

Εγχειρίδιο ΚΙΤ *ipsogen*[®] WT1 *ProfileQuant*[®] (ELN*)



Έκδοση 1

IVD

Ποσοτική in vitro διάγνωση

Για χρήση με το σύστημα Rotor-Gene[®] Q, ABI PRISM[®]
7900HT SDS, Applied Biosystems[®] 7500 Real-Time PCR και
τα όργανα LightCycler[®]



REF

676923



QIAGEN GmbH, QIAGEN Strasse 1, 40724 Hilden,
Γερμανία

R2

MAT

1072503EL

ELN LeukemiaNet[®]
European



QIAGEN Τεχνολογίες δειγμάτων και προσδιορισμών

Η QIAGEN ηγείται στο χώρο πρωτοποριακών τεχνολογιών δειγμάτων και προσδιορισμών, παρέχοντας τη δυνατότητα απομόνωσης και ανίχνευσης των περιεχομένων οποιουδήποτε βιολογικού δείγματος. Τα προηγμένα, υψηλής ποιότητας προϊόντα και οι υπηρεσίες μας αποτελούν εγγύηση επιτυχίας - από το δείγμα έως το αποτέλεσμα.

Η QIAGEN θέτει πρότυπα:

- στον καθαρισμό DNA, RNA και πρωτεϊνών
- στους προσδιορισμούς νουκλεϊκών οξέων και πρωτεϊνών
- στην έρευνα microRNA και RNAi
- στην αυτοματοποίηση τεχνολογιών δειγμάτων και προσδιορισμών

Αποστολή μας είναι η διασφάλιση των δικών σας επιτυχιών και επιτευγμάτων. Για περισσότερες πληροφορίες, επισκεφθείτε μας στη διεύθυνση www.qiagen.com

Περιεχόμενα

Προβλεπόμενη χρήση	4
Περίληψη και ερμηνεία	4
Αρχές της διαδικασίας	5
Υλικά που παρέχονται	9
Περιεχόμενα του κιτ	9
Απαιτούμενα υλικά που δεν παρέχονται	10
Προειδοποιήσεις και προφυλάξεις	11
Γενικές προφυλάξεις	11
Φύλαξη και χειρισμός αντιδραστηρίων	12
Διαδικασία	14
Προετοιμασία RNA δείγματος	14
Πρωτόκολλα	
■ Συνιστώμενη τυποποιημένη ανάστροφη μεταγραφή κατά EAC	14
■ qPCR σε όργανα RotorGene Q MDx 5plex HRM ή Rotor Gene Q 5plex HRM με στροφέα 72 σωληναρίων	17
■ qPCR στο ABI PRISM 7900HT SDS, στο σύστημα Applied Biosystems 7500 Real-Time PCR, και στο όργανο LightCycler 480	21
■ qPCR στο όργανο LightCycler 1.2	26
Ερμηνεία των αποτελεσμάτων	30
Αρχή της ανάλυσης δεδομένων	30
Αποτελέσματα	31
Οδηγός αντιμετώπισης προβλημάτων	32
Ποιοτικός έλεγχος	36
Περιορισμοί	36
Χαρακτηριστικά απόδοσης	37
Μη κλινικές μελέτες	37
Κλινικές μελέτες	39
Βιβλιογραφία	42
Σύμβολα	43
Πληροφορίες επικοινωνίας	44
Πληροφορίες παραγγελίας	45

Προβλεπόμενη χρήση

Το kit *ipsogen WT1 Profile Quant* προορίζεται για την ποσοτικοποίηση των μεταγραφημάτων γονιδίου όγκου του Wilm (WT) σε ολικό RNA απομονωμένο από ασθενείς με οξεία μυελογενή λευχαιμία (ΟΜΛ, AML). Τα λαμβανόμενα αποτελέσματα προορίζονται για να βοηθήσουν στην παρακολούθηση της πρώιμης ανταπόκρισης στη θεραπεία και για ελάχιστη υπολειμματική νόσο (MRD).

Περίληψη και ερμηνεία

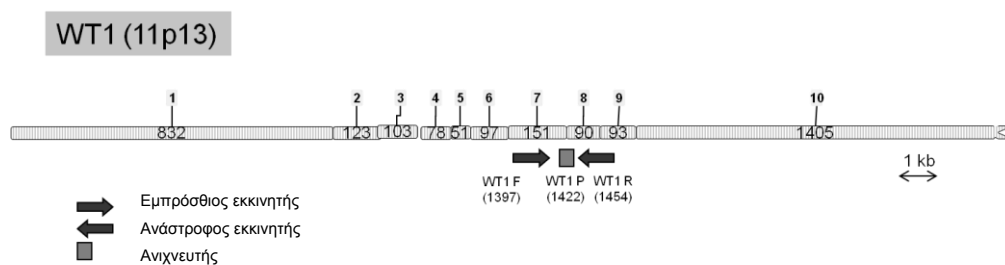
Τα τρέχοντα πρωτόκολλα θεραπείας για την οξεία μυελογενή λευχαιμία (ΟΜΛ, AML) βασίζονται σε προγνωστικούς παράγοντες, οι οποίοι συνεισφέρουν στη διαστρωμάτωση της θεραπείας (1, 2). Οι βασικοί προγνωστικοί παράγοντες που έχουν αναγνωρισθεί μέχρι σήμερα περιλαμβάνουν χαρακτηριστικά προ της θεραπείας, όπως ηλικία και αριθμός λευκών αιμοσφαιρίων (WBC), καθώς και τον καρυότυπο του ασθενούς και την παρουσία ειδικών γονιδιωματικών μεταλλάξεων, όπως FLT3 και NPM1 (3, 4). Η μορφολογική ανταπόκριση στη χημειοθεραπεία εφόδου παρέχει έναν περαιτέρω προγνωστικό παράγοντα, ο οποίος έχει ενσωματωθεί στα τρέχοντα σχήματα διαστρωμάτωσης κινδύνου που χρησιμοποιούνται για τη λήψη εμπειριστατωμένων αποφάσεων όσον αφορά τη θεραπεία σταθεροποίησης, ειδικότερα τα αλλογενή μοσχεύματα (5). Ενώ αυτές οι παράμετροι διακρίνουν τις ομάδες ασθενών σε ευρέως διαφορετικούς κινδύνους υποτροπής, υπάρχει επιτακτική ανάγκη για την τελειοποίηση της διαστρωμάτωσης κινδύνου προκειμένου να αναγνωρίζονται πιο αξιόπιστα εκείνοι οι ασθενείς που είναι περισσότερο (ή λιγότερο) πιθανό να ωφεληθούν από το μόσχευμα. Ένας αριθμός μελετών έχουν επισημάνει τη δυνατότητα της παρακολούθησης MRD μέσω ποσοτικής αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (qPCR) πραγματικού χρόνου να ανιχνεύει ειδικούς για τη λευχαιμία στόχους, δηλ. μεταγραφήματα γονιδίου σύντηξης (FG), όπως PML-RARA, CBFB-MYH11, AML1-ETO (RUNX1-RUNX1T1), ή μεταλλάξεις σε συγκεκριμένα γονίδια, όπως NPM1. Αυτό επιτρέπει την αναγνώριση εκείνων των ασθενών που διατρέχουν τον υψηλότερο κίνδυνο υποτροπής και συνεπώς υποδεικνύει τους υποψηφίους για πρώιμη θεραπευτική παρέμβαση (6).

Περίπου οι μισοί ασθενείς με ΟΜΛ δεν διαθέτουν κατάλληλο, ειδικό για τη λευχαιμία στόχο και υπάρχει σημαντικό ενδιαφέρον στην ανάπτυξη εναλλακτικών προσεγγίσεων που θα μπορούν να επιτρέψουν την εφαρμογή της παρακολούθησης MRD σε ένα πολύ μεγαλύτερο ποσοστό ασθενών. Μία στρατηγική περιλαμβάνει τη χρήση κυτταρομετρίας ροής για την αναγνώριση και παρακολούθηση παρεκκλινόντων φαινοτύπων, αλλά, ενώ αυτή η στρατηγική έχει ευρεία δυνατότητα εφαρμογής, είναι τεχνικά απαιτητική (6). Μια άλλη προσέγγιση περιλαμβάνει τη χρήση qPCR για την ανίχνευση μεταγραφημάτων που υπερεκφράζονται σε μεγάλο βαθμό στις βλάστες της ΟΜΛ σε σχέση με φυσιολογικό αίμα και μυελό, με τη μεγαλύτερη προσοχή να εστιάζεται στο γονίδιο *WT1* (6).

Το γονίδιο *WT1* βρίσκεται στο χρωμόσωμα 11p13, κωδικοποιεί ένα μεταγραφικό παράγοντα μοτίβου «δακτύλων» ψευδαργύρου (zinc-finger) και αναγνωρίστηκε αρχικά για την εμπλοκή του στην παθογένεση του όγκου του Wilm (7). Το γονίδιο *WT1* έχει καταδειχθεί ότι εκφράζεται σε μεγάλο βαθμό σε αρκετούς αιμοποιητικούς όγκους, συμπεριλαμβανομένης της ΟΜΛ (7, 8). Αν και οι μηχανισμοί που οδηγούν στην υπερέκφραση του *WT1* παραμένουν ελάχιστα κατανοητοί, αυτό το φαινόμενο μπορεί να αξιοποιηθεί ως ένας δείκτης που υποδεικνύει την παρουσία, εμμονή ή επανεμφάνιση της λευχαιμικής αιμοποίησης.

Αρχές της διαδικασίας

Η τεχνική qPCR επιτρέπει την ακριβή ποσοτικοποίηση των προϊόντων PCR κατά τη διάρκεια της εκθετικής φάσης της διεργασίας ενίσχυσης PCR. Τα δεδομένα από την qPCR μπορούν να ληφθούν γρήγορα, χωρίς μετεπεξεργασία PCR, μέσω ανίχνευσης σε πραγματικό χρόνο των σημάτων φθορισμού κατά τη διάρκεια ή/και μετά την κυκλοποίηση PCR, μειώνοντας έτσι δραστικά τον κίνδυνο επιμόλυνσης του προϊόντος PCR. Επί του παρόντος, υπάρχουν διαθέσιμοι 3 κύριοι τύποι τεχνικών qPCR: Ανάλυση qPCR που χρησιμοποιεί χρωστική SYBR[®] Green I, ανάλυση qPCR που χρησιμοποιεί ανιχνευτές υδρόλυσης, και ανάλυση qPCR που χρησιμοποιεί ανιχνευτές υβριδισμού.

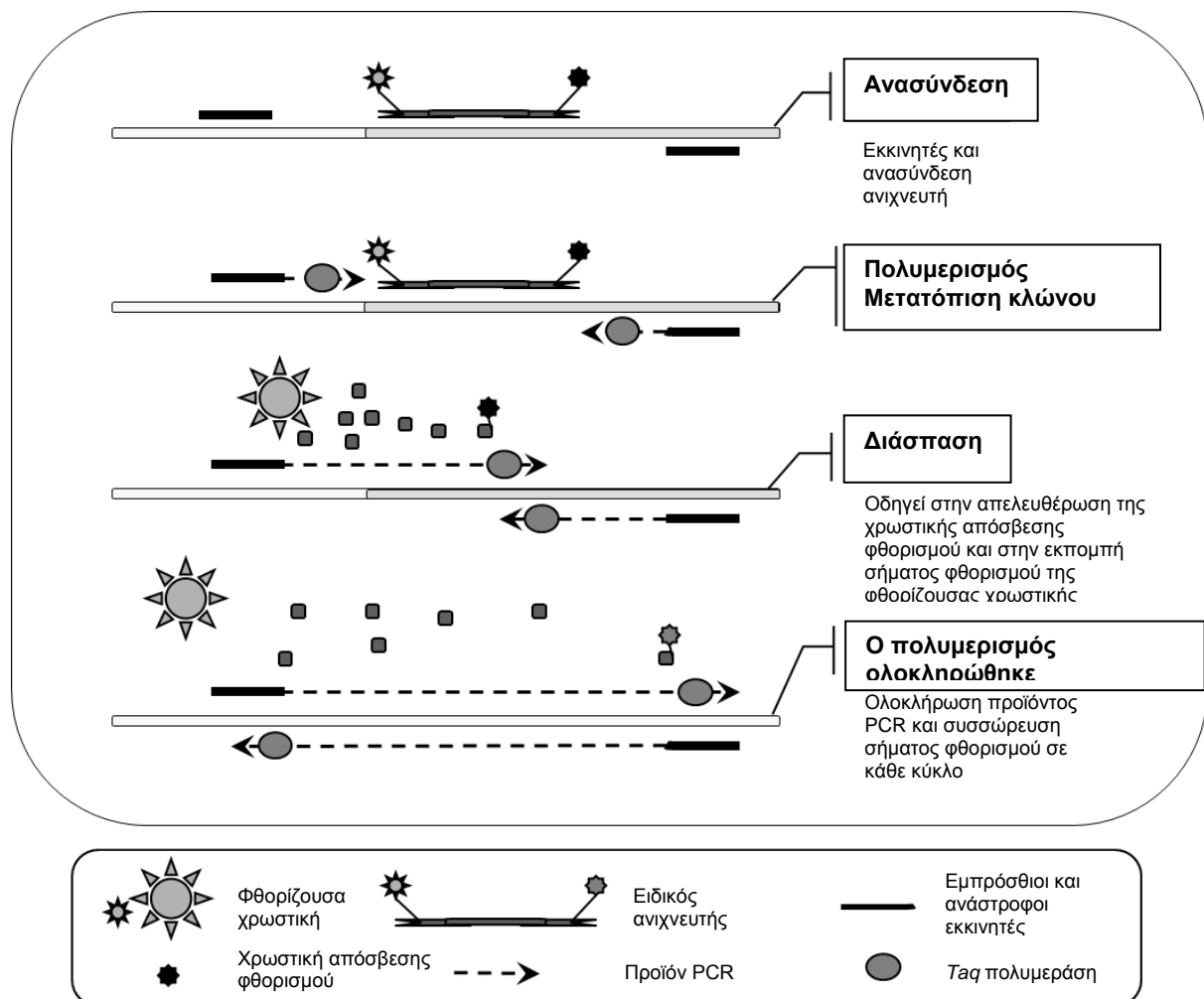


Εικόνα 1. Σχηματικό διάγραμμα του μεταγραφήματος *WT1* που καλύπτεται από τους εκκινητές και σύνολο ανιχνευτών ELN qPCR: *WT1-ELN F-WT1-ELN P-WT1-ELN R*. Ο αριθμός κάτω από τους εκκινητές και τον ανιχνευτή αναφέρεται στη θέση του νουκλεοτιδίου στο μεταγράφημα του φυσιολογικού γονιδίου. Το εξόνιο 5 μπορεί να υποστεί εναλλακτικό μάτισμα.

