

Priručnik za komplet *ipsogen*[®] BCR-ABL1 MbcR IS-MMR



Verzija 1

IVD

Kvantitativna in vitro dijagnostika

Za uporabu s instrumentima Rotor-Gene[®] Q, Applied Biosystems[®], ABI PRISM[®] i LightCycler[®]

CE

REF 670723



QIAGEN GmbH, QIAGEN Strasse 1, 40724 Hilden,
NJEMAČKA

R3 **MAT** 1072509HR



QIAGEN Sample and Assay Technologies

QIAGEN je vodeći dobavljač inovativnih tehnologija za uzimanje uzoraka i testiranje koje omogućuju izolaciju i otkrivanje sadržaja bilo kojeg biološkog uzorka. Naši napredni, visoko kvalitetni proizvodi i usluge osiguravaju uspjeh u procesu od uzimanja uzorka do dobivanja rezultata.

QIAGEN postavlja standarde za:

- pročišćavanje DNA, RNA i proteina
- analiziranje nukleinske kiseline i proteina
- istraživanje microRNA i RNAi
- automatiziranje tehnologija za uzimanja uzoraka i testiranje

Naš zadatak je omogućiti vam postizanje izvanrednog uspjeha i novih otkrića. Za više informacija posjetite **www.qiagen.com**.

Sadržaj

Namjenska uporaba	5
Pregled i objašnjenje	5
Što je kronična mijeloična leukemija (CML)	5
Praćenje bolesti	5
Načelo postupka	7
Priloženi materijali	9
Sadržaj kompleta	9
Materijali koji su potrebni, ali nisu priloženi	10
Upozorenja i mjere opreza	12
Opće mjere opreza	12
Pohranjivanje i rukovanje reagensima	13
Rukovanje i pohranjivanje uzoraka	13
Postupak	14
Priprema RNA iz uzorka	14
Protokoli	
■ Reverzna transkripcija pomoću SuperScript III reverzne transkriptaze	14
■ qPCR na instrumentima Rotor Gene Q MDx 5plex HRM ili Rotor-Gene Q 5plex HRM s rotorom sa 72 epruvete	17
■ qPCR na instrumentima Applied Biosystems 7500 Real-Time PCR System, ABI PRISM 7900HT SDS i LightCycler 480	21
■ qPCR na instrumentima LightCycler 1.2, 1.5 i 2.0	27
Tumačenje rezultata	31
Načelo analize podataka	31
Standardne krivulje i kriteriji kvalitete koji se odnose na neobrađene podatke	32
Normaliziran broj kopija (NCN)	34
IS konverzija i MMR izvještavanje	35
Pregled kriterija kvalitete	36
Uklanjanje smetnji	36
Kontrola kvalitete	37
Ograničenja	37
Karakteristike izvedbe	38

Granica praznine i granica detekcije	38
Linearnost	38
Prijenosi	38
Preciznost	38
Istraživanje podudarnosti: Usporedba standarda ERM-AD623 BCR-ABL1 jedan plazmid (IRMM) s <i>ipsogen</i> jednim plazmidom (QIAGEN)	39
Reference	41
Simboli	42
Kontakt informacije	42
Informacije za naručivanje	43

Namjenska uporaba

Komplet *ipsogen* BCR-ABL1 Mbcr IS-MMR je namijenjen za kvantificiranje BCR-ABL p210 b2a2 ili b3a2 prijepisa u koštanoj srži ili perifernim uzorcima krvi akutne limfoblastične leukemije (ALL) ili kronične mijeloične leukemije (CML) u bolesnika kojima je prethodno dijagnosticirana prisutnost fuzijskog gena BCR-ABL Mbcr. Test je namijenjen za procjenu razine molekularnog odgovora; rezultati se mogu koristiti za praćenje minimalne rezidualne bolesti.

Pregled i objašnjenje

Što je kronična mijeloična leukemija (CML)

Kronična mijeloična leukemija (CML) pripada grupi mijeloproliferativnih tumora i u >90% slučajeva ogleda se kroz prisutnost filadelfijskog kromosoma (engl. Philadelphia chromosome, Ph chromosome).

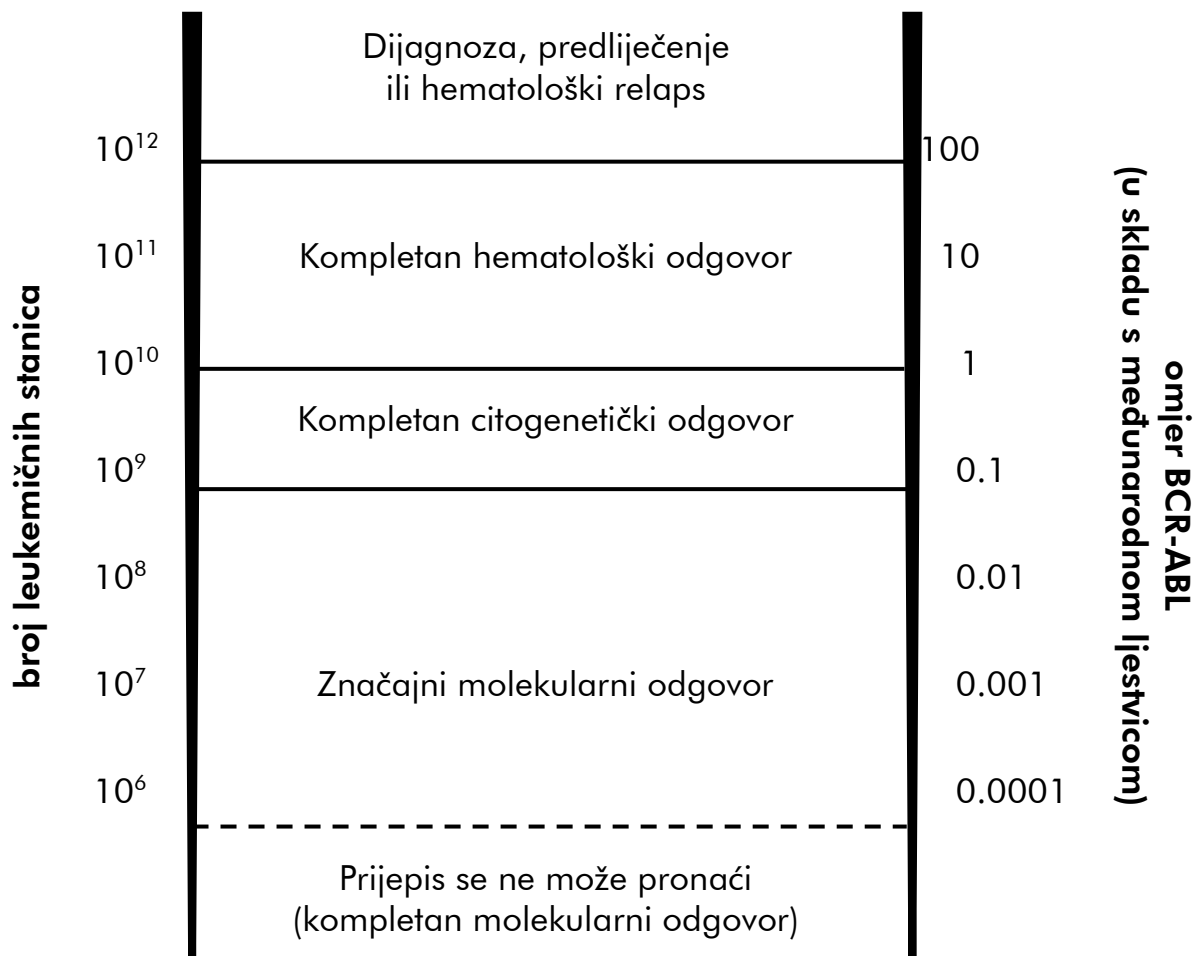
Ovaj kromosom je proizvod recipročne translokacije između dugačkih krakova kromosoma 9 i 22, t(9;22), pri čemu je BCR uski dio kromosoma (engl. breakpoint cluster region, BCR) smješten na kromosomu 22, a c-ABL onkogen dolazi iz kromosoma 9. Odgovarajući fuzijski gen, BCR-ABL, transkribira se u 8,5 kb mRNA, s 2 načina spajanja b2a2 (40% slučajeva) i b3a2 (55% slučajeva). On kodira kimerični protein, p210, s povećanom aktivnošću tirozin-kinaze. Prijepisi b2a3 i b3a3 predstavljaju manje od 5% slučajeva. Ph kromosom može se otkriti i u 35% SVIH odraslih bolesnika.

