

Czerwiec 2018 r.

ipsogen[®] BCR-ABL1 MbcR RGGQ RT-PCR Kit — Instrukcja obsługi



24

Wersja 1

IVD

Ilościowa diagnostyka in vitro

Do użytku z aparatem Rotor-Gene[®] Q MDx 5plex HRM

CE

REF

670923



QIAGEN GmbH, QIAGEN Strasse 1, 40724 Hilden,
NIEMCY

R4 **MAT**

1114278PL

Spis treści

Przeznaczenie.....	5
Podsumowanie i objaśnienie.....	5
Podstawowe informacje na temat przewlekłej białaczki szpikowej.....	5
Monitorowanie choroby.....	6
Zasada procedury.....	8
Dostarczone materiały.....	11
Zawartość zestawu.....	11
Materiały wymagane, ale niedostarczone.....	12
Ostrzeżenia i środki ostrożności.....	15
Informacje dotyczące bezpieczeństwa.....	15
Ogólne środki ostrożności.....	15
Przechowywanie i sposób postępowania z odczynnikami.....	17
Warunki transportu.....	17
Warunki przechowywania.....	18
Stabilność.....	18
Przechowywanie i sposób postępowania z próbkami.....	19
Próbki krwi pełnej.....	19
Próbki RNA.....	19
Procedura.....	20
Protokół lizy erytrocytów w celu izolacji całkowitych leukocytów z krwi pełnej.....	20
Izolacja całkowitego RNA.....	22
Określenie jakości i oznaczenie ilościowe RNA.....	25

Założenie RNA.....	26
Odwrotna transkrypcja	29
Analiza ręczna: reakcja qPCR w aparacie Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM z rotorem na 72 próbki i oprogramowaniem RGQ	32
Analiza zautomatyzowana: reakcja qPCR w aparacie Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM z rotorem na 72 próbki i oprogramowaniem RGAM.....	38
Interpretacja wyników w oprogramowaniu RGQ.....	49
Zasada analizy danych.....	49
Krzywe wzorcowe i kryteria jakości mające zastosowanie do danych surowych	50
Interpretacja wyników w oprogramowaniu RGAM	58
Rozwiązywanie problemów	67
Kontrola jakości	69
Ograniczenia	69
Parametry skuteczności	71
Granica próby ślepej	71
Granica wykrywalności.....	71
Liniowość	71
Powtarzalność i odtwarzalność	72
Substancje zakłócające.....	72
Walidacja kliniczna i porównanie metod.....	73
Badanie zgodności: Wzorec pojedynczego plazmidu ERM-AD623 BCR-ABL1 (IRMM) względem wzorca pojedynczego plazmidu <i>ipsogen</i> (QIAGEN).....	75
Literatura	78
Symbole	80
Informacje dotyczące zamawiania.....	81

Historia zmian w instrukcji	83
-----------------------------------	----

Przeznaczenie

Zestaw *ipsogen BCR-ABL1 MbcR RGQ RT-PCR Kit* jest testem ilościowej diagnostyki *in vitro* przeznaczonym do pomiaru transkryptów b3a2 (e14a2) i b2a2 (e13a2) genu fuzyjnego BCR-ABL1 w RNA całkowitym wyizolowanym z krwi pełnej.

Zestaw *ipsogen BCR-ABL1 MbcR RGQ RT-PCR Kit* jest przeznaczony do monitorowania głębokiej odpowiedzi molekularnej u pacjentów z rozpoznaniem przewlekłej białaczki szpikowej (chronic myeloid leukemia, CML) w fazie przewlekłej z obecnością chromosomu Filadelfia (Philadelphia chromosome positive, Ph+) i białka p210.

Zestaw ten jest skalibrowany względem międzynarodowego genetycznego panelu referencyjnego Światowej Organizacji Zdrowia (World Health Organization, WHO).

Podsumowanie i objaśnienie

Podstawowe informacje na temat przewlekłej białaczki szpikowej

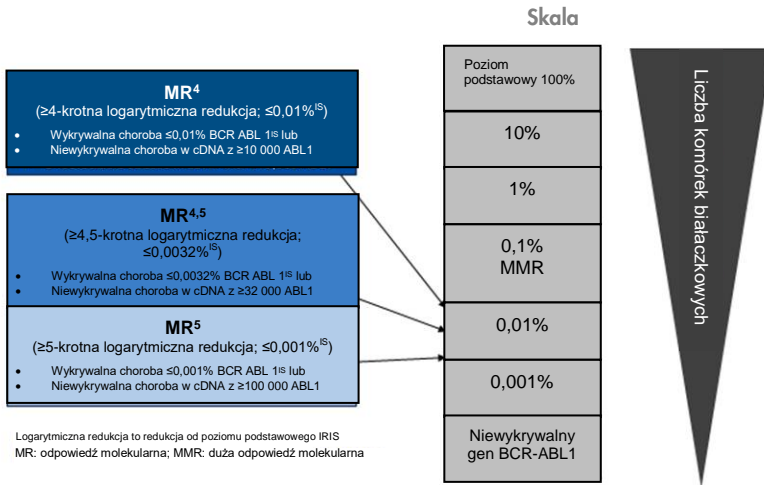
CML należy do grupy nowotworów mieloproliferacyjnych i jest obserwowana w >90% przypadków charakteryzujących się obecnością chromosomu Filadelfia (Philadelphia chromosome, Ph CHRS). Chromosom ten powstaje w wyniku translokacji wzajemnej zachodzącej między długimi ramionami chromosomu 9 i 22, t(9;22), przy czym region złamań chromosomu (breakpoint cluster region, BCR) znajduje się na chromosomie 22, a onkogen c-ABL na chromosomie 9. Odpowiedni gen fuzyjny, BCR-ABL1, ulega transkrypcji do mRNA o długości 8,5 kb, tworząc 2 warianty połączeń genów, b2a2 (obserwowany w 40% przypadków) i b3a2 (obecny w 55% przypadków). Ten gen fuzyjny koduje białko chimeryczne, p210, charakteryzujące się podwyższoną aktywnością kinazy tyrozynowej. Transkrypty b2a3 i b3a3 są obecne w mniej niż 5% przypadków. Chromosom Ph można

również wykryć u 35% dorosłych pacjentów z ostrą białaczką limfoblastyczną (acute lymphoblastic leukemia, ALL).

Co roku wykrywanych jest około 1–2 przypadków CML na 100 000 osób. CML stanowi 20% wszystkich przypadków białaczek wśród osób dorosłych. Klinicznie charakteryzuje się ona nadmiarem komórek mieloidalnych, które różnicują się i funkcjonują prawidłowo. W 90–95% przypadków CML pacjenci zostaną zdiagnozowani w przewlekłej lub stabilnej fazie choroby. W przeszłości u pacjentów dochodziło do progresji choroby w przełom blastyczny i ostrą białaczkę kończącą się zgonem po średnio 4–6 latach. Pojawienie się leku imatynib oraz, od niedawna, inhibitorów kinazy tyrozynowej (tyrosine kinase inhibitors, TKI) drugiej generacji diametralnie zmieniło naturalny przebieg choroby. Obecnie większość pacjentów pozostaje w fazie remisji, co stwarza potrzebę kontroli i monitorowania choroby w perspektywie długoterminowej.

Monitorowanie choroby

Obecnym celem terapii CML jest osiągnięcie 100% przeżywalności i wyeliminowanie obecności chromosomu Ph. Z tego względu monitorowanie choroby jest kluczowym narzędziem do oceny odpowiedzi na leczenie i możliwie najszybszego wykrycia nawrotu choroby u pacjentów. Leczenie inhibitorami TKI zwykle powoduje postęp od remisji hematologicznej do cytogenetycznej, a następnie molekularnej, z równoczesnym zmniejszeniem liczby komórek białaczkowych oraz transkryptów BCR-ABL1, tak jak przedstawiono na Ryc. 1.



Ryc. 1. Definicja odpowiedzi molekularnej. Na podstawie publikacji 1, 2 i 9. MR, molecular response: odpowiedź molekularna. MMR, : major molecular response: duża odpowiedź molekularna.

Metodą referencyjną wykorzystywaną do oszacowania nasilenia nowotworu u pacjentów z CML jest standardowa analiza cytogenetyczna (technika prążków G) komórek szpiku kostnego (bone marrow, BM) w metafazie. Odpowiedź cytogenetyczna jest oceniana na podstawie co najmniej 20 komórek szpiku w metafazie. Poziom odpowiedzi cytogenetycznej jest szacowany na podstawie odsetku komórek w metafazie, w których obecny jest chromosom Ph (3). Jednakże na ocenę tę wpływa skuteczność wykonywania analizy i doświadczenie laboratoryjne i ma ona niską czułość — na poziomie 5% w przypadku analizy 20 komórek w metafazie.

Oznaczenie ilościowe mRNA genu BCR-ABL1 Mbcr w próbkach krwi obwodowej (peripheral blood, PB) za pomocą ilościowej reakcji łańcuchowej polimerazy (quantitative polymerase chain reaction, qPCR) w czasie rzeczywistym określa odpowiedź molekularną i obecnie należy do technik monitorowania choroby stosowanych w przypadku CML. Metoda ta jest mniej inwazyjna niż standardowa analiza cytogenetyczna komórek szpiku kostnego w metafazie i charakteryzuje się większą czułością.

Niedawno uaktualniono również zalecenia dotyczące monitorowania choroby CML, uwzględniając nowe dane kliniczne z badań leków, wyższą skuteczność kliniczną inhibitorów TKI drugiej generacji oraz udoskonalenia techniczne oznaczeń ilościowych genu BCR-ABL1, a wszystko to celem ulepszonych monitorowania choroby. W szczególności inhibitory TKI drugiej generacji doprowadziły do uzyskania bardziej znaczącej odpowiedzi molekularnej u dużej liczby pacjentów z CML, którzy osiągnęli stan definiowany jako głęboka odpowiedź molekularna, i odpowiadają za redukcję obciążenia transkryptem BCR-ABL1 do poziomu poniżej 0,01% (MR4,0) lub 0,0032% (MR4,5). Możliwość dokładnego oznaczenia ilościowego bardzo niskich poziomów obciążenia transkryptem BCR-ABL1 może mieć znaczenie kliniczne, gdyż w badaniach obserwacyjnych wykazano, że u pacjentów, którzy osiągnęli trwałą odpowiedź molekularną MR4,5, można bezpiecznie przerwać podawanie inhibitorów TKI (4). Trwają jednak dodatkowe badania kliniczne w celu potwierdzenia tych wyników.

Najnowsze zalecenia dotyczące definicji odpowiedzi oraz monitorowania pacjentów z CML przyjmujących inhibitory TKI są opracowane przez ekspertów ELN (3).

Międzynarodowi eksperci podejmują wysiłki w celu ujednoczenia badań transkryptu BCR-ABL1 M_{bcr} i raportowania wyników na płaszczyźnie technicznej (5–7). Ponadto, aby umożliwić łatwą standaryzację oznaczenia ilościowego transkryptu BCR-ABL1, w ostatnim czasie przeprowadzono walidację panelu referencyjnego pod kontrolą WHO (8).

Zasada procedury

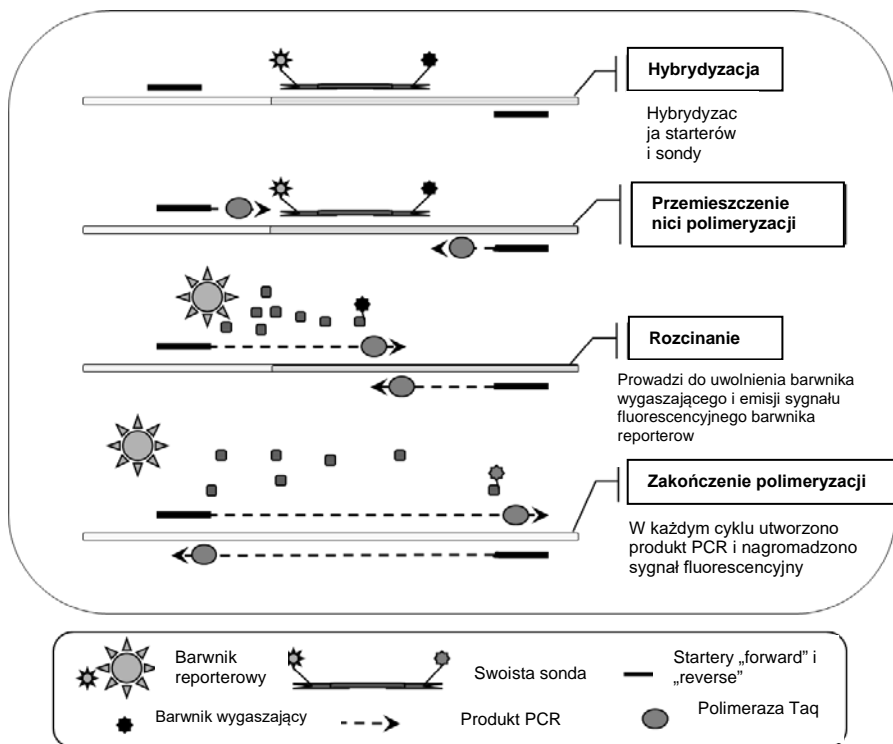
Technika qPCR umożliwia precyzyjne ilościowe oznaczenie produktów PCR podczas fazy wykładniczej procesu amplifikacji reakcji PCR. Dane z reakcji qPCR można uzyskać szybko, bez konieczności ich przetwarzania po reakcji PCR, poprzez detekcję sygnałów fluorescencyjnych w czasie rzeczywistym podczas i/lub po przeprowadzeniu cykli reakcji PCR, tym samym znacznie zmniejszając ryzyko zanieczyszczenia produktów PCR. Obecnie dostępne są trzy główne techniki qPCR: analiza qPCR z wykorzystaniem barwnika SYBR®

Green I, analiza qPCR z wykorzystaniem sond hydrolitycznych oraz analiza qPCR z wykorzystaniem sond hybrydacyjnych.

W tym oznaczeniu wykorzystywana jest technologia qPCR oparta na hydrolizie oligonukleotydów wyznakowanych dwoma barwnikami. Podczas reakcji PCR startery „forward” i „reverse” hybrydują do swoistej sekwencji. W tej samej mieszaninie znajduje się oligonukleotyd wyznakowany dwoma barwnikami. Ta sonda, która składa się z oligonukleotydu wyznakowanego barwnikiem reporterowym (ang. reporter) na końcu 5' i barwnikiem wygaszającym (ang. quencher) na końcu 3' (downstream), hybryduje do sekwencji docelowej w obrębie produktu PCR. W analizie qPCR z sondami hydrolitycznymi wykorzystywana jest aktywność 5'→3' egzonukleazy polimerazy DNA *Thermus aquaticus* (*Taq*). Jeśli sonda jest nienaruszona, bliskość barwnika reporterowego i barwnika wygaszającego powoduje wyłączenie fluorescencji barwnika reporterowego głównie poprzez przeniesienie energii typu Förstera.

Podczas reakcji PCR, jeśli sekwencja docelowa jest obecna, sonda swoiście hybryduje między miejsca starterów „forward” i „reverse”. Polimeraza DNA, dzięki aktywności 5'→3' egzonukleazy, rozcina sondę między barwnikiem reporterowym i barwnikiem wygaszającym, tylko jeśli sonda zhybryduje do sekwencji docelowej. Fragmenty sondy są następnie wypierane z sekwencji docelowej, a polimeryzacja nici jest kontynuowana. Koniec 3' sondy jest blokowany, aby uniknąć wydłużania sondy podczas reakcji PCR (Ryc. 2). Ten proces zachodzi podczas każdego cyklu i nie zakłóca gromadzenia produktu w sposób wykładniczy.

Wzrost sygnału fluorescencyjnego jest wykrywany wyłącznie wtedy, gdy sekwencja docelowa jest komplementarna z sondą i, co za tym idzie, amplifikowana podczas reakcji PCR. Ze względu na powyższe wymogi amplifikacja nieswoista nie jest wykrywana. Wzrost fluorescencji jest więc wprost proporcjonalny do amplifikacji sekwencji docelowej podczas reakcji PCR.



Ryc. 2. Zasada reakcji. Całkowite RNA ulega odwrotnej transkrypcji, a utworzone cDNA jest amplifikowane za pomocą reakcji PCR z parą swoistych starterów i swoistą sondą wewnętrzną znakowaną dwoma barwnikami (FAM™–BHQ®-1). Sonda przyłącza się do amplikonu podczas każdego etapu hybrydyzacji reakcji PCR. Gdy polimeraza Taq wydłuża nić od startera przyłączonego do amplikonu, powoduje przemieszczenie końca 5' sondy, który jest następnie rozkładany dzięki aktywności 5'→3' egzonukleazy polimerazy DNA Taq. Rozcinanie trwa do momentu odłączenia pozostałej części sondy od amplikonu. Ten proces powoduje uwolnienie fluoroforu i barwnika wygaszającego do roztworu, rozdzielając je od siebie w przestrzeni i prowadząc do wzrostu fluorescencji emitowanej przez barwnik FAM i spadku fluorescencji emitowanej przez barwnik BHQ-1.

Dostarczone materiały

Zawartość zestawu

ipsogen BCR-ABL1 MbcR RGQ RT-PCR Kit		(24)
Nr katalogowy		670923
Liczba reakcji		24
Reagents for reverse transcription (Odczynniki do odwrotnej transkrypcji) (RT)		
Reverse transcriptase	Fioletowy	100 µl
RT Mix	Fioletowy	300 µl
Odczynniki do kalibracji		
High Positive RNA Control	Biały	15 µl x 3
Low Positive RNA Control	Biały	15 µl x 3
IS-MMR Calibrator	Biały	15 µl x 3
SP1-BCR-ABL MbcR and ABL: MbcR and ABL1 Single Plasmid Standard Dilution (10 ¹ kopii/5 µl)	Żółty	35 µl
SP2-BCR-ABL MbcR and ABL: MbcR and ABL1 Single Plasmid Standard Dilution (10 ² kopii/5 µl)	Żółty	35 µl
SP3-BCR-ABL MbcR and ABL: MbcR and ABL1 Single Plasmid Standard Dilution (10 ³ kopii/5 µl)	Żółty	70 µl
SP4-BCR-ABL MbcR and ABL: MbcR and ABL1 Single Plasmid Standard Dilution (10 ⁴ kopii/5 µl)	Żółty	35 µl
SP5-BCR-ABL MbcR and ABL: MbcR and ABL1 Single Plasmid Standard Dilution (10 ⁵ kopii/5 µl)	Żółty	70 µl
SP6-BCR-ABL MbcR and ABL: MbcR and ABL1 Single Plasmid Standard Dilution (10 ⁶ kopii/5 µl)	Żółty	70 µl

Ciąg dalszy tabeli na następnej stronie

Dalsza część tabeli z poprzedniej strony

Odczynniki do reakcji qPCR		
Taq DNA polymerase (Polimeraza DNA Taq)	Miętowy	85 µl
qPCR Mix ABL1* (Mieszanina qPCR Mix ABL1)	Zielony	720 µl x 3
qPCR Mix Mbcr† (Mieszanina qPCR Mix Mbcr)	Czerwony	720 µl x 3
ipsogen <i>BCR-ABL1 Mbcr RGQ RT-PCR</i> — <i>Instrukcja obsługi</i>		1

* Zawiera mieszaninę swoistych starterów „reverse” i „forward” dla genu kontrolnego ABL1 i swoistą sondę FAM-BHQ-1.

† Zawiera mieszaninę swoistych starterów „reverse” i „forward” dla genu fuzyjnego BCR-ABL1 Mbcr i swoistą sondę FAM-BHQ-1.