Αυτός ο προσδιορισμός εκμεταλλεύεται την αρχή της ολιγονουκλεοτιδικής υδρόλυσης διπλής χρωστικής qPCR. Κατά τη διάρκεια της PCR, εμπρόσθιοι ή ανάστροφοι εκκινητές υβριδίζουν σε μια ειδική αλληλουχία. Ένα νουκλεοτίδιο διπλής χρώσης περιέχεται στο ίδιο μείγμα. Αυτός ο ανιχνευτής, ο οποίος αποτελείται από ένα ολιγονουκλεοτίδιο σημασμένο με μια φθορίζουσα χρωστική (reporter) στο 5' άκρο του και μια καθοδική χρωστική απόσβεσης φθορισμού (quencher) στο 3' άκρο του, υβριδίζει σε μια αλληλουχία-στόχο εντός του προϊόντος PCR. Η ανάλυση qPCR με τους ανιχνευτές υδρόλυσης εκμεταλλεύεται τη δραστηριότητα 5'→3' εξονουκλεάσης της DNA πολυμεράσης από *Thermus aquaticus* (*Taq*). Όταν ο ανιχνευτής είναι άθικτος, η εγγύτητα της φθορίζουσας χρωστικής με τη χρωστική απόσβεσης φθορισμού οδηγεί σε καταστολή του φθορισμού της φθορίζουσας χρωστικής κυρίως μέσω μεταφοράς ενέργειας τύπου Förster.

Κατά τη διάρκεια της PCR, εάν ο στόχος ενδιαφέροντος είναι παρών, ο ανιχνευτής ανασυνδέεται ειδικά μεταξύ των θέσεων εμπρόσθιων και ανάστροφων εκκινήτων. Η δραστηριότητα 5'→3' εξονουκλεάσης της DNA πολυμεράσης διασπά τον ανιχνευτή μεταξύ της φθορίζουσας χρωστικής και της χρωστικής απόσβεσης φθορισμού μόνο εάν ο ανιχνευτής υβριδίζει στο στόχο. Τα θραύσματα του ανιχνευτή στη συνέχεια μετατοπίζονται από το στόχο, και ο πολυμερισμός του κλώνου συνεχίζεται. Το 3' άκρο του ανιχνευτή μπλοκάρεται για να αποτραπεί η επέκταση του ανιχνευτή κατά τη διάρκεια της PCR (Εικόνα 2). Αυτή η διεργασία λαμβάνει χώρα σε κάθε κύκλο και δεν παρεμβαίνει στην εκθετική συσσώρευση του προϊόντος.

Η αύξηση του σήματος φθορισμού ανιχνεύεται μόνο εάν η αλληλουχία-στόχος είναι συμπληρωματική στον ανιχνευτή και ως εκ τούτου ενισχύεται κατά τη διάρκεια της PCR. Λόγω αυτών των απαιτήσεων, δεν ανιχνεύεται μη ειδική ενίσχυση. Συνεπώς, η αύξηση του φθορισμού είναι ευθέως ανάλογη με την ενίσχυση του στόχου κατά τη διάρκεια της PCR.

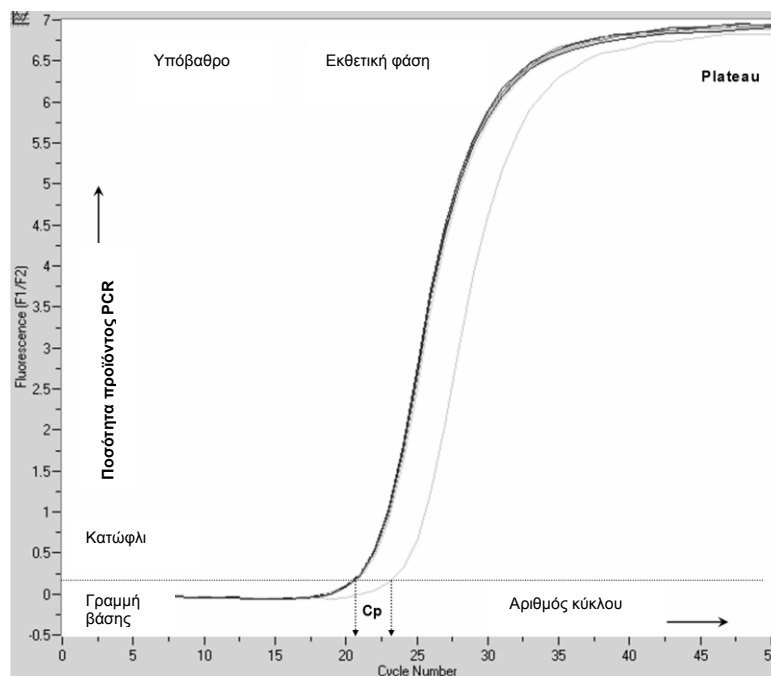


Εικόνα 2. Γενική αρχή της αντίδρασης. Το ολικό RNA μεταγράφεται αντίστροφα και το παραγόμενο cDNA ενισχύεται μέσω της PCR χρησιμοποιώντας ένα ζεύγος ειδικών εκκινήτων και έναν ειδικό εσωτερικό ανιχνευτή διπλής χρώσης (FAM™–TAMRA™). Ο ανιχνευτής συνδέεται στο αμπλικόνιο κατά τη διάρκεια κάθε βήματος ανασύνδεσης της PCR. Όταν η Taq επεκτείνεται από τον εκκινήτη που είναι συνδεδεμένος στο αμπλικόνιο, μετατοπίζει το 5' άκρο του ανιχνευτή, το οποίο στη συνέχεια αποικοδομείται από τη

δραστηριότητα της 5'→3' εξωνουκλεάσης της *Taq* DNA πολυμεράσης. Η διάσπαση συνεχίζεται μέχρι την τήξη του αμπλικονίου από τον υπολειπόμενο ανιχνευτή. Αυτή η διεργασία απελευθερώνει το φθορισμοφόρο και τη χρωστική απόσβεσης φθορισμού, διαχωρίζοντάς τα στο χώρο και οδηγώντας σε μια αύξηση του φθορισμού από το FAM και μια μείωση του φθορισμού από το TAMRA.

Όταν ο φθορισμός παρουσιάζεται γραφικά έναντι του αριθμού κύκλου, η συσσώρευση του προϊόντος PCR φαίνεται στην Εικόνα 3. Αυτή η καμπύλη ενίσχυσης απαρτίζεται διαδοχικά από μια πρώιμη φάση υποβάθρου (κάτω από το όριο ανίχνευσης του οργάνου), μια εκθετική φάση (ή λογαριθμική φάση) και μια σταθεροποιημένη κατάσταση (plateau). Ο ακριβέστερος ποσοτικός προσδιορισμός μπορεί να πραγματοποιηθεί μόνο κατά τη διάρκεια της εκθετικής φάσης. Ο πρώτος κύκλος στον οποίο το όργανο μπορεί να διακρίνει τον παραγόμενο από την ενίσχυση φθορισμό ως πάνω από το σήμα υποβάθρου ονομάζεται κύκλος κατωφλίου (C_T) ή σημείο διέλευσης (C_P). Επιλέγοντας το κατώφλι εντός της λογαριθμικής-γραμμικής φάσης, είναι δυνατός ο υπολογισμός της πραγματικής ποσότητας των αρχικών εναρκτήριων μορίων, δεδομένου ότι η ένταση του φθορισμού είναι ευθέως ανάλογη προς την ποσότητα του προϊόντος PCR στην εκθετική φάση.

Κατά τη διάρκεια της φάσης plateau, δεν παρατηρείται καμία σημαντική αύξηση στην ποσότητα του προϊόντος PCR. Αυτό οφείλεται κυρίως στην εξάντληση των στοιχείων PCR και στην εκ νέου ανασύνδεση των κλώνων του προϊόντος PCR που προκαλείται από την υψηλή συγκέντρωση των τελικών προϊόντων, τα οποία εμποδίζουν την περαιτέρω ανασύνδεση του εκκινήτη.



Εικόνα 3. Λήψη φθορισμού κατά τη διάρκεια κυκλοποίησης και διαδοχικών φάσεων ενίσχυσης.

Η πιο άμεση και ακριβής προσέγγιση για την ανάλυση ποσοτικών δεδομένων είναι η χρήση μια πρότυπης καμπύλης που προετοιμάζεται από μια σειρά αραιώσεων θετικού μάρτυρα γνωστής συγκέντρωσης. Αυτή είναι γνωστή ως

«πρότυπη καμπύλη» ή «απόλυτη» ποσοτικοποίηση. Ακολουθώντας την ενίσχυση της σειράς τυπικών αραιώσεων, η πρότυπη καμπύλη παράγεται σχεδιάζοντας το λογάριθμο του αρχικού αριθμού αντιγράφων του θετικού μάρτυρα έναντι της C_p που παράγεται για κάθε αραιώση. Η σχεδίαση αυτών των σημείων παράγει μια πρότυπη καμπύλη. Η χρήση της εξίσωσης αυτής της πρότυπης καμπύλης επιτρέπει τον προσδιορισμό του αρχικού αριθμού αντιγράφων των δειγμάτων προς ποσοτικοποίηση.

Το kit WT1 ProfileQuant Kit (ELN) περιλαμβάνει ειδικά πλασμίδια και εκκινητές και μείγματα ανιχνευτών για WT1 και ABL. Αυτά τα στοιχεία έχουν επικυρωθεί από κοινού στα πλαίσια μιας συλλογικής μελέτης με επικεφαλής μια ομάδα εμπειρογνομόνων από την κοινοπραξία Ευρωπαϊκό Δίκτυο για τη Λευχαιμία (European Leukemia Net). Ο προσδιορισμός που δημοσιεύθηκε προηγουμένως από τους Van Dijk και συνεργάτες είχε καλύτερες επιδόσεις από τους άλλους προσδιορισμούς και είναι λιγότερο επιρρεπής σε μεταλλάξεις στην OMA λόγω της διαμόρφωσής του (9). Συνεπώς, επιλέχθηκε ως ο προσδιορισμός ELN WT1. Το kit *ipsogen* WT1 ProfileQuant βασίζεται σε αυτήν την τεχνική. Σε αυτό το kit, ένας ενδογενής μάρτυρας (μεταγράφημα ABL) ενισχύεται από το δείγμα καθώς και το μεταγράφημα WT1. Παρέχονται πρότυπες διαδοχικές αραιώσεις του cDNA μάρτυρα και WT1 και οι παραγόμενες πρότυπες καμπύλες επιτρέπουν τον ακριβή υπολογισμό του αριθμού αντιγράφων των μεταγραφημάτων WT1 και του ABL σε κάθε δείγμα.

Υλικά που παρέχονται

Περιεχόμενα του ΚΙΤ

<i>ipsogen</i> WT1 ProfileQuant Kit		(24)
Αρ. καταλόγου		676923
Αριθμός αντιδράσεων		24
ABL Control Gene Standard Dilution (τυπική αραίωση γονιδίου-μάρτυρα ABL) (10^3 αντίγραφα/5 μ l)	C1-ABL	50 μ l
ABL Control Gene Standard Dilution (τυπική αραίωση γονιδίου-μάρτυρα ABL) (10^4 αντίγραφα/5 μ l)	C2-ABL	50 μ l
ABL Control Gene Standard Dilution (τυπική αραίωση γονιδίου-μάρτυρα ABL) (10^5 αντίγραφα/5 μ l)	C3-ABL	50 μ l
WT1 Profile Gene Standard Dilution (τυπική αραίωση γονιδίου προφίλ WT1) (10^1 αντίγραφα/5 μ l)	P1-WT1	50 μ l
WT1 Profile Gene Standard Dilution (τυπική αραίωση γονιδίου προφίλ WT1) (10^2 αντίγραφα/5 μ l)	P2-WT1	50 μ l
WT1 Profile Gene Standard Dilution (τυπική αραίωση γονιδίου προφίλ WT1) (10^3 αντίγραφα/5 μ l)	P3-WT1	50 μ l
WT1 Profile Gene Standard Dilution (τυπική αραίωση γονιδίου προφίλ WT1) (10^5 αντίγραφα/5 μ l)	P4-WT1	50 μ l
WT1 Profile Gene Standard Dilution (τυπική αραίωση γονιδίου προφίλ WT1) (10^6 αντίγραφα/5 μ l)	P5-WT1	50 μ l
Primers and Probe Mix ABL (εκκινητές και μείγμα ανιχνευτών ABL)*	PPC-ABL 25x	90 μ l
Primers and Probe Mix PPP-WT1 (εκκινητές και μείγμα ανιχνευτών PPP-WT1) (ELN) [†]	PPP- WT1 (ELN) 25x	110 μ l
<i>ipsogen</i> WT1 ProfileQuant Kit Handbook (αγγλικά)		1

*Μείγμα ειδικών ανάστροφων και εμπρόσθιων εκκινητών για το γονίδιο-μάρτυρα ABL (CG) συν ειδικός ανιχνευτής FAM-TAMRA.

[†] Μείγμα ειδικών ανάστροφων και εμπρόσθιων εκκινητών για το γονίδιο WT1 (εξόνιο 1-2) συν ειδικός ανιχνευτής FAM-TAMRA.

Σημείωση: Φυγοκεντρίστε σύντομα τα πρότυπα αραιωμένα διαλύματα και τους εκκινητές και τα μείγματα ανιχνευτών πριν τη χρήση.

Απαιτούμενα υλικά που δεν παρέχονται

Όταν εργάζεστε με χημικά θα πρέπει πάντοτε να φοράτε προστατευτική ποδιά εργαστηρίου, γάντια μίας χρήσης και προστατευτικά γυαλιά. Για περισσότερες πληροφορίες, ανατρέξτε στα σχετικά δελτία δεδομένων ασφάλειας (SDS), τα οποία και είναι διαθέσιμα από τον προμηθευτή του προϊόντος.