Godišnja učestalost slučajeva CML približno je 1–2 na 100.000 i CML se pojavljuje u 20% odraslih bolesnika s leukemijom. Klinički ju karakterizira porast broja mijeloičnih stanica koje se normalno diferenciraju i funkcioniraju. Bolesnicima s CML dijagnoza će u 90–95% slučajeva biti uspostavljena u kroničnoj ili stabilnoj fazi bolesti. Povijesno gledano, unutar 4 do 6 godina u prosjeku, bolesnici su uključivani u ubranu fazu koja dovodi do blastične krize i akutne leukemije što je uvijek fatalno. Pojava imatiniba i u skorije vrijeme, druge generacije inhibitora tirozin-kinaze (TKI) dramatično je promijenila prirodni tijek bolesti: većina bolesnika sad je u remisiji i uključena je u dugotrajno promatranje i praćenje bolesti.

Praćenje bolesti

Do ovog trenutka, cilj terapije za CML je postići postotak preživljavanja od 100% i negativnost Ph kromosoma. Praćenje bolesti je dakle bitno sredstvo za procjenu odgovora na liječenje i otkrivanje ranog relapsa za svakog pojedinačnog bolesnika. Tijekom liječenja inhibitorima tirozin-kinaze, bolesnici tipično postižu napredak od hematološke do citogenetične i potom molekularne

remisije, odgovarajući na smanjene brojeve leukemičnih stanica i prijepisa BCR-ABL kao što je detaljno predstavljeno na slici 1 ispod.



Slika 1. Prilagođeno iz reference 1.

Standardna metoda za procjenu težine tumora u bolesnika s CML je konvencionalna citogenetska analiza (G-pruganje) metafaza koštane srži. Citogenetički odgovor se procjenjuje na najmanje 20 metafaza koštane srži. Razina citogenetičkog odgovora se procjenjuje prema postotku metafaza s pozitivnim Ph kromosomom (vidjeti tablicu 1, referenca 2). Međutim, ova procjena ovisi o laboratorijskim rezultatima i ima malu osjetljivost, od 5% kad se analizira 20 metafaza.

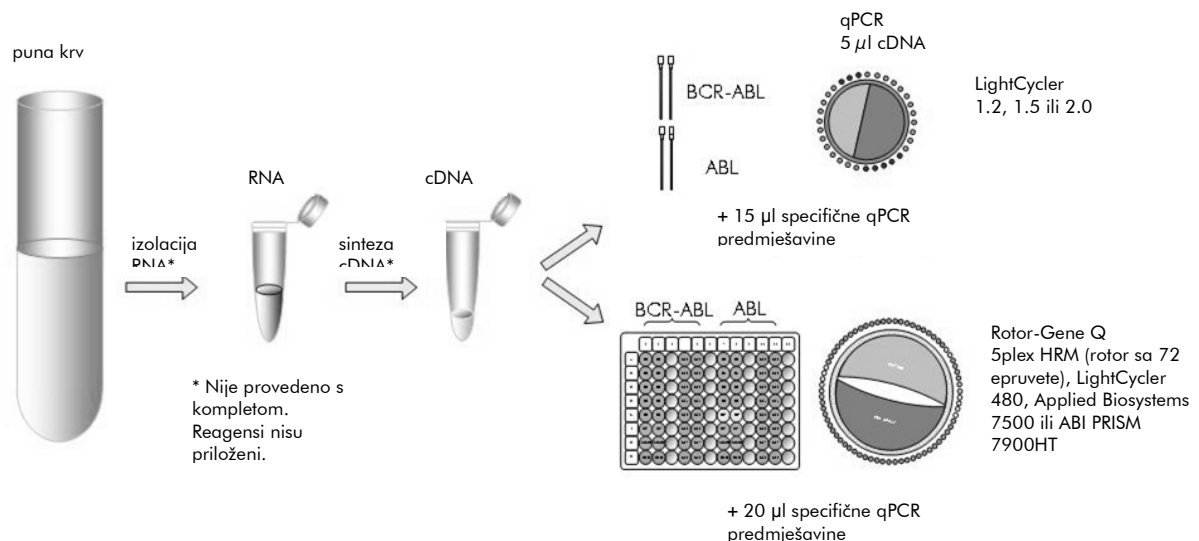
Kvantitativna lančana reakcija polimerazom (qPCR) u realnom vremenu koja kvantificira BCR-ABL M_{bcr} mRNA, na uzorcima periferne krvi sad je dio tehnika praćenja bolesti za liječenje CML. Ona je manje invazivna i osjetljivija od konvencionalne citogenetike metafaze koštane srži.

Preporuke za praćenje bolesti CML nedavno su također aktualizirane kako bi se uključili novi klinički dokazi iz kliničkih ispitivanja kao i poboljšano planiranje ciljeva i sredstava za praćenje bolesti. Najnovije preporuke vezano uz definiciju

odgovora i praćenje bolesnika koji uzimaju imatinib dolaze od stručnjaka Europske mreže za leukemiju (engl. European LeukemiaNet, ELN) (2).

S tehničke točke gledišta, međunarodni stručnjaci ulažu velike napore kako bi se uskladili načini testiranja i pronalaženja BCR-ABL Mbcr (3–5). Osim toga, nedavno je pod pokroviteljstvom WHO izabrana referentna grupa koja za cilj ima omogućiti jednostavnu standardizaciju kvantifikacije prijepisa BCR-ABL (6).

Načelo postupka



Slika 2. Izolacija RNA, sinteza cDNA i qPCR.

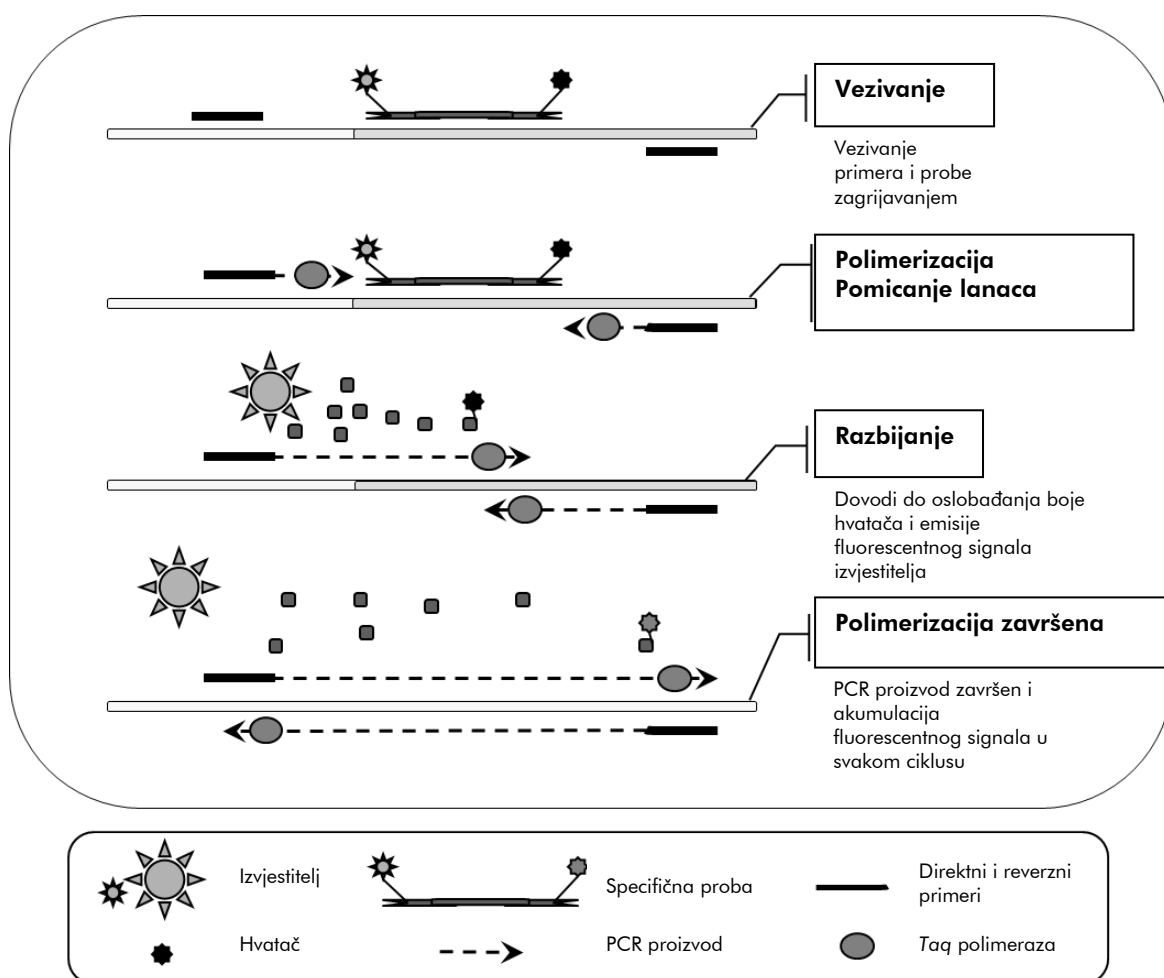
qPCR omogućuje točnu kvantifikaciju PCR proizvoda tijekom eksponencijalne faze procesa amplifikacije PCR. Podaci za kvantitativni PCR mogu se brzo dobiti, bez obrade nakon PCR, detekcijom fluorescentnih signala u realnom vremenu tijekom i/ili odmah nakon PCR ciklusa i time smanjiti rizik od kontaminacije PCR proizvoda. Trenutačno su na raspolaganju 3 osnovne vrste qPCR tehnika: qPCR analiza uz uporabu SYBR® zelene I boje, qPCR analiza uz uporabu probi hidrolize i qPCR analiza uz uporabu hibridizacijskih proba.

