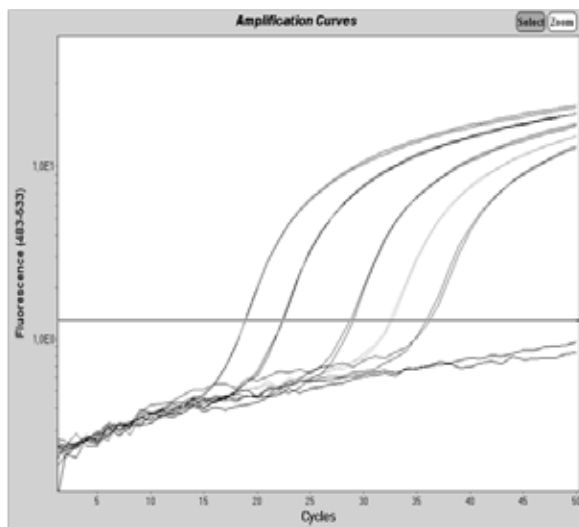
Při použití technologie TaqMan se počet cyklů PCR nezbytných pro detekci signálu nad prahovou hodnotou nazývá prahový cyklus (C_T) a je přímo úměrný množství přítomné cílové látky na počátku reakce.

Pomocí standardů se známým počtem molekul můžete vytvořit standardní křivku a stanovit přesné množství cílové látky přítomné v testovacím vzorku. Standardní křivky *ipsogen* jsou založeny na plazmidech; používáme 3 plazmidová standardní ředění pro kontrolní gen ABL (CG) a 5 standardních ředění pro fúzní gen (PML-RARA bcr1), aby byly zajištěny přesné standardní křivky. Obrázky 7 a 8 ukazují příklad amplifikačních křivek TaqMan získaných pomocí sady *ipsogen* PML-RARA bcr1



Obrázek 7. Detekce ABL standardů (C1, C2, C3). 10³, 10⁴ a 10⁵ kopii/5 µl.

- PML-RARA bcr1 10¹
- PML-RARA bcr1 10²
- PML-RARA bcr1 10³
- PML-RARA bcr1 10⁵
- PML-RARA bcr1 10⁶



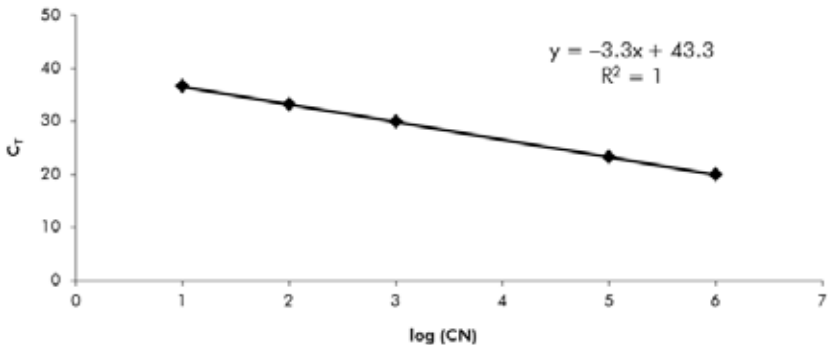
Obrázek 8. Detekce PML-RARA bcr1 standardů (F1–F5). 10¹, 10², 10³, 10⁵ a 10⁶ kopií/5 μ l.

Výsledky

Standardní křivka a kritéria kvality

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

Pro každý gen (ABL a PML-RARA) se surové hodnoty C_T získané z naředění plazmidových standardů vynášejí podle logaritmu počtu kopií (3, 4 a 5 pro C1, C2 a C3; 1, 2, 3, 5 a 6 pro F1, F2, F3, F4 a F5). Obrázek 9 ukazuje příklad teoretické standardní křivky vypočítané z 5 standardních ředění.