Materiały wymagane, ale niedostarczone

Podczas pracy ze środkami chemicznymi należy zawsze używać odpowiedniego fartucha laboratoryjnego, rękawiczek jednorazowych i okularów ochronnych. W celu uzyskania dodatkowych informacji należy zapoznać się z kartami charakterystyki (safety data sheet, SDS) uzyskanymi od producentów poszczególnych produktów.

Odczynniki do lizy erytrocytów

- Erythrocyte Lysis (EL) Buffer (nr kat. 79217)
- 14,3-molowy β-merkaptotetanol*
- RNeasy® Midi Kit (nr kat. 75144)

* Środki chemiczne i wyposażenie zalecane do lizy erytrocytów i izolacji RNA potencjalnie mogą stwarzać zagrożenie. Przed użyciem należy upewnić się, że personel nosi odpowiednie środki ochrony indywidualnej i zastosowano odpowiednie środki ochronne.

Odczynniki do izolacji RNA całkowitego

- RNeasy Midi Kit (nr kat. 75144)
- Etanol (70-procentowy, 80-procentowy i 96–100-procentowy)
- Etap oczyszczania i zatężania RNA: RNeasy MinElute® Cleanup Kit (nr kat. 74204)
- Woda wolna od nukleaz, odpowiednia do PCR

Materiały eksploatacyjne

- Jałowe końcówki do pipet do przygotowywania reakcji PCR, wolne od nukleaz, odporne na aerozole, z filtrami hydrofobowymi
- Igła o rozmiarze 18–20 G* przymocowana do strzykawki wolnej od RNaz
- Probówki wolne od nukleaz, pojemność 0,5 ml lub 0,2 ml
- Probówki wolne od nukleaz, pojemność 1,5 ml lub 2 ml
- Probówki wirówkowe, pojemność 50 ml
- Strip Tubes and Caps 0.1 ml do aparatu Rotor-Gene Q (nr kat. 981103 lub 981106)
- Lód

Wyposażenie

- Pipety* przeznaczone do przygotowywania reakcji PCR (1–10 µl; 10–100 µl; 100–1000 µl)
- Wirówka laboratoryjna* z rotorem dla próbek reakcyjnych o pojemności 0,2 ml i 2 ml (umożliwiająca wirowanie przy 8000 x g lub 10 000 rpm)
- Spektrofotometr*

* Upewnij się, że aparaty zostały sprawdzone i skalibrowane zgodnie z wytycznymi producenta.

- Wirówka laboratoryjna* z rotorem dla probówek wirówkowych o pojemności 15 i 50 ml (umożliwiająca wirowanie przy 3000–5000 x g), umożliwiająca wirowanie w warunkach chłodniczych (4°C)
- Termomikser, podgrzewany inkubator z orbitalnym wytrząsaniem, blok grzewczy lub łaźnia wodna (do etapu odwrotnej transkrypcji)*
- Aparat Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM* (nr kat. 9002032) oraz powiązane odpowiednie materiały
Uwaga: Aparatu Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM nie można używać do etapu odwrotnej transkrypcji.

Wyposażenie do reakcji qPCR z analizą ręczną

Oprogramowanie Rotor-Gene Q w wersji 2.1.0 lub wyższej Wyposażenie do reakcji qPCR ze zautomatyzowaną analizą

- Oprogramowanie Rotor-Gene AssayManager® w wersji 2.1.x (x≥0)
- Narzędzie Rotor-Gene AssayManager Gamma Plug-in w wersji 1.0.x (x≥0)
- Profil oznaczenia Assay Profile ipsogen_BCR-ABL1Mbc(ABL)_blood_CE_V1_0_x.iap (x≥1)

Ostrzeżenia i środki ostrożności

Do diagnostyki in vitro

Informacje dotyczące bezpieczeństwa

Podczas pracy ze środkami chemicznymi należy zawsze używać odpowiedniego fartucha laboratoryjnego, rękawiczek jednorazowych i okularów ochronnych. W celu uzyskania dodatkowych informacji należy zapoznać się z odpowiednimi kartami charakterystyki (SDS). Są one dostępne w Internecie w wygodnym, kompaktowym formacie PDF pod adresem www.qiagen.com/safety. Na tej stronie można wyszukiwać, wyświetlać i drukować karty charakterystyki dla wszystkich zestawów i składników zestawów firmy QIAGEN®.

Wszystkie środki chemiczne i materiały biologiczne są potencjalnie niebezpieczne. Próbkami są potencjalnie zakaźne i należy je traktować jako materiały stwarzające zagrożenie biologiczne. Krew jest uznawana za materiał potencjalnie zakaźny. Podczas pracy z próbkami krwi pełnej należy podjąć wszystkie niezbędne środki ostrożności zalecane przez odpowiednie organy regulacyjne w kraju użytkowania.

Środki chemiczne i wyposażenie zalecane do lizy erytrocytów i izolacji RNA potencjalnie mogą stwarzać zagrożenie. Przed użyciem należy upewnić się, że personel nosi odpowiednie środki ochrony indywidualnej i zastosowano odpowiednie środki ochronne.

Ogólne środki ostrożności

Podczas przeprowadzania testów qPCR wymagane jest przestrzeganie dobrych praktyk laboratoryjnych, w tym dotyczących konserwacji sprzętu, właściwych dla biologii molekularnej i zgodnych z obowiązującymi przepisami i właściwymi normami. Składniki tego produktu wystarczają na wykonanie 24 reakcji dla każdego oznaczenia.

- Zużyte próbki i odczynniki należy utylizować zgodnie z lokalnymi przepisami dotyczącymi bezpieczeństwa.
- Odczynniki dostarczone w zestawie *ipsogen BCR-ABL1 MbcR RGQ RT-PCR Kit* są optymalnie rozcieńczone. Nie należy dalej rozcieńczać odczynników, gdyż może to doprowadzić do utraty skuteczności.
- Wszystkie odczynniki dostarczone w zestawie *ipsogen BCR-ABL1 MbcR RGQ RT-PCR Kit* są przeznaczone do stosowania wyłącznie z odczynnikami z tego samego zestawu. Nie należy wymieniać odczynników między zestawami *ipsogen BCR-ABL1 MbcR RGQ RT-PCR Kit*, gdyż może to wpłynąć na skuteczność.
- Informacje o dodatkowych ostrzeżeniach, środkach ostrożności i procedurach zawierają podręczniki użytkownika aparatu Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM, oprogramowania Rotor-Gene AssayManager w wersji 2.1 oraz narzędzia Gamma Plugin.
- Zmiana okresów i/lub temperatur inkubacji może spowodować otrzymanie błędnych lub sprzecznych danych.
- Nie należy używać przeterminowanych lub niewłaściwie przechowywanych składników.
- Podczas używania kontroli Positive Control należy zachować szczególną ostrożność, aby zapobiec zanieczyszczeniu krzyżowemu.
- Zachować szczególną ostrożność, aby zapobiec przenoszeniu zanieczyszczenia w postaci cDNA lub produktów PCR, które mogą spowodować otrzymanie fałszywie pozytywnego sygnału.
- Zachować szczególną ostrożność, aby zapobiec przenoszeniu zanieczyszczenia w postaci RNaz lub DNaz, które mogą spowodować rozkład matryc RNA lub cDNA.
- Nie otwierać aparatu Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM przed zakończeniem reakcji.
- Zachować ostrożność, aby zapewnić prawidłowe przebadanie próbek, zwracając szczególną uwagę na nieprawidłowe umieszczenie próbek, błędy podczas ładowania i błędy pipetowania.
- Upewnić się, że próbki są przetwarzane w systematyczny sposób, aby zapewnić prawidłową identyfikację próbek w każdym momencie, zachowując identyfikowalność.

W związku z tym zalecane jest przestrzeganie poniższych instrukcji:

- Używać sprzętu laboratoryjnego wolnego od nukleaz (dotyczy to np. pipet, końcówek do pipet, fiolek reakcyjnych)
- Aby uniknąć zanieczyszczenia krzyżowego próbek i odczynników, na każdym etapie pipetowania używać świeżych, odpornych na aerozole końcówek do pipet.
- Przygotowywać wstępne mieszaniny Master Mix na potrzeby reakcji PCR, używając przeznaczonych do tego celu materiałów (pipet, końcówek itp.) w odrębnym obszarze, do którego nie są wprowadzane żadne matryce DNA (cDNA, plazmid lub produkty reakcji PCR).
- Dodać matrycę w oddzielnej strefie (najlepiej w innym pomieszczeniu), używając przeznaczonych do tego celu materiałów (pipet, końcówek itp.).

Informacje dotyczące bezpieczeństwa specyficzne dla odczynników i zestawów używanych do przygotowania próbek zawierają odpowiednie instrukcje obsługi. Informacje dotyczące bezpieczeństwa przeznaczone dla zestawu RNeasy Midi Kit (nr kat. 75144) używanego w połączeniu z buforem Buffer EL (nr kat. 79217) zawiera dokument *RNeasy Midi/Maxi — Instrukcja obsługi* (RNeasy Midi/Maxi Handbook), a informacje dotyczące bezpieczeństwa przeznaczone dla zestawu RNeasy MinElute Cleanup Kit (nr kat. 74204) zawiera dokument *RNeasy MinElute Cleanup — Instrukcja obsługi* (RNeasy MinElute Cleanup Handbook).

Przechowywanie i sposób postępowania z odczynnikami

Warunki transportu

Zestaw *ipsogen* BCR-ABL1 Mbcr RGQ RT-PCR Kit jest transportowany na suchym lodzie. Jeśli którykolwiek składnik zestawu *ipsogen* BCR-ABL1 Mbcr RGQ RT-PCR Kit nie jest zamrożony w chwili odbioru, opakowanie zewnętrzne zostało otwarte podczas transportu lub przesyłka nie zawiera listy zawartości opakowania lub odczynników, należy skontaktować się z

działem serwisu technicznego lub lokalnym dystrybutorem firmy QIAGEN (informacje znajdują się na tylnej stronie okładki lub pod adresem www.qiagen.com).

Warunki przechowywania

Niezwłocznie po otrzymaniu zestawu *ipsogen* BCR-ABL1 MbcR RGQ RT-PCR Kit należy go umieścić w temperaturze od -30°C do -15°C w zamrażarce o stałej temperaturze. Należy zachować ostrożność, aby chronić mieszaniny qPCR przed światłem.

Informacje dotyczące przechowywania odczynników i zestawów używanych do przygotowania próbek: W przypadku stosowania zestawu RNeasy Midi Kit (nr kat. 75144), buforu Buffer EL (nr kat. 79217), zestawu RNeasy MinElute Cleanup Kit (nr kat. 74204) należy zapoznać się odpowiednimi instrukcjami obsługi.

Stabilność

Zestaw *ipsogen* BCR-ABL1 MbcR RGQ RT-PCR Kit zachowuje stabilność do podanej daty ważności, jeśli jest przechowywany w określonych warunkach przechowywania.

Po otwarciu odczynniki można przechowywać w ich oryginalnych opakowaniach w temperaturze od -30°C do -15°C do podanej daty ważności widocznej na opakowaniu. Nie przekraczać maksymalnej liczby pięciu cykli zamrażania-rozmrażania.

Informacje dotyczące stabilności odczynników i zestawów używanych do przygotowania próbek: W przypadku stosowania zestawu RNeasy Midi Kit (nr kat. 75144), buforu Buffer EL (nr kat. 79217), zestawu RNeasy MinElute Cleanup Kit (nr kat. 74204) należy zapoznać się odpowiednimi instrukcjami obsługi.

Przechowywanie i sposób postępowania z próbkami

Zestaw *ipsogen* BCR-ABL1 MbcR RGQ RT-PCR Kit jest przeznaczony do stosowania z próbkami RNA wyizolowanego z krwi pełnej. Wszystkie próbki należy traktować jako materiał potencjalnie zakaźny.

Próbki krwi pełnej

- Próbki krwi pełnej należy poddać antykoagulacji przy użyciu soli potasowej EDTA (K₂-EDTA), i przechowywać w temperaturze 2–8°C przez maksymalnie 4 dni przed izolacją RNA.
- Nie używać zamrożonej krwi.
- Oznakowywać i przechowywać próbki krwi oraz obchodzić się z nimi w sposób kontrolowany, zgodnie z lokalnymi procedurami.

Uwaga: Próbki krwi pełnej należy transportować w takich samych warunkach, jak warunki przechowywania, aby uniknąć zmian temperatury.

Próbki RNA

- Po izolacji oczyszczony RNA można przechowywać w temperaturze od –30°C do –15°C lub, jeśli wymagane jest przechowywanie długoterminowe, w niższej temperaturze (od –90°C do –65°C).
- Oznakowywać i przechowywać próbki RNA oraz obchodzić się z nimi w sposób kontrolowany, zgodnie z lokalnymi procedurami.

Uwaga: Próbki RNA należy transportować w takich samych warunkach, jak warunki przechowywania, aby uniknąć zmian temperatury podczas przechowywania i transportu.

Procedura

Całkowite RNA należy oczyszczać z 10 ml obwodowej krwi pełnej pobranej do probówek EDTA.

- Upewnić się, że odczynniki, które mają być używane do lizy erytrocytów, izolacji RNA i zatężania RNA nie są przeterminowane i były transportowane i przechowywane w odpowiednich warunkach.
- Użyć zestawu RNeasy Midi Kit (nr kat. 75144) i buforu Buffer EL przeznaczonego do lizy erytrocytów (nr kat. 79217) do oczyszczenia RNA z obwodowej krwi pełnej.

Protokół lizy erytrocytów w celu izolacji całkowitych leukocytów z krwi pełnej

Ten protokół jest przeznaczony do izolacji całkowitych leukocytów z 10 ml ludzkiej krwi pełnej za pomocą buforu Buffer EL (nr kat. 79217).

Uwaga: Ten protokół nie jest przeznaczony do użytku z zamrożonymi próbkami krwi pełnej.

Ważne informacje przed rozpoczęciem

- Krew i płyny ustrojowe pochodzenia ludzkiego są uznawane za materiały potencjalnie zakaźne. Podczas pracy z próbkami krwi pełnej należy podjąć wszystkie niezbędne środki ostrożności zalecane przez odpowiednie organy regulacyjne w kraju użytkowania.
- Podczas przechowywania buforu Buffer RLT może wytrącić się osad. W razie potrzeby rozpuścić osad, ogrzewając odczynnik, a następnie umieścić go w temperaturze pokojowej.
- Etap lizy erytrocytów należy wykonywać na lodzie.
- Etapy 3 i 5 tego protokołu dotyczące wirowania należy wykonywać w temperaturze 4°C w standardowej wirówce laboratoryjnej.

Czynności do wykonania przed rozpoczęciem

- Przygotować bufor Buffer RLT (dostarczony z zestawem RNeasy Midi Kit), dodając β -merkaptoetanol (β -ME): dodać 10 μ l β -ME na 1 ml buforu Buffer RLT.
- Po dodaniu β -ME bufor Buffer RLT zachowuje stabilność przez 1 miesiąc.

Uwaga: β -ME jest toksyczny; należy go dodawać pod wyciągiem i nosić odpowiednią odzież ochronną.

Uwaga: Bufor Buffer RLT zawiera izotiocyjanian guanidyny, który może tworzyć wysoce reaktywne związki w połączeniu z wybielaczem. Nie dolewać wybielacza lub roztworów kwasowych bezpośrednio do odpadów powstałych po przygotowaniu próbek.

Procedura

1. Dodaj 40 ml buforu Buffer EL do 10 ml krwi pełnej znajdującej się w pojedynczej probówce wirówkowej o pojemności 50 ml. Wymieszaj, odwracając probówkę przez krótki czas.
2. Inkubuj przez 15 minut na lodzie. Podczas inkubacji dwukrotnie wymieszaj, odwracając probówkę przez krótki czas.

Uwaga: Podczas inkubacji mętna zawiesina staje się przezroczysta, co wskazuje lizę czerwonych krwinek.

3. Wiruj przy 400 x g przez 10 minut w temperaturze 4°C. Całkowicie usuń supernatant. Zachowaj osad leukocytów.

Uwaga: Po odwirowaniu leukocyty utworzą osad. Należy upewnić się, że usunięto cały supernatant. Śladowe ilości czerwonych krwinek, które mogą pozostać na tym etapie, zostaną usunięte w kolejnych etapach.

Niecałkowite usunięcie supernatantu doprowadzi do inhibicji lizy i rozcieńczenia lizatu, zakłócając warunki wiązania RNA do membrany RNeasy. Oba zjawiska mogą spowodować zmniejszenie uzysku RNA.

4. Dodaj 20 ml buforu Buffer EL do osadu leukocytów i zawieś go, pipetując w górę i w dół.
5. Wiruj przy 400 x g przez 10 minut w temperaturze 4°C. Całkowicie usuń supernatant. Zachowaj osad leukocytów.

Uwaga: Kolejne etapy wirowania (np. izolacja RNA) należy wykonywać w temperaturze 20–25°C.

6. Odklej osad leukocytów, lekko stukając probówkę, do której dodano 4 ml buforu Buffer RLT z dodatkiem β -ME. Wytrząsaj lub pipetuj, aby wymieszać.

Uwaga: Przed użyciem buforu Buffer RLT należy upewnić się, że dodano do niego β -ME.

7. Rozbić komórki, używając standardowego homogenizatora typu rotor-stator przez co najmniej 45 sekund przy pełnej prędkości do całkowitego zhomogenizowania próbki. Można również wytrząsać próbkę przez 10 sekund, a następnie co najmniej 10 razy przepuścić lizat przez igłę o rozmiarze 18–20 G przymocowaną do strzykawki wolnej od RNaz.

Uwaga: Niecałkowite rozbicie spowoduje znaczące obniżenie uzysków z powodu zatkania kolumny RNeasy. Rozbicie komórek homogenizatorem typu rotor-stator zwykle powoduje otrzymanie wyższych uzysków całkowitego RNA niż w przypadku zastosowania innych metod homogenizacji.

Uwaga: Po rozbiciu próbki można przechowywać w temperaturze od –90°C do –65°C w buforze do lizy. Zamrożone próbki zachowują stabilność przez wiele miesięcy.

Izolacja całkowitego RNA

Ten protokół jest przeznaczony do izolacji całkowitego RNA komórkowego z lizatu zhomogenizowanych leukocytów zawieszonych w 4 ml mieszaniny RLT/ β -ME.

Ważne informacje przed rozpoczęciem

- Trawienie DNazą nie jest wymagane, gdyż technologia membrany krzemionkowej RNeasy skutecznie usuwa większość DNA.
- Bufory Buffer RLT i Buffer RW1 zawierają sól guanidyny i z tego względu nie są zgodne z odczynnikami dezynfekującymi, które zawierają wybielacz. Guanidyna jest czynnikiem drażniącym. Podjąć odpowiednie środki ostrożności i nosić rękawiczki podczas pracy.
- Protokół RNeasy należy wykonywać w temperaturze pokojowej. Podczas wykonywania procedury należy pracować szybko.
- Wszystkie etapy wirowania są przeprowadzane w temperaturze 20–25°C. Należy upewnić się, że wirówka nie schłodzi się do temperatury poniżej 20°C.
- Podczas każdego etapu wirowania cała objętość musi przejść przez kolumnę. Może być konieczne powtórne wirowanie.

Czynności do wykonania przed rozpoczęciem

- W razie potrzeby przed rozpoczęciem protokołu izolacji RNA należy rozmrozić lizat leukocytów w temperaturze pokojowej.
- Przygotować po 4 ml 70-procentowego etanolu na próbkę.
- Bufor Buffer RPE jest dostarczany w postaci koncentratu. Przed pierwszym użyciem dodać 4 objętości etanolu (96–100-procentowego), zgodnie z instrukcją na butelce, aby uzyskać roztwór roboczy.