Za ovo testiranje koristi se načelo qPCR s hidrolizom dvostruko obojanog oligonukleotida. Tijekom PCR, direktni i reverzni primeri hibridiziraju se u specifičnu sekvencu. Dvostruko obojani oligonukleotid je sadržan u istoj mješavini. Ova proba, koja se sastoji od oligonukleotida označenog na 5' kraju bojom izvjestitelja i na 3' kraju bojom hvatača, hibridizira se do ciljne sekvence unutar PCR proizvoda. qPCR analiza s probama hidrolize koristi egzonukleaznu aktivnost 5'→3' *Thermus aquaticus* (Taq) DNA polimeraze. Kad je proba intaktna, blizina boje izvjestitelja boji hvatača za rezultat ima supresiju izvjestiteljske fluorescencije primarno zbog prijenosa energije fluorescentnom rezonancom.

Tijekom PCR, ako je cilj od interesa prisutan, proba se posebice vezuje zagrijavanjem između lokacija direktnog i reverznog primera. Egzonukleazna

aktivnost 5'→3' DNA polimeraze razbija probu između izvjestitelja i hvatača samo ako se proba hibridizira do cilja. Fragmenti probe se potom udaljavaju od cilja i polimerizacija lanca se nastavlja. 3' kraj probe je blokiran kako bi se spriječilo širenje probe tijekom PCR (slika 3). Ovaj proces se obavlja u svakom ciklusu i ne utječe na eksponencijalnu akumulaciju proizvoda.

Povećanje fluorescentnog signala detektira se samo ako je ciljna sekvenca komplementarna s probom i prema tome se pojačava tijekom PCR. Zbog ovih zahtjeva nespecifična amplifikacija se ne detektira. Prema tome, povećavanje fluorescencije je izravno proporcionalno ciljnoj amplifikaciji tijekom PCR.



Slika 3. Načelo reakcije. Ukupna RNA se reverzno transkribira, a generirana cDNA se amplificira tijekom PCR pomoću nekoliko specifičnih primera i specifične interne probe s dvostrukim bojanjem (FAM™–TAMRA™). Proba se povezuje s amplikonom tijekom svakog koraka vezivanja PCR. Kad se Taq proširuje od spoja primera do amplikona, on pomiče 5' kraj probe koji se potom razgrađuje egzozukleaznom aktivnošću 5'→3' Taq DNA polimeraze. Razbijanje se nastavlja dok preostala proba ne istopi amplikon. Ovaj proces oslobađa fluorofor i hvatač u otopinu, prostorno ih odvajajući i dovodeći do povećavanja fluorescencije od FAM i smanjivanja fluorescencije od TAMRA.

Priloženi materijali

Sadržaj kompleta

ipsogen BCR-ABL1 MbcR IS-MMR Kit		(24)
Kataloški br.		670723
Broj reakcija		24
High Positive RNA Control (visoko pozitivna RNA kontrola)		3 x 10 µl
IS-MMR Calibrator (kalibrator IS-MMR)		3 x 10 µl
MbcR and ABL Single Plasmid Standard Dilution (standardna otopina pojedinačnog plazmida za MbcR i ABL) (10 ¹ kopija/5 µl)	SP1-BCR-ABL MbcR & ABL (SP1-BCR-ABL MbcR i ABL)	35 µl
MbcR and ABL Single Plasmid Standard Dilution (standardna otopina pojedinačnog plazmida za MbcR i ABL) (10 ² kopija/5 µl)	SP2-BCR-ABL MbcR & ABL (SP2-BCR-ABL MbcR i ABL)	35 µl
MbcR and ABL Single Plasmid Standard Dilution (standardna otopina pojedinačnog plazmida za MbcR i ABL) (10 ³ kopija/5 µl)	SP3-BCR-ABL MbcR & ABL (SP3-BCR-ABL MbcR i ABL)	70 µl
MbcR and ABL Single Plasmid Standard Dilution (standardna otopina pojedinačnog plazmida za MbcR i ABL) (10 ⁴ kopija/5 µl))	SP4-BCR-ABL MbcR & ABL (SP4-BCR-ABL MbcR i ABL)	35 µl
MbcR and ABL Single Plasmid Standard Dilution (standardna otopina pojedinačnog plazmida za MbcR i ABL) (10 ⁵ kopija/5 µl))	SP5-BCR-ABL MbcR & ABL (SP5-BCR-ABL MbcR i ABL)	70 µl
MbcR and ABL Single Plasmid Standard Dilution (standardna otopina pojedinačnog plazmida za MbcR i ABL) (10 ⁶ kopija/5 µl)	SP6-BCR-ABL MbcR & ABL (SP6-BCR-ABL MbcR i ABL)	70 µl

ipsogen BCR-ABL1 MbcR IS-MMR Kit		(24)
Kataloški br.		670723
Broj reakcija		24
Primers and Probe Mix ABL* (mješavina primera i probe za ABL*)	PPC-ABL 25x	110 µl
Primers and Probe Mix BCR-ABL MbcR Fusion Gene [†] (mješavina primera i probe za fuzijski gen BCR-ABL MbcR) [‡]	PPF-MbcR 25x	110 µl
ipsogen <i>BCR-ABL1 MbcR IS-MMR Handbook</i> (engleski)		1

* Mješavina specifičnih reverznih i direktnih primera za ABL kontrolni gen plus specifična FAM–TAMRA proba.

[†] Mješavina specifičnih reverznih i direktnih primera za BCR-ABL MbcR fuzijski gen plus specifična FAM–TAMRA proba.

Napomena: Lagano izmiješajte i kratko centrifugirajte standarde (SP1-SP6) i mješavinu primera i proba prije uporabe.

Materijali koji su potrebni, ali nisu priloženi

Kad radite s kemikalijama, uvijek nosite odgovarajuću laboratorijsku kutu, rukavice za jednokratnu uporabu i zaštitne naočale. Za više informacija pogledajte odgovarajuće listove sa sigurnosnim podacima (SDSs) koji su dostupni kod dobavljača proizvoda.