Obrázek 9. Teoretická křivka vypočítaná z 5 standardních ředění. Vypočítá se přímka lineární regrese ($y = ax + b$) pro každý gen (ABL a PML-RARA), kde a je sklon přímky a b je průsečík s osou y , což je souřadnice y bodu, kdy přímka protíná osu y . Její rovnice a koeficient stanovení (R^2) se promítne do grafu.

Jako standardy slouží 10-násobná ředění, teoretický sklon křivky je -3,3. Sklon od -3,0 do -3,9 je přijatelný, pokud je $R^2 > 0,95$ (6). Ovšem hodnota $R^2 > 0,98$ je žádoucí pro přesné výsledky (7).

Normalizovaný počet kopií (NCN)

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

Standardní rovnice křivky PML-RARA by se měla použít pro transformaci surových hodnot C_T (získaných pomocí PPF-PML-RARA) pro neznámé vzorky do počtu kopií PML-RARA ($PML-RARA_{CN}$).

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

$$\text{NCN} = \frac{\text{PML-RARA}_{\text{CN}}}{\text{ABL}_{\text{CN}}}$$

Hodnota MRD

Hodnota minimálního reziduálního onemocnění (MRD) je poměr mezi CG normalizovanou expresí FG v kontrolních $(\text{FG}_{\text{CN}}/\text{CG}_{\text{CN}})_{\text{FUP}}$ a diagnostických vzorcích $(\text{FG}_{\text{CN}}/\text{CG}_{\text{CN}})_{\text{DX}}$.

$$\text{Hodnota MRD (MRDv)} = \frac{(\text{FG}_{\text{CN}}/\text{CG}_{\text{CN}})_{\text{FUP}}}{(\text{FG}_{\text{CN}}/\text{CG}_{\text{CN}})_{\text{DX}}}$$

Senzitivita

Senzitivita (SENS_v) se vypočítává z relativní exprese FG při diagnóze $(\text{FG}_{\text{CN}}/\text{CG}_{\text{CN}})_{\text{DX}}$ a CG exprese $(\text{CG}_{\text{CN,FUP}})$ v kontrolním vzorku.

$$\text{Senzitivita (SENSv)} = \frac{\text{CG}_{\text{CN,DX}}}{\text{CG}_{\text{CN,FUP}} \times \text{FG}_{\text{CN,DX}}}$$

Kontrola kvality hodnot ABL

Špatná kvalita RNA nebo problémy během kroků qPCR má za následek nízkou hodnotu ABL_{CN}. Doporučujeme nezahrnovat výsledky ze vzorků dávající ABL_{CN} <1318 (nižší hodnota 95% CI ze vzorků pacienta ve studii EAC, reference 5).

Reproducibilita mezi replikáty

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

Variace hodnot C_T mezi replikáty je obecně $<1,5$, pokud bude hodnota C_T replikátů <36 (6).

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

Kontroly s vodou

Negativní kontroly by měly dávat nulovou CN.

Pozitivní kontrola vody je výsledkem zkřížené kontaminace. Viz "Řešení problémů" níže, kde naleznete řešení.

Řešení problémů

V této kapitole naleznete užitečné informace, které Vám mohou pomoci při řešení případných problémů. Další informace obdržíte od klinického koordinátora, případně navštívte webové stránky www.qiagen.com.

Komentáře a návrhy

Negativní výsledek pro kontrolní gen (ABL) a PML-RARA bcr1 ve všech vzorcích — standard je v pořádku

- | | |
|---------------------------------------|--|
| a) Nízká kvalita RNA | Před zahájením vždy zkontrolujte kvalitu a koncentraci RNA.
Spusťte pozitivní kontrolu RNA buněčné linie (sada kontrol <i>ipsogen</i> PML-RARA bcr1, katalogové číslo 672091)*) souběžně. |
| b) Selhání kroku reverzní transkripce | Před zahájením vždy zkontrolujte kvalitu a koncentraci RNA.
Spusťte pozitivní kontrolu RNA buněčné linie (sada kontrol <i>ipsogen</i> PML-RARA bcr1, katalogové číslo 672091)*) souběžně. |