Αντιδραστήρια

- Νερό κατηγορίας εφαρμογών PCR χωρίς νουκλεάση
- Αντιδραστήρια για ανάστροφη μεταγραφή: Το επικυρωμένο αντιδραστήριο είναι ανάστροφη μεταγραφάση Superscript® II (ή Superscript), περιλαμβάνει 5x ρυθμιστικό διάλυμα πρώτου κλώνου, 100 mM DTT (Life Technologies, αριθμός καταλόγου 18064-022)
- Αναστολέας RNασών: Το επικυρωμένο αντιδραστήριο είναι RNaseOUT™ (Life Technologies, αρ. καταλόγου 10777-019)
- Σετ dNTP, κατηγορίας εφαρμογών PCR
- Τυχαίο εξαμερές
- MgCl₂
- Ρυθμιστικό διάλυμα και Taq DNA πολυμεράση: Τα επικυρωμένα αντιδραστήρια είναι TaqMan® Universal PCR Master Mix (κύριο μείγμα PCR 2x) (Life Technologies, αρ. καταλόγου 4304437) και LightCycler TaqMan Master (κύριο μείγμα PCR 5x) (Roche, αρ. καταλόγου 04535286001)

Αναλώσιμα

- Ανθεκτικά στα αερολύματα αποστειρωμένα ρύγχη πιπέτας PCR χωρίς νουκλεάση με υδρόφοβα φίλτρα
- Σωληνάρια PCR χωρίς RNάση και DNάση 0,5 ml ή 0,2 ml
- Πάγος

Εξοπλισμός

- Πιπέτα μικρολίτρων αποκλειστική για PCR (1–10 μl, 10–100 μl, 100–1.000 μl)
- Φυγόκεντρος πάγκου με στροφέα για σωληνάρια αντίδρασης 0,2 ml/0.5 ml και μέγιστη ταχύτητα 13.000-14.000 rpm
- Όργανο PCR πραγματικού χρόνου: Rotor-Gene Q 5plex HRM® ή άλλο όργανο Rotor-Gene; LightCycler 1.2, 2.0 ή 480; ή ABI PRISM 7900HT

SDS; Applied Biosystems 7500 Real-Time PCR System; και σχετικό ειδικό υλικό

- Θερμικός κυκλοποιητής ή λουτρό νερού (βήμα ανάστροφης μεταγραφής)

Σημείωση: Βεβαιωθείτε πως ο θερμικός κυκλοποιητής ή το λουτρό νερού έχουν ελεγχθεί και βαθμονομηθεί σύμφωνα με τις συστάσεις του κατασκευαστή.

Προειδοποιήσεις και προφυλάξεις

Για διαγνωστική χρήση in vitro

Όταν εργάζεστε με χημικά θα πρέπει πάντοτε να φοράτε προστατευτική ποδιά εργαστηρίου, γάντια μίας χρήσης και προστατευτικά γυαλιά. Για περισσότερες πληροφορίες παρακαλείστε να ανατρέξετε στα σχετικά δελτία δεδομένων ασφάλειας (SDS). Αυτά τα δελτία είναι διαθέσιμα online σε εύχρηστη μορφή PDF στη διεύθυνση www.qiagen.com/safety όπου και μπορείτε να βρείτε, να προβάλλετε και να εκτυπώσετε τα δελτία SDS για κάθε kit και συστατικό των kit της QIAGEN.

Απορρίψτε τα απόβλητα δειγμάτων και προσδιορισμών σύμφωνα με τις εκάστοτε τοπικές διατάξεις ασφαλείας.

Γενικές προφυλάξεις

Η χρήση δοκιμασιών qPCR απαιτεί καλές εργαστηριακές πρακτικές, συμπεριλαμβανομένης της συντήρησης του εξοπλισμού, οι οποίες είναι αποκλειστικές για τη μοριακή βιολογία, και πρέπει να συμμορφώνεται με τους ισχύοντες κανονισμούς και τα σχετικά πρότυπα.

Αυτό το kit προορίζεται για in vitro διαγνωστική χρήση. Τα αντιδραστήρια και οι οδηγίες που παρέχονται σε αυτό το kit έχουν επικυρωθεί για βέλτιστη απόδοση. Η περαιτέρω αραίωση των αντιδραστηρίων ή η αλλαγή των χρόνων και θερμοκρασιών επώασης ενδέχεται να οδηγήσει σε εσφαλμένα ή ασύμβατα δεδομένα. Τα αντιδραστήρια PPC-ABL και PPP-WT1 μπορεί να αλλοιωθούν εάν εκτεθούν στο φως. Όλα τα αντιδραστήρια είναι μορφοποιημένα ειδικά για χρήση με αυτήν τη δοκιμασία. Για βέλτιστη απόδοση της δοκιμασίας, δεν επιτρέπεται να γίνουν υποκαταστάσεις.

Ο προσδιορισμός των επιπέδων μεταγραφημάτων με χρήση qPCR απαιτεί τόσο την ανάστροφη μεταγραφή του mRNA όσο και την ενίσχυση του παραγόμενου cDNA μέσω PCR. Συνεπώς, ολόκληρη η διαδικασία του προσδιορισμού πρέπει να εκτελείται υπό συνθήκες ελεύθερες από RNάση/DNάση.

Απαιτείται ιδιαίτερη προσοχή ώστε να αποφευχθεί:

- Επιμόλυνση RNάσης/DNάσης, η οποία θα μπορούσε να προκαλέσει αποικοδόμηση της μήτρας mRNA και του παραγόμενου cDNA
- Επιμόλυνση από μεταφορά mRNA ή PCR με αποτέλεσμα ψευδές θετικό σήμα

Συνεπώς, συνιστούμε τα ακόλουθα.

- Χρησιμοποιείτε εργαστηριακό εξοπλισμό (π.χ. πιπέτες, ρύγχη πιπέτας, φιαλίδια αντίδρασης) ελεύθερο νουκλεάσης και φοράτε γάντια όταν εκτελείτε τον προσδιορισμό.
- Χρησιμοποιείτε νέα ανθεκτικά στα αερολύματα ρύγχη πιπετών για όλα τα βήματα διανομής με πιπέτα προκειμένου να αποφύγετε τη διασταυρούμενη μόλυνση των δειγμάτων και των αντιδραστηρίων.
- Παρασκευάζετε το κύριο προ-μείγμα PCR με αποκλειστικά για το σκοπό αυτό υλικά (πιπέτες, ρύγχη κτλ.) σε αποκλειστικό χώρο όπου δεν έχουν εισαχθεί μήτρες DNA (cDNA, DNA, πλασμίδιο). Προσθέτετε τη μήτρα σε ξεχωριστή ζώνη (κατά προτίμηση σε ξεχωριστό δωμάτιο) με ειδικά υλικά (πιπέτες, ρύγχη κτλ.).
- Χειρίζεστε τα πρότυπα αραιωμένα διαλύματα (C1–3 και P1–5) σε ξεχωριστό δωμάτιο.

Φύλαξη και χειρισμός αντιδραστηρίων

Τα kit αποστέλλονται σε ξηρό πάγο και πρέπει να φυλάσσονται σε θερμοκρασία -30°C έως -15°C κατά την παραλαβή.

- Ελαχιστοποιήστε την έκθεση των εκκινητών και μειγμάτων ανιχνευτών στο φως (σωληνάρια PPC και PPP).
- Αναμείξτε απαλά και φυγοκεντρίστε τα σωληνάρια πριν το άνοιγμα.
- Φυλάσσετε όλα τα συστατικά του kit στους αρχικούς περιέκτες.

Αυτές οι συνθήκες φύλαξης ισχύουν τόσο για τα ανοιγμένα όσο και τα μη ανοιγμένα συστατικά. Συστατικά που φυλάσσονται σε συνθήκες διαφορετικές από εκείνες που αναφέρονται στις ετικέτες ενδέχεται να μην έχουν σωστή απόδοση και να επηρεάσουν αρνητικά τα αποτελέσματα του προσδιορισμού.

Οι ημερομηνίες λήξης για κάθε αντιδραστήριο υποδεικνύονται στις ετικέτες των επιμέρους συστατικών. Σε σωστές συνθήκες φύλαξης, το προϊόν θα διατηρήσει την απόδοσή του μέχρι την ημερομηνία λήξης που είναι τυπωμένη στην ετικέτα.

Δεν υπάρχουν εμφανή σημάδια που να υποδεικνύουν τυχόν αστάθεια αυτού του προϊόντος. Εντούτοις, θετικοί και αρνητικοί μάρτυρες πρέπει να εκτελούνται ταυτόχρονα με άγνωστα δείγματα.

Διαδικασία

Προετοιμασία RNA δείγματος

Η προετοιμασία RNA από δείγματα ασθενούς (αίμα ή μυελός των οστών) πρέπει να έχει διενεργηθεί με χρήση επικυρωμένης διαδικασίας. Η ποιότητα του προσδιορισμού εξαρτάται σε μεγάλο βαθμό από την ποιότητα του RNA εισόδου. Συνεπώς συνιστούμε την επικύρωση του κεκαθαρμένου RNA μέσω ηλεκτροφόρησης σε πήκτωμα αγαρόζης* ή χρησιμοποιώντας το βιοαναλυτή Agilent® Bioanalyzer® πριν από την ανάλυση.

Πρωτόκολλο: Συνιστώμενη τυποποιημένη ανάστροφη μεταγραφή κατά EAC

Απαραίτητες ενέργειες πριν από την έναρξη

- Προετοιμάστε dNTP, 10 mM έκαστο. Φυλάξτε στους -20°C σε κλάσματα.
- Προετοιμάστε τυχαίο εξαμερές, 50 mM. Φυλάξτε στους -20°C σε κλάσματα.
- Προετοιμάστε MgCl_2 , 50 mM. Φυλάξτε στους -20°C σε κλάσματα.

Διαδικασία

1. Αποψύξτε όλα τα απαραίτητα συστατικά και τοποθετήστε τα σε πάγο.
2. Επωάστε 1 μg RNA (1–4 μl) για 10 λεπτά στους 70°C και ψύξτε αμέσως σε πάγο για 5 λεπτά.
3. Φυγοκεντρίστε σύντομα (περίπου 10 δευτερόλεπτα, 10.000 rpm) για να συλλέξετε το υγρό στο κάτω μέρος του σωληναρίου. Στη συνέχεια διατηρήστε σε πάγο.
4. Προετοιμάστε το ακόλουθο μείγμα RT σύμφωνα με τον αριθμό των δειγμάτων υπό επεξεργασία (Πίνακας 1).

* Όταν εργάζεστε με χημικά θα πρέπει πάντοτε να φοράτε προστατευτική ποδιά εργαστηρίου, γάντια μίας χρήσης και προστατευτικά γυαλιά.

Πίνακας 1. Προετοιμασία του μείγματος RT

Συστατικό	Όγκος ανά δείγμα (μl)	Τελική συγκέντρωση
Ρυθμιστικό διάλυμα πρώτου κλώνου (παρέχεται με την ανάστροφη μεταγραφάση Superscript II), 5x	4,0	1x
MgCl ₂ (50 mM)	2,0	5 mM
dNTP (10 mM έκαστο, να προετοιμάζεται προηγουμένως και να φυλάσσεται στους –20°C σε κλάσματα)	2,0	1 mM
DTT (100 mM, παρέχεται με την ανάστροφη μεταγραφάση Superscript II)	2,0	10 mM
Αναστολέας RNασών (40 U/μl)	0,5	1 U/μl
Τυχαίο εξαμερές (100 μM)	5,0	25 μM
Superscript II (200 U/μl)	0,5	5 U/μl
Θερμασμένο δείγμα RNA (για προσθήκη στο βήμα 5)	1,0–4,0	50 ng/μl
Νερό κατηγορίας εφαρμογών PCR χωρίς νουκλεάση (για προσθήκη στο βήμα 5)	0,0–3,0	–
Τελικός όγκος	20.0	–

5. Διανείμετε με πιπέτα 16 μl του μείγματος RT σε κάθε σωληνάριο PCR. Στη συνέχεια προσθέστε 1–4 μl (1 μg) RNA (από το βήμα 3), και προσαρμόστε τον όγκο σε 20 μl με νερό κατηγορίας εφαρμογών PCR χωρίς νουκλεάση (βλ. Πίνακα 2).

Πίνακας 2. Προετοιμασία της αντίδρασης ανάστροφης μεταγραφής

Συστατικό	Όγκος (μl)
Μείγμα RT	16,0
Θερμασμένο RNA δείγματος (1 μg)	1.0–4.0
Νερό κατηγορίας εφαρμογών PCR χωρίς νουκλεάση	0,0–3,0
Τελικός όγκος	20.0

6. Αναμείξτε καλά και φυγοκεντρίστε σύντομα (περίπου 10 δευτερόλεπτα, 10.000 rpm) για να συλλέξετε το υγρό στο κάτω μέρος του σωληναρίου.
7. Επωάστε στους 20°C για 10 λεπτά.
8. Επωάστε στους 42°C σε θερμικό κυκλοποιητή για 45 λεπτά, κατόπιν αμέσως στους 99°C για 3 λεπτά.
9. Ψύξτε σε πάγο (για να διακόψετε την αντίδραση) για 5 λεπτά.
10. Φυγοκεντρίστε σύντομα (περίπου 10 δευτερόλεπτα, 10.000 rpm) για να συλλέξετε το υγρό στο κάτω μέρος του σωληναρίου. Στη συνέχεια διατηρήστε σε πάγο.
11. Αραιώστε το τελικό cDNA με 30 μl νερό κατηγορίας εφαρμογών PCR χωρίς νουκλεάση έτσι ώστε ο τελικός όγκος να είναι 50 μl.
12. Διενεργήστε PCR σύμφωνα με τα ακόλουθα πρωτόκολλα, σύμφωνα με το όργανο qPCR που διαθέτετε.

Σημείωση: Αυτό το πρωτόκολλο ανάστροφης μεταγραφής προέρχεται από τις μελέτες «Europe Against Cancer» (Η Ευρώπη κατά του καρκίνου, EAC) (10, 11).