Reagensi

- Reagensi za pročišćavanje RNA: Odobreni reagensi su RNeasy[®] Midi Kit (srednji komplet) (QIAGEN, kat. br. 75144) ili TRIzol[®] Reagent (reagens) (Thermo Fisher Scientific Inc, kat. br. 15596018 ili 15596026)
- Sterilna voda bez nukleaze za PCR
- Pufer i Taq DNA polimeraza: Odobreni reagensi su *Premix Ex Taq*[™] DNA polimeraza (u savršenom realnom vremenu) (TaKaRa, kat. br. RR039A) i *Premix Ex Taq* DNA polimeraza (Proba qPCR) (TaKaRa, kat. br. RR390A). Obje uključuju glavnu mješavinu 2× Taq DNA polimeraze i ROX[™] referentnih boja
- Reagensi za reverznu transkripciju: Odobreni reagensi su komplet *ipsogen* RT, uključuje reverznu transkriptazu, 5× RT pufer, 100 mM DTT, ribonukleazni inhibitor, proizvodljivi primer i dNTPs (QIAGEN, kat. br. 679923); ili SuperScript[®] III reverzna transkriptaza, uključuje

reverznu transkriptazu, 5× pufer za prvi lanac i 100 mM DTT (Thermo Fisher Scientific Inc., kat. br. 18080044)

- Kada se upotrebljava SuperScript III, potrebni su sljedeći dodatni reagensi:
 - Ribonukleazni inhibitor: Odobreni reagens je RNaseOUT™ rekombinantni ribonukleazni inhibitor (Thermo Fisher Scientific Inc., kat. br. 10777019)
 - Komplet dNTP-ova, PCR stupnja
 - Proizvoljni nonamer

Potrošni materijal

- Sterilni vrhovi pipeta s hidrofobičnim filtrima otporni na aerosole za PCR bez nukleaze
- Epruvete za PCR od 0,5 ml ili 0,2 ml bez ribonukleaze i dezoksiribonukleaze
- Led

Oprema

- Mikrolitarske pipete* za PCR (1–10 µl; 10–100 µl; 100–1000 µl)
- Stacionarni uređaj za centrifugu* s rotorom za reakcijske epruvete od 0,2 ml/0,5 ml (sposobne za postizanje 10.000 rpm)
- Instrument za PCR u realnom vremenu:* Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM ili drugi instrument RotorGene; LightCycler 1.2, 1.5, 2.0, ili 480; Applied Biosystems 7500 Real-Time PCR System; ABI PRISM 7900HT SDS; i prateći specifični materijal
- Amplifikator* ili vodena kupelj* (korak reverzne transkripcije)

* Uvjerite se da su instrumenti provjereni i kalibrirani u skladu s preporukama proizvođača.

Upozorenja i mjere opreza

Za in vitro dijagnostičku uporabu

Kad radite s kemikalijama, uvijek nosite odgovarajuću laboratorijsku kutu, rukavice za jednokratnu uporabu i zaštitne naočale. Za više informacija molimo pogledajte odgovarajuće listove s podacima o sigurnosti (SDSs). Dostupni su online u standardnom i kompaktnom PDF formatu na www.qiagen.com/safety gdje možete pronaći, pregledati i ispisivati SDS za svaki QIAGEN komplet i komponente kompleta.

Zbrinite uzorke i otpad od testiranja u skladu s vašim lokalnim sigurnosnim odredbama.

Opće mjere opreza

Za qPCR testiranja potrebne su dobre laboratorijske prakse, uključujući održavanje opreme, koje su vezane uz molekularnu biologiju i koje su u skladu s primjenjivim odredbama i relevantnim standardima.

Ovaj komplet je namijenjen za in vitro dijagnostičku uporabu. Reagensi i upute koji su priloženi uz ovaj komplet predviđeni su za optimalnu izvedbu. Daljnje razrjeđivanje reagenasa ili izmjena vremena i temperatura inkubacije za rezultat može imati krive ili odstupajuće podatke. Do promjene PPC i PPF reagenasa može doći ukoliko se izlože svjetlosti. Svi reagensi su formulirani specifično za uporabu s ovim testom. Da bi se postigla optimalna izvedba testa, ne smiju se vršiti nikakve preinake. Za određivanje razine prijepisa pomoću qPCR potrebna je reverzna transkripcija mRNA i amplifikacija generirane cDNA iz PCR. Prema tomu, cjelokupni postupak testiranja mora se obaviti u uvjetima bez prisutnosti ribonukleaze/dezoksiribonukleaze.

Budite iznimno oprezni kako biste spriječili:

- kontaminaciju ribonukleazom/dezoksiribonukleazom koja može prouzročiti degradaciju matične mRNA i generirane cDNA
- kontaminaciju mRNA ili kontaminaciju zbog prijenosa u PCR koja za rezultat ima lažno pozitivan signal

Zbog toga mi preporučamo sljedeće.

- Koristite laboratorijsku opremu bez prisutnosti nukleaze (npr. pipete, vrhove pipeta, reakcijske bočice) i nosite rukavice kad provodite testiranje.
- Koristite svježere vrhove pipeta otporne na aerosole za sve korake pipetiranja kako biste spriječili križnu kontaminaciju uzoraka i reagenasa.

* Uvjerite se da su instrumenti provjereni i kalibrirani u skladu s preporukama proizvođača.

- Pripremite glavnu mješavinu prije PCR s priloženim materijalom (pipete, vrhovi, itd.) na predviđenom mjestu gdje nisu uvedene DNA matrice (cDNA, DNA, plazmid). Dodajte matricu na odvojenom mjestu (po mogućnosti u odvojenoj prostoriji) s predviđenim materijalom (pipete, vrhovi, itd.).
- Obradite standarde (SP1-SP6) u odvojenoj prostoriji.

Pohranjivanje i rukovanje reagensima

Kompleti se isporučuju na suhom ledu i po prijemu se moraju pohraniti na temperaturi od -30°C do -15°C .

- Pobrinite se da se mješavine primera i proba što manje izlažu svjetlosti (PPC i PPF epruvete).
- Lagano promiješajte i centrifugirajte epruvete prije otvaranja.
- Čuvajte sve komponente kompleta u originalnim spremnicima.

Ovi uvjeti pohrane odnose se i na otvorene i na neotvorene komponente. Komponente koje se pohranjuju pod nekim drugim uvjetima a ne onim koji su navedeni na naljepnicama možda neće pravilno funkcionirati i mogu negativno utjecati na rezultate testiranja.

Rokovi valjanosti za svaki reagens su navedeni na naljepnicama pojedinačnih komponenti. Pod pravilnim uvjetima pohrane proizvod će nastaviti funkcionirati do isteka roka valjanosti koji je otisnut na naljepnici.

Nema očiglednih znakova koji ukazuju na nestabilnost ovog proizvoda. Međutim, pozitivne i negativne kontrole moraju se provoditi istodobno s nepoznatim uzorcima.

Rukovanje i pohranjivanje uzoraka

Potrebno je provesti antikoagulaciju uzoraka pune krvi s kalij EDTA i pohraniti ih na temperaturi između $2-8^{\circ}\text{C}$ ne dulje od 5 dana prije RNA ekstrakcije.

Postupak

Priprema RNA iz uzorka

Priprema RNA iz uzoraka bolesnika (iz krvi ili koštane srži) mora se provesti s provjerenim postupkom. Kvaliteta testiranja u velikoj je mjeri ovisna o kvaliteti korištene RNA. Mi zbog toga preporučamo kvalificiranje pročišćene RNA elektroferezom s agaroznim* gelom pomoću uređaja Agilent® Bioanalyzer® ili spektrofotometrijom prije analize.†□

Protokol: Reverzna transkripcija pomoću SuperScript III reverzne transkriptaze

Ovaj protokol je namijenjen za reverznu transkripciju pomoću SuperScript III reverzne transkriptaze. Kad koristite komplet *ipsogen RT*, slijedite protokol naveden u *priručniku za komplet ipsogen RT*.

Stvari koje treba obaviti prije početka

- Pripremite dNTPs, svaki s 10 mM. Čuvajte pri –20°C u alikvotima.

Postupak

1. Odmrznite sve potrebne komponente i stavite ih na led.
2. Dobro promiješajte (bez vrtnje) i kratko centrifugirajte (približno 10 s, 10.000 rpm, kako bi se tekućina skupila na dno epruvete). Potom držite na ledu.
3. Namjestite RNA uzorke na 0,1 µg/µl. Pipetirajte 10 µl (1 µg) svakog RNA uzorka u odvojene, označene epruvete. Pipetirajte 10 µl visoko pozitivne RNA kontrole, 10 µl kalibratora IS-MMR i 10 µl vode bez nukleaze (kao RT negativnu kontrolu) u odvojene, označene epruvete i obradite ih paralelno s RNA uzorcima kao što je opisano ispod.
4. Inkubirajte svaki uzorak, kontrolu i kalibrator (svaki po 10 µl) tijekom 5 min pri 65°C i odmah hladite na ledu u tijekom 5 min.

* Kad radite s kemikalijama, uvijek nosite odgovarajuću laboratorijsku kutu, rukavice za jednokratnu uporabu i zaštitne naočale.

† Optička gustoća izmjerena pri 260 i 280 nm: Optička gustoća od 1,0 pri 260 nm odgovara približno 40 µg/ml jednolančane RNA. A_{260}/A_{280} omjer između 1,8 i 2,1 ukazuje na visoko pročišćenu RNA.