Negativní výsledek pro kontrolní gen (ABL) ve vzorcích — standard je v pořádku

- | | |
|---------------------------------------|--|
| a) Nízká kvalita RNA | Před zahájením vždy zkontrolujte kvalitu a koncentraci RNA.
Spusťte pozitivní kontrolu RNA buněčné linie (sada kontrol <i>ipsogen</i> PML-RARA bcr1, katalogové číslo 672091)*) souběžně. |
| b) Selhání kroku reverzní transkripce | Před zahájením vždy zkontrolujte kvalitu a koncentraci RNA.
Spusťte pozitivní kontrolu RNA buněčné linie (sada kontrol <i>ipsogen</i> PML-RARA bcr1, katalogové číslo 672091)*) souběžně. |

Signál standardu negativní

- | | |
|---------------------|--|
| a) Chyba pipetování | Zkontrolujte schéma pipetování a nastavení reakce.
Opakujte PCR reakci. |
|---------------------|--|

Komentáře a návrhy

- b) Nevhodné uchování součástí soupravy
- Uchovávejte soupravu *ipsogen* PML-RARA bcr1 Kit při -15 až -30°C a chraňte primery a směsi sond (PPC and PPF) před světlem. Viz. "Uchování a nakládání s reagensy" str.14.
- Vyhňte se opakovanému rozmrazování a zmrazování.
- Reagensy uchovávejte v alikvótech.

Negativní kontroly jsou pozitivní

Křížová kontaminace

Vyměňte všechny kritické reagensy.

Opakujte experiment s novými alikvótními množstvími všech reagensů.

Vždy nakládejte se vzorky, komponenty sady a spotřebními materiály ve shodě s běžně přijatou praxí, aby se zabránilo kontaminaci přenosem.

Žádný signál, ani v standardních kontrolách

- a) Chyba pipetování nebo vynechání reagensů
- Zkontrolujte schéma pipetování a namíchání reakce.
- Opakujte PCR.
- b) Inhibiční efekty materiálu vzorku způsobené nedostatečným přečištěním.
- Opakujte přípravu RNA.
- c) LightCycler: Vybrán nesprávný detekční kanál
- Zadejte nastavení kanálu na F1/F2 nebo 530 nm/640 nm.
- d) LightCycler: Snímání dat nebylo naprogramováno
- Zkontrolujte programy cyklů.
- Zkontrolujte režim snímání „jednotlivě“ na konci každého segmentu snímání programu PCR.

Nepřítomný nebo nízký signál u vzorků, ale standardní kontroly jsou v pořádku.

- a) Nízká kvalita nebo koncentrace RNA
- Před zahájením vždy zkontrolujte kvalitu a koncentraci RNA.
- Spusťte pozitivní kontrolu RNA buněčné linie (*ipsogen* PML-RARA bcr1 Controls Kit, kat. č. 672091*) souběžně.

Komentáře a návrhy

- | | |
|--|--|
| b) Selhání kroku reverzní transkripce | Před zahájením vždy zkontrolujte kvalitu a koncentraci RNA.

Spusťte pozitivní kontrolu buněčné linie (<i>ipsogen</i> PML-RARA bcr1 Controls Kit, kat. č. 672091)*) souběžně. |
| Intenzita fluorescence je | příliš nízká |
| a) Nevhodné uchování komponent soupravy | Uchovávejte soupravu <i>ipsogen</i> PML-RARA bcr1 Kit při -15 až -30°C a chraňte primery a směsi sond (PPC a PPF) před světlem viz. "Uchovávání a nakládání s reagensy", str.14.

Chraňte před opakovaným zmražením a rozmražením.

Uchovávejte reagensy v alikvótách. |
| b) Velmi nízké výchozí množství cílové RNA | Zvyšte množství vzorku RNA.