Procedura

1. Dodaj 4 ml 70-procentowego etanolu do lizatu, a następnie dokładnie wymieszaj, energicznie wstrząsając fiolką. Nie wiruj.

Uwaga: Po dodaniu etanolu może wytrącić się widoczny osad. Całkowicie rozpuścić osad, energicznie wstrząsając fiolką, a następnie niezwłocznie przejść do etapu 2. Niewystarczające rozpuszczenie osadu może spowodować zanieczyszczenie próbki przez DNA i doprowadzić do otrzymania nieczystego całkowitego RNA.

2. Nanieś próbkę, w tym osad (jeśli się wytrącił), na kolumnę RNeasy Midi Column umieszczoną w probówce wirówkowej o pojemności 15 ml (dostarczona). Delikatnie zamknij probówkę i wiruj przez 5 minut przy 4000 x g. Wyrzuć przesącz.

Uwaga: Maksymalna objętość, którą można nanieść, wynosi 4 ml. Jeśli objętość przekracza 4,0 ml, należy kolejno ładować porcje na kolumnę RNeasy Column i wirować, tak jak powyżej. Po każdym etapie wirowania wyrzucić przesącz.

Użyć tej samej probówki wirówkowej w etapie 3.

3. Dodaj 4 ml buforu Buffer RW1 na kolumnę RNeasy Column. Delikatnie zamknij probówkę wirówkową, a następnie wiruj przez 5 minut przy 4000 x g, aby przepłukać kolumnę. Wyrzuć przesącz.

Uwaga: Przesącz zawiera bufor Buffer RLT lub bufor Buffer RW1 i z tego względu nie jest zgodny z wybielaczem.

Użyć tej samej probówki wirówkowej w etapie 4.

4. Dodaj 2,5 ml buforu Buffer RPE na kolumnę RNeasy Column. Delikatnie zamknij probówkę wirówkową, a następnie wiruj przez 2 minuty przy 4000 x g, aby przepłukać kolumnę.

Uwaga: Bufor Buffer RPE jest dostarczany w postaci koncentratu. Przed użyciem buforu Buffer RPE należy upewnić się, że dodano do niego etanol.

Użyć tej samej probówki wirówkowej w etapie 5. Nie należy wyrzucać przesączu.

5. Dodaj kolejne 2,5 ml buforu Buffer RPE na kolumnę RNeasy Column. Delikatnie zamknij probówkę wirówkową, a następnie wiruj przez 5 minut przy 4000 x g, aby osuszyć membranę z żelu krzemionkowego RNeasy.

Uwaga: Osuszenie membrany RNeasy jest istotne, gdyż pozostałości etanolu mogą zakłócać dalsze reakcje. Wykonanie tego wirowania gwarantuje, że etanol nie zostanie przeniesiony podczas elucji.

Uwaga: Po odwirowaniu należy ostrożnie wyciągnąć kolumnę RNeasy z probówki wirówkowej, tak aby kolumna nie dotknęła przesącza, gdyż może to spowodować przeniesienie etanolu.

6. W celu elucji przenieś kolumnę RNeasy Column do nowej probówki zbiorczej o pojemności 15 ml (dostarczona). Za pomocą pipety nanieś 200 µl wody wolnej od RNaz bezpośrednio na membranę z żelu krzemionkowego RNeasy. Delikatnie zamknij probówkę. Pozostaw na 1 minutę, a następnie wiruj przez 3 minuty przy 4000 x g.
7. Powtórz etap elucji (etap 6), używając eluatu z etapu 6, a następnie wiruj przez 5 minut przy 4000 x g.

Uwaga: W celu przechowywania długoterminowego RNA można umieścić w temperaturze od -90°C do -65°C .

Określenie jakości i oznaczenie ilościowe RNA

Jakość oznaczenia jest w dużym stopniu uzależniona od jakości wejściowego RNA. Przed wykonaniem analizy zalecamy ocenę oczyszczonego RNA za pomocą elektroforezy w żelu agarozowym lub analizy spektrofotometrycznej.

- Do skalibrowania spektrofotometru należy użyć ślepej próby — odpowiedniej do reakcji PCR wody wolnej od nukleaz.
- Wartość OD równa 1,0 przy 260 nm to równowartość około 40 µg/ml jednoniciowego RNA.
- Stosunek $\text{OD}_{260}/\text{OD}_{280}$ między 1,8 a 2,1 wskazuje na RNA o wysokiej jakości.

Do wykonania etapu RT wymagane jest RNA o stężeniu 200 ng/μl. Jeśli stężenie RNA w eluacie jest niższe niż 200 ng/μl, należy je zwiększyć, używając zestawu RNeasy MinElute Cleanup Kit (QIAGEN, nr kat. 74204).

Jeśli stężenie RNA w eluacie przekracza górny limit zakresu, należy dostosować stężenie do 200 ng/μl, używając wody wolnej od RNaz.

Uwaga: Po normalizacji należy sprawdzić stężenie RNA.

Zatężanie RNA

Ten protokół jest zoptymalizowany w celu zatężenia RNA.

Ważne informacje przed rozpoczęciem

- Nie jest wymagane wykonanie trawienia DNazą, gdyż technologia membrany krzemionkowej RNeasy skutecznie usuwa większość DNA.
- Bufor Buffer RLT zawiera sól guanidyny i z tego względu nie jest zgodny z odczynnikami dezynfekującymi, które zawierają wybielacz.
- Wszystkie etapy procedury należy przeprowadzać w temperaturze pokojowej (15–25°C). Podczas wykonywania procedury należy pracować szybko.
- Wszystkie etapy wirowania należy przeprowadzać w temperaturze 20–25°C w standardowej mikrowirówce. Upewnić się, że wirówka nie schłodzi się poniżej temperatury 20°C.
- Podczas przechowywania buforu Buffer RLT może wytrącić się osad. W razie potrzeby rozpuścić osad, ogrzewając odczynnik, a następnie umieścić go w temperaturze pokojowej (15–25°C).

Czynności do wykonania przed rozpoczęciem

- Przygotować po 500 µl 80-procentowego etanolu na każdą próbkę RNA, która ma zostać zatężona.
- Bufor Buffer RPE jest dostarczany w postaci koncentratu. Przed pierwszym użyciem dodać 4 objętości etanolu (96–100-procentowego), zgodnie z instrukcją na butelce, aby uzyskać roztwór roboczy.
- Przed rozpoczęciem zmontować kolumny w temperaturze pokojowej.
- Zmierzyć objętość próbek, które mają zostać poddane procedurze, a następnie dostosować końcową objętość do 200 µl.

Procedura

1. Po dostosowaniu objętości próbki do 200 µl za pomocą wody wolnej od RNaz dodaj 700 µl buforu Buffer RLT i dobrze wymieszaj.
2. Dodaj 500 µl 96–100-procentowego etanolu do rozcieńczonego RNA i dobrze wymieszaj, używając pipety. Nie wiruj. Niezwłocznie przejdź do etapu 3.
3. Przenieś maksymalnie 700 µl próbki na kolumnę RNeasy MinElute Spin Column umieszczoną w probówce zbiorczej o pojemności 2 ml (dostarczona). Delikatnie zamknij wieczko i wiruj przez 15 sekund przy $\geq 8000 \times g$ ($\geq 10\,000$ rpm). Wyrzuć przesącz. Przenieś pozostałą objętość próbki (maksymalnie 700 µl) i powtórz wirowanie. Wyrzuć przesącz.

Uwaga: Przesącz zawiera bufor Buffer RLT i z tego względu nie jest zgodny z wybielaczem. Informacje dotyczące bezpieczeństwa znajdują się w części „Ostrzeżenia i środki ostrożności”, strona 15.

4. Umieść kolumnę RNeasy MinElute Spin Column w nowej probówce zbiorczej o pojemności 2 ml (dostarczona).

5. Dodaj 500 µl ml buforu Buffer RPE na kolumnę wirówkową. Delikatnie zamknij wieczko i wiruj przez 15 sekund przy $\geq 8000 \times g$ ($\geq 10\,000$ rpm), aby przepłukać membranę kolumny wirówkowej. Wyrzuć przesącz.

Uwaga: Bufor Buffer RPE jest dostarczany w postaci koncentratu. Przed użyciem buforu Buffer RPE należy upewnić się, że dodano do niego etanol.

Użyć tej samej probówki zbiorczej w etapie 6.

6. Dodaj 500 µl 80-procentowego etanolu na kolumnę RNeasy MinElute Spin Column. Delikatnie zamknij wieczko i wiruj przez 2 minuty przy $\geq 8000 \times g$ ($\geq 10\,000$ rpm), aby przepłukać membranę kolumny wirówkowej. Wyrzuć przesącz i probówkę zbiorczą.

Uwaga: Przesącz zawiera bufor Buffer RLT i z tego względu nie jest zgodny z wybielaczem.

Uwaga: Po odwirowaniu należy ostrożnie wyciągnąć kolumnę wirówkową RNeasy MinElute z probówki zbiorczej, tak aby kolumna nie dotknęła przesączu. W przeciwnym razie może dojść do przeniesienia etanolu.

7. Umieść kolumnę RNeasy MinElute Spin Column w nowej probówce zbiorczej o pojemności 2 ml (dostarczona).

8. Otwórz wieczko kolumny wirówkowej i wiruj kolumnę przez 5 minut przy pełnej prędkości. Wyrzuć przesącz i probówkę zbiorczą.

Aby uniknąć uszkodzenia wieczek kolumn wirówkowych, należy włożyć kolumny wirówkowe do wirówki w taki sposób, aby między kolumnami było przynajmniej jedno puste miejsce. Obróć wieczka w taki sposób, aby były skierowane w stronę przeciwną do kierunku, w którym obraca się rotor (np. jeśli rotor obraca się w prawo, obróć wieczka w lewo).

Osuszenie membrany kolumny wirówkowej jest istotne, gdyż pozostałości etanolu mogą zakłócać dalsze reakcje. Odwirowanie kolumn wirówkowych z otwartymi wieczkami gwarantuje, że etanol nie zostanie przeniesiony podczas elucji RNA.

9. Umieść kolumnę RNeasy MinElute Spin Column w nowej probówce zbiorczej o pojemności 1,5 ml (dostarczona).

10. Dodaj 20 µl wody wolnej od RNaz bezpośrednio na środek membrany kolumny wirówkowej. Delikatnie zamknij wieczko i wiruj kolumnę przez 1 minutę przy pełnej prędkości, aby wykonać elucję RNA.
11. Po ukończeniu etapu elucji umieść próbkę na lodzie.
12. Zmierz objętość próbek, które mają zostać poddane procedurze, a następnie dostosuj objętość próbki, tak aby końcowe stężenie było równe 200 ng/µl.
W razie potrzeby szczegółowe informacje zawiera część „Określenie jakości i oznaczenie ilościowe RNA”, strona 25.

Odwrotna transkrypcja

Czynności do wykonania przed rozpoczęciem

- Rozmrozić wszystkie potrzebne składniki z wyjątkiem transkryptazy Reverse transcriptase, która musi być przechowywana w zamrażarce, gdy nie jest używana. Umieścić próbki zawierające składniki na lodzie w celu ich rozmrożenia.
Uwaga: Aby uniknąć rozkładu materiału, etap rozmrażania nie powinien trwać dłużej niż 30 minut.
- Wyczyścić obszar roboczy przeznaczony do przygotowywania mieszaniny do odwrotnej transkrypcji (reverse transcription, RT), aby uniknąć zanieczyszczenia matrycą lub nukleazami.
- Przed użyciem dobrze wymieszać zawartość probówek z odczynnikami do odwrotnej transkrypcji, próbkami RNA, kontrolami pozytywnymi i kalibratorem IS-MMR Calibrator, pipetując w górę i w dół 10 razy i krótko odwirowując. Następnie trzymać na lodzie.
- Podczas etapu odwrotnej transkrypcji należy przygotować kontrolę negatywną RT, używając wody wolnej od nukleaz, odpowiedniej do reakcji PCR.
- Wymagana ilość materiału wejściowego wynosi 3 µg RNA na próbkę.
- Zestaw *ipsogen BCR-ABL1 MbcR RGQ RT-PCR Kit* zawiera odczynniki w ilości umożliwiającej wykonanie trzech reakcji po osiem próbek.

Procedura

1. Inkubuj 15 µl każdej próbki, kontroli pozytywnej (kontrola wysoko- i niskopozytywne), wody (używanej do przygotowania kontroli negatywnej RT) i kalibratora IS-MMR przez 5 minut w temperaturze 65°C. Następnie niezwłocznie umieść na lodzie i chłódź przez co najmniej 5 minut.
2. Krótco odwiruj (około 5 sekund), aby zebrać płyn na dnie probówki. Następnie trzymać na lodzie.
3. Przygotuj opisaną niżej mieszaninę RT odpowiednio do liczby przetwarzanych próbek, kontroli i kalibratorów (Tabela 1).

Uwaga: końcowa objętość reakcji musi być równa 25 µl.

Tabela 1. Przygotowanie mieszaniny RT

Składnik	Objętość na próbkę (µl)	Mieszanina RT: 12 +1 reakcja (µl)	Stężenie końcowe
RT Mix, 3,33x	7,5	97,5	1x
Reverse transcriptase, 10x	2,5	32,5	1x
Kończowa objętość mieszaniny RT (dodawana w etapie 4)	10	130	–
Próbka, kontrola pozytywne, kalibrator IS-MMR Calibrator lub woda (z etapu 1)	15	15 na każdą	–
Łączna objętość	25	25 na każdą	–

4. Za pomocą pipety przenieś po 10 µl mieszaniny RT do każdej oznaczonej probówki zawierającej próbkę RNA, kontrola pozytywne, wodę lub kalibrator (z etapu 3).
5. Dobrze wymieszaj, pipetując w górę i w dół 10 razy, a następnie krótco odwiruj (około 5 sekund), aby zebrać płyn na dnie probówki.

Uwaga: Aby uniknąć degradacji materiałów, po przygotowaniu reakcji wszystkie odczynniki do reakcji odwrotnej transkrypcji z zestawu *ipsogen BCR-ABL1 Mbcr RGQ RT-PCR Kit* należy przenieść do zamrażarki.

6. Umieścić próbki w termocyklerze i skonfigurować program odwrotnej transkrypcji (Tabela 2).

Tabela 2. Profil temperaturowy dla odwrotnej transkrypcji

Etap	Parametry
Reverse transcription 1 (Odwrotna transkrypcja 1)	Temperature (Temperatura): 25°C Time (Czas): 10 minut
Reverse transcription 2 (Odwrotna transkrypcja 2)	Temperature (Temperatura): 46°C Time (Czas): 45 minut
Inactivation (Inaktywacja)	Temperature (Temperatura): 85°C Time (Czas): 5 minut
Cooling (Chłodzenie)	Temperature (Temperatura): 4°C Time (Czas): 5 minut

7. Po zakończeniu programu krótko odwiruj próbki (około 5 sekund), aby zebrać płyn na dnach próbek. Do czasu wykonania eksperymentu qPCR trzymaj próbki na lodzie lub w temperaturze -20°C .

Analiza ręczna: reakcja qPCR w aparacie Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM z rotorem na 72 próbki i oprogramowaniem RGQ

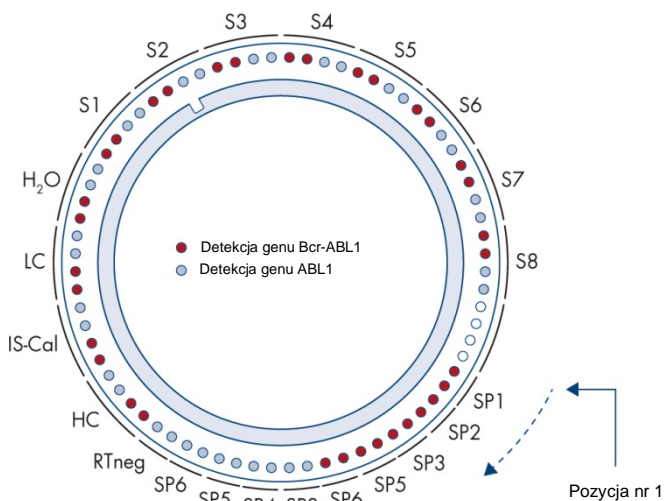
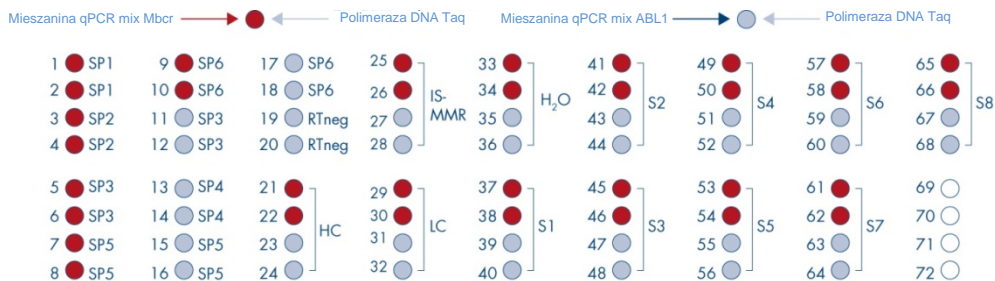
Zalecamy wykonanie wszystkich pomiarów w dwóch powtórzeniach, zgodnie z tabelą Tabela 3. Zestaw umożliwi przebadanie ośmiu próbek cDNA w dwóch powtórzeniach w jednym eksperymencie. Za pomocą zestawu *ipsogen BCR-ABL1 MbcR RGQ RT-PCR Kit* można wykonać trzy eksperymenty.

Tabela 3. Liczba reakcji w przypadku używania aparatu Rotor-Gene Q z rotorem na 72 próbki

Próbka	Reakcje
Z mieszaniną qPCR Mix ABL1 (34 reakcje)	
8 próbek cDNA	8 x 2 reakcje
1 kontrola cDNA High Positive Control	2 reakcje
1 kontrola cDNA Low Positive Control	2 reakcje
1 kalibrator cDNA IS-MMR Calibrator	2 reakcje
Wzorce pojedynczych plazmidów	4 x 2 reakcje (SP3, SP4, SP5 i SP6)
Kontrola negatywna RT	2 reakcje
Kontrola — woda	2 reakcje
Z mieszaniną qPCR Mix MbcR (34 reakcje)	
8 próbek cDNA	8 x 2 reakcje
1 kontrola cDNA High Positive Control	2 reakcje
1 kontrola cDNA Low Positive Control	2 reakcje
1 kalibrator cDNA IS-MMR Calibrator	2 reakcje
Wzorce pojedynczych plazmidów	5 x 2 reakcje (SP1, SP2, SP3, SP5 i SP6)
Kontrola — woda	2 reakcje

Konfiguracja bloku ładowania i rotora

Aby zoptymalizować użycie wzorców oraz mieszanin starterów i sond zalecamy testowanie co najmniej ośmiu próbek cDNA w jednym eksperymencie. Schemat rotora na Ryc. 3 przedstawia przykładowy eksperyment.



Ryc. 3. Konfiguracja rotora dla każdego eksperymentu. SP1–SP6: wzorce BCR-ABL1 Mbcr i ABL1; RTneg: kontrola negatywna RT; IS-Cal: kalibrator IS-MMR Calibrator; HC: kontrola High Positive Control; LC: kontrola Low Positive Control; H₂O: kontrola — woda; S1–S8: próbki cDNA.