5. **Kratko centrifugirajte (približno 10 s, 10.000 rpm, kako bi se tekućina skupila na dno epruvete). Potom držite na ledu.**
6. **Pripremite sljedeću RT mješavinu u skladu s brojem uzoraka, kontrola i kalibratora koji se obrađuju (tablica 1).**

Tablica 1. Priprema RT mješavine

Komponenta	Volumen po uzorku (μl)	Konačna koncentracija
Pufer za prvi lanac, 5x (priložen uz SuperScript III reverznu transkriptazu)	5,0	1x
dNTPs (svaki od 10 mM, potrebno ih je prethodno pripremiti i pohraniti pri – 20°C u alikvotima)	2,0	0,8 mM
Proizvoljni nonamer (100 μ M)	5,25	21 μ M
RNaseOUT (40 U/ μ l)	0,5	0,8 U/ μ l
Superscript III reverzna transkriptaza (200 U/ μ l)	1,0	8 U/ μ l
DTT (priloženo uz SuperScript III reverznu transkriptazu)	1,25	–
Zagrijan RNA uzorak, kontrola ili kalibrator IS-MMR (treba dodati u koraku 7)	10,0	40 ng/ μ l
Konačan volumen	25,0	–

7. **Pipetirajte 15 μ l RT mješavine u svaku epruvetu za PCR. Potom dodajte 10 μ l (1 μ g) RNA uzorka, kontrole ili kalibratora (iz koraka 4).**
8. **Pažljivo promiješajte (bez vrtnje) i kratko centrifugirajte (približno 10 s, 10.000 rpm, kako bi se tekućina skupila na dno epruvete).**
9. **Programirajte amplifikator s programom reverzne transkriptaze kao što je navedeno u tablici 2.**

Tablica 2. Temperaturni profil

Reverzna transkripcija 1	temperatura: 25°C vrijeme: 10 min
Reverzna transkripcija 2	temperatura: 50°C vrijeme: 60 min
Neaktivnost	temperatura: 85°C vrijeme: 5 min
Hlađenje	temperatura: 4°C vrijeme: 5 min

- 10. Stavite epruvete u amplifikator i pokrenite program toplinskog cikliranja kao što je navedeno u tablici 2.**
- 11. Nakon završetka programa kratko centrifugirajte epruvete (približno 10 s, 10.000 rpm, kako bi se tekućina skupila na dno epruvete). Držite epruvete na ledu ili pri –20°C dok je qPCR u tijeku, u skladu sa sljedećim protokolima, u skladu s vašim instrumentom za qPCR.**
Napomena: Za instrumente LightCycler 1.2, 1.5 i 2.0 svaka RT preparacija osigurava cDNA za dva ciklusa qPCR.

Protokol: qPCR na instrumentima Rotor Gene Q MDx 5plex HRM ili Rotor-Gene Q 5plex HRM s rotorom sa 72 epruvete

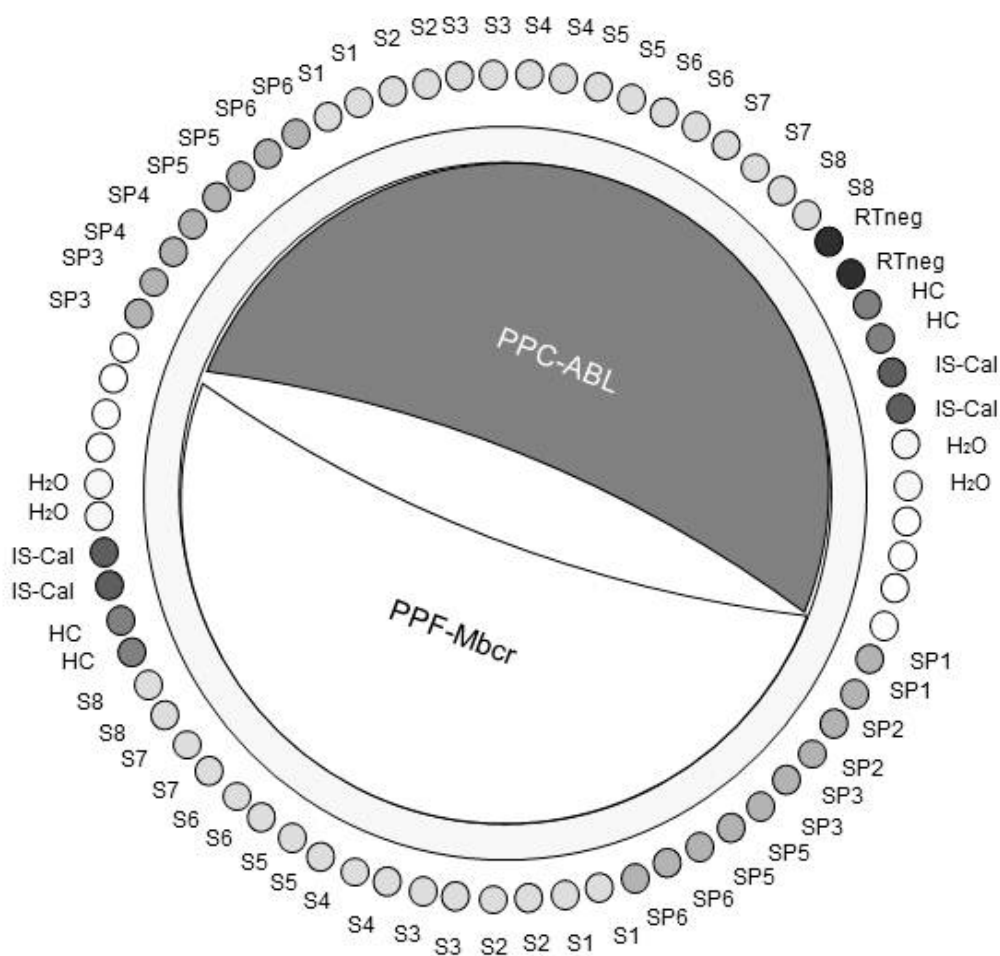
Za uporabu ovog instrumenta preporučamo provedbu svih mjerenja dvaput, kao što je navedeno u tablici 3. Komplet je dizajniran za testiranje 8 različitih uzoraka cDNA 3 puta u istom eksperimentu.

Tablica 3. Broj reakcija za instrumente Rotor-Gene Q s rotorom sa 72 epruvete

Uzorci	Reakcije
S mješavinom primera i proba za ABL (PPC-ABL) (32 reakcija)	
8 uzoraka cDNA	8 x 2 reakcije
1 visoko pozitivna kontrola cDNA	2 reakcije
1 kalibrator IS-MMR za cDNA	2 reakcije
Standardi s pojedinačnim plazmidom	2 x 4 reakcije (SP3, SP4, SP5 i SP6, svaki od njih testiran dvaput)
RT negativna kontrola	2 reakcije
Kontrola vode	2 reakcije
S mješavinom primera i proba za BCR-ABL Mbc (PPF-Mbc) (32 reakcije)	
8 uzoraka cDNA	8 x 2 reakcije
1 visoko pozitivna kontrola cDNA	2 reakcije
1 kalibrator IS-MMR za cDNA	2 reakcije
Standardi s pojedinačnim plazmidom	2 x 5 reakcije (SP1, SP2, SP3, SP5 i SP6, svaki od njih testiran dvaput)
Kontrola vode	2 reakcije

Obrada uzoraka na instrumentima Rotor-Gene Q s rotorom sa 72 epruvete

Mi preporučamo testiranje najmanje 8 uzoraka cDNA u istom eksperimentu kako bi se optimizirala uporaba standarda i mješavina primera i proba. Shema rotora na slici 4 prikazuje primjer takvog eksperimenta.



Slika 4. Preporučena postavka rotora za svaki eksperiment s kompletom *ipsogen BCR-ABL1 Mbcr IS-MMR*. SP1–SP6: BCR-ABL Mbcr i ABL standardi; **HC:** visoko pozitivna cDNA kontrola; **IS-Cal:** kalibrator IS-MMR; **RTneg:** RT negativna kontrola; **S:** cDNA uzorak; **H₂O:** kontrola vode.

Napomena: Pobrinite se da uzorak koji treba testirati uvijek stavite u poziciju 1 na rotoru. U suprotnom, tijekom koraka kalibracije, instrument neće provesti kalibraciju i prikupit će se netočni podaci o fluorescenciji.