Poznámka: V závislosti na zvolené metodě přípravy RNA se mohou vyskytnout inhibiční účinky. |

LightCycler: Intenzita fluorescence je proměnlivá

- | | |
|---|--|
| a) Chyba pipetování | Proměnlivost způsobená tzv. „chybou pipetování“ lze snížit analýzou dat v režimu F1/F2 nebo 530 nm/640 nm. |
| b) Nedostatečná centrifugace kapilár | Připravená směs PCR může být stále přítomna v horní části kapiláry nebo může dojít k zachycení vzduchové bubliny ve špičce kapiláry.

Vždy centrifugujte kapiláry naplněné reakční směsí, jak je to popsáno v konkrétní provozní příručce přístroje. |
| c) Vnější povrch špičky kapiláry je znečištěn | Při manipulaci s kapilárami vždy noste rukavice. |

LightCycler: Chyba standardní křivky

- | | |
|------------------|---|
| Chyba pipetování | Proměnlivost způsobená tzv. „chybou pipetování“ lze snížit analýzou dat v režimu F1/F2 or 530 nm/640 nm mode. |
|------------------|---|

*Souprava kontrol *ipsogen* PML-RARA bcr1 Controls Kit, kat. č. 672091, je pouze pro výzkumné účely. Není určena pro použití při diagnostice. Žádné tvrzení nebo ujištění se netýká poskytování informací o diagnóze, prevenci nebo léčbě nemocí.

Kontrola kvality

Na přístroji LightCycler 480 proveďte řízení jakosti úplné sady. Tato sada se vyrábí podle normy ISO 13485:2003. Certifikáty o analýze jsou k dispozici na požádání na adrese www.qiagen.com/support/.

Omezení

Uživatelé musí být školeni a obeznámeni s touto technologií před použitím tohoto zařízení. Tato souprava by měla být používána podle pokynů uvedených v této příručce v kombinaci s validovanými reagensii a přístroji (viz "Vyžadovaný materiál, který není součástí soupravy", stránka 10).

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

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

Poznámka: Sada byla navržena podle studií "Europe Against Cancer" (EAC -Evropa proti rakovině) (4, 5). Dodržuje pokyny uvedené v manuálu v kombinaci s validovanými reagensii a přístroji. Jakékoliv použití tohoto výrobku mimo schválené indikace a/nebo úprava komponent zneplatní závazky QIAGEN.

Výkonnostní charakteristiky

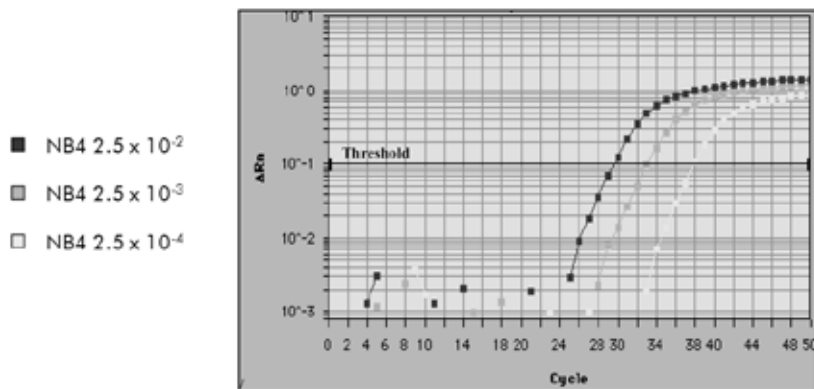
Neklinické studie

Materiál a metody

Hodnocení výkonů bylo provedeno na přístroji ABI PRISM 7700 SDS v kombinaci s reagensii uvedenými na seznamu v “Vyžadovaný materiál, který není součástí soupravy”, stránka 10. Studie ekvivalence validovaly její použití pro následující přístroje: ABI PRISM 7000 a 7900HT SDS, LightCycler 1.2 a 480, Rotor-Gene 3000 a SmartCycler.