Uwaga: We wszystkich pozostałych pozycjach należy umieścić puste probówki. Liczby oznaczają pozycje w bloku ładowania i wskazują końcową pozycję rotora.

Przygotowanie reakcji qPCR

Czynności do wykonania przed rozpoczęciem

- Rozmrozić wszystkie potrzebne składniki z wyjątkiem polimerazy DNA *Taq*, która musi być przechowywana w zamrażarce, gdy nie jest używana. Umieścić probówki zawierające składniki na lodzie w celu ich rozmrożenia.

Uwaga: Aby uniknąć rozkładu materiału, etap rozmrażania nie powinien trwać dłużej niż 30 minut.

- Wyczyścić obszar roboczy przeznaczony do przygotowywania mieszaniny do reakcji PCR, aby uniknąć zanieczyszczenia matrycą lub nukleazami
- Przed użyciem dobrze wymieszać zawartość probówek z mieszaninami qPCR Mix ABL1 i qPCR Mix Mbcr, pipetując w górę i w dół 10 razy i krótko odwirowując. Następnie trzymać na lodzie.

Procedura

1. Przygotuj mieszaninę Master Mix do reakcji PCR odpowiednio do liczby przetwarzanych próbek.

Tabela 4 przedstawia schemat pipetowania przy przygotowywaniu mieszaniny odczynników, obliczonej w taki sposób, aby końcowa objętość wynosiła 25 μ l. Wstępna mieszanina jest przygotowywana odpowiednio do liczby reakcji za pomocą tej samej mieszaniny starterów i sond (mieszaniny qPCR Mix ABL1 lub mieszaniny qPCR Mix Mbcr). Aby skompensować błędy pipetowania, uwzględniono dodatkowe objętości.

Uwaga: Nie stosować objętości reakcyjnych (mieszanina reakcyjna i próbka) mniejszych niż 25 μ l.

Tabela 4. Przygotowanie mieszaniny Master Mix do reakcji PCR

Składnik	1 reakcja (μl)	Mieszanina wstępna ABL1 lub Mbcr: 34 +2 reakcje (μl)	Stężenie końcowe
Mieszanina qPCR Mix (qPCR Mix ABL1 lub qPCR Mix Mbcr)	19,75	711	1x
Polimeraza DNA <i>Taq</i>	0,25	9	1x
Próbka, wzorzec, kontrola lub kalibrator IS-MMR Calibrator (dodawany w etapie 3)	5	5 na każdą	–
Łączna objętość	25	25 na każdą	–

2. Dodaj po 20 μl mieszaniny wstępnej do reakcji qPCR do każdej próbki Rotor-Gene Q o pojemności 0,1 ml.
3. Dodaj 5 μl produktu RT (cDNA) otrzymanego po etapie odwrotnej transkrypcji (patrz część „Odwrotna transkrypcja”, strona 29), 5 μl wzorców, 5 μl kontroli lub kalibratora IS-MMR Calibrator zgodnie z układem próbek przedstawionym na Ryc. 4 (objętość całkowita 25 μl).
4. Delikatnie wymieszaj, pipetując w górę i w dół.

Przygotowanie aparatu Rotor-Gene MDx i uruchamianie reakcji qPCR

1. Umieść próbki w adapterze dostarczonej z aparatem.
Uwaga: Do nieużywanych pozycji należy włożyć puste próbki.
2. Umieść pierścień blokujący nad próbkami i naciśnij go, aby go zablokować.
3. Załaduj pełny adapter do aparatu Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM.
4. Zaprogramuj aparat Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM na program cykli termicznych w sposób, który przedstawia Tabela 5.

Uwaga: Aby uniknąć degradacji materiałów, należy przenieść składniki zestawu *ipsogen BCR-ABL1 MbcR RGQ RT-PCR Kit* do zamrażarki.

Tabela 5. Profil temperaturowy dla reakcji qPCR

Etap	Parametry
Mode of analysis (Tryb analizy)	Quantitation (Oznaczenie ilościowe)
Hold 1 (Wstrzymanie 1)	Temperature (Temperatura): 95°C Time (Czas): 15 minut
Cycling (Wykonywanie cykli)	50 cykli 94°C; 15 sekund 60°C; 60 sekund z rejestracją fluorescencji barwnika FAM w kanale zielonym.

- Kliknij przycisk „Gain Optimisation” (Optymalizacja wzmocnienia) w oknie dialogowym „New Run Wizard” (Kreator nowego cyklu), aby otworzyć okno dialogowe „Auto-Gain Optimisation Setup” (Konfiguracja optymalizacji wzmocnienia automatycznego). Zaznacz zakres dla kanału zielonego od wartości „5 FI” dla odczytu „Min Reading” (Odczyt min.) do wartości „10 FI” dla odczytu „Max Reading” (Odczyt maks.) i ustaw akceptowalny zakres wzmocnienia od –10 do 10.
- Upewnij się, że opcja „Perform Optimisation Before 1st Acquisition” (Wykonaj optymalizację przed pierwszą rejestracją) jest zaznaczona i zamknij okno dialogowe „Auto-Gain Optimisation Setup” (Konfiguracja optymalizacji wzmocnienia automatycznego).
- Uruchom program cykli termicznych.
- Utwórz podzbiory ABL1 i MbcR, wprowadzając dane w oknie „Edit samples” (Edytuj próbki).
- Po zakończeniu programu cykli termicznych wybierz opcję „Options” (Opcje), a następnie opcję „Crop Start Cycles” (Usuń cykle początkowe). Usuń dane zarejestrowane przed cyklem 10. Następnie wybierz opcję „Analysis” (Analiza) i opcję

„Cycling A. Green from 10” (Zielony kanał rejestracji od 10), wskazaną w raporcie jako „left threshold = 10.00” (lewy próg = 10,00).

10. W przypadku ABL1 i MbcR wykonaj następujące czynności:

- Jeśli zostanie otwarte okno „Calculate Automatic Threshold” (Oblicz próg automatyczny), wybierz opcję „Cancel” (Anuluj).
- Zdefiniuj próg na wartość 0,03 (po prawej stronie okna na dole).
- Wybierz opcję „Dynamic Tube” (Probówka dynamiczna) jako metodę normalizacji w raporcie, a następnie opcję „Slope Correct” (Korekcja nachylenia), aby uwzględnić nachylenie szumu.
- Upewnij się, że opcja „Outlier Removal” (Usuwanie wartości odstających) jest ustawiona na 0% (odpowiednio do progu NTC), a funkcja „Reaction Efficiency Threshold” (Próg wydajności reakcji) jest wyłączona.
- Ustaw wykres na skalę liniową i wybierz opcję „Auto-Scale” (Automatyczne skalowanie).
- Kliknij prawym przyciskiem myszy okno, w którym wyświetlane są krzywe amplifikacji, i upewnij się, że opcja „Digital filter” (Filtr cyfrowy) jest ustawiona na „Light” (Jasny).
- Aby upewnić się, że wszystkie próbki są wyświetlane, wybierz opcję „named on” (nazwane) (po prawej stronie okna).

Po wykonaniu wszystkich etapów upewnij się, że zarejestrowano surowe dane i przejdź do analizy wyników (patrz część „Zasada analizy danych”, strona 49).

Analiza zautomatyzowana: reakcja qPCR w aparacie Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM z rotorem na 72 próbki i oprogramowaniem RGAM

Zalecamy wykonanie wszystkich pomiarów w dwóch powtórzeniach, zgodnie z tabelą Tabela 6. Zestaw umożliwia przebadanie ośmiu próbek cDNA w dwóch powtórzeniach w jednym eksperymencie. Za pomocą zestawu *ipsogen BCR-ABL1 MbcR RGQ RT-PCR Kit* można wykonać trzy eksperymenty.

Tabela 6. Liczba reakcji w przypadku używania aparatu Rotor-Gene Q z rotorem na 72 próbki

Próbka	Reakcje
Z mieszaniną qPCR Mix ABL1 (34 reakcje)	
8 próbek cDNA	8 x 2 reakcje
1 kontrola cDNA High Positive Control	2 reakcje
1 kontrola cDNA Low Positive Control	2 reakcje
1 kalibrator cDNA IS-MMR Calibrator	2 reakcje
Wzorce pojedynczych plazmidów	4 x 2 reakcje (SP3, SP4, SP5 i SP6)
Kontrola negatywna RT	2 reakcje
Kontrola — woda	2 reakcje
Z mieszaniną qPCR Mix MbcR (34 reakcje)	
8 próbek cDNA	8 x 2 reakcje
1 kontrola cDNA High Positive Control	2 reakcje
1 kontrola cDNA Low Positive Control	2 reakcje
1 kalibrator cDNA IS-MMR Calibrator	2 reakcje
Wzorce pojedynczych plazmidów	5 x 2 reakcje (SP1, SP2, SP3, SP5 i SP6)
Kontrola — woda	2 reakcje

Ważne informacje przed rozpoczęciem

Zestaw *ipsogen* BCR-ABL1 Mbcr RGQ RT-PCR Kit musi być wykonywany w aparacie Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM przy użyciu oprogramowania Rotor-Gene AssayManager w wersji 2.1. Przed rozpoczęciem protokołu zapoznać się z obsługą aparatu Rotor-Gene Q MDx. Szczegółowe informacje zawierają podręczniki użytkownika aparatu, oprogramowania Rotor-Gene AssayManager w wersji 2.1 oraz narzędzia Gamma Plug-in.

Oprogramowanie Rotor-Gene AssayManager w wersji 2.1 umożliwia zautomatyzowaną interpretację wyników reakcji PCR. Parametry wykonywania cykli są zablokowane dla reakcji.

Czynności do wykonania przed rozpoczęciem

Oprogramowanie Rotor-Gene AssayManager w wersji 2.1 musi być zainstalowane na komputerze podłączonym do aparatu Rotor-Gene Q. Można je pobrać ze strony internetowej firmy QIAGEN: [_http://www.qiagen.com/Products/Rotor-GeneAssayManager_v2.1.aspx](http://www.qiagen.com/Products/Rotor-GeneAssayManager_v2.1.aspx). Szczegółowe informacje na temat instalacji oprogramowania podstawowego Rotor-Gene AssayManager w wersji 2.1 zawiera dokument *Podręcznik użytkownika aplikacji podstawowej Core Application oprogramowania Rotor-Gene AssayManager w wersji 2.1* (Rotor-Gene AssayManager v2.1 Core Application User Manual).

- Do zestawu *ipsogen* BCR-ABL1 Mbcr RGQ RT-PCR Kit wymagane jest specjalne narzędzie Gamma Plug-in. Narzędzie to można pobrać ze strony internetowej firmy QIAGEN: <https://www.qiagen.com/resources/resourcedetail?id=bf8c9a8-245b-4ab4-99ea-1b39e2c243a0&lang=en>. To narzędzie należy zainstalować na komputerze, na którym jest już zainstalowane oprogramowanie Rotor-Gene AssayManager w wersji 2.1.
- Do zestawu *ipsogen* BCR-ABL1 Mbcr RGQ RT-PCR Kit wymagany jest również profil oznaczenia. Profil oznaczenia (plik *.iap) zawiera wszystkie parametry wymagane do

wykonywania cykli i analizowania oznaczenia qPCR. Można go pobrać ze strony internetowej poświęconej zestawowi *ipsogen* BCR-ABL1 MbcR RGQ RT-PCR Kit w witrynie firmy QIAGEN <https://www.qiagen.com/shop/detection-solutions/personalized-healthcare/ipsogen-bcr-abl1-mbcr-rgq-rt-pcr-kit-ce/#resources>. Profil oznaczenia musi zostać zaimportowany do oprogramowania Rotor-Gene AssayManager w wersji 2.1.

Uwaga: Zestaw *ipsogen* BCR-ABL1 MbcR RGQ RT-PCR Kit można wykonać, tylko jeśli w oprogramowaniu Rotor-Gene AssayManager w wersji 2.1 zaprogramowano odpowiednie ustawienia konfiguracji.

Aby zapewnić bezpieczeństwo procesowe całego systemu, należy ustawić następujące wymagane ustawienia konfiguracji w trybie zamkniętym:

- „Material number required” (Wymagany numer materiału)
- „Valid expiry date required” (Wymagana ważna data ważności)
- „Lot number required” (Wymagany numer serii)

Instalacja narzędzia Gamma Plug-in i importowanie profilu oznaczenia

Instalację i importowanie narzędzia Gamma Plug-in i profilu oznaczenia opisano szczegółowo w instrukcji obsługi oprogramowania Rotor-Gene AssayManager w wersji 2.1 i instrukcji obsługi narzędzia Gamma Plug-in, odpowiednio *Podręcznik użytkownika aplikacji podstawowej Core Application oprogramowania Rotor-Gene AssayManager w wersji 2.1* i *Podręcznik użytkownika narzędzia Gamma Plug-in* (Gamma Plug-in User Manual).

- Narzędzie Gamma Plug-in i najnowszą wersję profilu oznaczenia *ipsogen_BCR-ABL1MbcR(ABL)_blood_CE* należy pobrać ze strony internetowej firmy QIAGEN.
- Uruchomić proces instalacji, klikając dwukrotnie plik *RGAM_V2_1_Gamma_Plug-in.Installation.V1_0_0.msi*, a następnie postępować zgodnie z instrukcjami instalacji. Szczegółowy opis tego procesu zawiera rozdział „Instalowanie narzędzi” w

Podręczniku użytkownika aplikacji podstawowej Core Application oprogramowania Rotor-Gene AssayManager w wersji 2.1.

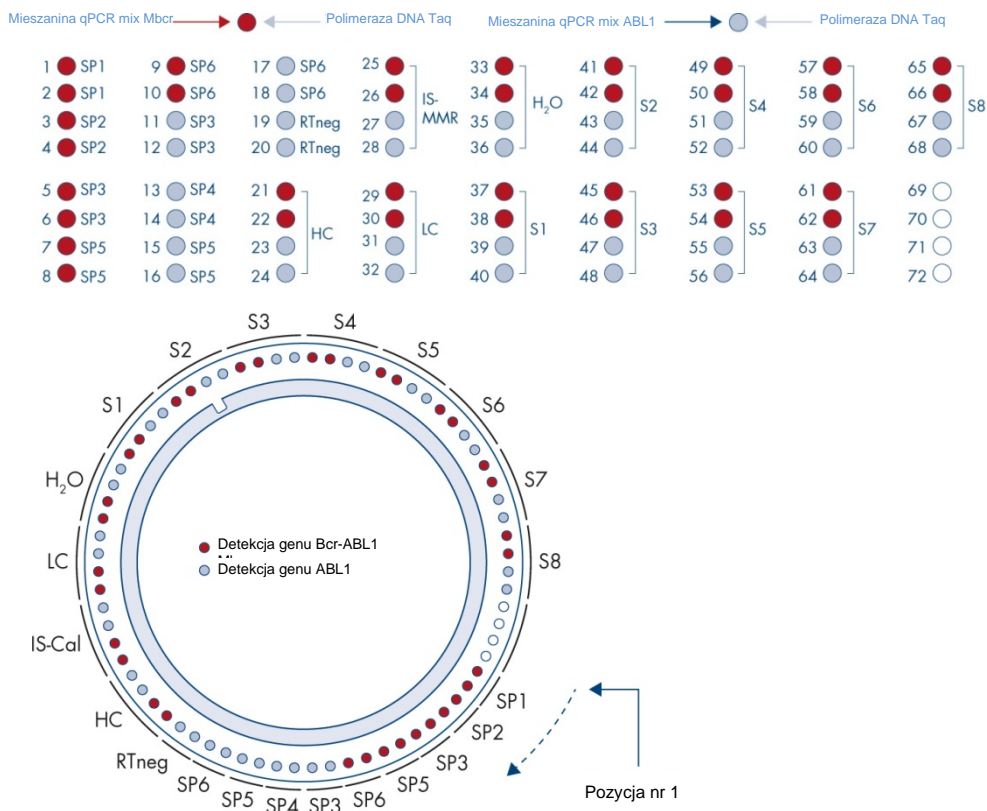
Uwaga: Aby zapewnić bezpieczeństwo procesowe całego systemu, wybrać kartę „Settings” (Ustawienia) i zaznaczyć pola wyboru opcji „Material number required” (Wymagany numer materiału), „Valid expiry date required” (Wymagana ważna data ważności) i „Lot number required” (Wymagany numer serii) dla trybu zamkniętego (sekcja Lista robocza). Jeśli nie są one włączone (wybrane), kliknąć, aby je włączyć.

- Po pomyślnym zainstalowaniu narzędzia osoba posiadająca uprawnienia administratora do oprogramowania Rotor-Gene AssayManager będzie musiała wykonać następujące czynności, aby zaimportować profil oznaczenia ipsogen_BCR-ABL1Mbcr(ABL)_blood_CE:
 1. Zaloguj się do oprogramowania Rotor-Gene AssayManager w wersji 2.1 jako użytkownik posiadający uprawnienia administratora.
 2. Wybierz środowisko konfiguracyjne.
 3. Wybierz kartę „Assay Profiles” (Profile oznaczeń).
 4. Kliknij przycisk „Import” (Importuj).
 5. W oknie dialogowym wybierz profil oznaczenia ipsogen_BCR-ABL1Mbcr(ABL)_blood_CE, który ma zostać zaimportowany, a następnie kliknij opcję „Open” (Otwórz).
 6. Po pomyślnym zaimportowaniu profilu można go używać w środowisku „Setup” (Konfiguracja).

Uwaga: Nie można zaimportować tej samej wersji profilu oznaczenia po raz drugi.

Konfiguracja bloku ładowania i rotora

Aby zoptymalizować użycie wzorców oraz mieszanin starterów i sond zalecamy testowanie co najmniej ośmiu próbek cDNA w jednym eksperymencie. Schemat rotora na Ryc. 4 przedstawia przykładowy eksperyment.



Ryc. 4. Konfiguracja rotora dla każdego eksperymentu. SP1–SP6: wzorce BCR-ABL1 Mbcr i ABL1; RTneg: kontrola negatywna RT; IS-Cal: kalibrator IS-MMR Calibrator; HC: kontrola High Positive Control; LC: kontrola Low Positive Control; H₂O: kontrola — woda; S1–S8: próbki cDNA. **Uwaga:** We wszystkich pozostałych pozycjach należy umieścić puste probówki. Liczby oznaczają pozycje w bloku ładowania i wskazują końcową pozycję rotora.



Próbki należy włożyć do rotora w sposób przedstawiony na Ryc. 4, gdyż zautomatyzowana analiza skonfigurowana w profilu oznaczenia opiera się na takim układzie. W przypadku zastosowania innego układu zostaną uzyskane nieprawidłowe wyniki.

Uwaga: We wszystkich niewykorzystanych pozycjach należy umieścić puste próbki.