Πρωτόκολλο: qPCR σε όργανα RotorGene Q MDx 5plex HRM ή Rotor Gene Q 5plex HRM με στροφέα 72 σωληναρίων

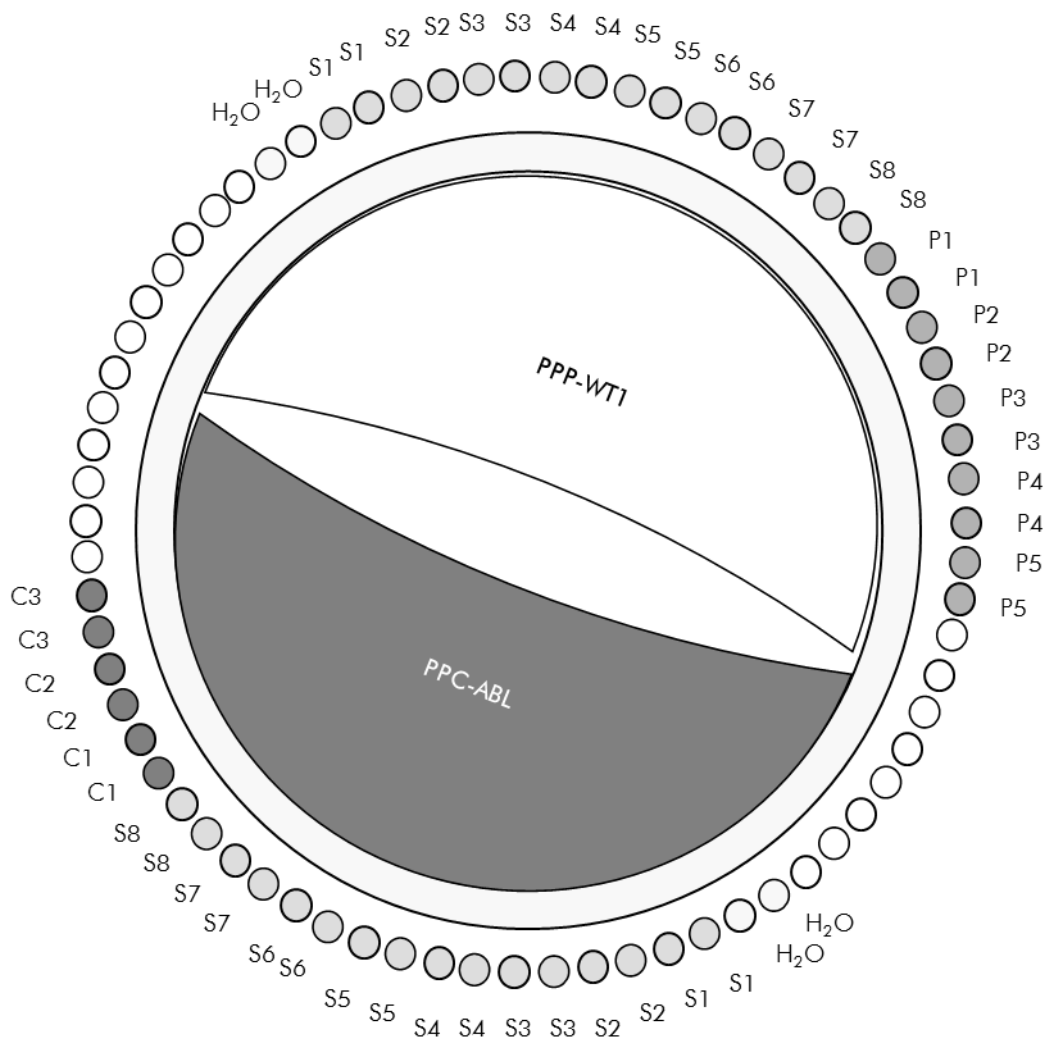
Κατά τη χρήση αυτού του οργάνου, συνιστούμε την εκτέλεση όλων των μετρήσεων εις διπλούν, όπως υποδεικνύεται στον Πίνακα 3.

Πίνακας 3. Αριθμός αντιδράσεων για όργανα Rotor-Gene Q με στροφέα 72 σωληναρίων

Δείγματα	Αντιδράσεις
Με τους εκκινητές και το μείγμα ανιχνευτών ABL (PPC-ABL)	
n δείγματα cDNA	n x 2 αντιδράσεις
Πρότυπο ABL	2 x 3 αντιδράσεις (3 αραιώσεις, έναστο εξεταζόμενο εις διπλούν)
Μάρτυρας νερού	2 αντιδράσεις
Με τους εκκινητές και το μείγμα ανιχνευτών WT1 (PPP-WT1)	
n δείγματα cDNA	n x 2 αντιδράσεις
Πρότυπο WT1	2 x 5 αντιδράσεις (5 αραιώσεις, έναστο εξεταζόμενο εις διπλούν)
Μάρτυρας νερού	2 αντιδράσεις

Επεξεργασία δειγμάτων σε όργανα Rotor-Gene Q με στροφέα 72 σωληναρίων

Συνιστούμε την εξέταση 8 δειγμάτων cDNA στο ίδιο πείραμα για τη βελτιστοποίηση της χρήσης των προτύπων και των εκκινητών και μειγμάτων ανιχνευτών.



Εικόνα 4. Προτεινόμενη προετοιμασία στροφέα για κάθε πείραμα με το κιτ *ipsogen* WT1 ProfileQuant. P1–5: πρότυπα WT1, C1–3: πρότυπα ABL, S: δείγμα cDNA, H₂O: μάρτυρας νερού.

Σημείωση: Φροντίστε έτσι ώστε να τοποθετείτε πάντοτε ένα δείγμα προς εξέταση στη θέση 1 του στροφέα. Διαφορετικά, κατά τη διάρκεια του βήματος βαθμονόμησης, το όργανο δεν θα εκτελέσει τη βαθμονόμηση, και θα ληφθούν εσφαλμένα δεδομένα φθορισμού.

Γεμίστε όλες τις άλλες θέσεις με κενά σωληνάρια.

qPCR σε όργανα Rotor-Gene Q με στροφέα 72 σωληναρίων

Σημείωση: Εκτελέστε όλα βήματα σε πάγο.

Διαδικασία

1. Αποφύξτε όλα τα απαραίτητα συστατικά και τοποθετήστε τα σε πάγο.
2. Προετοιμάστε το ακόλουθο μείγμα qPCR σύμφωνα με τον αριθμό των δειγμάτων υπό επεξεργασία.

Όλες οι συγκεντρώσεις αφορούν τον τελικό όγκο της αντίδρασης.

Ο Πίνακας 4 περιγράφει το σχήμα διανομής με πιπέτα για την προετοιμασία ενός μείγματος αντιδραστηρίων, υπολογισμένο για την επίτευξη τελικού όγκου αντίδρασης 25 μl. Μπορεί να προετοιμαστεί ένα προ-μείγμα, σύμφωνα με τον αριθμό των αντιδράσεων, χρησιμοποιώντας τους ίδιους εκκινητές και μείγμα ανιχνευτών (είτε PPC-ABL είτε PPP-WT1). Συμπεριλαμβάνονται επιπλέον όγκοι για αντιστάθμιση σφάλματος διανομής με πιπέτα.

Πίνακας 4. Προετοιμασία του μείγματος qPCR

Συστατικό	1 αντίδραση (μl)	ABL: 24 + 1 αντιδράσεις (μl)	WT1: 28 + 1 αντιδράσεις (μl)	Τελική συγκέντρωση
Κύριο μείγμα TaqMan Universal PCR, 2x	12,5	312,5	362,5	1x
Εκκινητές και μείγμα ανιχνευτών, 25x	1,0	25,0	29,0	1x
Νερό κατηγορίας εφαρμογών PCR χωρίς νουκλεάση	6,5	162,5	188,5	–
Δείγμα (για προσθήκη στο βήμα 4)	5,0	5 έκαστο	5 έκαστο	–
Συνολικός όγκος	25,0	25 έκαστο	25 έκαστο	–

3. Χορηγήστε 20 μl από το προ-μείγμα qPCR ανά σωληνάριο.
4. Προσθέστε 5 μl προϊόντος RT (cDNA, 100 ng RNA ισοδύναμο) που ελήφθη στην ανάστροφη μεταγραφή (βλ. «Πρωτόκολλο: Συνιστώμενη τυποποιημένη ανάστροφη μεταγραφή κατά EAC», σελίδα 14) στο αντίστοιχο σωληνάριο (συνολικός όγκος 25 μl).

5. Αναμείξτε απαλά, με επαναλαμβανόμενη αναρρόφηση/εξώθηση με πιπέτα.
6. Τοποθετήστε τα σωληνάρια στο θερμικό κυκλοποιητή σύμφωνα με τις συστάσεις του κατασκευαστή.
7. Προγραμματίστε το όργανο Rotor-Gene Q με το πρόγραμμα θερμικής κυκλοποίησης, όπως υποδεικνύεται στον Πίνακα 5.

Πίνακας 5. Προφίλ θερμοκρασίας

Λειτουργία ανάλυσης	Ποσοτικοποίηση
Διατήρηση	Θερμοκρασία: 50 βαθμοί Χρόνος: 2 λεπτά
Διατήρηση 2	Θερμοκρασία: 95 βαθμοί Χρόνος: 10 λεπτά
Κυκλοποίηση	50 φορές 95 βαθμοί για 15 δευτερόλεπτα 60°C για 1 λεπτό με λήψη φθορισμού FAM στο κανάλι Green: Μονό

8. Για όργανα Rotor-Gene Q, επιλέξτε «Slope Correct» (διόρθωση κλίσης) για την ανάλυση. Συνιστούμε τη ρύθμιση του κατωφλίου στο 0,03. Ξεκινήστε το πρόγραμμα θερμικής κυκλοποίησης, όπως υποδεικνύεται στον Πίνακα 5.

Πρωτόκολλο: qPCR στο ABI PRISM 7900HT SDS, στο σύστημα Applied Biosystems 7500 Real-Time PCR, και στο όργανο LightCycler 480

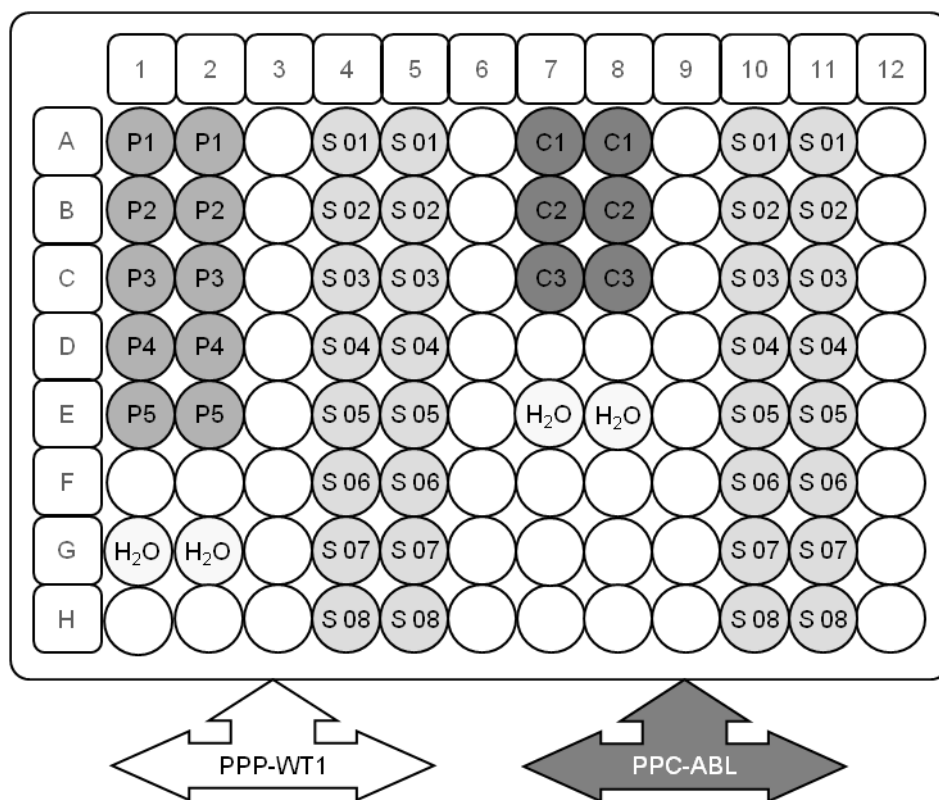
Κατά τη χρήση εξοπλισμού qPCR πλακιδίων 96 φρεατίων, συνιστούμε την εκτέλεση όλων των μετρήσεων εις διπλούν, όπως υποδεικνύεται στον Πίνακα 6.

Πίνακας 6. Αριθμός αντιδράσεων με χρήση εξοπλισμού qPCR πλακιδίων 96 φρεατίων

Δείγματα	Αντιδράσεις
Με τους εκκινητές και το μείγμα ανιχνευτών ABL (PPC-ABL)	
n δείγματα cDNA	n x 2 αντιδράσεις
Πρότυπο ABL	2 x 3 αντιδράσεις (3 αραιώσεις, έναστο εξεταζόμενο εις διπλούν)
Μάρτυρας νερού	2 αντιδράσεις
Με τους εκκινητές και το μείγμα ανιχνευτών WT1 (PPP-WT1)	
n δείγματα cDNA	n x 2 αντιδράσεις
Πρότυπο WT1	2 x 5 αντιδράσεις (5 αραιώσεις, έναστο εξεταζόμενο εις διπλούν)
Μάρτυρας νερού	2 αντιδράσεις

Επεξεργασία δειγμάτων στο ABI PRISM 7900HT SDS, στο σύστημα Applied Biosystems 7500 Real-Time PCR, και στα όργανα LightCycler 480

Συνιστούμε την εξέταση τουλάχιστον 8 δειγμάτων cDNA στο ίδιο πείραμα για τη βελτιστοποίηση της χρήσης των προτύπων και των εκκινητών και μειγμάτων ανιχνευτών. Η διάταξη πλακιδίων στην Εικόνα 5 δείχνει ένα παράδειγμα τέτοιου πειράματος.



Εικόνα 5. Προτεινόμενη προετοιμασία πλακιδίων για ένα πείραμα. **S:** δείγμα cDNA, **P1–5:** πρότυπα WT1, **C1–3:** πρότυπα ABL, **H₂O:** μάρτυρας νερού.

qPCR στο ABI PRISM 7900HT SDS, στο σύστημα Applied Biosystems 7500 Real-Time PCR, και στα όργανα LightCycler 480

Σημείωση: Εκτελέστε όλα βήματα σε πάγο.

Διαδικασία

1. Αποψύξτε όλα τα απαραίτητα συστατικά και τοποθετήστε τα σε πάγο.
2. Προετοιμάστε το ακόλουθο μείγμα qPCR σύμφωνα με τον αριθμό των δειγμάτων υπό επεξεργασία.

Όλες οι συγκεντρώσεις αφορούν τον τελικό όγκο της αντίδρασης.

Ο Πίνακας 7 περιγράφει το σχήμα διανομής με πιπέτα για την προετοιμασία ενός μείγματος αντιδραστηρίων, υπολογισμένο για την επίτευξη τελικού όγκου αντίδρασης 25 μl. Μπορεί να προετοιμαστεί ένα προ-μείγμα, σύμφωνα με τον αριθμό των αντιδράσεων, χρησιμοποιώντας τους ίδιους εκκινητές και μείγμα ανιχνευτών (είτε PPC-ABL είτε PPP-WT1). Συμπεριλαμβάνονται επιπλέον όγκοι για αντιστάθμιση σφάλματος διανομής με πιπέτα.

Πίνακας 7. Προετοιμασία του μείγματος qPCR

Συστατικό	1 αντίδραση (μl)	ABL: 24 + 1 αντιδράσεις (μl)	WT1: 28 + 1 αντιδράσεις (μl)	Τελική συγκέντρωση
Κύριο μείγμα TaqMan Universal PCR, 2x	12,5	312,5	362,5	1x
Εκκινητές και μείγμα ανιχνευτών, 25x	1,0	25,0	29,0	1x
Νερό κατηγορίας εφαρμογών PCR χωρίς νουκλεάση	6,5	162,5	188,5	–
Δείγμα (για προσθήκη στο βήμα 4)	5,0	5 έκαστο	5 έκαστο	–
Συνολικός όγκος	25,0	25 έκαστο	25 έκαστο	–

3. Χορηγήστε 20 μl από το προ-μείγμα qPCR ανά φρεάτιο.
4. Προσθέστε 5 μl προϊόντος RT (cDNA, 100 ng RNA ισοδύναμο) που ελήφθη στην ανάστροφη μεταγραφή (βλ. «Πρωτόκολλο: Συνιστώμενη τυποποιημένη ανάστροφη μεταγραφή κατά EAC», σελίδα 14) στο αντίστοιχο φρεάτιο (συνολικός όγκος 25 μl).
5. Αναμείξτε απαλά, με επαναλαμβανόμενη αναρρόφηση/εξώθηση με πιπέτα.
6. Κλείστε το πλακίδιο και φυγοκεντρίστε σύντομα (300 x g, περίπου 10 δευτερόλεπτα).
7. Τοποθετήστε το πλακίδιο στο θερμικό κυκλοποιητή σύμφωνα με τις συστάσεις του κατασκευαστή. Προγραμματίστε τον θερμικό κυκλοποιητή με το πρόγραμμα θερμικής κυκλοποίησης όπως υποδεικνύεται στον Πίνακα 8 για το ABI PRISM 7900HT SDS ή το σύστημα Applied Biosystems 7500 Real-Time PCR, ή στον Πίνακα 9 για το όργανο LightCycler 480.