Ke zjištění analytické výkonnosti sady *ipsogen* PML-RARA bcr1 byly provedeny neklinické studie. Tyto neklinické laboratorní studie byly provedeny na celkové RNA z buněčné linie NB4 naředěné konstantním konečným množstvím celkové RNA buněčné linie MV4-11.

Pro stanovení opakovatelnosti analýzy bylo analyzováno 5 různých koncentrací celkové RNA NB4 (5 ng, 500 pg, 50 pg, 5 pg a 0,5 pg) naředěné v celkové RNA MV4- 11 v konstantním konečném celkovém množství 200 ng v 5 replikátech na běh a ve 4 různých běžích. Vzorky s 5pg a 0.5pg RNA NB4 v MV4-11 byly příliš nízké, aby poskytovaly výsledky (Obrázek 10).



Obrázek 10. Amplifikační křivky 2.5×10^{-2} (5 ng), 2.5×10^{-3} (0.5 ng) a 2.5×10^{-4} (0.05 ng) ředění NB4 celkové RNA v MV4-11 negativní totální RNA.

Analytická data

Tabulky 16-19 ukazují analýzy jednotlivých rozborů s průměrným prahovým cyklem, (C_T), směrodatnou odchylkou (SD), počtem vzorků (n), variačním koeficientem (CV), průměrným počtem kopií (CN) a průměrným normalizovaným počtem kopií (NCN).

Tabulka 16. Inter- a intra-assay analýza — buněčné linie PML-RARA a ABL

Buněčná linie	Ředění	Inter-assay analýza			Intra-assay analýza		
		Průměr C_T	SD	n	CV (%)	Min CV	Max CV
PML-RARA	5 ng	29.86	0.29	20	0.98	0.32	1.42
	0.5 ng	33.70	0.48	20	1.42	0.56	2.16
	0.05 ng	37.03	0.37	18	1.01	1.07	2.03
ABL	–	24.06	0.22	100	0.92	0.15	2.31

Tabulka 17. Inter-assay analýza — plazmidy

Gen	Plazmid	Průměr C _T	SD	n	CV (%)
PML-RARA	F1 (10 ¹ kopií)	35.95	0.29	8	0.79
	F2 (10 ² kopií)	32.25	0.59	8	1.84
	F3 (10 ³ kopií)	28.71	0.55	8	1.90
	F4 (10 ⁵ kopií)	22.14	0.49	7	2.23
	F5 (10 ⁶ kopií)	18.64	0.72	8	3.84
ABL	C1 (10 ³ kopií)	28.85	0.76	7	2.62
	C2 (10 ⁴ kopií)	25.25	0.71	8	2.82
	C3 (10 ⁵ kopií)	21.74	0.81	8	3.74

Tabulka 18. Inter-assay analýza — buněčné linie PML-RARA bcr1 a ABL (průměr CN)

Buněčné linie	Ředění	Průměr CN	SD	n	CV (%)
PML-RARA bcr1	2.5 x 10 ⁻² (5 ng/200 µg)	583.95	149.19	20	25.55
	2.5 x 10 ⁻³ (0.5 ng/200 ng)	44.98	12.25	20	27.23
	2.5 x 10 ⁻⁴ (0.05 ng/200 ng)	4.91	1.55	19	31.52
ABL	–	35,171.47	22,448.3	99	63.83

Tabulka 19. Inter-assay analýza — buněčná linie PML-RARA bcr1 (průměr NCN)

Buněčná linie	Ředění	Průměr NCN*	SD	n	CV (%)
PML-RARA bcr1	2.5×10^{-2} (5 ng/200 ng)	271.4	150.00	20	55.56
	2.5×10^{-3} (0.5 ng/200 ng)	15.35	8.12	20	52.87
	2.5×10^{-4} (0.05 ng/200 ng)	1.66	0.91	18	55.14
ABL	–	35,171.47	22,448.3	99	63.83

* Pouze pro tyto studijní výsledky se NCN udává jako $\frac{\text{PML-RARA bcr1}_{\text{CN}}}{\text{ABL}_{\text{CN}}} \times 10,000$.