Popunite sve ostale pozicije praznim epruветama.

qPCR na instrumentima Rotor-Gene Q s rotorom sa 72 epruветe

Napomena: Provedite sve korake na ledu.

Postupak

1. Odmrznite sve potrebne komponente i stavite ih na led.
2. Miješajte standarde, PPF-Mbcr i PPC-ABL epruветe s vrtnjom i kratko centrifugirajte (približno 10 s, 10.000 rpm, kako bi se tekućina skupila na dno epruветe).

3. Pripremite sljedeću mješavinu za qPCR u skladu s brojem uzoraka koji se obrađuju.

Sve koncentracije su predviđene za konačni volumen reakcije.

U tablici 4 opisana je shema pipetiranja za pripremu jedne mješavine reagensa koja je predviđena za dobivanje konačnog volumena reakcije od 25 μ l. Predmješavina se može pripremiti, u skladu s brojem reakcija, uz uporabu istih mješavina primera i proba (ili PPC-ABL ili PPF-Mbcr). Dodatni volumeni su uključeni radi kompenziranja grešaka pri pipetiranju.

Tablica 4. Priprema mješavine za qPCR

Komponenta	1 reakcija (μ l)	BCR-ABL		Konačna koncentracija
		ABL: 32+1 reakcija (μ l)	Mbcr: 32+1 reakcija (μ l)	
predmješavina Ex Taq, 2x	12,5	412,5	412,5	1x
mješavina primera i proba, 25x	1	33	33	1x
sterilna voda bez nukleaze za PCR	6,5	214,5	214,5	–
uzorak (treba ga dodati u koraku 5)	5	svaki po 5	svaki po 5	–
ukupni volumen	25	svaki po 25	svaki po 25	–

4. Uzmite 20 μ l predmješavine za qPCR po epruveti.
5. U drugom dijelu laboratorija s odgovarajućom opremom, dodajte 5 μ l RT proizvoda (cDNA, odgovara 200 ng RNA) koji je dobiven reverznom transkripcijom (vidjeti "Protokol: Reverzna transkripcija pomoću SuperScript III reverzne transkriptaze", stranica 14) u odgovarajuću epruvetu (ukupni volumen 25 μ l).
6. Lagano promiješajte okretanjem pipete prema gore i prema dolje.
7. Zatvorite sve epruvete i stavite ih u amplifikator u skladu s preporukama proizvođača.
8. Programirajte instrument Rotor-Gene Q s programom za toplinsko cikliranje kao što je navedeno u tablici 5.

Tablica 5. Temperaturni profil

Način analiziranja	Kvantifikacija
Hold 1	temperatura: 95°C vrijeme: 10 s
Cikliranje	50 puta 95°C tijekom 5 sek. 60°C tijekom 30 sek. s prikupljanjem FAM fluorescencije u kanalu Green (Zeleno): pojedinačno
Hold 2	temperatura: 36°C vrijeme: 1 min

9. Kliknite „Gain Optimisation” (Optimizacija pojačanja) u dijaloškom okviru „New Run Wizard” (Čarobnjak za novi pokus) za otvaranje dijaloga „Auto-Gain Optimisation Setup” (Postavljanje automatske optimizacije pojačanja). Postavite raspon za Zeleni kanal od „5 Fl” za „Min Reading” (Minimalno očitavanje) do „10 Fl” za „Max Reading” (Maksimalno očitavanje) i prihvatljivi Raspon pojačanja od -10 do 10.
10. Označite polje „Perform Optimisation Before 1st Acquisition” (Obavi optimizaciju prije prvog obuhvaćanja) i zatvorite dijaloški okvir „Auto-Gain Optimisation Setup” (Postavljanje automatske optimizacije pojačanja).
11. Pokrenite program termalnog cikliranja.
12. Odaberite „Slope Correct” (Nagib pravila) za analizu. Preporučamo postavljanje referentne vrijednosti na 0,03.

Protokol: qPCR na instrumentima Applied Biosystems 7500 Real-Time PCR System, ABI PRISM 7900HT SDS i LightCycler 480

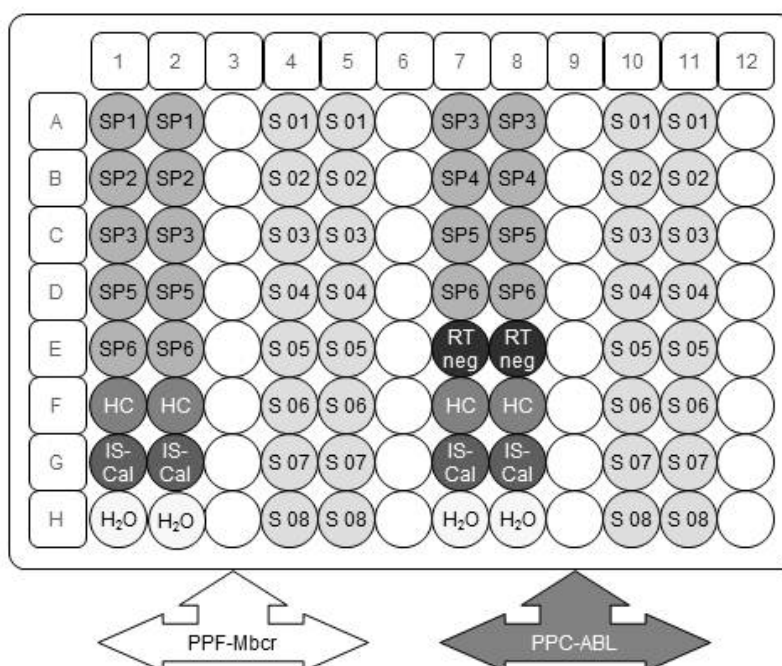
Za uporabu opreme s pločom s po 96 udubljenja za qPCR, preporučamo provedbu svih mjerenja dvaput, kao što je navedeno u tablici 6. Komplet je dizajniran za testiranje 8 različitih uzoraka cDNA 3 puta u istom eksperimentu.

Tablica 6. Broj reakcija uz uporabu opreme s pločom s po 96 udubljenja za qPCR

Uzorci	Reakcije
S mješavinom primera i proba za ABL (PPC-ABL) (32 reakcija)	
8 uzoraka cDNA	8 x 2 reakcije
1 visoko pozitivna kontrola cDNA	2 reakcije
1 kalibrator IS-MMR za cDNA	2 reakcije
Standardi s pojedinačnim plazmidom	2 x 4 reakcije (SP3, SP4, SP5 i SP6, svaki od njih testiran dvaput)
RT negativna kontrola	2 reakcije
Kontrola vode	2 reakcije
S mješavinom primera i proba za BCR-ABL Mbc (PPF-Mbc) (32 reakcije)	
8 uzoraka cDNA	8 x 2 reakcije
1 visoko pozitivna kontrola cDNA	2 reakcije
1 kalibrator IS-MMR za cDNA	2 reakcije
Standardi s pojedinačnim plazmidom	2 x 5 reakcije (SP1, SP2, SP3, SP5 i SP6, svaki od njih testiran dvaput)
Kontrola vode	2 reakcije

Obrada uzoraka na instrumentima Applied Biosystems, ABI PRISM i LightCycler 480

Mi preporučamo testiranje najmanje 8 uzoraka cDNA u istom eksperimentu kako bi se optimizirala uporaba standarda i mješavina primera i proba. Shema ploče na slici 5 prikazuje primjer takvog eksperimenta.



Slika 5. Preporučena postavka ploče za jedan eksperiment s kompletom ipsogen BCR-ABL1 Mbcr IS-MMR. SP1–SP6: BCR-ABL Mbcr i ABL standardi; **HC:** visoko pozitivna cDNA kontrola; **IS-Cal:** kalibrator IS-MMR; **RTneg:** RT negativna kontrola; **S:** cDNA uzorak; **H₂O:** kontrola vode.

qPCR na instrumentima Applied Biosystems, ABI PRISM ili LightCycler 480

Napomena: Provedite sve korake na ledu.

Postupak

1. Odmrznite sve potrebne komponente i stavite ih na led.
2. Promiješajte standarde, ROX, PPF-Mbcr i PPC-ABL epruvete uz vrtnju i kratko centrifugirajte (približno 10 s, 10.000 rpm, kako bi se tekućina skupila na dno epruvete).
3. Pripremite sljedeću mješavinu za qPCR u skladu s brojem uzoraka koji se obrađuju. Ako koristite opremu s pločom s po 96 udubljenja za qPCR, preporučamo provedbu svih mjerenja dvaput.