Πίνακας 8. Προφίλ θερμοκρασίας για το ABI PRISM 7900HT SDS ή το σύστημα Applied Biosystems 7500 Real-Time PCR System

Λειτουργία ανάλυσης	Πρότυπη καμπύλη — Απόλυτη ποσοτικοποίηση
Διατήρηση	Θερμοκρασία: 50°C Χρόνος: 2 λεπτά
Διατήρηση 2	Θερμοκρασία: 95°C Χρόνος: 10 λεπτά
Κυκλοποίηση	50 φορές 95°C για 15 δευτερόλεπτα 60°C για 1 λεπτό με λήψη φθορισμού FAM, χρωστική απόσβεσης φθορισμού: TAMRA

Πίνακας 9. Προφίλ θερμοκρασίας για το όργανο LightCycler 480

Λειτουργία ανάλυσης	Απόλυτη ποσοτικοποίηση («Abs Quant»)
Μορφές ανίχνευσης	Επιλέξτε «Simple Probe» (απλός ανιχνευτής) στο παράθυρο Detection formats (μορφές ανίχνευσης)
Διατήρηση	Θερμοκρασία: 50°C Χρόνος: 2 λεπτά
Διατήρηση 2	Θερμοκρασία: 95°C Χρόνος: 10 λεπτά
Κυκλοποίηση	50 φορές 95°C για 15 δευτερόλεπτα 60°C για 1 λεπτό με λήψη φθορισμού FAM που αντιστοιχεί σε (483–533 nm) για LC έκδοση 01 και (465–510 nm) για LC έκδοση 02

8. Για το ABI PRISM 7900HT SDS και το σύστημα Applied Biosystems 7500 Real-Time PCR, ακολουθήστε το βήμα 8α. Για το όργανο LightCycler 480, ακολουθήστε το βήμα 8β.

8α. ABI PRISM 7900HT SDS και σύστημα Applied Biosystems 7500 Real-Time PCR: Συνιστούμε ένα κατώφλι ρυθμισμένο στο 0,1 όπως περιγράφεται στο πρωτόκολλο EAC στο βήμα ανάλυσης και γραμμή

- βάσης ρυθμισμένη μεταξύ των κύκλων 3 και 15. Ξεκινήστε το πρόγραμμα κυκλοποίησης, όπως υποδεικνύεται στον Πίνακα 8.
- 8β. LightCycler 480: Συνιστούμε μια λειτουργία ανάλυσης Fit point (σημεία προσαρμογής) με υπόβαθρο 2,0 και κατώφλι στα 2,0. Ξεκινήστε το πρόγραμμα θερμικής κυκλοποίησης, όπως υποδεικνύεται στον Πίνακα 9.

Πρωτόκολλο: qPCR στο όργανο LightCycler 1.2

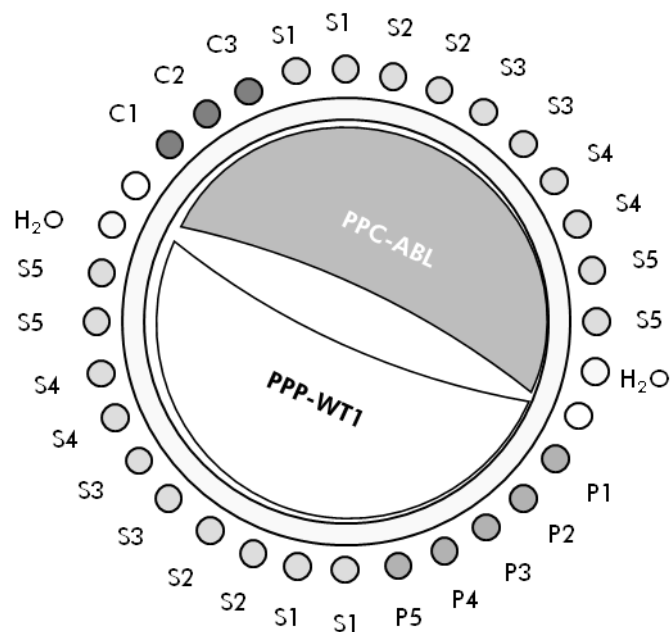
Κατά τη χρήση τριχοειδικών οργάνων, συνιστούμε τη μέτρηση των δειγμάτων εις διπλούν και των μαρτύρων μόνο εις απλούν, όπως υποδεικνύεται στον Πίνακα 10.

Πίνακας 10. Αριθμός αντιδράσεων για το όργανο LightCycler 1.2

Δείγματα	Αντιδράσεις
Με τους εκκινητές και το μείγμα ανιχνευτών ABL (PPC-ABL)	
n δείγματα cDNA	n x 2 αντιδράσεις
Πρότυπο ABL	1 x 3 αντιδράσεις (3 πρότυπα αραιωμένα διαλύματα, έναστο εξεταζόμενο εις απλούν)
Μάρτυρας νερού	1 αντίδραση
Με τους εκκινητές και το μείγμα ανιχνευτών WT1 (PPP-WT1)	
n δείγματα cDNA	n x 2 αντιδράσεις
Πρότυπο WT1	1 x 5 αντιδράσεις (5 πρότυπα αραιωμένα διαλύματα, έναστο εξεταζόμενο εις απλούν)
Μάρτυρας νερού	1 αντίδραση

Επεξεργασία δείγματος στο όργανο LightCycler 1.2

Συνιστούμε την εξέταση 5 δειγμάτων cDNA στο ίδιο πείραμα για τη βελτιστοποίηση της χρήσης των προτύπων και των εκκινητών και μειγμάτων ανιχνευτών. Το τριχοειδικό σχήμα στην Εικόνα 6 δείχνει ένα παράδειγμα πειράματος.



Εικόνα 6. Προτεινόμενη προετοιμασία στροφέα για κάθε πείραμα με το kit *ipsogen WT1 ProfileQuant*. P1–5: πρότυπα WT1, C1–3: πρότυπα ABL, S: άγνωστο δείγμα DNA προς ανάλυση, H₂O: μάρτυρας νερού.

qPCR στο όργανο LightCycler 1.2

Σημείωση: Λόγω ιδιαίτερων τεχνολογικών απαιτήσεων, τα πειράματα στο LightCycler πρέπει να πραγματοποιούνται χρησιμοποιώντας ειδικά αντιδραστήρια. Συνιστούμε τη χρήση του LightCycler TaqMan Master και την τήρηση των οδηγιών του κατασκευαστή για την προετοιμασία του κύριου μείγματος 5x.

Σημείωση: Εκτελέστε όλα βήματα σε πάγο.

Διαδικασία

1. Αποψύξτε όλα τα απαραίτητα συστατικά και τοποθετήστε τα σε πάγο.
2. Προετοιμάστε το ακόλουθο μείγμα qPCR σύμφωνα με τον αριθμό των δειγμάτων υπό επεξεργασία.

Όλες οι συγκεντρώσεις αφορούν τον τελικό όγκο της αντίδρασης.

Ο Πίνακας 11 περιγράφει το σχήμα διανομής με πιπέτα για την προετοιμασία ενός μείγματος αντιδραστηρίων, υπολογισμένο για την επίτευξη τελικού όγκου αντίδρασης 20 μl. Μπορεί να προετοιμαστεί ένα προ-μείγμα, σύμφωνα με τον αριθμό των αντιδράσεων, χρησιμοποιώντας τους ίδιους εκκινητές και μείγμα ανιχνευτών (είτε PPC-ABL είτε PPP-WT1). Συμπεριλαμβάνονται επιπλέον όγκοι για αντιστάθμιση σφάλματος διανομής με πιπέτα.

Πίνακας 11. Προετοιμασία του μείγματος qPCR

Συστατικό	1 αντίδραση (μl)	ABL: 14 + 1 αντιδράσεις (μl)	WT1: 16 + 1 αντιδράσεις (μl)	Τελική συγκέντρωση
Φρέσκο προετοιμασμένο κύριο μείγμα LightCycler TaqMan, 5x	4,0	60,0	68,0	1x
Εκκινητές και μείγμα ανιχνευτών, 25x	0,8	12,0	13,6	1x
Νερό κατηγορίας εφαρμογών PCR χωρίς νουκλεάση	10,2	153,0	173,4	–
Δείγμα (για προσθήκη στο βήμα 4)	5,0	5 έκαστο	5 έκαστο	–
Συνολικός όγκος	20,0	20 έκαστο	20 έκαστο	–

3. Χορηγήστε 15 μl από το προ-μείγμα qPCR ανά τριχοειδές.
4. Προσθέστε 5 μl προϊόντος RT (cDNA, 100 ng RNA ισοδύναμο) που ελήφθη στην ανάστροφη μεταγραφή (βλ. «Πρωτόκολλο: Συνιστώμενη τυποποιημένη ανάστροφη μεταγραφή κατά EAC», σελίδα 14) στο αντίστοιχο σωληνάριο (συνολικός όγκος 20 μl).
5. Αναμείξτε απαλά, με επαναλαμβανόμενη αναρρόφηση/εξώθηση με πιπέτα.
6. Τοποθετήστε τα τριχοειδή στους προσαρμογείς που παρέχονται με τη συσκευή, φυγοκεντρίστε σύντομα (700 x g, περίπου 10 δευτερόλεπτα).
7. Φορτώστε τα τριχοειδή στο θερμικό κυκλοποιητή σύμφωνα με τις συστάσεις του κατασκευαστή.
8. Προγραμματίστε το όργανο LightCycler 1.2 με το πρόγραμμα θερμικής κυκλοποίησης, όπως υποδεικνύεται στον Πίνακα 12.

Πίνακας 12. Προφίλ θερμοκρασίας

Λειτουργία ανάλυσης	Ποσοτικοποίηση
Διατήρηση	Θερμοκρασία: 95°C Χρόνος: 10 λεπτά Ράμπα: 20
Κυκλοποίηση	50 φορές 95°C για 10 δευτερόλεπτα, ράμπα: 20 60°C για 1 λεπτό, ράμπα: 20, με λήψη φθορισμού FAM: Μονό
Διατήρηση 2	45°C για 1 λεπτό, ράμπα: 20

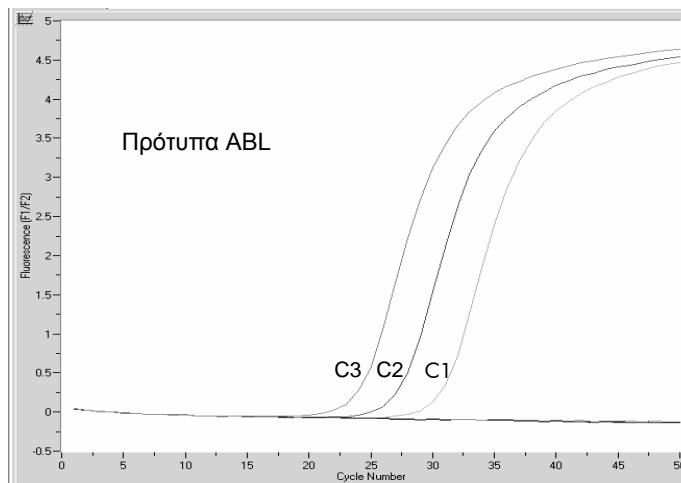
9. Για το όργανο LightCycler 1.2, συνιστάται η λειτουργία F1/F2 και «2nd derivative analysis» (ανάλυση 2ης παραγώγου). Ξεκινήστε το πρόγραμμα θερμικής κυκλοποίησης, όπως υποδεικνύεται στον Πίνακα 12.

Ερμηνεία των αποτελεσμάτων

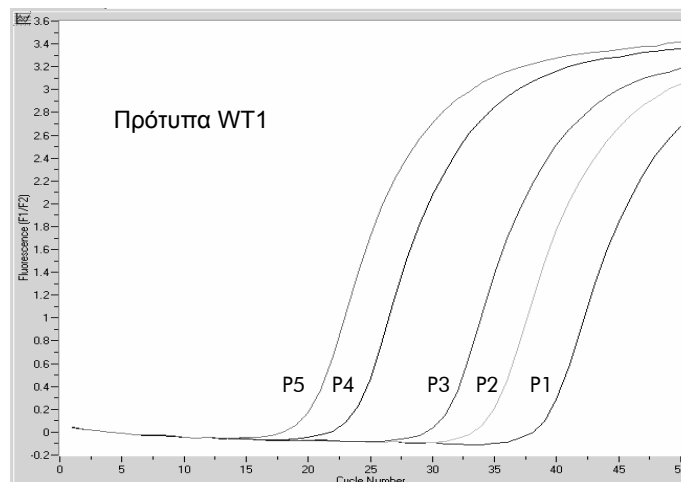
Αρχή της ανάλυσης δεδομένων

Χρησιμοποιώντας τεχνολογία TaqMan, ο αριθμός των κύκλων PCR που απαιτούνται για την ανίχνευση ενός σήματος πάνω από το κατώφλι ονομάζεται κύκλος κατωφλίου (C_T) και είναι ευθέως ανάλογος προς την ποσότητα του στόχου που είναι παρών κατά την έναρξη της αντίδρασης.

Χρησιμοποιώντας πρότυπα με γνωστό αριθμό μορίων, είναι δυνατή η δημιουργία μιας πρότυπης καμπύλης και ο καθορισμός της ακριβούς ποσότητας του στόχου που είναι παρών στο εξεταζόμενο δείγμα. Οι πρότυπες καμπύλες *ipsogen* βασίζονται σε πλασμιδία. Χρησιμοποιούμε 3 πρότυπα αραιωμένα διαλύματα πλασμιδίου για το γονίδιο-μάρτυρα ABL (CG), και 5 πρότυπα αραιωμένα διαλύματα για το γονίδιο WT1, προκειμένου να διασφαλίσουμε ακριβείς πρότυπες καμπύλες. Οι εικόνες 7 και 8 δείχνουν ένα παράδειγμα των καμπυλών ενίσχυσης TaqMan που λαμβάνονται με το kit *ipsogen* WT1 ProfileQuant.