Tworzenie listy roboczej

Dla próbek, które mają być przetwarzane, należy utworzyć listę roboczą, wykonując następujące czynności:

1. Włącz aparat Rotor-Gene Q MDx.
2. Otwórz oprogramowanie Rotor-Gene AssayManager w wersji 2.1 i zaloguj się jako użytkownik posiadający rolę operatora w trybie zamkniętym.
3. Kliknij przycisk „New manual work list” (Nowa ręczna lista robocza) w menadżerze listy roboczej (środowisko „Setup” (Konfiguracja)).
4. Wybierz profil oznaczenia „ipsogen_BCR-ABL1Mbc(ABL)_blood_CE” z listy dostępnych profili oznaczenia na etapie „Assay” (Oznaczenie).
5. Kliknij przycisk „Add assay to work list” (Dodaj oznaczenie do listy roboczej), aby przenieść wybrany profil oznaczenia na listę „Selected assay profiles” (Wybrane profile oznaczeń). Profil oznaczenia powinien być teraz wyświetlany na liście „Selected assay profiles” (Wybrane profile oznaczeń).
6. Wpisz liczbę próbek w odpowiednie pole.
7. Wybierz opcję „Kit information” (Informacje o zestawie) i wpisz następujące informacje o zestawie *ipsogen BCR-ABL1 Mbc RGQ RT-PCR Kit*, które są wydrukowane na wieczku pudełka.
 - Numer materiału: 0670923
 - Ważna data ważności

- Numer serii.
8. Wybierz etap „Samples” (Próbki). Zostanie wyświetlona lista zawierająca szczegóły dotyczące próbek. Lista przedstawia oczekiwany układ rotora.
 9. Wpisz numery identyfikacyjne próbek na listę oraz wszelkie opcjonalne informacje o próbkach jako komentarz do każdej próbki.
 10. Wybierz etap „Properties” (Właściwości) i wpisz nazwę listy roboczej.
 11. Włącz pole wyboru „is applicable” (ma zastosowanie).
 12. Zapisz listę roboczą.
 13. Listę roboczą można wydrukować, gdyż może ona ułatwić przygotowanie i konfigurację reakcji qPCR. Aby wydrukować listę roboczą, naciśnij przycisk „Print work list” (Drukuj listę roboczą). Szczegóły dotyczące próbek stanowią część tej listy roboczej.
- Uwaga:** Listę roboczą można utworzyć podczas konfiguracji eksperymentu w aparacie lub przed włożeniem próbek do aparatu, gdy możliwe jest zapisanie listy roboczej.

Przygotowanie reakcji qPCR

Czynności do wykonania przed rozpoczęciem

- Rozmrozić wszystkie potrzebne składniki z wyjątkiem polimerazy DNA *Taq*, która musi być przechowywana w zamrażarce, gdy nie jest używana. Umieścić próbówki zawierające składniki na lodzie w celu ich rozmrożenia.
- Uwaga:** Aby uniknąć rozkładu materiału, etap rozmrażania nie powinien trwać dłużej niż 30 minut.
- Wyczyścić obszar roboczy przeznaczony do przygotowywania mieszaniny do reakcji PCR, aby uniknąć zanieczyszczenia matrycą lub nukleazami
 - Przed użyciem dobrze wymieszać zawartość próbek z mieszaninami qPCR Mix ABL1 i qPCR Mix Mbcr, pipetując w górę i w dół 10 razy i krótko odwirowując. Następnie trzymać na lodzie.

Procedura

1. Przygotuj mieszaninę Master Mix do reakcji PCR odpowiednio do liczby przetwarzanych próbek.

Tabela 7 przedstawia schemat pipetowania przy przygotowywaniu mieszaniny odczynników, obliczonej w taki sposób, aby końcowa objętość wynosiła 25 μ l. Wstępna mieszanina jest przygotowywana odpowiednio do liczby reakcji za pomocą tej samej mieszaniny starterów i sond (mieszaniny qPCR Mix ABL1 lub mieszaniny qPCR Mix Mbcr). Aby skompensować błędy pipetowania, uwzględniono dodatkowe objętości.

Uwaga: Nie stosować objętości reakcyjnych (mieszanina reakcyjna i próbka) mniejszych niż 25 μ l.

Tabela 7. Przygotowanie mieszaniny Master Mix do reakcji PCR

Składnik	1 reakcja (μ l)	Mieszanina wstępna ABL1 lub Mbcr: 34 +2 reakcje (μ l)	Stężenie końcowe
Mieszanina qPCR Mix (qPCR Mix ABL1 lub qPCR Mix Mbcr)	19,75	711	1x
Polimeraza DNA <i>Taq</i>	0,25	9	1x
Próbka, wzorzec, kontrola lub kalibrator IS-MMR Calibrator (dodawany w etapie 3)	5	5 na każdą	–
Łączna objętość	25	25 na każdą	–

2. Dodaj po 20 μ l mieszaniny wstępnej do reakcji qPCR do każdej probówki Rotor-Gene Q o pojemności 0,1 ml.
3. Dodaj 5 μ l produktu RT (cDNA) otrzymanego po etapie odwrotnej transkrypcji (patrz część „Odwrotna transkrypcja”, strona 29), 5 μ l wzorców, 5 μ l kontroli lub kalibratora IS-MMR Calibrator zgodnie z układem próbek przedstawionym na Ryc. 4 (objętość całkowita 25 μ l).
4. Delikatnie wymieszaj, pipetując w górę i w dół. ●

Przygotowanie aparatu Rotor-Gene MDx i uruchamianie reakcji qPCR

1. Umieść 72-dołkowy rotor w uchwycie rotora Rotor-Gene Q MDx.
2. Napelnij rotor próbkami w paskach, wkładając je do przypisanych im pozycji, rozpoczynając od pozycji 1, jak przedstawiono na Ryc. 4, umieszczając we wszystkich nieużywanych pozycjach puste próbki w paskach zamknięte zatyczkami.

Uwaga: Należy upewnić się, że pierwszą próbkę włożono do pozycji 1, a próbki w paskach są umieszczone w prawidłowej orientacji i pozycjach, tak jak przedstawiono na Ryc. 4.

3. Zamocuj pierścień blokujący.
4. Załaduj rotor z pierścieniem blokującym do aparatu Rotor-Gene Q MDx, a następnie zamknij pokrywę aparatu.
5. W oprogramowaniu Rotor-Gene AssayManager w wersji 2.1 wybierz odpowiednią listę roboczą z menedżera listy roboczej, a następnie kliknij przycisk „Apply” (Zastosuj) lub, jeśli lista robocza jest wciąż otwarta, kliknij przycisk „Apply” (Zastosuj).

Uwaga: Jeśli nie utworzono listy roboczej przeznaczonej dla eksperymentu, przed wykonaniem kolejnych czynności należy zalogować się do oprogramowania Rotor-Gene AssayManager w wersji 2.1 i wykonać etap „Tworzenie listy roboczej”, strona 43.

6. Wpisz nazwę eksperymentu.
7. Wybierz cykl, który ma być używany, w obszarze „Cycler selection” (Wybór cyklera).
8. Upewnij się, że pierścień blokujący jest prawidłowo zamocowany, a następnie potwierdź na ekranie, że zamocowano pierścień blokujący.
9. Kliknij przycisk „Start run” (Rozpocznij reakcję). Reakcja *ipsogen* BCR-ABL1 MbcR RGQ RT-PCR powinna się rozpocząć.

Udostępnianie i raportowanie wyników reakcji qPCR

1. Po zakończeniu reakcji kliknij przycisk „Finish run” (Zakończ reakcję).
2. Udostępnienie i zatwierdzenie wyników reakcji:

- W przypadku użytkowników posiadających rolę Approver (Osoba zatwierdzająca): kliknij opcję „Release and go to approval” (Udostępnij i przejdź do zatwierdzania).
 - W przypadku użytkowników posiadających rolę Operator: kliknij opcję „Release” (Udostępnij).
3. Po kliknięciu opcji „Release and go to approval” (Udostępnij i przejdź do zatwierdzania) wyświetlane są wyniki eksperymentu.
 4. Po kliknięciu opcji „Release” (Udostępnij) przez użytkownika o roli operatora użytkownik o roli „Approver” (Osoba zatwierdzająca) musi zalogować się do oprogramowania i wybrać środowisko „Approval” (Zatwierdzanie).
 - a. Odfiltruj listę wg oznaczeń, które oczekują na zatwierdzenie, wybierając opcje filtrowania i klikając przycisk „Apply” (Zastosuj).
 - b. Zaznacz pole wyboru obok eksperymentu, który ma zostać zatwierdzony.
 - c. Kliknij przycisk „Start approval” (Rozpocznij zatwierdzanie).

Ze względu na to, że eksperyment zawiera jeden kalibrator, przed ostatecznym zatwierdzeniem próbek konieczne jest wprowadzenie obowiązkowych informacji na temat kalibratora na karcie „Calibrator” (Kalibrator).

5. Wybierz przycisk „Use calibrator” (Użyj kalibratora) i wpisz odpowiednią wartość (umieszczoną na próbówce lub świadectwie analizy kalibratora IS-MMR Calibrator).

Uwaga: Wartość tę należy wpisać dwa razy — w pole „Enter calibrator value” (Wprowadź wartość kalibratora) i „Reenter calibrator value” (Ponownie wprowadź wartość kalibratora).

Potwierdź wprowadzone wartości, naciskając przycisk „Apply” (Zastosuj): wyniki są aktualizowane.

Uwaga: Po udostępnieniu przynajmniej jednego wyniku próbki nie można wprowadzić zmian w kalibratorze.

6. Przejrzyj wyniki, a następnie kliknij przycisk „Release/Report data” (Udostępnij/raportuj dane).

Kliknij przycisk „OK”. Raport zostanie wygenerowany w formacie *.pdf i będzie automatycznie przechowywany we wstępnie zdefiniowanym folderze.

Domyślna ścieżka folderu to: QIAGEN > Rotor-Gene AssayManager > Export > Reports (QIAGEN > Rotor-Gene AssayManager > Eksport > Raporty)

Uwaga: Ścieżkę i folder można zmienić w środowisku „Configuration” (Konfiguracja).

Uwaga: Do rozwiązywania problemów wymagany jest pakiet wsparcia z reakcji.

Pakiety wsparcia można wygenerować ze środowiska zatwierdzania lub archiwizacji (*Podręcznik użytkownika aplikacji podstawowej Core Application oprogramowania Rotor-Gene AssayManager w wersji 2.1, część 1.8, „Rozwiązywanie problemów” > „Tworzenie pakietu wsparcia”). Ponadto może okazać się przydatna ścieżka audytu z czasu wystąpienia zdarzenia (±1 dzień). Ścieżkę audytu można uzyskać w środowisku serwisowym (Podręcznik użytkownika aplikacji podstawowej Core Application oprogramowania Rotor-Gene AssayManager w wersji 2.1, część 1.5.5.5).*

7. Rozładuj aparat Rotor-Gene Q MDx i zutylizuj próbówki w paskach zgodnie z lokalnymi przepisami dotyczącymi bezpieczeństwa.

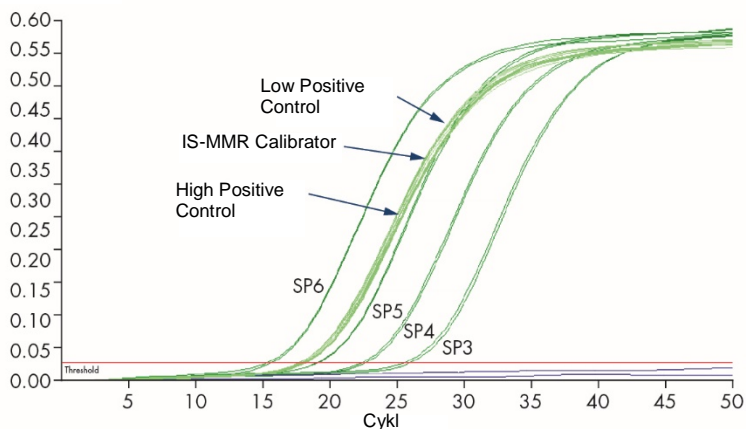
Interpretacja wyników w oprogramowaniu RGQ

Zasada analizy danych

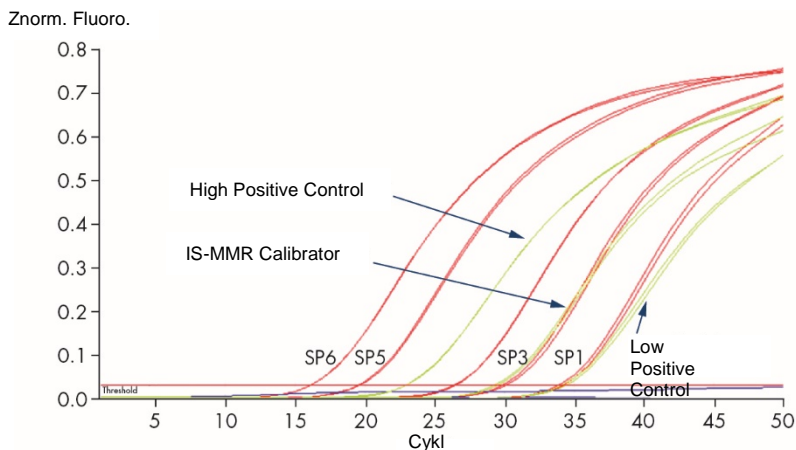
W przypadku technologii TaqMan® liczba cykli PCR wymaganych do wykrycia sygnału powyżej wartości progowej jest nazywana cyklem progowym (C_T) i jest wprost proporcjonalna do ilości sekwencji docelowej obecnej na początku reakcji.

Używając wzorców o znanej liczbie cząsteczek, można ustalić krzywą wzorcową i określić dokładną ilość sekwencji docelowej obecnej w badanej próbce. Krzywe wzorcowe opierają się na plazmidach. W celu zagwarantowania dokładnych krzywych wzorcowych używane są cztery rozcieńczenia wzorców genu ABL1 i pięć rozcieńczeń wzorców genu Mbcr. Zestaw zawiera również kalibrator IS, który umożliwia przekształcenie wyników na skalę międzynarodową. Ryc. 5 i Ryc. 6 przedstawiają przykładowe krzywe amplifikacji TaqMan podobne do krzywych otrzymywanych dla wzorców, kalibratora IS-MMR Calibrator, kontroli High Positive RNA Control i kontroli Low Positive RNA Control za pomocą zestawu *ipsogen BCR-ABL1 Mbcr RGQ RT-PCR Kit*.

Znorm. Fluoro.



Ryc. 5. Detekcja genu ABL1 przy zastosowaniu kontroli i wzorców SP3, SP4, SP5 i SP6. 10^3 , 10^4 , 10^5 i 10^6 kopii/reakcję.



Ryc. 6. Detekcja genu BCR-ABL1 MbcR przy zastosowaniu kontroli i wzorców SP1, SP2, SP3, SP5 i SP6. 10^1 , 10^2 , 10^3 , 10^5 i 10^6 kopii/reakcję.

Krzywe wzorcowe i kryteria jakości mające zastosowanie do danych surowych

Powtarzalność między powtórzeniami

Różnica wartości C_T między powtórzeniami powinna być ≤ 2 — w przeciwnym razie powtórzenie powinno zostać unieważnione, z wyjątkiem następujących sytuacji:

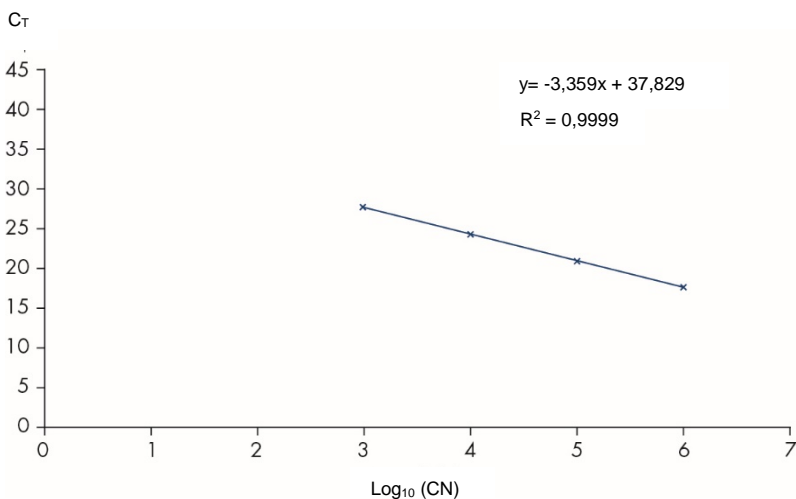
Jeśli średnia wartość C_T jest ≥ 36 lub jeśli wartość C_{Ta} jest ≥ 36 , a wartość C_{Tb} jest określona jako „nie wykryto”, kryteria wartości ΔC_T nie mają zastosowania; powtórzenie spełnia wymagania. W takim przypadku liczbę kopii (copy number, CN) obliczoną dla wartości C_{Ta} należy podzielić przez 2.

Uwaga: Użytkownik powinien zmierzyć poziom powtarzalności w danym laboratorium.

Krzywe wzorcowe

W celu przeanalizowania danych surowych można je wkleić do pliku programu Excel®.

Wartości C_T uzyskane z rozcieńczeń wzorców plazmidów dla każdego genu (ABL1 i BCR-ABL1 Mbc) są wykreślane względem logarytmu liczby kopii (3, 4, 5 i 6 dla wzorców SP3, SP4, SP5 i SP6; 1, 2, 3, 5 i 6 dla wzorców SP1, SP2, SP3, SP5 i SP6). Ryc. 7 przedstawia przykładową krzywą ABL1 obliczoną na podstawie czterech rozcieńczeń wzorców. Ryc. 8 przedstawia przykładową krzywą BCR-ABL1 Mbc obliczoną na podstawie pięciu rozcieńczeń wzorców.



Ryc. 7. Krzywa wzorcowa dla genu ABL1 obliczona na podstawie czterech rozcieńczeń wzorców. Obliczono krzywą regresji liniowej ($y = ax + b$), gdzie „a” to nachylenie linii, a „b” to punkt przecięcia z osią y — współrzędna y punktu, w którym linia przecina oś y. Równanie i współczynnik determinacji (R^2) przedstawiono na wykresie.

$$\text{Log}_{10} \text{ próbki ABL1CN} = \frac{\text{Średnia wartość } C_T \text{ ABL} - \text{punkt przecięcia krzywej wzorcowej ABL1}}{\text{Nachylenie krzywej wzorcowej ABL}}$$

$$\text{Log}_{10} \text{ próbki BCR-ABL1 Mbcrcn} = \frac{\text{Średnia wartość } C_T \text{ BCR-ABL1 Mbcrcr} - \text{punkt przecięcia krzywej wzorcowej BCR-ABL1 Mbcrcr}}{\text{Nachylenie krzywej wzorcowej BCR-ABL1 Mbcrcr}}$$

Kontrola jakości wszystkich wartości ABL1_{CN}

Niska jakość RNA lub problemy podczas reakcji RT-qPCR mogą spowodować uzyskanie małej liczby kopii genu ABL1.

Aby osiągnąć optymalną czułość testu wartość ABL1_{CN} dla kontroli High Positive RNA Control, kontroli Low Positive RNA Control i kalibratora IS-MMR Calibrator powinna być równa 100 000 lub większa.

Kontrola negatywna RT i kontrola — woda

Kontrole bez matrycy (no template control, NTC) powinny dawać wartości CN równe zero dla genu ABL1 i genu BCR-ABL1 Mbcrcr na etapie reakcji PCR (kontrola — woda) i etapie odwrotnej transkrypcji (kontrola negatywna RT). W związku z tym (odpowiednio) wartość C_T nie powinna zostać otrzymana lub wartość C_T będzie powyżej punktu przecięcia krzywych wzorcowych. Wynik pozytywny dla tych kontroli NTC wskazuje, że podczas odwrotnej transkrypcji i/lub reakcji qPCR doszło do zanieczyszczenia krzyżowego.

Znormalizowana liczba kopii (normalized copy number, NCN)

Stosunek tych wartości CN to znormalizowana liczba kopii (NCN):

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

Wynik NCN należy obliczyć dla kontroli High Positive RNA Control (NCN_{HC}), kontroli Low Positive RNA Control (NCN_{LC}), kalibratora IS MMR (NCN_{kal}) i każdej próbki (NCN_{próbka}).

Kontrola jakości wartości znormalizowanej liczby kopii

Kontrola High Positive RNA Control, kontrola Low Positive RNA Control oraz kalibrator IS-MMR Calibrator umożliwiają monitorowanie etapów odwrotnej transkrypcji i amplifikacji genów ABL1 i BCR-ABL1 Mbcr podczas oznaczenia ilościowego transkryptu.