Sve koncentracije su predviđene za konačni volumen reakcije.

U tablici 7 opisana je shema pipetiranja za pripremu jedne mješavine reagensa za instrumente Applied Biosystems i ABI PRISM koja je predviđena za dobivanje konačnog volumena reakcije od 25 μ l. U tablici 8 opisana je shema pipetiranja za pripremu jedne mješavine reagensa za instrument LightCycler 480 koja je predviđena za dobivanje konačnog volumena

reakcije od 25 μ l. Predmješavina se može pripremiti, u skladu s brojem reakcija, uz uporabu istih mješavina primera i proba (ili PPC-ABL ili PPF-Mbcr). Dodatni volumeni su uključeni radi kompenziranja grešaka pri pipetiranju.

Tablica 7. Priprema mješavine za qPCR za instrumente Applied Biosystems i ABI PRISM.

Komponenta	1 reakcija (μl)	ABL: 32+1 reakcija (μl)	BCR-ABL Mbcr: 32+1 reakcija (μl)	Konačna koncentracija
predmješavina Ex Taq, 2x	12,5	412,5	412,5	1x
mješavina primera i proba, 25x	1	33	33	1x
boja ROX I, 50x (ABI PRISM 7900HT) ili boja ROX II, 50x (Applied Biosystems 7500)	0,5	16,5	16,5	1x
sterilna voda bez nukleaze za PCR	6	198	198	–
uzorak (treba ga dodati u koraku 5)	5	svaki po 5	svaki po 5	–
ukupni volumen	25	svaki po 25	svaki po 25	–

Tablica 8. Preparacija mješavine za qPCR za LightCycler 480

Komponenta	1 reakcija (μl)	ABL: 32+1 reakcija (μl)	BCR-ABL Mbc: 32+1 reakcija (μl)	Konačna koncentracija
<i>predmješavina Ex Taq, 2x</i>	12,5	412,5	412,5	1x
mješavina primera i proba, 25x	1	33	33	1x
sterilna voda bez nukleaze za PCR	6,5	214,5	214,5	–
uzorak (treba ga dodati u koraku 5)	5	svaki po 5	svaki po 5	–
ukupni volumen	25	svaki po 25	svaki po 25	–

4. **Uzmite 20 μ l predmješavine za qPCR po udubljenju.**
5. **U drugom dijelu laboratorija s odgovarajućom opremom, dodajte 5 μ l RT proizvoda (cDNA, odgovara 200 ng RNA) koji je dobiven reverznom transkripcijom (vidjeti "Protokol: Reverzna transkripcija pomoću SuperScript III reverzne transkriptaze", stranica 14) u odgovarajuće udubljenje (ukupni volumen 25 μ l).**
6. **Lagano promiješajte okretanjem pipete prema gore i prema dolje.**
7. **Zatvorite ploču i kratko centrifugirajte (300 x g, približno 10 s).**
8. **Stavite ploču u amplifikator u skladu s preporukama proizvođača. Programirajte amplifikator s programom za toplinsko cikliranje kao što je navedeno u tablici 9 za instrumente Applied Biosystems i ABI PRISM ili u tablici 10 za instrument LightCycler 480.**

Tablica 9. Temperaturni profil za instrumente Applied Biosystems i ABI PRISM

Način analiziranja	Standardna krivulja — Apsolutna kvantifikacija
Hold 1	temperatura: 95°C vrijeme: 10 s
Cikliranje	50 puta 95°C tijekom 5 s 60°C tijekom 30 s s prikupljanjem FAM fluorescencije: pojedinačno; hvatač: TAMRA
Hold 2	temperatura: 36°C vrijeme: 1 min

Tablica 10. Temperaturni profil za instrument LightCycler 480

Način analiziranja	Apsolutna kvantifikacija ("Abs Quant")
Formati detekcije	Odaberite "Simple Probe" ("Jednostavna proba") u prozoru za formate detekcije
Hold 1	temperatura: 95°C vrijeme: 10 s
Cikliranje	50 puta 95°C tijekom 5 s 60°C tijekom 30 s s prikupljanjem FAM fluorescencije što odgovara (483–533 nm) za LC verziju 01 i (465–510 nm) za LC verziju 02
Hold 2	temperatura: 36°C vrijeme: 1 min

- 9. Za instrumente Applied Biosystems 7500 i ABI PRISM 7900HT SDS, slijedite korak 9a. Za instrument LightCycler 480 slijedite korak 9b.**
- 9a. Applied Biosystems i ABI PRISM: Preporučamo postavljanje granice na 0,1 u koraku analize na instrumentu. Pokrenite program cikliranja kao što je navedeno u tablici 9.**
- 9b. Instrument LightCycler 480: Preporučamo način analize "Fit point" s pozadinom na 2,0 i granicom na 2,0. Pokrenite program toplinskog cikliranja kao što je navedeno u tablici 10.**

Protokol: qPCR na instrumentima LightCycler 1.2, 1.5 i 2.0

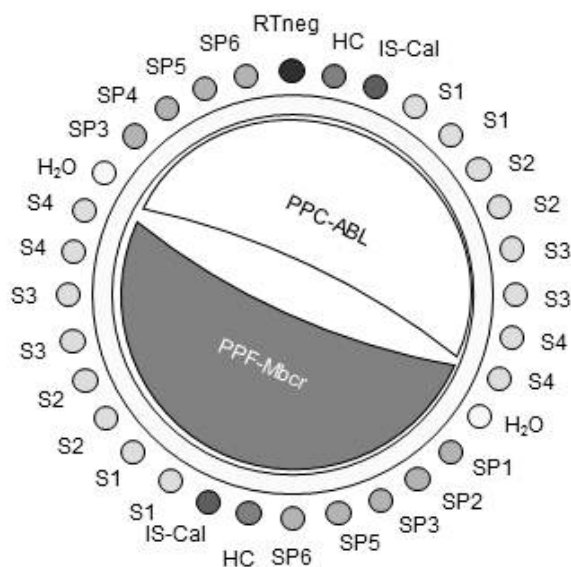
Za uporabu kapilarnih instrumenta preporučamo mjerenje uzoraka dvaput, a kontrola samo jednom, kao što je navedeno u tablici 11. Komplet je dizajniran za testiranje 4 različita uzorka cDNA 6 puta u istom eksperimentu.

Tablica 11. Broj reakcija za instrumente LightCycler 1.2, 1.5 i 2.0.

Uzorci	Reakcije
S mješavinom primera i proba za ABL (PPC-ABL) (16 reakcija)	
4 uzorka cDNA	4 x 2 reakcije
1 visoko pozitivna kontrola cDNA	1 reakcija
1 kalibrator IS-MMR za cDNA	1 reakcija
Standardi s pojedinačnim plazmidom	1 x 4 reakcije (SP3, SP4, SP5 i SP6)
RT negativna kontrola	1 reakcija
Kontrola vode	1 reakcija
S mješavinom primera i proba za BCR-ABL Mbc (PPF-Mbc) (16 reakcije)	
4 uzorka cDNA	4 x 2 reakcije
1 visoko pozitivna kontrola cDNA	1 reakcija
1 kalibrator IS-MMR za cDNA	1 reakcija
Standardi s pojedinačnim plazmidom	1 x 5 reakcija (SP1, SP2, SP3, SP5 i SP6)
Kontrola vode	1 reakcija

Obrada uzoraka na instrumentima LightCycler 1.2, 1.5 i 2.0

Mi preporučamo testiranje najmanje 4 uzorka cDNA u istom eksperimentu kako bi se optimizirala uporaba standarda i mješavina primera i proba. Kapilarna shema na slici 6 prikazuje primjer takvog pokusa.



Slika 6. Preporučena postavka rotora za svaki eksperiment s kompletom *ipsogen BCR-ABL1 Mbc* IS-MMR. SP1–SP6: BCR-ABL Mbc i ABL standardi; HC: visoko pozitivna cDNA kontrola; IS-Cal: kalibrator IS-MMR; RTneg: RT negativna kontrola; S: cDNA uzorak; H₂O: kontrola vode.

qPCR na instrumentima LightCycler 1.2, 1.5 i 2.0

Napomena: Provedite sve korake na ledu.