Εικόνα 7. Ανίχνευση προτύπων ABL (C1, C2, C3). 10^3 , 10^4 και 10^5 αντίγραφα/5 μ l.



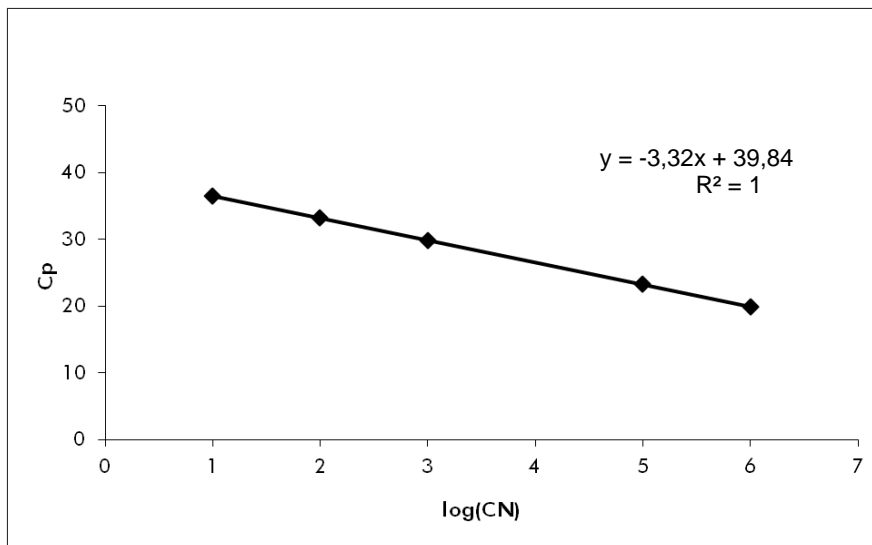
Εικόνα 8. Ανίχνευση προτύπων WT1 (P1-P5). 10^1 , 10^2 , 10^3 , 10^5 , 10^6 αντίγραφα/5 μ l.

Αποτελέσματα

Πρότυπη καμπύλη και κριτήρια ποιότητας

Ανεπεξέργαστα δεδομένα μπορούν να επικολληθούν σε ένα αρχείο Excel® για ανάλυση.

Για κάθε γονίδιο (ABL και WT1), ανεπεξέργαστες τιμές C_P / C_T που λαμβάνονται από πρότυπα αραιωμένα διαλύματα πλασμιδίου σχεδιάζονται σύμφωνα με τον αριθμό αντιγράφων \log (3, 4 και 5 για C1, C2 και C3, και 1, 2, 3, 5 και 6 για P1, P2, P3, P4 και P5). Η Εικόνα 9 δείχνει ένα παράδειγμα της θεωρητικής καμπύλης που υπολογίζεται σε 5 πρότυπα αραιωμένα διαλύματα.



Εικόνα 9. Θεωρητική καμπύλη υπολογιζόμενη σε 5 πρότυπα αραιωμένα διαλύματα.

Μια καμπύλη γραμμικής παλινδρόμησης ($y = ax + b$) υπολογίζεται για κάθε γονίδιο (ABL και WT1), όπου a είναι η κλίση της γραμμής και b είναι η τομή y , η οποία είναι η συντεταγμένη y του σημείου όπου η γραμμή τέμνει τον άξονα y . Η εξίσωσή της και ο συντελεστής προσδιορισμού (R^2) αναγράφονται στο γράφημα.

Καθώς τα πρότυπα είναι 10-πλάσιες αραιώσεις, η θεωρητική κλίση της καμπύλης είναι $-3,32$. Μια κλίση μεταξύ $-3,0$ και $-3,9$ είναι αποδεκτή εφόσον R^2 είναι $>0,95$ (12). Ωστόσο, μια τιμή για $R^2 >0,98$ είναι επιθυμητή για ακριβή αποτελέσματα (13).

Κανονικοποιημένος αριθμός αντιγράφων (NCN)

Η εξίσωση πρότυπης καμπύλης ABL πρέπει να χρησιμοποιηθεί για τη μετατροπή ανεπεξέργαστων τιμών C_P (που λαμβάνονται με PPC-ABL) για τα άγνωστα δείγματα σε αριθμούς αντιγράφων ABL (ABL_{CN}).

$$\text{Log}_{10} ABL_{CN} \text{ δείγματος} = \frac{\text{Μέση } ABL C_P - \text{Τομή πρότυπης καμπύλης } ABL}{\text{Κλίση πρότυπης καμπύλης } ABL}$$

Η εξίσωση πρότυπης καμπύλης WT1 πρέπει να χρησιμοποιηθεί για τη μετατροπή ανεπεξέργαστων τιμών C_P (που λαμβάνονται με PPP-WT1) για τα άγνωστα δείγματα, σε αριθμούς αντιγράφων WT1 (WT1_{CN}).

$$\text{Log}_{10} \text{ WT1}_{\text{CN}} \text{ δείγματος} = \frac{\text{Μέση WT1 C}_P - \text{Τομή πρότυπης καμπύλης WT1}}{\text{Κλίση πρότυπης καμπύλης WT1}}$$

Η αναλογία αυτών των τιμών CN δίνει τον κανονικοποιημένο αριθμό αντιγράφων (NCN) ανά 10.000 αντίγραφα του ABL:

$$\text{NCN} = \frac{\text{WT1}_{\text{CN}}}{\text{ABL}_{\text{CN}}} \times 10.000$$

Έλεγχος ποιότητας στις τιμές ABL

Κακή ποιότητα του RNA ή προβλήματα κατά τη διάρκεια των βημάτων qPCR οδηγούν σε χαμηλό ABL_{CN}. Συνιστούμε την απόρριψη των αποτελεσμάτων από δείγματα που δίνουν ABL_{CN} <4.246.

Αναπαραγωγιμότητα μεταξύ θυγατρικών κλώνων

Η διακύμανση στις τιμές C_P μεταξύ των θυγατρικών κλώνων πρέπει να είναι <2, που αντιστοιχεί σε μια 4-πλάσια μεταβολή στις τιμές αριθμού αντιγράφων.

Η διακύμανση στις τιμές C_P μεταξύ των θυγατρικών κλώνων είναι γενικά <1,5 εάν η μέση τιμή C_P των θυγατρικών κλώνων είναι <36 (12).

Σημείωση: Κάθε χρήστης πρέπει να μετρά τη δική του επαναληψιμότητα στο εργαστήριό του.

Μάρτυρες νερού

Οι αρνητικοί μάρτυρες πρέπει να δίνουν μηδενικό CN τόσο για ABL όσο και για WT1.

Ένας θετικός μάρτυρας νερού προκύπτει από διασταυρούμενη μόλυνση. Βλ. «Οδηγός αντιμετώπισης προβλημάτων», παρακάτω, για να βρείτε μια λύση.

Οδηγός αντιμετώπισης προβλημάτων

Αυτός ο οδηγός αντιμετώπισης προβλημάτων μπορεί να σας βοηθήσει στην επίλυση οποιωνδήποτε προβλημάτων που ενδεχομένως προκύψουν. Για περισσότερες πληροφορίες, ανατρέξτε στη σελίδα Frequently Asked Questions (συχνές ερωτήσεις) του Κέντρου Τεχνικής Υποστήριξης της εταιρείας μας: www.qiagen.com/FAQ/FAQList.aspx. Οι επιστήμονες των

Τεχνικών Υπηρεσιών της QIAGEN είναι πάντοτε πρόθυμοι/-ες να απαντήσουν σε οποιοσδήποτε απορίες σας σχετικά με τις πληροφορίες και το πρωτόκολλο αυτού του εγχειριδίου ή τεχνολογίες δειγμάτων και προσδιορισμών (για πληροφορίες επικοινωνίας, βλ. «Πληροφορίες επικοινωνίας», σελίδα 44).

Σχόλια και προτάσεις

Αρνητικό αποτέλεσμα για το γονίδιο-μάρτυρα (ABL) και το WT1 σε όλα τα δείγματα — το πρότυπο είναι εντάξει

- | | |
|---|---|
| α) Κακή ποιότητα RNA | Πάντοτε να ελέγχετε την ποιότητα του RNA και τη συγκέντρωση προτού ξεκινήσετε.
Εκτελέστε ένα θετικό μάρτυρα RNA κυτταρικής σειράς παράλληλα. |
| β) Αποτυχία βήματος ανάστροφης μεταγραφής | Πάντοτε να ελέγχετε την ποιότητα του RNA και τη συγκέντρωση προτού ξεκινήσετε.
Εκτελέστε ένα θετικό μάρτυρα RNA κυτταρικής σειράς παράλληλα. |

Αρνητικό αποτέλεσμα για το γονίδιο-μάρτυρα (ABL) στα δείγματα — το πρότυπο είναι εντάξει

- | | |
|---|---|
| α) Κακή ποιότητα RNA | Πάντοτε να ελέγχετε την ποιότητα του RNA και τη συγκέντρωση προτού ξεκινήσετε.
Εκτελέστε ένα θετικό μάρτυρα RNA κυτταρικής σειράς παράλληλα. |
| β) Αποτυχία βήματος ανάστροφης μεταγραφής | Πάντοτε να ελέγχετε την ποιότητα του RNA και τη συγκέντρωση προτού ξεκινήσετε.
Εκτελέστε ένα θετικό μάρτυρα RNA κυτταρικής σειράς παράλληλα. |

Αρνητικό σήμα προτύπου

- | | |
|------------------------------|---|
| a) Σφάλμα διανομής με πιπέτα | Ελέγξτε το σχήμα διανομής με πιπέτα και την προετοιμασία της αντίδρασης.
Επαναλάβετε την εκτέλεση PCR. |
|------------------------------|---|

Σχόλια και προτάσεις

- b) Ακατάλληλη φύλαξη των συστατικών του κιτ Φυλάσσετε το κιτ *ipsogen* WT1 ProfileQuant στους -15 έως -30°C και διατηρείτε τους εκκινητές και τα μείγματα ανιχνευτών (PPC και PPP) προστατευμένα από το φως. Βλ. «Φύλαξη και χειρισμός αντιδραστηρίων», σελίδα 12.
- Αποφεύγετε την επαναλαμβανόμενη κατάψυξη και απόψυξη.
- Φυλάσσετε τα αντιδραστήρια σε κλάσματα.

Οι αρνητικοί μάρτυρες είναι θετικοί

- Διασταυρούμενη μόλυνση Αντικαταστήστε όλα τα κρίσιμα αντιδραστήρια. Επαναλάβετε το πείραμα με νέα κλάσματα όλων των αντιδραστηρίων.
- Πάντοτε να χειρίζεστε τα δείγματα, τα συστατικά του κιτ και τα αναλώσιμα σύμφωνα με τις κοινώς αποδεκτές πρακτικές προκειμένου να αποφύγετε επιμόλυνση από μεταφορά.

Απουσία σήματος, ακόμα και στους πρότυπους μάρτυρες

- a) Σφάλμα διανομής με πιπέτα ή παράλειψη αντιδραστηρίων Ελέγξτε το σχήμα διανομής με πιπέτα και την προετοιμασία της αντίδρασης. Επαναλάβετε την εκτέλεση PCR.
- b) Ανασταλτικές επιδράσεις του υλικού του δείγματος, προκαλούμενες από ανεπαρκή καθαρισμό Επαναλάβετε την προετοιμασία RNA.
- c) LightCycler: Επιλέχθηκε λανθασμένο κανάλι ανίχνευσης Ορίστε τη ρύθμιση καναλιού σε F1/F2 ή 530 nm/640 nm.
- d) LightCycler: Δεν προγραμματίστηκε λήψη δεδομένων Ελέγξτε τα προγράμματα κύκλων. Επιλέξτε τη λειτουργία λήψης «Single» (μονό) στο τέλος κάθε τμήματος ανασύνδεσης του προγράμματος PCR.

Σχόλια και προτάσεις

Απουσία σήματος ή χαμηλό σήμα στα δείγματα αλλά οι πρότυποι μάρτυρες είναι εντάξει

- α) Κακή ποιότητα RNA ή χαμηλή συγκέντρωση
- Πάντοτε να ελέγχετε την ποιότητα του RNA και τη συγκέντρωση προτού ξεκινήσετε.
Εκτελέστε ένα θετικό μάρτυρα RNA κυτταρικής σειράς παράλληλα.
- β) Αποτυχία βήματος ανάστροφης μεταγραφής
- Πάντοτε να ελέγχετε την ποιότητα του RNA και τη συγκέντρωση προτού ξεκινήσετε.
Εκτελέστε ένα θετικό μάρτυρα RNA κυτταρικής σειράς παράλληλα.

Η ένταση του φθορισμού είναι πολύ χαμηλή

- α) Ακατάλληλη φύλαξη των συστατικών του κιτ
- Φυλάσσετε το κιτ *ipsogen WT1 ProfileQuant* στους -15 έως -30°C και διατηρείτε τους εκκινητές και τα μείγματα ανιχνευτών (PPC και PPP) προστατευμένα από το φως. Βλ. «Φύλαξη και χειρισμός αντιδραστηρίων», σελίδα 12.
Αποφεύγετε την επαναλαμβανόμενη κατάψυξη και απόψυξη.
Φυλάσσετε τα αντιδραστήρια σε κλάσματα.
- β) Πολύ χαμηλή αρχική ποσότητα RNA-στόχου
- Αυξήστε την ποσότητα του RNA δείγματος.
Σημείωση: Ανάλογα με την επιλεγμένη μέθοδο προετοιμασίας RNA, ενδέχεται να υπάρξουν ανασταλτικές επιδράσεις.

Σχόλια και προτάσεις

LightCycler: Η ένταση φθορισμού ποικίλλει

- a) Σφάλμα διανομής με πιπέτα Η διακύμανση που προκαλείται από το επονομαζόμενο «σφάλμα διανομής με πιπέτα» μπορεί να μειωθεί αναλύοντας τα δεδομένα στη λειτουργία F1/F2 ή 530 nm/640 nm.
- b) Ανεπαρκής φυγοκέντριση των τριχοειδών Το προετοιμασμένο μείγμα PCR μπορεί ακόμα να βρίσκεται στο επάνω δοχείο του τριχοειδούς, ή φυσαλίδα αέρα εγκλωβισμένη στο άκρο του τριχοειδούς.
Πάντοτε να φυγοκεντρίζετε τα τριχοειδή φορτωμένα με το μείγμα της αντίδρασης, όπως περιγράφεται στο ειδικό εγχειρίδιο χρήσης της συσκευής.
- c) Η εξωτερική επιφάνεια του άκρου του τριχοειδούς είναι βρώμικη Πάντοτε να φοράτε γάντια όταν χειρίζεστε τα τριχοειδή.