Klinické studie

Hodnocení výkonů bylo provedeno na přístroji ABI PRISM 7700 SDS v kombinaci s reagensii uvedenými na seznamu v “Vyžadovaný materiál, který není součástí soupravy”, stránka 10. Studie ekvivalence validovaly její použití pro následující přístroje: Přístroje ABI PRISM 7000 a 7900HT SDS, LightCycler 1.2 a 480, Rotor-Gene 3000 a SmartCycler.

Skupina 26 laboratoří v 10 evropských zemích organizovaných v rámci koordinovaného postupu EAC použila plazmidy poskytnuté *ipsogen* ke zjištění standardizovaného protokolu pro analýzu qPCR hlavních genů fúze spojované s leukémií v klinickém nastavení. Transkript PML-RARA bcr1 byl jedním z genů fúze (FG) zařazených do studie. Předkládáme zde souhrn této validační studie; plné výsledky byly zveřejněny v roce 2003 (4,5).

Inter-laboratorní reproducibilita pro CG a FG plasmidových standardů

Jedenáct laboratoří provedlo experiment mezilaboratorní reprodukovatelnosti s cílem vyhodnotit variabilitu měření standardních ředění plazmidů CG a FG. Ředění byla prováděna v každém zařízení dvojmo. Tabulka 20 uvádí průměr, směrodatnou odchylku a CV (%) pro každé ředění.

Tabulka 20. Inter-laboratorní reproducibilita pro CG a FG plazmidové standardy

Gen	Ředění	Průměr	C _T SD	CV (%)
ABL kontrolní gen	C1	29.26	0.69	2.31
	C2	25.79	0.65	2.53
	C3	22.40	0.61	2.70
PML-RARA bcr1 fúzní gen	F1	35.84	0.79	2.21
	F2	32.47	0.49	1.50
	F3	28.91	0.34	1.17
	F4	21.82	0.30	1.40
	F5	18.47	0.29	1.55

Hodnoty exprese FG transkriptu PML-RARA bcr1

Tabulky 21 a 22 ukazují hodnoty exprese transkriptu FG PML-RARA bcr1 a ABL CG pro buněčnou linii NB4, pacienti s APL diagnózou a negativní kontrolní skupina pacientů.

Tabulka 21. Hodnoty exprese FG transkriptu PML-RARA bcr1 a ABL CG — C_T hodnoty

	C _T hodnoty (95% rozsah)	
	PML-RARA bcr1	ABL
NB4 buněčná linie	24.7	23.7
Vzorky pacientů s APL		
Kostní dřeň (n = 14)	25.6 (23.1–27.5)	24.5 (21.7–28.5)
Periferní krev (n = 9)	25.7 (23.7–29.4)	24.6 (22.0–27.4)
Vzorky negativních pacientů		
Kostní dřeň (n = 26)	–	25.35 (24.68–26.02)
Periferní krev (n = 74)	–	25.15 (24.83–25.48)

Hodnoty ABL C_T se mezi normálními a leukémickými vzorky významně nelišily, a to ani mezi typy vzorků (PB nebo BM) nebo mezi leukémickými vzorky od pacientů diagnostikovaných na APL.

Tabulka 22. Hodnoty exprese FG transkriptu PML-RARA bcr1 a ABL CG — hodnoty CN a NCN

	CN hodnoty (95% rozsah)		NCN hodnoty (95% rozsah)
	PML-RARA bcr1	ABL	CN bcr1/ CN ABL
Vzorky pacientů			
Kostní dřeň (n = 14)	5129 (1480–25,704)	1538.7 (133.2–46,781.28)	0.30 (0.09–1.82)
Periferní krev (n = 9)	3891 (475–14,454)	1400.76 (50.27–11,274)	0.36 (0.11–0.78)
Vzorky negativních pacientů			
Kostní dřeň (n = 26)	–	19,201 (12,922–25,480)	–
Periferní krev (n = 74)	–	21,136 (17,834–24,437)	–

Míra výskytu falešně pozitivních a falešně negativních vzorků

Míry výskytu falešně negativních a falešně pozitivních vzorků byly vypočítány pomocí následujících kontrol.