- Wynik NCN uzyskany dla kalibratora IS-MMR-Calibrator, testowanego za pomocą zestawu *ipsogen BCR-ABL1 Mbcr RGQ RT-PCR Kit*, musi mieścić się w przedziale 0,05–0,3, gdyż w przeciwnym razie nie jest możliwe przekształcenie wartości NCN na skalę międzynarodową.
- Czułość eksperymentu można ocenić, wyłącznie jeśli wykryto kontrolę Low Positive RNA Control.

Przekształcenie na skalę międzynarodową

Uwaga: Przed interpretacją wyników należy zapoznać się z wartością określoną na etykiecie próbki kalibratora IS-MMR Calibrator lub na świadectwie analizy dostarczonym z zestawem. (Upewnić się, że na etykiecie i świadectwie znajduje się taka sama wartość).

Użyć eksperymentalnego wyniku NCN kalibratora IS-MMR Calibrator (NCN_{kal}) oraz jego przypisanej wartości (wartość IS-Cal) określonej w świadectwie analizy do obliczenia znormalizowanej liczby kopii w skali międzynarodowej (IS-NCN_{próbka}).

$$\text{IS-NCN}_{\text{próbka}} = \frac{\text{NCN}_{\text{próbka}} \times \text{wartość IS-Cal}}{\text{NCN}_{\text{kal}}}$$

Kontrola jakości wartości IS-NCN

- Wynik IS-NCN_{HC} (NCN w skali międzynarodowej dla kontroli High Positive RNA Control) nie powinien wskazywać na dużą odpowiedź molekularną („Brak MMR”, patrz „Raportowanie odpowiedzi molekularnej” poniżej).
- Wynik IS-NCN_{LC} (NCN w skali międzynarodowej dla kontroli Low Positive RNA Control) powinien być <0,01 (MR4), aby zagwarantować, że status MR4,5 można ustalić z dużą pewnością.

Raportowanie odpowiedzi molekularnej

Określić status odpowiedzi molekularnej każdej próbki zgodnie z interpretacją przedstawioną w Tabeli 8.

Tabela 8. Raportowanie odpowiedzi molekularnej

Przypadek	ABL CN	BCR-ABL1 M _{bcr} CN	IS-NCN%	Status
1	<10 000	<10	–	Niska jakość próbki
2	<10 000	≥10	>0,1	Brak MMR
		≥10	≤0,1	Wynik niejednoznaczny
3	10 000 ≤CN _{ABL} <32 000	≥LOD	>0,1	Brak MMR
		LOB<CN<LOD Zastąpić wartość CN wartością LOD	≤0,1	MMR
		LOB<CN<LOD Zastąpić wartość CN wartością LOD	>0,1	Brak MMR
		LOB<CN<LOD Zastąpić wartość CN wartością LOD	≤0,1	MMR
4	32 000 ≤CN _{ABL} <100 000	≤LOB	–	Nie wykryto/MR4
		≥LOD	>0,1	Brak MMR
		≥LOD	0,01 <IS ≤0,1	MMR
		≥LOD	≤0,01	MR4
		LOB<CN<LOD Zastąpić wartość CN wartością LOD	>0,1	Brak MMR
		LOB<CN<LOD Zastąpić wartość CN wartością LOD	0,01 <IS ≤0,1	MMR
5	100 000 ≤CN _{ABL}	≤LOB	–	Nie wykryto/MR4,5
		≥LOD	>0,1	Brak MMR
		≥LOD	0,01 <IS ≤0,1	MMR
		≥LOD	0,0032 <IS ≤0,01	MR4
		≥LOD	≤0,0032	MR4,5
		LOB<CN<LOD Zastąpić wartość CN wartością LOD	>0,1	Brak MMR
		LOB<CN<LOD Zastąpić wartość CN wartością LOD	0,01 <IS ≤0,1	MMR
		LOB<CN<LOD Zastąpić wartość CN wartością LOD	0,0032 <IS ≤0,01	MR4
5	100 000 ≤CN _{ABL}	≤LOB	–	Nie wykryto/MR4,5
		≤LOB	–	Nie wykryto/MR5

LOB, limit of blank: granica próby ślepej; LOD, limit of detection: granica wykrywalności; MR: odpowiedź molekularna; MMR: duża odpowiedź molekularna.

Podsumowanie kryteriów jakości

Tabela 9 podsumowuje różne kryteria jakości i powiązane wartości lub wyniki.

Tabela 9. Podsumowanie kryteriów jakości

Kryteria	Akceptowalne wartości/wyniki
Różnice wartości C_T między powtórzeniami	$\leq 2 C_T$ Z wyjątkiem sytuacji, w której średnia wartość C_T jest ≥ 36 lub wartość C_{Ta} jest ≥ 36 , a wartość C_{Tb} jest określona jako „nie wykryto”: powtórzenie spełnia wymagania. Wartość CN obliczoną dla C_{Ta} należy podzielić przez 2.
Nachylenie krzywych wzorcowych	Od $-3,1$ do $-3,6$
R^2 krzywych wzorcowych	Co najmniej $>0,95$ (w idealnym przypadku $>0,98$)
Rozcieńczenie wzorca SP1 (plazmid BCR-ABL1, 10 kopii)	Musi zostać wykryte, aby było możliwe utworzenie krzywej wzorcowej
Kontrola jakości wartości ABL_{CN} dla próbek biologicznych	Patrz Tabela 8
Kontrola High Positive RNA Control, kontrola Low Positive RNA Control i kalibrator IS-MMR-Calibrator	$ABL1_{CN} \geq 100\ 000$
Kontrole NTC (woda) i RTneg	Dla każdej wartość $ABL1_{CN} = 0$, a wartość $Mbcr_{CN} = 0$ (brak wartości C_T lub wartość $C_T >$ punkt przecięcia krzywej wzorcowej)
Wartość NCN uzyskana dla kalibratora IS-MMR Calibrator (NCN _{kal})	Musi mieścić się w przedziale $0,05-0,3$
Kontrola High Positive RNA Control	Musi zostać wykryta
Kontrola Low Positive RNA Control	Musi zostać wykryta
IS-NCN _{HC}	Status: Brak dużej odpowiedzi molekularnej
IS-NCN _{LC}	IS-NCN _{LC} $\leq 0,01$ (MR4) Musi zostać wykryta, aby zagwarantować, że status MR4,5 można ustalić z dużą pewnością.

C_T , threshold cycle: cykl progowy; HC, high control: kontrola wysoka; IS, International Standard: wzorzec międzynarodowy; LC, low control: kontrola niska; MR, molecular response: odpowiedź molekularna; MMR, major molecular response: duża odpowiedź molekularna; NCN, normalized copy number: znormalizowana liczba kopii; NTC, No Template Control: kontrola bez matrycy; RTneg, reverse transcription negative: negatywna podczas odwrotnej transkrypcji.

Interpretacja wyników w oprogramowaniu RGAM

Analiza jest w pełni zautomatyzowana.

Oprogramowanie Rotor-Gene AssayManager w wersji 2.1 najpierw analizuje krzywe amplifikacji i może unieważnić krzywe, które nie spełniają wymagań, na podstawie ich kształtu i amplitudy szumu. W takim przypadku do unieważnionej krzywej zostanie przypisana flaga.

Wyniki próbek badanych są automatycznie analizowane i konfigurowane przez oprogramowanie Rotor-Gene AssayManager w wersji 2.1, ale muszą zostać zatwierdzone i udostępnione przez zalogowanego użytkownika posiadającego rolę osoby zatwierdzającej. Na końcu wiersza wyników próbek, które oczekują na zatwierdzenie, widoczne są trzy dodatkowe przyciski zatwierdzania. Przyciski te służą do interaktywnego zatwierdzenia lub odrzucenia wyników próbek. Dalsze informacje zawiera dokument *Podręcznik użytkownika narzędzia Gamma Plug-in*.

Następnie oprogramowanie Rotor-Gene AssayManager w wersji 2.1 przeanalizuje kontrole reakcji:

- Kontrole NTC (RT-neg i H2O) są sprawdzane pod kątem braku swoistej amplifikacji (ABL1 i BCR-ABL1 Mbcr).
- ABL1 i BCR-ABL1 Mbcr SP: Walidacja opiera się na wartości R^2 i nachylenia każdej krzywej.
- HC: Liczba kopii genu ABL1 musi być wystarczająco wysoka, aby możliwa była interpretacja tej kontroli. W takim przypadku zostanie obliczony odsetek IS-NCN. Ta kontrola reakcji jest walidowana, jeśli zgodnie z testem uzyskano status „Brak MMR”.

- LC: Liczba kopii genu ABL1 musi być wystarczająco wysoka, aby możliwa była interpretacja tej kontroli. W takim przypadku zostanie obliczony odsetek IS-NCN. Ta kontrola reakcji jest walidowana, jeśli zgodnie z testem uzyskano status „MR4”.
- Kalibrator IS-MMR Calibrator: Liczba kopii genu ABL1 musi być wystarczająco wysoka, aby możliwa była interpretacja tej kontroli. W takim przypadku zostanie obliczona wartość NCN. Ta kontrola reakcji jest walidowana, jeśli zgodnie z testem uzyskana dla niej wartość NCN jest w akceptowalnym przedziale.

Uwaga: Raport generowany pod koniec reakcji przedstawia wyniki uzyskane dla kontroli reakcji wraz z flagami unieważniającymi umieszczonymi przed nieważnymi danymi.

Jeśli wszystkie kontrole reakcji spełniają wymagania, oprogramowanie Rotor-Gene AssayManager w wersji 2.1 przeanalizuje nieznane próbki.

Zmiana wartości C_T między powtórzeniami próbki musi być wystarczająco mała, aby była możliwa interpretacja wyników. Następnie zostanie obliczony odsetek IS-NCN, a próbce zostanie nadany status.

Uwaga: Jeśli wyniki kontroli reakcji oraz wyniki próbek są ważne, w raporcie będą widoczne liczby kopii genów ABL1 i BCR-ABL1 Mbcf, wartość NCN (%), wartość IS-NCN (%) i status odpowiedzi molekularnej dla każdej próbki.

Tabela 10 i Tabela 11 przedstawiają odpowiednio unieważniające i ostrzegawcze flagi próbek, które mogą zostać przypisane do poszczególnych próbek podczas analizy wykonywanej przez oprogramowanie Rotor-Gene AssayManager w wersji 2.1, wraz z objaśnieniami znaczenia flag.

Tabela 10. Unieważniające flagi próbek i opis terminów

Flaga	Opis
ANALYSIS_FAILED (NIEPOWODZENIE_ANALIZY)	Oznaczenie jest określone jako nieważne, gdyż analiza zakończyła się niepowodzeniem. Skontaktuj się z serwisem technicznym firmy QIAGEN.
ASSAY_INVALID (NIEWAŻNE_OZNACZENIE)	Oznaczenie jest nieważne, ponieważ co najmniej jedna kontrola zewnętrzna jest nieważna.
CONSECUTIVE_FAULT (BŁĄD_KOLEJNOŚCI)	Wartość docelowa użyta do obliczenia danej wartości docelowej jest nieważna.
CURVE_SHAPE_ANOMALY (ANOMALIA_KSZTAŁTU_KRZYWEJ)	Krzywa amplifikacji danych surowych ma kształt odbiegający od kształtu oczekiwanego dla tego oznaczenia. Istnieje wysokie prawdopodobieństwo uzyskania nieprawidłowych wyników lub błędnej interpretacji wyników.
FLAT_BUMP (RÓWNE_WYBRZUSZENIE)	Krzywa amplifikacji danych surowych ma kształt „równego wybrzuszenia”, który odbiega od kształtu oczekiwanego dla tego oznaczenia. Istnieje wysokie prawdopodobieństwo uzyskania nieprawidłowych wyników lub błędnej interpretacji wyników (np. określenia nieprawidłowej wartości C_T).
HIGH_PC_HIGH_DELTA_CT (ABL or Mbc)(DUŻA_DELTA_WARTOŚCI_CT_WYSOKIEJ_KONTROLI_POZYTYWNEJ (ABL lub Mbc))	Różnica wartości C_T między powtórzeniami kontroli High Positive Control w mieszaninie genu kontrolnego jest zbyt wysoka.

HIGH_PC_HIGH_DELTA_CT (Mbc) (DUŻA_DELTA_WARTOŚCI_CT_WYSOKIEJ_KONTROLI_POZYTYWNEJ (Mbc))	Różnica wartości C_T między powtórzeniami kontroli High Positive Control w mieszaninie genu fuzyjnego jest zbyt wysoka.
HIGH_PC_LOW_ABL_CN (NISKA_WARTOŚĆ_ABL_CN_WYSOKIEJ_KONTROLI_POZYTYWNEJ)	Liczba kopii genu kontrolnego dla kontroli High Positive Control jest zbyt niska.
HIGH_PC_LOW_IS-NCN (NISKA_WARTOŚĆ_IS-NCN_WYSOKIEJ_KONTROLI_POZYTYWNEJ)	Znormalizowana liczba kopii (skala międzynarodowa) dla kontroli High Positive Control jest zbyt niska.
HIGH_PC_NO_CT (ABL) (BRAK_WARTOŚCI_CT_WYSOKIEJ_KONTROLI_POZYTYWNEJ (ABL))	Brak wykrywalnej wartości C_T dla kontroli High Positive Control w mieszaninie genu kontrolnego.
HIGH_PC_NO_CT (Mbc) (BRAK_WARTOŚCI_CT_WYSOKIEJ_KONTROLI_POZYTYWNEJ (Mbc))	Brak wykrywalnej wartości C_T dla kontroli High Positive Control w mieszaninie genu fuzyjnego.
HIGH_PC_REPLICATE_NO_CT (ABL) (BRAK_WARTOŚCI_CT_POWTÓRZENIA_WYSOKIEJ_KONTROLI_POZYTYWNEJ (ABL))	Jedno z powtórzeń kontroli High Positive Control nie zostało wykryte w mieszaninie genu kontrolnego.
HIGH_PC_REPLICATE_NO_CT (Mbc) (BRAK_WARTOŚCI_CT_POWTÓRZENIA_WYSOKIEJ_KONTROLI_POZYTYWNEJ (Mbc))	Jedno z powtórzeń kontroli High Positive Control nie zostało wykryte w mieszaninie genu fuzyjnego.
INVALID_CALCULATION (NIEPRAWIDŁOWE_OBLICZENIE)	Obliczenie danej wartości docelowej zakończyło się niepowodzeniem.
IS-CAL_HIGH_DELTA_CT (ABL) (DUŻA_DELTA_WARTOŚCI_CT_IS-CAL (ABL))	Różnica wartości C_T między powtórzeniami kalibratora IS-MMR-Calibrator w mieszaninie genów kontrolnych jest zbyt wysoka.

Flaga	Opis
IS-CAL_HIGH_DELTA_CT (Mbcrr) (DUŻA_DELTA_WARTOŚCI_CT_IS-CAL (Mbcrr))	Różnica wartości C_T między powtórzeniami kalibratora IS-MMR-Calibrator w mieszaninie genu fuzyjnego jest zbyt wysoka.
IS-CAL_HIGH_NCN (WYSOKA_WARTOŚĆ_NCN_IS-CAL)	Znormalizowana liczba kopii dla kalibratora IS-MMR-Calibrator jest zbyt wysoka.
IS-CAL_LOW_ABL_CN (NISKA_WARTOŚĆ_ABL_CN_IS-CAL)	Liczba kopii genu kontrolnego dla kalibratora IS-MMR-Calibrator jest zbyt niska.
IS-CAL_LOW_NCN (NISKA_WARTOŚĆ_NCN_IS-CAL)	Znormalizowana liczba kopii dla kalibratora IS-MMR-Calibrator jest zbyt niska.
IS-CAL_REPLICATE_NO_CT (ABL) (BRAK_WARTOŚCI_CT_POWTÓRZENIA_IS-CAL (ABL))	Jedno z powtórzeń kalibratora IS-MMR-Calibrator nie zostało wykryte w mieszaninie genu kontrolnego.
IS-CAL_REPLICATE_NO_CT (Mbcrr) (BRAK_WARTOŚCI_CT_POWTÓRZENIA_IS-CAL (Mbcrr))	Jedno z powtórzeń kalibratora IS-MMR-Calibrator nie zostało wykryte w mieszaninie genu fuzyjnego.
LOW_PC_HIGH_DELTA_CT (ABL) (DUŻA_DELTA_WARTOŚCI_CT_NISKIEJ_KONTROLI_POZYTYWNEJ (ABL))	Różnica wartości C_T między powtórzeniami kontroli Low Positive Control w mieszaninie genu kontrolnego jest zbyt wysoka.
LOW_PC_HIGH_DELTA_CT (Mbcrr) (DUŻA_DELTA_WARTOŚCI_CT_NISKIEJ_KONTROLI_POZYTYWNEJ (Mbcrr))	Różnica wartości C_T między powtórzeniami kontroli Low Positive Control w mieszaninie genu fuzyjnego jest zbyt wysoka.
LOW_PC_HIGH_IS-NCN (DUŻA_WARTOŚĆ_IS-NCN_NISKIEJ_KONTROLI_POZYTYWNEJ)	Znormalizowana liczba kopii (skala międzynarodowa) dla kontroli Low Positive Control jest zbyt wysoka.
LOW_PC_LOW_ABL_CN (MAŁA_WARTOŚĆ_ABL_CN_NISKIEJ_KONTROLI_POZYTYWNEJ)	Liczba kopii genu kontrolnego dla kontroli Low Positive Control jest zbyt niska.
LOW_PC_NO_CT (ABL) (BRAK_WARTOŚCI_CT_NISKIEJ_KONTROLI_POZYTYWNEJ (ABL))	Brak wykrywalnej wartości C_T dla kontroli Low Positive Control w mieszaninie genu kontrolnego.

LOW_PC_NO_CT (Mbcr) (BRAK_WARTOŚCI_CT_NISKIEJ_KONTROLI_POZYTYWNEJ (Mbcr))	Brak wykrywalnej wartości C_T dla kontroli Low Positive Control w mieszaninie genu fuzyjnego.
LOW_PC_REPLICATE_NO_CT (ABL) (BRAK_WARTOŚCI_CT_POWTÓRZENIA_NISKIEJ_KONTROLI_POZYTYWNEJ (ABL))	Jedno z powtórzeń kontroli Low Positive Control nie zostało wykryte w mieszaninie genu kontrolnego.
LOW_PC_REPLICATE_NO_CT (Mbcr) (BRAK_WARTOŚCI_CT_POWTÓRZENIA_NISKIEJ_KONTROLI_POZYTYWNEJ (Mbcr))	Jedno z powtórzeń kontroli Low Positive Control nie zostało wykryte w mieszaninie genu fuzyjnego.
MULTIPLE_THRESHOLD_CROSSING (WIELOKROTNE_PRZEKROCZENIE_PROGU)	Krzywa amplifikacji przekracza próg więcej niż jeden raz. Nie można wyznaczyć jednoznacznej wartości C_T .
NO_BASELINE (BRAK_LINII_PODSTAWOWEJ)	Nie odnaleziono wstępnej linii podstawowej. Nie można wykonać dalszych analiz.
NTC_UNEXPECTED_VALUE (NIEOCZEKIWANA_WARTOŚĆ_NTC)	Wykryto wartość C_T w kontroli bez matrycy.
OTHER_TARGET_INVALID (NIEWAŻNA_INNA_WARTOŚĆ_DOCELOWA)	Inna wartość docelowa dla tej samej próbki jest nieważna.
OUT_OF_COMPUTATION_RANGE (POZA_ZAKRESEM_OBLICZENIOWYM)	Stężenie obliczone dla danej próbki wykracza poza limit techniczny.