LightCycler: Σφάλμα της πρότυπης καμπύλης

- Σφάλμα διανομής με πιπέτα Η διακύμανση που προκαλείται από το επονομαζόμενο «σφάλμα διανομής με πιπέτα» μπορεί να μειωθεί αναλύοντας τα δεδομένα στη λειτουργία F1/F2 ή 530 nm/640 nm.

Ποιοτικός έλεγχος

Ποιοτικός έλεγχος ολόκληρου του kit διενεργήθηκε σε ένα όργανο LightCycler 480. Αυτό το kit παράγεται σύμφωνα με το πρότυπο ISO 13485:2003.

Πιστοποιητικά ανάλυσης είναι διαθέσιμα κατόπιν αιτήματος στο www.qiagen.com/support/.

Περιορισμοί

Οι χρήστες πρέπει να έχουν εκπαιδευτεί και εξοικειωθεί με την τεχνολογία πριν από τη χρήση αυτής της συσκευής. Αυτό το kit πρέπει να χρησιμοποιείται σύμφωνα με τις οδηγίες που παρέχονται στο παρόν εγχειρίδιο, σε συνδυασμό με ένα επικυρωμένο όργανο που αναφέρεται στην ενότητα «Απαιτούμενα υλικά που δεν παρέχονται», σελίδα 10.

Κάθε παραγόμενο διαγνωστικό αποτέλεσμα θα πρέπει να ερμηνεύεται στο πλαίσιο των υπόλοιπων κλινικών ή εργαστηριακών ευρημάτων. Η επαλήθευση της απόδοσης του συστήματος για οποιεσδήποτε διαδικασίες που

εφαρμόζονται στο εκάστοτε εργαστήριο και δεν καλύπτονται από τις μελέτες αξιολόγησης απόδοσης της QIAGEN αποτελούν ευθύνη του χρήστη.

Δώστε προσοχή στις ημερομηνίες λήξης που αναγράφονται στο κουτί και στις ετικέτες όλων των συστατικών. Μη χρησιμοποιείτε τα συστατικά μετά την ημερομηνία λήξης τους.

Σημείωση: Το κιτ έχει σχεδιαστεί σύμφωνα με τις μελέτες του Ευρωπαϊκού Δικτύου για τη Λευχαιμία (“European LeukemiaNet”, ELN) (10, 11). Πρέπει να χρησιμοποιείται σύμφωνα με τις οδηγίες που παρέχονται στο παρόν εγχειρίδιο, σε συνδυασμό με επικυρωμένα αντιδραστήρια και όργανα. Οποιαδήποτε μη προβλεπόμενη χρήση αυτού του προϊόντος ή/και τροποποίηση των συστατικών θα επισύρει ακύρωση της ευθύνης της QIAGEN.

Χαρακτηριστικά απόδοσης

Μη κλινικές μελέτες

Υλικά και μέθοδοι

Μελέτες γραμμικότητας πραγματοποιήθηκαν σε 14 δείγματα, καθένα από τα οποία ελήφθη από ένα διαφορετικό μείγμα RNA εκχυλισμένο από κυτταρική σειρά υψηλής έκφρασης και δείγματα υγιών δοτών, τα οποία είχαν χαμηλό επίπεδο έκφρασης για το γονίδιο WT1. Κάθε δείγμα εξετάστηκε εις τριπλούν. Για NCN, οι τιμές κυμάνθηκαν από 2,20 έως 3.838,11 NCN και αυτή η μελέτη κατέδειξε ότι το κιτ *ipsogen* WT1 *ProfileQuant* έδωσε γραμμικά αποτελέσματα σε αυτό το εύρος τιμών.

Ακρίβεια

Μελέτες ακρίβειας πραγματοποιήθηκαν σε 4 δείγματα, καθένα από τα οποία ελήφθη από ένα διαφορετικό μείγμα RNA εκχυλισμένο από κυτταρικές σειρές με υψηλή και χαμηλή έκφραση WT1. Αυτοί οι προσδιορισμοί επαναλήφθηκαν έως και 16 φορές για κάθε δείγμα. Τα αναλυτικά δεδομένα συνοψίζονται στους ακόλουθους πίνακες.

Πίνακας 13. Αναλυτικά δεδομένα από τη μελέτη ακρίβειας — πλασμίδια

	Αραίωση	Μέση C_T	σ	n	ΣΔ (%)
Πλασμίδια WT1	P1: 10 ¹ αντίγραφα/5 μl	36,13	0,87	15	2,42
	P2: 10 ² αντίγραφα/5 μl	32,70	0,40	16	1,21
	P3: 10 ³ αντίγραφα/5 μl	29,39	0,43	16	1,45
	P4: 10 ⁵ αντίγραφα/5 μl	22,62	0,41	16	1,80
	P5: 10 ⁶ αντίγραφα/5 μl	19,25	0,38	16	1,98
Πλασμίδια ABL	C1: 10 ³ αντίγραφα/5 μl	29,59	0,35	16	1,20
	C2: 10 ⁴ αντίγραφα/5 μl	26,11	0,40	15	1,52
	C3: 10 ⁵ αντίγραφα/5 μl	22,77	0,28	16	1,22

Πίνακας 14. Αναλυτικά δεδομένα από τη μελέτη ακρίβειας — κυτταρικές σειρές

	Αραίωση	Μέσος NCN	σ	n	ΣΔ (%)
Αραίωση RNA κυτταρικής σειράς	10%	10.472	5.598,76	16	53
	1,5%	1.880	747,01	16	40
	0,05%	86	37,79	16	44
	0,0025%	3	1,90	16	57

Όριο τυφλού και όριο ανίχνευσης

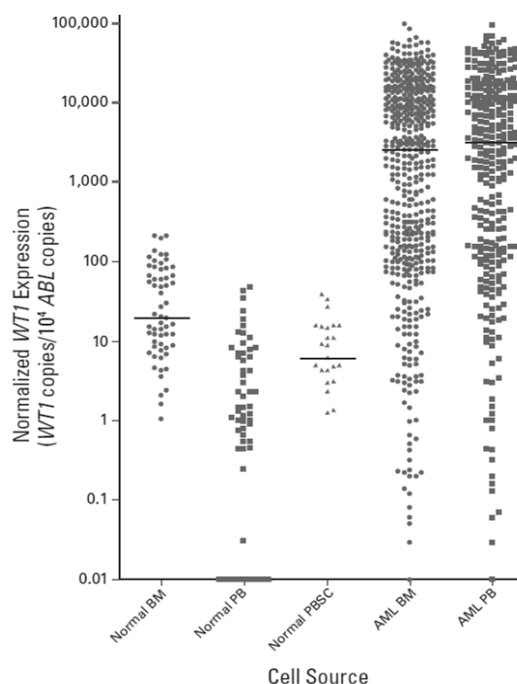
Ο σχεδιασμός της μελέτης βασίστηκε στις συστάσεις που περιγράφονται στο έγγραφο EP17-A του NCCLS «Protocols for Determination of Limits of Detection and Limits of Quantitation; Approved Guideline» (πρωτόκολλα για

τον προσδιορισμό των ορίων ανίχνευσης και των ορίων ποσοτικοποίησης, εγκεκριμένη κατευθυντήρια οδηγία). Το επίπεδο υποβάθρου ή το όριο τυφλού (LOB) προσδιορίστηκε σε φυσιολογικά δείγματα αίματος από υγιείς δότες (4 δείγματα, 73 μετρήσεις). Αυτό βρέθηκε να ισούται με 3,66 WT1 NCN.

Το όριο ανίχνευσης (LOD), το οποίο υποδεικνύει την αναλυτική ευαισθησία, προσδιορίστηκε σε δείγματα με γνωστή χαμηλή έκφραση του WT1 που ελήφθησαν από υγιείς δότες και εμβολιάστηκαν με κύτταρα που είχαν υψηλό επίπεδο έκφρασης WT1. Αυτό διασφάλισε ότι η αναμενόμενη τιμή NCN ήταν 4-πλάσια του LOB. Πραγματοποιήθηκε ένα σύνολο 4 δειγμάτων και 72 μετρήσεων και το LOD βρέθηκε να ισούται με 13,08 WT1 NCN.

Κλινικές μελέτες

Καθώς το WT1 εκφράζεται σε φυσιολογικά αιμοποιητικά κύτταρα, είναι κρίσιμης σημασίας να καθιερωθεί το επίπεδο έκφρασης που παρατηρείται στα φυσιολογικά δείγματα μαρτύρων, ούτως ώστε να είναι δυνατός ο καθορισμός ενός κατωφλίου που διακρίνει μεταξύ της υπολειπόμενης λευχαιμίας και της ενίσχυσης υποβάθρου. Η ανάλυση 204 δειγμάτων μαρτύρων που προήλθαν από υγιείς εθελοντές χρησιμοποιώντας τον προσδιορισμό ELN που χρησιμοποιείται στο kit *ipsogen* WT1 ProfileQuant επιβεβαίωσε ότι παρατηρείται πολύ χαμηλή έκφραση του WT1 σε δείγματα περιφερικού αίματος, μυελού των οστών και βλαστικών κυττάρων περιφερικού αίματος. Οι διάμεσες τιμές ήταν 19,8 αντίγραφα WT1 /10⁴ αντίγραφα ABL (εύρος 0–213) στο μυελό των οστών, 0,01 (εύρος 0,01–47,6) στο περιφερικό αίμα και 6,1 (εύρος 0–39) στα βλαστικά κύτταρα περιφερικού αίματος (βλ. Εικόνα 10). Η έκφραση του WT1 στο περιφερικό αίμα ήταν σημαντικά χαμηλότερη από ό,τι στο μυελό των οστών ($p < 0,0001$). Με βάση αυτά τα αποτελέσματα, το άνω όριο του φυσιολογικού καθορίστηκε ως 250 NCN για το μυελό των οστών και 50 NCN για το περιφερικό αίμα.



Εικόνα 10. Έκφραση του WT1 σε δείγματα από υγιείς δότες. Οξεία μυελογενής λευχαιμία, ΟΜΛ (AML), μυελός των οστών (BM), περιφερικό αίμα (PB), βλαστικά κύτταρα περιφερικού αίματος (PBSC). (15)

Ανατύπωση κατόπιν αδείας από τους Cilloni D et al: Real-time quantitative polymerase chain reaction detection of minimal residual disease by standardized WT1 assay to enhance risk stratification in acute myeloid leukemia: A European LeukemiaNet Study: *J Clin Oncol* 27(31):5195-201. Epub 2009 Sep 1. © 2009, American Society of Clinical Oncology, All rights reserved.

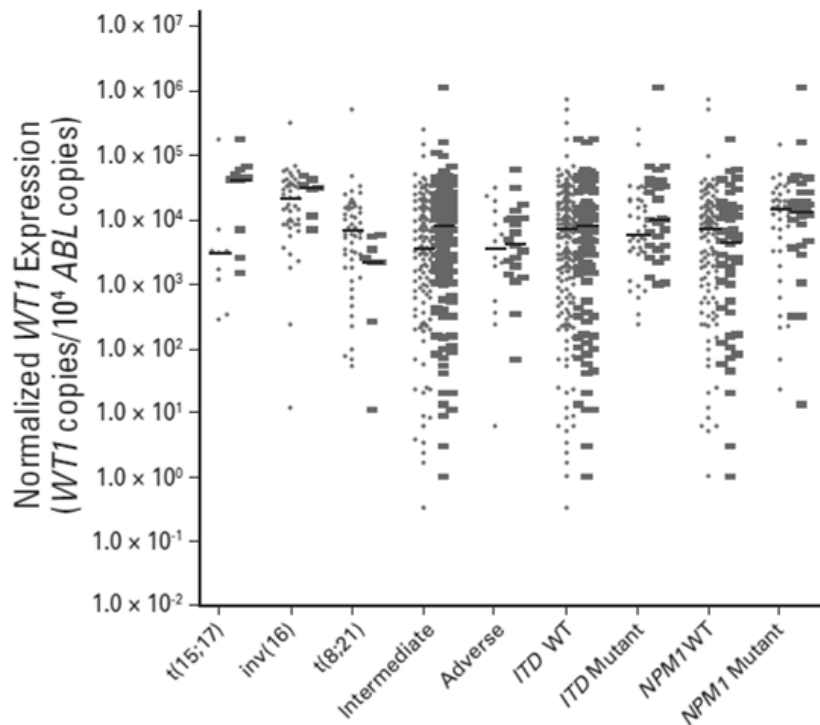
Καθορισμός της έκφρασης του WT1 μέσω τυποποιημένου προσδιορισμού ELN qPCR σε δείγματα ΟΜΛ προ της θεραπείας

Για την αξιολόγηση της δυνατότητας εφαρμογής του προσδιορισμού ELN που χρησιμοποιείται στο κιτ *ipsogen* WT1 ProfileQuant για την ανίχνευση της MRD, 620 δείγματα προ της θεραπείας (238 από περιφερικό αίμα και 382 από μυελό των οστών) αναλύθηκαν από 504 ασθενείς.

Το WT1 υπερεκφραζόταν πάνω από τα επίπεδα υποβάθρου (που καθορίζονται ως >250 και >50 αντίγραφα WT1 /10⁴ αντίγραφα ABL σε μυελό των οστών και περιφερικό αίμα, αντίστοιχα) στο 86% και 91% των διαγνωστικών δειγμάτων ΟΜΛ περιφερικού αίματος (βλ. επίσης Εικόνα 10).

Η διάμεση τιμή των αντιγράφων WT1 /10⁴ αντίγραφα ABL ήταν 2.505, (εύρος 0–7,5 x 10⁵) στο μυελό των οστών (p<0,0001 έναντι φυσιολογικού μυελού των οστών) και 3.107 (εύρος 0–1,13 x 10⁶) στο περιφερικό αίμα (p<0,0001 έναντι φυσιολογικού περιφερικού αίματος). Δεν παρατηρήθηκε σημαντική διαφορά στην έκφραση μεταξύ περιφερικού αίματος και μυελού των οστών σε ολόκληρη την κοόρτη, όπως επιβεβαιώθηκε από τα αποτελέσματα που ελήφθησαν σε ασθενείς με αντιστοιχισμένα διαγνωστικά δείγματα περιφερικού αίματος και μυελού των οστών, βλ. Cilloni D et al., *J Clin Oncol*, Εικόνα A3 στο Παράρτημα (15).

Διακύμανση στο κανονικοποιημένο επίπεδο έκφρασης WT1 παρατηρήθηκε σύμφωνα με τα κυτταρογενετικά χαρακτηριστικά (Εικόνα 11, $p < 0,001$), με ιδιαιτέρως υψηλά επίπεδα σε περιπτώσεις με $inv(16)(p13;q22)/t(16;16)(p13;q22)$ (διάμεσος $2,31 \times 10^4$, εύρος $12-3,14 \times 10^5$). Σημαντικά υψηλότερα επίπεδα WT1 ανιχνεύθηκαν επίσης στην ΟΜΛ με μεταλλάξεις NPM1 (μεταλλαγμένο NPM1: διάμεσος $1,44 \times 10^4$, εύρος $0-1,13 \times 10^6$, NPM1 μη μεταλλαγμένου (άγριου) τύπου: διάμεσος 6.566, εύρος $0-7,5 \times 10^5$, $p = 0,005$).