- I Pozitivní kontroly: Buňky NB4, buněčná linie dobře známá pro svoji pozitivitu pro fúzní gen PML-RARA bcr1; vzorky pacientů byly již prokázány jako PML-RARA bcr1 pozitivní.
- I Negativní kontroly: Negativní vzorky RNA, kontroly bez amplifikace (NAC) získané z RNA *E. coli* namísto humánní RNA pro kontrolu kontaminace PCR a beztemplátové kontroly (NTC), které obsahovaly vodu místo lidské RNA

Amplifikace vzorků RNA FG byla prováděna v triplikátech a pro CG v duplikátech.

Falešně negativní vzorek byl definován jako pozitivní RNA vzorek s méně než 50 % pozitivními jamkami (0/2, 0/3 nebo 1/3).

Falešně pozitivní vzorek byl definován jako negativní vzorek s méně než 50 % pozitivními jamkami (1/2, 2/3 nebo 3/3).

Tabulka 23 ukazuje počet a procentuální podíl falešně negativních a falešně pozitivních vzorků.

Tabulka 23. Falešně negativní a falešně pozitivní vzorky

Falešná negativita		Falešná pozitivita	
10^{-3}	10^{-4}	FG negativní kontrola	NAC/NTC
0% (0/29)	0% (0/28)	11% (5/45)	5% (5/100)

Reference

1. Santamarie, C. et al. (2007) Using quantification of the PML-RARalpha transcript to stratify the risk of relapse in patients with acute promyelocytic leukemia. *Haematologica* **92**, 315.
2. Kern, W. et al. (2004) Monitoring of minimal residual disease in acute myeloid leukemia. *Atlas Genet. Cytogenet. Oncol. Haematol.* **112**, 4.
3. Lo-Coco, F. and Ammantuna, E. (2006) The biology of acute promyelocytic leukemia and its impact on diagnosis and treatment. *Hematology ASH Educ. Program* **514**, 156.
4. Beillard, E. et al. (2003) Evaluation of candidate control genes for diagnosis and residual disease detection in leukemic patients using 'real-time' quantitative reverse-transcriptase polymerase chain reaction (RQ-PCR) - a Europe against cancer program. *Leukemia* **17**, 2474.
5. 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.
6. van der Velden, V.H. et al. (2003) Detection of minimal residual disease in hematologic malignancies by real-time quantitative PCR: principles, approaches, and laboratory aspects. *Leukemia* **17**, 1013.
7. Branford, S. et al. (2006) Rationale for the recommendations for harmonizing current methodology for detecting BCR-ABL transcripts in patients with chronic myeloid leukemia. *Leukemia* **20**, 1925.

Symboly

Na obalech a štítcích se mohou objevit následující symboly:



<N>

Obsahuje dostatek reagentů pro <N> reakcí



Použitelné do



Prostředek zdravotnické techniky pro in vitro diagnostiku



Katalogové číslo



Číslo šarže



Materiálové číslo (tj. označení komponenty)



Mezinárodní číslo obchodní položky GTIN



Teplotní omezení



Výrobce



Další informace viz návod k použití

Historie revizí dokumentu

R5, listopad 2017

Doplněny poznámky o tom, že souprava kontrol *ipsogen* PML-RARA bcr1 Controls Kit, kat. č. 672091, je „Pouze pro výzkum“; opraveny drobné překlepy.