Flaga	Opis
RUN_FAILED (NIEPOWODZENIE_REAKCJI)	Oznaczenie jest określone jako nieważne z powodu problemu z cyklerem lub połączeniem z cyklerem.
RUN_STOPPED (REAKCJA_ZATRZYMANA)	Oznaczenie jest określone jako nieważne z powodu ręcznego zatrzymania reakcji.
SAMPLE_HIGH_DELTA_CT (ABL) (DUŻA_DELTA_WARTOŚCI_CT_PRÓBKII (ABL))	Różnica wartości C_T między powtórzeniami próbki badanej w mieszaninie genu kontrolnego jest zbyt wysoka.
SAMPLE_HIGH_DELTA_CT (Mbcrr) (DUŻA_DELTA_WARTOŚCI_CT_PRÓBKII (Mbcrr))	Różnica wartości C_T między powtórzeniami próbki badanej w mieszaninie genu fuzyjnego jest zbyt wysoka.
SAMPLE_REPLICATE_NO_CT (ABL) (BRAK_WARTOŚCI_CT_POWTÓRZENIA_PRÓBKII (ABL))	Jedno z powtórzeń próbki badanej nie zostało wykryte w mieszaninie genu kontrolnego.
SAMPLE_REPLICATE_NO_CT (Mbcrr) (BRAK_WARTOŚCI_CT_POWTÓRZENIA_PRÓBKII (Mbcrr))	Jedno z powtórzeń próbki badanej nie zostało wykryte w mieszaninie genu fuzyjnego.
SATURATION (NASYCENIE)	Dane surowe fluorescencji są silnie nasyczone przed punktem przegięcia krzywej amplifikacji.
SPIKE_CLOSE_TO_CT (WZROST_BLISKO_WARTOŚCI_CT)	Wykryto wzrost na krzywej amplifikacji blisko wartości C_T .
SP_HIGH_SLOPE (ABL) (DUŻE_NACHYLENIE_WZORCA_SP (ABL))	Przekroczono górny limit nachylenia genu kontrolnego.
SP_HIGH_SLOPE (Mbcrr) (DUŻE_NACHYLENIE_WZORCA_SP (Mbcrr))	Przekroczono górny limit nachylenia genu fuzyjnego.
SP_LOW_RSQUARED (ABL) (NISKA_WARTOŚĆ_R2_WZORCA_SP (ABL))	Nie osiągnięto dolnego limitu wartości R^2 genu kontrolnego.
SP_LOW_RSQUARED (Mbcrr) (NISKA_WARTOŚĆ_R2_WZORCA_SP (Mbcrr))	Nie osiągnięto dolnego limitu wartości R^2 genu fuzyjnego.
SP_LOW_SLOPE (ABL) (MAŁE_NACHYLENIE_WZORCA_SP (ABL))	Nie osiągnięto dolnego limitu nachylenia genu kontrolnego.
SP_LOW_SLOPE (Mbcrr) (MAŁE_NACHYLENIE_WZORCA_SP (Mbcrr))	Nie osiągnięto dolnego limitu nachylenia genu fuzyjnego.
SP1_NO_CT (Mbcrr) (BRAK_WARTOŚCI_CT_SP1 (Mbcrr))	Brak wykrywalnej wartości C_T dla plazmidu wzorcowego 1 w mieszaninie genu fuzyjnego.
STANDARD_HIGH_DELTA_CT (ABL) (DUŻA_DELTA_WARTOŚCI_CT_WZORCA (ABL))	Różnica wartości C_T między powtórzeniami wzorca w mieszaninie genu kontrolnego jest zbyt wysoka.
STANDARD_HIGH_DELTA_CT (Mbcrr) (DUŻA_DELTA_WARTOŚCI_CT_WZORCA (Mbcrr))	Różnica wartości C_T między powtórzeniami wzorca w mieszaninie genu fuzyjnego jest zbyt wysoka.
STANDARD_REPLICATE_NO_CT (ABL) (BRAK_WARTOŚCI_CT_POWTÓRZENIA_WZORCA (ABL))	Jedno z powtórzeń wzorca nie zostało wykryte w mieszaninie genu kontrolnego.

STANDARD_REPLICATE_NO_CT (Mbc) (BRAK_WARTOŚCI_CT_POWTÓRZENIA_WZORCA (Mbc))	Jedno z powtórzeń wzorca nie zostało wykryte w mieszaninie genu fuzyjnego.
STEEP_BASELINE (STROMA_LINIA_PODSTAWOWA)	Na krzywej amplifikacji wykryto stromo rosnącą linię podstawową dla surowych danych fluorescencji.

Flaga	Opis
STRONG_BASELINE_DIP (SILNY_SPADEK_LINII_PODSTAWOWEJ)	Na krzywej amplifikacji wykryto silny spadek linii podstawowej dla surowych danych fluorescencji.
STRONG_NOISE (SILNY_SZUM)	Poza fazą wzrostu krzywej amplifikacji wykryto silny szum.
STRONG_NOISE_IN_GROWTH_PHASE (SILNY_SZUM_W_FAZIE_WZROSTU)	W fazie wzrostu (fazie wykładniczej) krzywej amplifikacji wykryto silny szum.
WAVY_BASE_FLUORESCENCE (FALISTA_LINIA_PODSTAWOWA_FLUORESCENCJI)	Na krzywej amplifikacji wykryto falistą linię podstawową dla surowych danych fluorescencji.

Tabela 10. Ostrzegawcze flagi próbek i opis terminów

Flaga	Opis
CN Mbcr Between LOB and LOD (Wartość CN Mbcr między LOB i LOD)	Liczba kopii genu fuzyjnego dla próbki badanej znajduje się między wartościami LOB i LOD i jest zastąpiona przez wartość LOD.
CN Mbcr Single Replicate (Wartość CN Mbcr jednego powtórzenia)	Liczba kopii genu fuzyjnego dla próbki badanej została obliczona na podstawie tylko jednego powtórzenia i jest podzielona przez 2.
CN Mbcr Single Replicate Between LOB and LOD (Wartość CN Mbcr jednego powtórzenia między LOB i LOD)	Liczba kopii genu fuzyjnego dla próbki badanej (obliczona na podstawie tylko jednego powtórzenia i podzielona przez 2) znajduje się między wartościami LOB i LOD i jest zastąpiona przez wartość LOD.
IS-NCN (%) Between LOB and LOD (Wartość IS-NCN (%) między LOB i LOD)	Znormalizowana liczba kopii (skala międzynarodowa) dla próbki badanej została uzyskana na podstawie wartości liczby kopii genu fuzyjnego między LOB i LOD.
IS-NCN (%) Single Replicate (Wartość IS-NCN (%) jednego powtórzenia)	Znormalizowana liczba kopii (skala międzynarodowa) dla próbki badanej została uzyskana na podstawie liczby kopii genu fuzyjnego obliczonej na podstawie tylko jednego powtórzenia.
IS-NCN (%) Single Replicate Between LOB and LOD (Wartość IS-NCN (%) jednego powtórzenia między LOB i LOD)	Znormalizowana liczba kopii (skala międzynarodowa) dla próbki badanej została uzyskana na podstawie liczby kopii genu fuzyjnego (obliczonej na podstawie tylko jednego powtórzenia) między wartościami LOB i LOD.
LOW_FLUORESCENCE_CHANGE (MAŁA_ZMIANA_FLUORESCENCJI)	Procentowa zmiana fluorescencji dla tej próbki względem próbówki o największej zmianie fluorescencji jest niższa niż określony limit.
LOW_REACTION_EFFICIENCY (MAŁA_WYDAJNOŚĆ_REAKCJI)	Wydajność reakcji dla tej próbki nie osiągnęła określonego limitu.
NCN (%) Between LOB and LOD (Wartość NCN (%) między LOB i LOD)	Znormalizowana liczba kopii dla próbki badanej została uzyskana na podstawie wartości liczby kopii genu fuzyjnego między LOB i LOD.
NCN (%) Single Replicate (Wartość NCN (%) jednego powtórzenia)	Znormalizowana liczba kopii dla próbki badanej została uzyskana na podstawie liczby kopii genu fuzyjnego obliczonej na podstawie tylko jednego powtórzenia.
NCN (%) Single Replicate Between LOB and LOD (Wartość NCN (%) jednego powtórzenia między LOB i LOD)	Znormalizowana liczba kopii dla próbki badanej została uzyskana na podstawie liczby kopii genu fuzyjnego (obliczonej na podstawie tylko jednego powtórzenia) między wartościami LOB i LOD.
SPIKE (WZROST)	W surowych danych fluorescencji wykryto wzrost na krzywej amplifikacji, ale jest on poza regionem, w którym określono wartość C_T .

Rozwiązywanie problemów

Ta część instrukcji może okazać się pomocna podczas rozwiązywania jakichkolwiek zaistniałych problemów. Aby uzyskać więcej informacji, należy także zapoznać się ze stroną często zadawanych pytań w witrynie naszego Centrum pomocy technicznej pod adresem: www.qiagen.com/FAQ/FAQList.aspx. Naukowcy z działu serwisu firmy QIAGEN chętnie odpowiedzą na wszelkie pytania dotyczące informacji i protokołów opisanych w niniejszej instrukcji obsługi, a także technologii próbek i testów (informacje kontaktowe znajdują się na tylnej stronie okładki lub pod adresem www.qiagen.com).

Komentarze i wskazówki

Izolacja RNA

W celu rozwiązywania problemów występujących podczas oczyszczania RNA z krwi pełnej za pomocą zestawu RNeasy Midi Kit i buforu Buffer EL należy zapoznać się z instrukcjami obsługi odpowiednich zestawów.

Niewystarczająca ilość RNA w eluacie

Użyto niewystarczającej ilości krwi

Powtórz izolację RNA, używając większej liczby próbek. Rozważ połączenie obu eluatów i zatężenie RNA za pomocą zestawu RNeasy MinElute Cleanup Kit (nr kat. 74204).

Niewystarczająca ilość RNA w eluacie

W celu uzyskania optymalnej czułości stężenie RNA musi wynosić 200 ng/μl

Użyj zestawu RNeasy MinElute Cleanup Kit (nr kat. 74204) do zatężenia próbki, a następnie dostosuj stężenie do 200 ng/μl.

Nie wykryto wzorca, kontroli lub kalibratora IS-Cal

- | | |
|----------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| a) Błędy pipetowania lub pominięcie odczynników; zmiana miejsca próbki lub dołka | Sprawdź schemat pipetowania i konfigurację reakcji. Powtórz reakcję PCR. |
| b) Nieprawidłowe przechowywanie składników zestawu | Przechowuj zestaw <i>ipsogen BCR-ABL1 MbcR RGQ RT-PCR Kit</i> w temperaturze od -30°C do -15°C i chroń mieszaniny qPCR Mix ABL1 i qPCR Mix MbcR przed światłem.
Nie przekraczaj maksymalnej liczby trzech cykli zamrażania-rozmrażania. |
| c) Uplynęła data ważności zestawu <i>ipsogen BCR-ABL1 MbcR RGQ RT-PCR Kit</i> | Sprawdź warunki przechowywania i datę ważności (patrz etykieta zestawu) odczynników i, w razie potrzeby, użyj nowego zestawu. |

Komentarze i wskazówki

Brak sygnału, w tym brak sygnału dla kontroli

- | | |
|----------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| a) Brak próbki reakcyjnej w pozycji 1 aparatu Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM | Należy zwrócić uwagę, aby zawsze umieszczać próbkę w pozycji 1 rotora. W przeciwnym razie aparat nie wykona kalibracji i zostaną zarejestrowane nieprawidłowe dane fluorescencji. |
| b) Błędy pipetowania lub pominięcie odczynników; zmiana miejsca próbki lub dołka | Sprawdź schemat pipetowania i konfigurację reakcji.
Powtórz reakcję PCR. |
| c) Nieprawidłowe przechowywanie składników zestawu | Przechowuj zestaw <i>ipsogen BCR-ABL1 MbcR RGQ RT-PCR Kit</i> w temperaturze od -30°C do -15°C i chroń mieszaniny starterów i sond przed światłem.
Nie przekraczaj maksymalnej liczby trzech cykli zamrażania-rozmrażania. |
| d) Upiętnęła data ważności zestawu <i>ipsogen BCR-ABL1 MbcR RGQ RT-PCR Kit</i> | Sprawdź warunki przechowywania i datę ważności (patrz etykieta zestawu) odczynników i, w razie potrzeby, użyj nowego zestawu. |
| e) Wybrano nieprawidłowy kanał detekcji | Ustaw kanał detekcji na kanał zielony lub 470 nm/510 nm. |
| f) Brak programu rejestracji danych | Sprawdź program wykonywania cykli. Patrz Tabela 5, strona 36.
Wybierz tryb rejestracji „Single” (Pojedynczy) przy końcu każdego segmentu hybrydyzacji w programie reakcji PCR. |

Zmienne natężenie fluorescencji

- | | |
|-------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------|
| Błędy pipetowania lub pominięcie odczynników; zmiana miejsca próbki lub dołka | Sprawdź schemat pipetowania i konfigurację reakcji.
Powtórz reakcję PCR. |
|-------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------|

Zbyt niskie natężenie fluorescencji

- | | |
|--------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| a) Nieprawidłowe przechowywanie składników zestawu | Przechowuj zestaw <i>ipsogen BCR-ABL1 MbcR RGQ RT-PCR Kit</i> w temperaturze od -30°C do -15°C i chroń mieszaniny qPCR Mix ABL1 i qPCR Mix MbcR przed światłem.
Nie przekraczaj maksymalnej liczby trzech cykli zamrażania-rozmrażania. |
| b) Upiętnęła data ważności zestawu <i>ipsogen BCR-ABL1 MbcR RGQ RT-PCR Kit</i> | Sprawdź warunki przechowywania i datę ważności (patrz etykieta zestawu) odczynników i, w razie potrzeby, użyj nowego zestawu. |
| c) Bardzo niska ilość docelowego RNA | Przed rozpoczęciem zawsze sprawdzaj stężenie RNA. |

Komentarze i wskazówki

Kontrola negatywna (H₂O) daje wynik pozytywny

Zanieczyszczenie krzyżowe,
zanieczyszczenie odczynnika, błąd aparatu,
zmiana miejsca dołka lub probówki kapilarnej lub rozkład sondy

Wymień wszystkie kluczowe odczynniki lub użyj nowego zestawu.
Aby uniknąć zanieczyszczenia krzyżowego, zawsze postępuj z odczynnikami, składnikami zestawu i materiałami eksploatacyjnymi zgodnie z powszechnie przyjętymi praktykami.
Chroń mieszaniny qPCR Mix ABL1 i qPCR Mix Mbcr przed światłem.
Sprawdź krzywe fluorescencji pod kątem fałszywie pozytywnych odczytów.
Sprawdź konfigurację reakcji.

Interpretacja wyników

W celu uzyskania informacji na temat rozwiązywania problemów związanych z aparatem Rotor-Gene Q MDx i oprogramowaniem Rotor-Gene Q lub oprogramowaniem Rotor-Gene AssayManager w wersji 2.1 należy zapoznać się z odpowiednimi instrukcjami obsługi.

Kontrola jakości

Kontrolę jakości całego zestawu wykonywano na aparacie Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM. Ten zestaw wyprodukowano zgodnie z normą ISO 13485. Świadectwa analiz są dostępne na żądanie pod adresem www.qiagen.com/support/.

Ograniczenia

Ten zestaw jest przeznaczony do użytku profesjonalnego.

Produkt może być obsługiwany wyłącznie przez personel przeszkolony w dziedzinie technik biologii molekularnej i zaznajomiony z tą technologią.

Niniejszego zestawu należy używać zgodnie z instrukcjami podanymi w niniejszym podręczniku, w połączeniu ze zwalidowanym aparatem wymienionym w części „Materiały wymagane, ale niedostarczone”, strona 12.

Należy zwracać uwagę na daty ważności wydrukowane na etykiecie opakowania. Nie używać przeterminowanych składników.

Wszystkie odczynniki dostarczone w zestawie *ipsogen* BCR-ABL1 MbcR RGQ RT-PCR Kit są przeznaczone do stosowania wyłącznie z odczynnikami z tego samego zestawu. Użycie innych odczynników lub odczynników z innych serii może wpłynąć na skuteczność.

Zestaw *ipsogen* BCR-ABL1 MbcR RGQ RT-PCR Kit jest zwalidowany wyłącznie dla próbek krwi pełnej antykoagulowanych solą potasową EDTA (K₂EDTA) pobranych od pacjentów z rozpoznaniem CML w fazie przewlekłej z obecnością chromosomu Filadelfia (Ph+) i białka p210.

Skuteczność zestawu *ipsogen* BCR-ABL1 MbcR RGQ RT-PCR Kit ustalono za pomocą zestawu RNeasy Midi Kit (nr kat. 75144), buforu Buffer EL (nr kat. 79217) oraz, w przypadku wykonywania etapu oczyszczania i zateżania RNA, zestawu RNeasy MinElute Cleanup Kit (nr kat. 74204).

Do wykonania reakcji PCR za pomocą tego zestawu zwalidowano wyłącznie aparat Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM.

Użycie tego produktu niezgodnie z przeznaczeniem i/lub wprowadzenie zmian w jego składnikach spowoduje zniesienie odpowiedzialności firmy QIAGEN.

Wszelkie wyniki diagnostyczne należy interpretować łącznie z innymi obserwacjami klinicznymi lub laboratoryjnymi.

Użytkownik jest odpowiedzialny za walidację skuteczności systemu pod kątem wszelkich procedur stosowanych w danym laboratorium, które nie są objęte badaniami wydajności wykonanymi przez firmę QIAGEN.

Parametry skuteczności

Granica próby ślepej

Granice próby ślepej (LOB) określono zgodnie z normą CLSI/NCCLS EP17-2A na próbkach krwi pełnej pobranych od zdrowych osób (siedem próbek, 12 pomiarów/dwie serie).

Wartość LOB wyniosła 1,02 kopii transkryptu genu BCR-ABL1 Mbcr.

Granica wykrywalności

Granice wykrywalności (LOD; czułość analityczna) określono na podstawie „Metody klasycznej” (Classical approach) opisaney w normie CLSI/NCCLS EP17-2A. W tym badaniu przeanalizowano niskopozytywne próbki o znanej ilości transkryptu (siedem próbek, 12 pomiarów/dwie serie).

Wartość LOD wyniosła 3,21 kopii transkryptu genu BCR-ABL1 Mbcr lub 0,0030% wartości IS-NCN.

Liniowość

Liniowość określono zgodnie z normą CLSI/NCCLS EP6-A, używając jednej serii zestawu *ipsogen BCR-ABL1 Mbcr RGQ RT-PCR Kit* na dziewięciu różnych próbkach przygotowanych poprzez wykonanie rozcieńczeń seryjnych pozytywnego RNA wyizolowanego z linii komórkowych w negatywnym RNA wyizolowanym od zdrowych dawców. Badania wykonywano dla trzech różnych wejściowych ilości RNA.

Oznaczenie ilościowe transkryptu genu BCR-ABL1 Mbcr jest liniowe od wartości LOD do 56% wartości IS-NCN o ile oznaczone ilościowo stężenie RNA próbki jest bliskie zalecanemu stężeniu wejściowemu 200 ng/μl (całkowita ilość 3 μg).

Przy mniejszych ilościach RNA zakres liniowości może być obniżony.