Εικόνα 11. Διακύμανση της έκφρασης WT1 σύμφωνα με τα κυτταρογενετικά χαρακτηριστικά (15).

Ανατύπωση κατόπιν αδείας από τους Cilloni D et al: Real-time quantitative polymerase chain reaction detection of minimal residual disease by standardized WT1 assay to enhance risk stratification in acute myeloid leukemia: A European LeukemiaNet Study: *J Clin Oncol* 27(31):5195-201, 2009. © 2009, American Society of Clinical Oncology, All rights reserved.

Τα επίπεδα της έκφρασης WT1 όπως καθορίζεται από τον προσδιορισμό ELN σε 15 περιπτώσεις που φέρουν μεταλλάξεις στα εξόνια 7 και 9 του γονιδίου WT1 ήταν συγκρίσιμα με εκείνα με WT1 μη μεταλλαγμένου (άγριου) τύπου ($p=0,2$). Ωστόσο, η ανάλυση αλληλουχίας μιας σειράς 32 περιπτώσεων στις οποίες ο προσδιορισμός ELN υπέδειξε χαμηλό επίπεδο έκφρασης μεταγραφημάτων WT1 (<250 αντίγραφα / 10^4 αντίγραφα ABL), υπέδειξε ότι σε 3 περιπτώσεις (9,4%) αυτό το χαμηλό επίπεδο έκφρασης συσχετίστηκε με μεταλλάξεις που διατάραξαν τη θέση σύνδεσης του εμπρόσθιου εκκινητή, βλ. Cilloni D et al., *J Clin Oncol*, Εικόνα A4 στο Παράρτημα (15).

Βιβλιογραφία

Η QIAGEN διατηρεί μία μεγάλη, ενημερωμένη online βάση δεδομένων επιστημονικών δημοσιεύσεων στις οποίες χρησιμοποιήθηκαν προϊόντα της QIAGEN. Με τις εύχρηστες δυνατότητες αναζήτησης μπορείτε να βρείτε τα άρθρα που αναζητάτε – είτε με απλή αναζήτηση λέξης-κλειδιού ή ορίζοντας την εφαρμογή, τον ερευνητικό τομέα, τον τίτλο κτλ.

Για ένα πλήρη κατάλογο της βιβλιογραφίας, επισκεφθείτε την online βιβλιογραφική βάση δεδομένων της QIAGEN (Reference Database) στη διεύθυνση www.qiagen.com/RefDB/search.asp ή επικοινωνήστε με τις τεχνικές υπηρεσίες της QIAGEN ή τον τοπικό σας αντιπρόσωπο.

Παρατιθέμενη βιβλιογραφία

1. Cheson, B.D. et al. (2003) Revised recommendations of the international working group for diagnosis, standardization of response criteria, treatment outcomes, and reporting standards for therapeutic trials in acute myeloid leukemia. *J. Clin. Oncol.* **21**, 4642.
2. Estey, E. and Döhner, H. (2006) Acute myeloid leukemia. *Lancet* **368**, 1894.
3. Grimwade D. (2001) The clinical significance of cytogenetic abnormalities in acute myeloid leukaemia. *Best. Pract. Res. Clin. Haematol.* **14**, 497.
4. Schlenk, R.F. et al (2008) Mutations and treatment outcome in cytogenetically normal acute myeloid leukemia. *N. Engl. J. Med.* **358**, 1909.
5. Wheatley, K. et al. (1999) A simple, robust, validated and highly predictive index for the determination of risk-directed therapy in acute myeloid leukaemia derived from the MRC AML 10 trial. United Kingdom Medical Research Council's Adult and Childhood Leukaemia Working Parties. *Br. J. Haematol.* **107**, 69.
6. Freeman, S.D., Jovanovic, J.V., and Grimwade D. (2008) Development of minimal residual disease-directed therapy in acute myeloid leukemia. *Semin. Oncol.* **4**, 388.
7. Sugiyama, H. (2001) Wilms' tumor gene WT1: its oncogenic function and clinical application. *Int. J. Hematol.* **73**, 177.
8. Liu-Yin, J. et al. (2008) Predictive value of minimal residual disease (MRD) monitoring by RQ-PCR in WT1 positive patients entered in the UK MRC AML-15 Trial. *Blood* **112**, 259.
9. Van Dijk J.P. et al. (2003) Abnormal WT1 expression in the CD34-negative compartment in myelodysplastic bone marrow. *Br. J. Haematol.* **118**, 1027.
10. 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.
11. 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.

12. 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.
13. Branford, S. et al. (2006) Rationale for the recommendations for harmonizing current methodology for detecting BCR-ABL transcripts in patients with chronic myeloid leukaemia. *Leukemia* **20**, 1925.
14. Cilloni, D. et al., American Society of Hematology (ASH) Annual Meeting, 2007.
15. Cilloni D. et al., Real-time quantitative polymerase chain reaction detection of minimal residual disease by standardized *WT1* assay to enhance risk stratification in acute myeloid leukemia: a European LeukemiaNet Study. *J Clin Oncol* **27**, 5195.

Σύμβολα

Τα ακόλουθα σύμβολα μπορεί να εμφανίζονται στη συσκευασία και στην επισήμανση:



Περιέχει αντιδραστήρια που επαρκούν για <N> αντιδράσεις



Ημερομηνία λήξης



In vitro διαγνωστικό ιατροτεχνολογικό προϊόν



Αριθμός καταλόγου



Αριθμός παρτίδας



Αριθμός υλικού



Διεθνής κωδικός μονάδας εμπορίας



Περιορισμός θερμοκρασίας



Κατασκευαστής



Συμβουλευθείτε τις οδηγίες χρήσης

ELN LeukemiaNet[®] European LeukemiaNet
European

Πληροφορίες επικοινωνίας

Για θέματα τεχνικής υποστήριξης και περαιτέρω πληροφορίες, επισκεφθείτε το Κέντρο Τεχνικής Υποστήριξης στη διεύθυνση www.qiagen.com/Support, καλέστε 00800-22-44-6000 ή επικοινωνήστε με κάποιο από τα Τμήματα Τεχνικής Εξυπηρέτησης της QIAGEN ή με τους τοπικούς αντιπροσώπους (βλ. οπισθόφυλλο ή επισκεφθείτε τη διεύθυνση www.qiagen.com).

Πληροφορίες παραγγελίας

Προϊόν	Περιεχόμενα	Αρ. καταλ.
<i>ipsogen</i> WT1 ProfileQuant (24)	Για 24 αντιδράσεις: Πρότυπα γονιδίου-μάρτυρα ABL, πρότυπα γονιδίου WT1 (εξόνιο 1-2), εκκινήτες και μείγμα ανιχνευτών ABL, εκκινήτες και μείγμα ανιχνευτών PPP-WT1	676923
Rotor-Gene Q MDx — για επικυρωμένη για IVD ανάλυση PCR πραγματικού χρόνου σε κλινικές εφαρμογές		
Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM Platform	Κυκλοποιητής PCR πραγματικού χρόνου και αναλυτής Melt υψηλής ανάλυσης με 5 κανάλια (πράσινο, κίτρινο, πορτοκαλί, κόκκινο, μπορντώ) και κανάλι HRM, φορητός υπολογιστής, λογισμικό, παρελκόμενα, εγγύηση 1 έτους στα εξαρτήματα και την εργασία, δεν περιλαμβάνει εγκατάσταση και κατάρτιση	9002032
Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM System	Κυκλοποιητής PCR πραγματικού χρόνου και αναλυτής Melt υψηλής ανάλυσης με 5 κανάλια (πράσινο, κίτρινο, πορτοκαλί, κόκκινο, μπορντώ) και κανάλι HRM, φορητός υπολογιστής, λογισμικό, παρελκόμενα, εγγύηση 1 έτους στα εξαρτήματα και την εργασία, εγκατάσταση και κατάρτιση	9002033

Για τις τρέχουσες πληροφορίες άδειας και αποποιήσεις σχετικά με συγκεκριμένα προϊόντα, ανατρέξτε στο σχετικό εγχειρίδιο ή οδηγίες χρήσης του kit QIAGEN. Τα εγχειρίδια και οι οδηγίες χρήσης των kit QIAGEN είναι διαθέσιμα στη διεύθυνση www.qiagen.com. Μπορείτε επίσης να τα ζητήσετε από τις τεχνικές υπηρεσίες της QIAGEN ή τον τοπικό σας αντιπρόσωπο.

Αυτή η σελίδα έχει παραμείνει σκοπίμως κενή

Αυτό το προϊόν προορίζεται για in vitro διαγνωστική χρήση. Τα προϊόντα *ipsogen* δεν επιτρέπεται να μεταπωληθούν, να τροποποιηθούν για μεταπώληση ή να χρησιμοποιηθούν για την κατασκευή εμπορικών προϊόντων χωρίς την έγγραφη έγκριση της QIAGEN.

Οι πληροφορίες στο παρόν έγγραφο μπορεί να αλλάξουν χωρίς προειδοποίηση. Η QIAGEN δεν αναλαμβάνει καμία ευθύνη για τυχόν σφάλματα που μπορεί να περιέχονται σε αυτό το έγγραφο. Αυτό το έγγραφο θεωρείται ότι είναι πλήρες και ακριβές κατά το χρόνο της δημοσίευσής. Σε καμία περίπτωση η QIAGEN δεν ευθύνεται για τυχόν ειδικές, πολλαπλές ή επακόλουθες ζημιές σε σχέση με, ή που προκύπτουν από τη χρήση αυτού του εγγράφου.

Τα προϊόντα *ipsogen* είναι εγγυημένα ότι πληρούν τις δηλωμένες προδιαγραφές τους. Η αποκλειστική υποχρέωση της QIAGEN και η αποκλειστική αποκατάσταση του πελάτη περιορίζονται στην αντικατάσταση των προϊόντων δωρεάν σε περίπτωση που η απόδοση των προϊόντων αυτών δεν είναι η προβλεπόμενη.

Εμπορικά σήματα: QIAGEN®, *ipsogen*®, *ProfileQuant*®, Rotor-Gene® (όμιλος QIAGEN), ABI PRISM®, Applied Biosystems®, FAM™, RNaseOUT™, SuperScript®, SYBR®, TAMRA™ (Life Technologies Corporation), Agilent®, Bioanalyzer® (Agilent Technologies, Inc), Excel® (Microsoft Corporation), LightCycler®, TaqMan® (όμιλος Roche).

Άδεια περιορισμένης χρήσης

Η χρήση αυτού του προϊόντος ισοδυναμεί με την αποδοχή από πλευράς οποιουδήποτε αγοραστή ή χρήστη του κιτ *ipsogen* WT1 *ProfileQuant* των εξής όρων:

1. Η χρήση του κιτ *ipsogen* WT1 *ProfileQuant* επιτρέπεται μόνο σύμφωνα με το *Εγχειρίδιο κιτ ipsogen WT1 ProfileQuant* και μόνο μαζί με τα συστατικά που περιέχει το κιτ. Η QIAGEN δεν παρέχει άδεια χρήσης υπό οποιαδήποτε πνευματική ιδιοκτησία της για τη χρήση ή ενσωμάτωση των παρεχόμενων συστατικών αυτού του κιτ σε οποιαδήποτε συστατικά που δεν περιλαμβάνονται σε αυτό το κιτ, εκτός και αν περιγράφεται διαφορετικά στο *Εγχειρίδιο κιτ ipsogen WT1 ProfileQuant* και πρόσθετα πρωτόκολλα στη διεύθυνση www.qiagen.com.
2. Με την εξαίρεση των ρητά αναφερόμενων αδειών, η QIAGEN δεν παρέχει καμία εγγύηση πως αυτό το κιτ και/ή η χρήση/-εις του δεν παραβιάζουν τα δικαιώματα τρίτων.
3. Αυτό το κιτ και τα συστατικά του φέρουν άδεια χρήσης για μια μόνο χρήση και δεν επιτρέπεται η επανάχρηση, η εκ νέου επεξεργασία ή η μεταπώλησή του.
4. Η QIAGEN αποποιείται ειδικά οποιοσδήποτε άλλες άδειες, ρητές ή έμμεσες εκτός από αυτές που αναφέρονται ρητά.
5. Ο αγοραστής ή ο χρήστης του κιτ συμφωνεί να μην προβεί και να μην επιτρέψει σε κανέναν άλλο να προβεί σε οποιοσδήποτε ενέργειες που θα μπορούσαν να οδηγήσουν σε ή να διευκολύνουν οποιοσδήποτε πράξεις που απαγορεύονται σύμφωνα με τα προαναφερθέντα. Η QIAGEN διατηρεί το δικαίωμα να επιβάλλει τις απαγορεύσεις της παρούσας Άδειας περιορισμένης χρήσης σε οποιοδήποτε δικαστήριο και θα αποζημιωθεί για όλες τις δαπάνες ανάκρισης και δικαστηρίου, συμπεριλαμβανομένων των δαπανών υπεράσπισης στο πλαίσιο οποιασδήποτε ενέργειας για την επιβολή αυτής της Άδειας περιορισμένης χρήσης ή οποιοδήποτε των πνευματικών δικαιωμάτων της σχετικά με το κιτ και/ή τα συστατικά του.

Για τους ενημερωμένους όρους της άδειας, βλ. www.qiagen.com.

HB-1355-002 © 2013–2015 QIAGEN, με την επιφύλαξη κάθε δικαιώματος.

www.qiagen.com

Australia ■ techservice-au@qiagen.com

Austria ■ techservice-at@qiagen.com

Belgium ■ techservice-bnl@qiagen.com

Brazil ■ suportetecnico.brasil@qiagen.com

Canada ■ techservice-ca@qiagen.com

China ■ techservice-cn@qiagen.com

Denmark ■ techservice-nordic@qiagen.com

Finland ■ techservice-nordic@qiagen.com

France ■ techservice-fr@qiagen.com

Germany ■ techservice-de@qiagen.com

Hong Kong ■ techservice-hk@qiagen.com

India ■ techservice-india@qiagen.com

Ireland ■ techservice-uk@qiagen.com

Italy ■ techservice-it@qiagen.com

Japan ■ techservice-jp@qiagen.com

Korea (South) ■ techservice-kr@qiagen.com

Luxembourg ■ techservice-bnl@qiagen.com

Mexico ■ techservice-mx@qiagen.com

The Netherlands ■ techservice-bnl@qiagen.com

Norway ■ techservice-nordic@qiagen.com

Singapore ■ techservice-sg@qiagen.com

Sweden ■ techservice-nordic@qiagen.com

Switzerland ■ techservice-ch@qiagen.com

UK ■ techservice-uk@qiagen.com

USA ■ techservice-us@qiagen.com