Informace pro objednávání

Produkt	Obsah	Kat. č.
<i>ipsogen</i> PML-RARA bcr1 Kit (24)	Pro 24 reakcí: ABL Control Gene Standardy, PML-RARA bcr1 Fusion Gene Standardy, Mix Primerů a prób ABL, Mix Primerů a Prób PML-RARA bcr1 Fusion Gene	672123
Rotor-Gene Q MDx — validovaný pro IVD real-time PCR analýzu v klinických aplikacích		
Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM Platform	Real-time PCR cykler a High Resolution Melting analyzátor s 5 kanály (zelený žlutý, oranžový, červený a anchovy) plus HRM kanál, přenosný počítač, software, příslušenství, 1-roční záruka na součásti, instalace a školení není zahrnuto	9002032
Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM System	Real-time PCR cykler a High Resolution Melting analyzátor s 5 kanály (zelený žlutý, oranžový, červený a anchovy) plus HRM kanál, přenosný počítač, software, příslušenství, 1-roční záruka na součásti, instalace a školení	9002033
<i>ipsogen</i> PML-RARA bcr1 Controls Kit — pro kvalitativní validaci extrakce RNA a reverzní transkripci fúzního genu PML-RARA bcr1		
<i>ipsogen</i> PML-RARA bcr1 Controls Kit	Buněčné linie s negativní, vysokou a nízkou pozitivní expresí fúzního genu PML-RARA bcr1	672091*

*Souprava kontrol *ipsogen* PML-RARA bcr1 Controls Kit, kat. č. 672091, je pouze pro výzkumné účely. Není určena pro použití při diagnostice. Žádné tvrzení nebo ujištění se netýká poskytování informací o diagnóze, prevenci nebo léčbě nemoci.

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

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

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

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

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

Omezená licenční smlouva pro soupravu *ipsogen* PML-RARA bcr1 Kit

Použitím produktu vyjadřuje kupující nebo uživatel tohoto produktu souhlas s následujícími podmínkami:

1. Tento výrobek se může používat výhradně v souladu s protokoly poskytnutými s tímto výrobkem a touto příručkou a pro použití pouze s komponenty dodanými v soupravě. Společnost QIAGEN neposkytuje žádnou licenci svých duševních práv k používání nebo začlenění součástí, které jsou obsaženy v této soupravě, společně s kterýmikoliv součástmi, které nejsou v této soupravě obsaženy, s výjimkou případů popsanych v této příručce a dalších protokolech dostupných na stránkách www.qiagen.com. Některé z těchto doplňujících protokolů byly poskytnuty uživateli výrobků společnosti QIAGEN pro jiné uživatele výrobků QIAGEN. Tyto protokoly nebyly důkladně testovány ani optimalizovány společností QIAGEN. Společnost QIAGEN nezaručuje ani neposkytuje záruku na to, že neporušují práva třetích stran.
2. QIAGEN neposkytuje žádnou jinou záruku než výslovně stanovené licence v tom smyslu, že tato sada a/nebo její použití nenarušuje práva třetích stran.
3. Tato sada a její díly jsou licencovány k jednorázovému použití a nesmí se používat opakovaně, přepracována ani opakovaně prodávat.
4. QIAGEN specificky odmítá jakékoliv další výslovné nebo nepřímé licence s výjimkou těch, které jsou uvedeny výslovně.
5. Kupující a uživatel této sady souhlasí s tím, že neposkytne a nepovolí nikomu jinému provádět žádné kroky, které by mohly vést nebo by usnadnily jakékoliv shora zakázané činnosti. QIAGEN může základy tohoto Omezeného licenčního ujednání prosadit u každého soudu a vyžadovat úhradu všech vyšetřovacích a soudních poplatků, vč. poplatků za advokáta, v rámci jakéhokoli postupu k prosazení tohoto Omezeného licenčního ujednání nebo jakýchkoliv jiných práv duševního vlastnictví vztahujících se na tuto soupravu a/nebo její komponenty.

Pro aktualizovaná licenční ustanovení viz www.qiagen.com.

HB-1358-005 1108718 Nov-2017 © 2013-2017 QIAGEN, všechna práva vyhrazena.