Powtarzalność i odtwarzalność

Badanie precyzji wykonano zgodnie z normą CLSI/NCCLS EP5-A2. Testy przeprowadzono na dziewięciu różnych próbkach badanych 45 razy w dwóch powtórzeniach w 45 reakcjach wykonywanych w ciągu 23 dni, w wyniku czego otrzymano 90 pomiarów na próbkę.

Wyniki badania precyzji przedstawiono w tabeli Tabela 12.

Tabela 11. Wyniki badania precyzji

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

CV_{TOTAL}: współczynnik zmienności dla precyzji całkowitej (IS-NCN BCR-ABL1 Mbcr); SD: odchylenie standardowe; R+: powtarzalność; RUN++: odtwarzalność między reakcjami; S: wzorzec; TOTAL+++: precyzja całkowita (w tym między aparatami, między operatorami i między seriami).

Substancje zakłócające

Projekt badania opracowano na podstawie zaleceń opisanych w normie NCCLS EP7-A2 „Interference Testing in clinical Chemistry”. Wybrano substancje, które mogą być obecne w próbkach krwi lub mogą zostać wprowadzone podczas oczyszczania RNA, ze względu na to, że potencjalnie mogą wpływać na reakcję PCR (bilirubina niezwiązana, bilirubina

związana, hemoglobina [ludzka], albumina surowicza [ludzka], nadmiar soli potasowej EDTA [K2-EDTA], etanol).

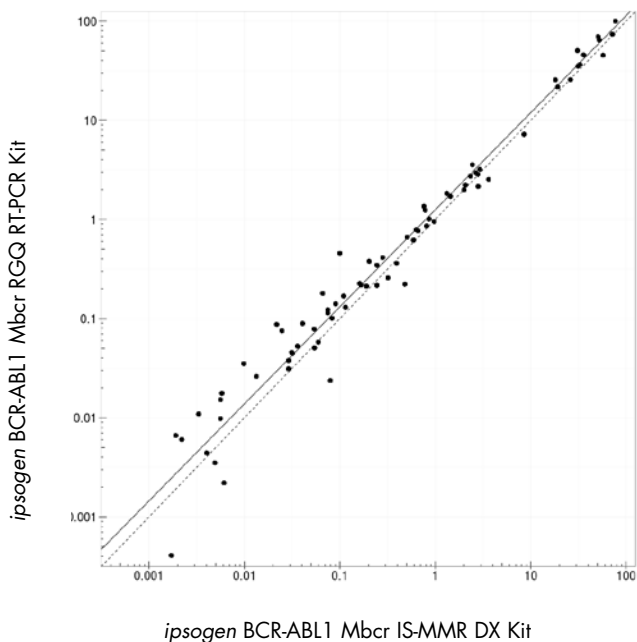
Uzyskane wyniki wskazują, że substancje te nie powodują efektu zakłócającego.

Walidacja kliniczna i porównanie metod

W celu porównania zestawu *ipsogen BCR-ABL1 MbcR RGQ RT-PCR Kit* z metodami alternatywnymi przeprowadzono dwa badania.

Badanie 1: 76 próbek RNA wyizolowanych z krwi obwodowej przeanalizowano za pomocą zestawu *ipsogen BCR-ABL1 MbcR RGQ RT-PCR Kit* oraz zestawu *ipsogen BCR-ABL1 MbcR IS-MMR DX Kit*.

Zmierzone wartości IS-NCN uzyskane za pomocą dwóch metod porównano za pomocą regresji Deminga. Między zestawem *ipsogen BCR-ABL1 MbcR RGQ RT-PCR Kit* a zestawem *ipsogen BCR-ABL1 MbcR IS-MMR DX Kit* była obserwowana silna korelacja ($R^2 = 0,97$), co przedstawiono na Ryc. 9.



Ryc. 9. Wykres wartości IS-NCN uzyskanych za pomocą zestawu *ipsogen BCR-ABL1 MbcR RGQ RT-PCR Kit* i zestawu *ipsogen BCR-ABL1 MbcR IS-MMR DX Kit*.

Badanie 2: 39 próbek RNA wyizolowanych z krwi obwodowej pacjentów z rozpoznaniem CML Ph+ przyjmujących inhibitory TKI przeanalizowano we francuskim ośrodku klinicznym za pomocą zestawu *ipsogen BCR-ABL1 MbcR RGQ RT-PCR Kit* i testu opracowanego przez laboratorium (metoda referencyjna). Wyniki uzyskane metodą referencyjną mogły być raportowane w postaci wystandaryzowanej do skali międzynarodowej przy użyciu przelicznika.

W celu porównania statusu klinicznego określonego za pomocą obu metod utworzono następującą tabelę kontyngencji. Między zestawem *ipsogen BCR-ABL1 MbcR RGQ RT-PCR Kit* a metodą referencyjną była obserwowana silna zgodność (ogólna zgodność = 97,4%), co przedstawiono na Ryc. 10.

		Metoda referencyjna		n	
		brak MR 4	MR 4 lub poniżej		
ipsogen BCR-ABL1 Mbc RGQ RT-PCR Kit	brak MR 4	15	1	16	
	MR 4 lub poniżej	0	23	23	
		n	15	24	39

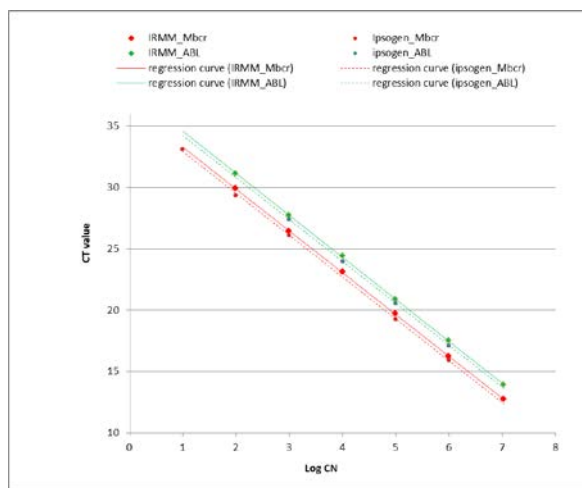
Ryc. 10. Tabela kontyngencji porównująca zestaw *ipsogen* BCR-ABL1 Mbc RGQ RT-PCR Kit i test opracowany przez laboratorium wystandaryzowany do skali międzynarodowej.

Badanie zgodności: Wzorzec pojedynczego plazmidu ERM-AD623 BCR-ABL1 (IRMM) względem wzorca pojedynczego plazmidu *ipsogen* (QIAGEN)

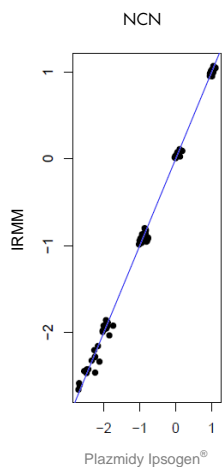
Najnowsze definicje robocze odpowiedzi molekularnej BCR-ABL1 Mbc w CML zostały podane przez grupę European LeukemiaNet/European Treatment Outcome Study (ELN/EUTOS) Molecular Monitoring Steering Group z Instytutu Materiałów Odniesienia i Pomiarów (Institute for Reference Materials and Measurements, IRMM) w Belgii (9) i obejmują zalecenie stosowania plazmidu BCR-ABL1 ERM-AD623.

W celu spełnienia tego zalecenia firma QIAGEN przeprowadziła badanie zgodności, aby porównać pojedynczy plazmid *ipsogen* z wieloma miejscami docelowymi używany w zestawie *ipsogen* BCR-ABL1 Mbc RGQ RT-PCR Kit (24) CE (nr kat. 670923) z plazmidem ERM-AD623 BCR-ABL1 (IRMM).

Porównanie opierało się na określeniu stosunku znormalizowanej liczby kopii (NCN) genu BCR-ABL1 Mbcf/ABL1, oceniano rozcieńczenia obu wzorców (*ipsogen* lub ERM-AD623 BCR-ABL1), na próbkach kontrolnych dołączonych do zestawów *ipsogen* i certyfikowanym materiale referencyjnym z Narodowego Instytutu Wzorców Biologicznych i Kontroli (National Institute for Biological Standards and Control, NIBSC) (8). Wyniki wskazują, że obie krzywe wzorcowe są zbieżne (Ryc. 11), a stosunki NCN są porównywalne (Ryc. 12).



Ryc. 11. Porównanie plazmidów *ipsogen* i ERM-AD623 BCR-ABL1 wskazuje, że krzywe wzorcowe są zbieżne.



Ryc. 12. Wartości NCN dla plazmidów *ipsogen* i ERM-AD623 są porównywalne.

Badanie firmy QIAGEN wykazało, że nie istnieje różnica istotna statystycznie: wzorzec pojedynczego plazmidu ERM-AD623 BCR-ABL1 i wzorzec pojedynczego plazmidu *ipsogen* dają równoważne wyniki.

Literatura

Cytowane odniesienia do literatury

1. Cross, N.C., White, H.E., Müller, M.C., Saglio, G., Hochhaus, A. (2012) Standardized definitions of molecular response in chronic myeloid leukemia. *Leukemia* 26, 2172.
2. Mahon, F.X., Etienne, G. (2013) Deep molecular response in chronic myeloid leukemia: the new goal of therapy? *Clin. Cancer Res.* 20, 310.
3. Baccarani, M., Deininger, M.W., Rosti, G., et al. (2013) European LeukemiaNet recommendations for the management of chronic myeloid leukemia: 2013. *Blood* 122, 872.
4. Rousselot, P., Charbonnier, A., Cony-Makhoul, P., et al. (2014) Loss of major molecular response as a trigger for restarting tyrosine kinase inhibitor therapy in patients with chronic-phase chronic myelogenous leukemia who have stopped imatinib after durable undetectable disease. *J. Clin. Oncol.* 32, 424.
5. Branford, S., Cross, N.C., Hochhaus, A., et al. (2006) Rationale for the recommendations for harmonizing current methodology for detecting BCR-ABL transcripts in patients with chronic myeloid leukaemia. *Leukemia* 20, 1925.
6. Branford, S., Fletcher, L., Cross, N.C., et al. (2008) Desirable performance characteristics for BCR-ABL measurement on an international reporting scale to allow consistent interpretation of individual patient response and comparison of response rates between clinical trials. *Blood* 112, 3330.
7. Hughes, T., Deininger, M., Hochhaus, A., et al. (2006) Monitoring CML patients responding to treatment with tyrosine kinase inhibitors: review and recommendations for harmonizing current methodology for detecting BCR-ABL transcripts and kinase domain mutations and for expressing results. *Blood* 108, 28.
8. White, H.E., Matejtschuk, P., Rigsby, P., et al. (2010) Establishment of the first World Health Organization International Genetic Reference Panel for quantitation of BCR-ABL mRNA. *Blood* 116, e111.
9. Cross, N.C., White, H.E., Colomer, D., et al. (2015) Laboratory recommendations for scoring deep molecular responses following treatment for chronic myeloid leukemia. *Leukemia* 29, 999.

Przydatne odniesienia do literatury

Baccarani, M., et al. (2006) Evolving concepts in the management of chronic myeloid leukemia: recommendations from an expert panel on behalf of the European LeukemiaNet. *Blood* 108, 1809.












Beillard, E., V.H., et al. (2003) Evaluation of candidate control genes for diagnosis and residual disease detection in leukemic patients using 'real-time' quantitative reverse-transcriptase polymerase chain reaction (RQ-PCR)—a Europe against cancer program. *Leukemia* 17, 2474.

Gabert, J., et al. (2003) Standardization and quality control studies of 'real-time' quantitative reverse transcriptase polymerase chain reaction of fusion gene transcripts for residual disease detection in leukemia—a Europe Against Cancer program. *Leukemia* 17, 2318.

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

Symbole

Poniższe symbole mogą znajdować się na opakowaniu i etykietach:

Symbol	Definicja symbolu
	Termin ważności
	Wyrób medyczny do diagnostyki in vitro
	Numer katalogowy
	Numer serii
	Numer materiału
	Globalny numer jednostki handlowej
	Zakres temperatury
	Producent
	Chronić przed światłem
	Zapoznać się z instrukcją użycia
	Przeostroga

Informacje dotyczące zamawiania

Produkt	Zawartość	Nr kat.
<i>ipsogen</i> BCR-ABL1 MbcR RGQ RT-PCR Kit (24)	Na 24 reakcje: wzorce ilościowe Single Plasmid Standard dla genów ABL1 i BCR-ABL1 MbcR, kontrole Low Positive Control i High Positive Control, kalibrator IS-MMR Calibrator, mieszanina qPCR mix ABL1, mieszanina qPCR mix MbcR, odczynniki do reakcji odwrotnej transkrypcji i qPCR.	670923
Aparat Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM — do analizy PCR w czasie rzeczywistym w zastosowaniach klinicznych, zwalidowany do użytku w diagnostyce in vitro		
Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM Platform	Cykler do reakcji PCR w czasie rzeczywistym i analizator High Resolution Melt z 5 kanałami (zielony, żółty, pomarańczowy, czerwony, purpurowy) i kanałem HRM, komputer typu laptop, oprogramowanie, akcesoria: obejmuje roczną gwarancję na części i robocizną, nie obejmuje instalacji i przeszkolenia.	9002032

Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM System	Cyklery do reakcji PCR w czasie rzeczywistym i analizator High Resolution Melt z 5 kanałami (zielony, żółty, pomarańczowy, czerwony, purpurowy) i kanałem HRM, komputer typu laptop, oprogramowanie, akcesoria: obejmuje roczną gwarancję na części i robocizną, instalację i przeszkolenie.	9002033
Rotor-Gene Assay Manager 2.1 Software	Oprogramowanie do wykonywania rutynowych badań za pomocą aparatu Rotor-Gene Q	9024203
Rotor-Gene Assay Manager 2.1 License	Pojedyncza licencja na oprogramowanie do zainstalowania na jednym komputerze	9025620
Loading Block 72 x 0.1 ml Tubes	Aluminiowy blok do ręcznego przygotowywania reakcji jednokanałową pipetą w 72 probówkach o pojemności 0,1 ml.	9018901
Strip Tubes and Caps, 0.1 ml (250)	250 pasków po 4 probówki z zatyczkami na 1000 reakcji.	981103
Strip Tubes and Caps, 0.1 ml (2500)	10 x 250 pasków po 4 probówki z zatyczkami na 10 000 reakcji.	981106
Izolacja RNA		
RNeasy Midi Kit	50 kolumn RNeasy Midi Spin Columns, probówki zbiorcze (15 ml), odczynniki i bufony wolne od RNaz. Do oczyszczania RNA całkowitego.	75144
Buffer EL	1000 ml buforu Erythrocyte Lysis Buffer.	79217

RNeasy MinElute Cleanup Kit

50 kolumn RNeasy MinElute Spin Columns, próbki zbiorcze (1,5 ml i 2 ml), odczynniki i bufory wolne od RNaz. Do oczyszczania i zatężania RNA przy małych objętościach elucji.

74204

Aktualne informacje licencyjne oraz dotyczące wyłączenia odpowiedzialności dla poszczególnych produktów znajdują się w odpowiedniej instrukcji obsługi lub podręczniku użytkownika zestawu QIAGEN. Instrukcje obsługi lub podręczniki użytkownika zestawu QIAGEN są dostępne w witrynie www.qiagen.com. Można je także zamówić w serwisie lub u lokalnego dystrybutora firmy QIAGEN.

Historia zmian w instrukcji

Dokument	Zmiany	Data
HB-1904_005	Dodanie części „Analiza zautomatyzowana: reakcja qPCR w aparacie Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM z rotorem na 72 próbki i oprogramowaniem RGAM” i „Interpretacja wyników w oprogramowaniu RGAM”.	Czerwiec 2018 r.

Ten produkt jest przeznaczony do diagnostyki in vitro. Produkty firmy QIAGEN nie mogą być odsprzedawane, modyfikowane w celu odsprzedaży lub wykorzystywane do produkcji komercyjnych produktów bez pisemnej zgody firmy QIAGEN.

Informacje zawarte w niniejszym dokumencie mogą ulec zmianie bez powiadomienia. Firma QIAGEN nie ponosi żadnej odpowiedzialności za błędy, które mogą wystąpić w niniejszym dokumencie. Dokument ten uważa się za kompletny i dokładny w momencie jego opublikowania. Firma QIAGEN nie ponosi w żadnym wypadku odpowiedzialności za jakiegokolwiek szkody przypadkowe, specjalne lub wynikowe ani z tytułu odszkodowań wielokrotnych w związku z niniejszym dokumentem lub jego użyciem.

Produkty firmy QIAGEN są objęte gwarancją w odniesieniu do podanych specyfikacji. Wyłącznym obowiązkiem firmy QIAGEN i jedynym zadośćuczynieniem przysługującym klientowi jest bezpłatna wymiana produktów w przypadku, gdy ich działanie nie będzie zgodne z zapisami gwarancji.

Nabywanie tego produktu umożliwia zastosowanie go przez nabywcę do przeprowadzania czynności diagnostycznych w zakresie diagnostyki in vitro u ludzi. Niniejszym nie udziela się praw patentowych ani innych licencji żadnego typu poza powyższym prawem użytkowania wynikającym z nabycia produktu.

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

Umowa ograniczonej licencji dla zestawu *ipsogen BCR-ABL1 MbcR RGQ RT-PCR Kit*

Korzystanie z tego produktu oznacza zgodę nabywcy lub użytkownika produktu na następujące warunki:

1. Niniejszy produkt może być użytkowany wyłącznie zgodnie z protokołem dołączonym do produktu oraz niniejszą instrukcją i wyłącznie ze składnikami znajdującymi się w tym zestawie. Firma QIAGEN nie udziela żadnej licencji w zakresie praw własności intelektualnej do użytkowania niniejszego zestawu ze składnikami nienależącymi do zestawu z wyjątkiem składników opisanych w wytycznych dołączonych do produktu, niniejszej instrukcji oraz dodatkowych wytycznych dostępnych na stronie www.qiagen.com. Niektóre dodatkowe protokoły zostały sformułowane przez użytkowników rozwiązań QIAGEN z myślą o innych użytkownikach rozwiązań QIAGEN. Takie protokoły nie zostały dokładnie przetestowane, ani poddane procesowi optymalizacji przez firmę QIAGEN. Firma QIAGEN nie gwarantuje, że nie naruszają one praw osób trzecich.
2. Firma QIAGEN nie gwarantuje, że niniejszy zestaw i/lub jego użytkowanie nie narusza praw osób trzecich. Wyjątek stanowią jedynie wyraźnie określone licencje.
3. Zestaw oraz jego składniki są przeznaczone do jednorazowego użytku, nie można ich ponownie używać, regenerować ani odsprzedawać.
4. Firma QIAGEN nie udziela innych licencji wyrażonych lub dorozumianych poza tymi, które są wyraźnie określone.
5. Nabywca i użytkownik zestawu zobowiązuje się nie podejmować działań ani nie zezwalać innym osobom na podejmowanie działań, które mogą doprowadzić do wykonania lub umożliwić wykonanie zabronionych czynności wymienionych powyżej. Firma QIAGEN może wyegzekwować przestrzeganie zakazów niniejszej Umowy ograniczonej licencji i wnieść sprawę do dowolnego sądu i ma prawo zażądać zwrotu kosztów wszelkich postępowań i kosztów sądowych, w tym wynagrodzeń prawników, związanych z egzekwowaniem postanowień Umowy ograniczonej licencji lub wszelkich praw własności intelektualnej w odniesieniu do zestawu i/lub jego składników.

Aktualne warunki licencyjne dostępne są na stronie www.qiagen.com.

1114278PL_06/2018_HB-1904-005 © 2016 QIAGEN, wszelkie prawa zastrzeżone.