Postupak

1. Odmrznite sve potrebne komponente i stavite ih na led.
2. Miješajte standarde, PPF-Mbc i PPC-ABL epruvete s vrtnjom i kratko centrifugirajte (približno 10 s, 10.000 rpm, kako bi se tekućina skupila na dno epruvete).
3. Pripremite sljedeću mješavinu za qPCR u skladu s brojem uzoraka koji se obrađuju.

Sve koncentracije su predviđene za konačni volumen reakcije.

U tablici 12 opisana je shema pipetiranja za pripremu jedne mješavine reagensa koja je predviđena za dobivanje konačnog volumena reakcije od 20 µl. Predmješavina se može pripremiti, u skladu s brojem reakcija, uz uporabu istih mješavina primera i proba (ili PPC-ABL ili PPF-Mbc). Dodatni volumeni su uključeni radi kompenziranja grešaka pri pipetiranju.

Tablica 12. Priprema mješavine za qPCR za instrumente LightCycler 1.2, 1.5 i 2.0

Komponenta	1 reakcija (μl)	BCR-ABL		Konačna koncentracija
		ABL: 16+1 reakcija (μl)	Mbcr: 16+1 reakcija (μl)	
predmješavina Ex Taq, 2x	10	170	170	1x
mješavina primera i proba, 25x	0,8	13,6	13,6	1x
sterilna voda bez nukleaze za PCR	4,2	71,4	71,4	–
uzorak (treba ga dodati u koraku 5)	5	svaki po 5	svaki po 5	–
ukupni volumen	20	svaki po 20	svaki po 20	–

4. **Uzmite 15 μl predmješavine za qPCR po kapilaru.**
5. **U drugom dijelu laboratorija s odgovarajućom opremom, dodajte 5 μl RT proizvoda (cDNA, odgovara 200 ng RNA) koji je dobiven reverznom transkripcijom (vidjeti "Protokol: Reverzna transkripcija pomoću SuperScript III reverzne transkriptaze", stranica 14) u odgovarajući kapilar (ukupni volumen 20 μl).**
6. **Lagano promiješajte okretanjem pipete prema gore i prema dolje.**
7. **Stavite kapilare u adaptere koji su priloženi uz aparaturu i kratko centrifugirajte (700 x g, približno 10 s).**
8. **Stavite kapilare u amplifikator u skladu s preporukama proizvođača.**
9. **Programirajte instrument LightCycler 1.2, 1.5 ili 2.0 s programom za toplinsko cikliranje kao što je navedeno u tablici 13.**

Tablica 13. Temperaturni profil

Način analiziranja	Kvantifikacija
Hold 1	temperatura: 95°C vrijeme: 10 s rampa: 20
Cikliranje	50 puta 95°C tijekom 5 s; rampa: 20 60°C tijekom 30 s; rampa: 20; s prikupljanjem FAM fluorescencije: pojedinačno
Hold 2	temperatura: 36°C vrijeme: 1 min rampa: 20

10. Za LightCycler 1.2 i 1.5 slijedite korak 10a. Za LightCycler 2.0 slijedite korak 10b.

10a. LightCycler 1.2 i 1.5: Preporučuje se način rada F1/F2 i "2. derivativna analiza". Pokrenite program za toplinsko cikliranje kao što je navedeno u tablici 13.

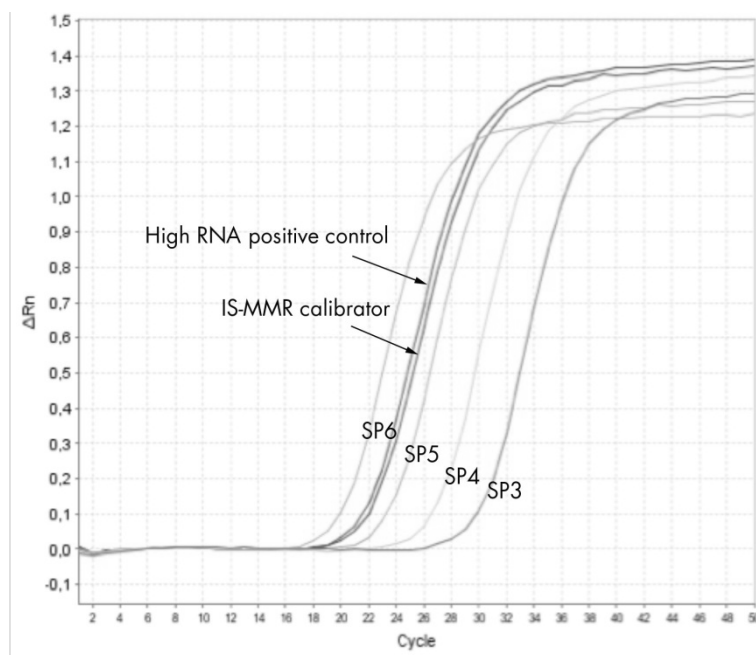
10b. LightCycler 2.0: Mi preporučamo uporabu automatizirane (F''maks) analize na LightCycler 2.0 verzija softvera 4.0 kako bi se dobili rezultati koji se mogu reproducirati. Pokrenite program za toplinsko cikliranje kao što je navedeno u tablici 13.

Tumačenje rezultata

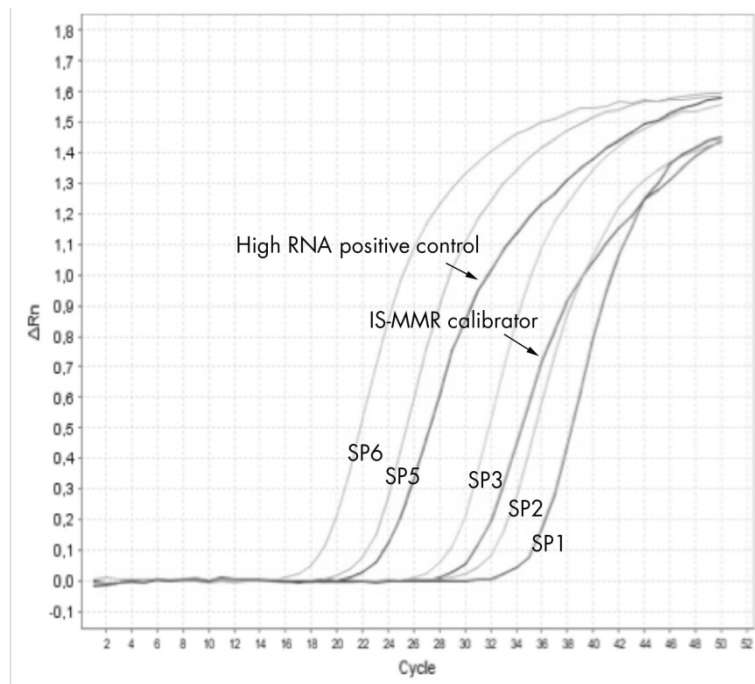
Načelo analize podataka

Pri uporabi tehnologije TaqMan® broj PCR ciklusa koji su potrebni za detekciju signala iznad granice naziva se granični ciklus (C_T) i izravno je proporcionalan količini proizvoda koja je prisutna na početku reakcije.

Uporabom standarda s poznatim brojem molekula moguće je uspostaviti standardnu krivulju i odrediti preciznu količinu proizvoda koja je prisutna u testiranom uzorku. *ipsogen* standardne krivulje temelje se na plazmidu. Kako bi se osigurala točnost standardnih krivulja, mi koristimo 4 standardne otopine za ABL i 5 standardnih otopina za Mbc. Komplet također sadržava i kalibrator IS-MMR koji omogućuje pretvaranje rezultata u skladu s međunarodnom ljestvicom. Na slikama 7 i 8 prikazani su primjeri TaqMan amplifikacijskih krivulja koje su dobivene za standarde, kalibrator IS-MMR i visoko pozitivnu RNA kontrolu s kompletom *ipsogen* BCR-ABL1 Mbc IS-MMR.



Slika 7. Detekcija ABL sa standardima SP3, SP4, SP5 i SP6. 10^3 , 10^4 , 10^5 i 10^6 kopije/5 μ l.



Slika 8. Detekcija BCR-ABL Mbc sa standardima SP1, SP2, SP3, SP5 i SP6. 10^1 , 10^2 , 10^3 , 10^5 , 10^6 kopije/ $5 \mu\text{l}$.

Standardne krivulje i kriteriji kvalitete koji se odnose na neobrađene podatke

Ponovljivost između replikacija

Variranje C_T vrijednosti između replikacija treba biti <2 , što odgovara četverostrukoj promjeni vrijednosti brojeva kopija.

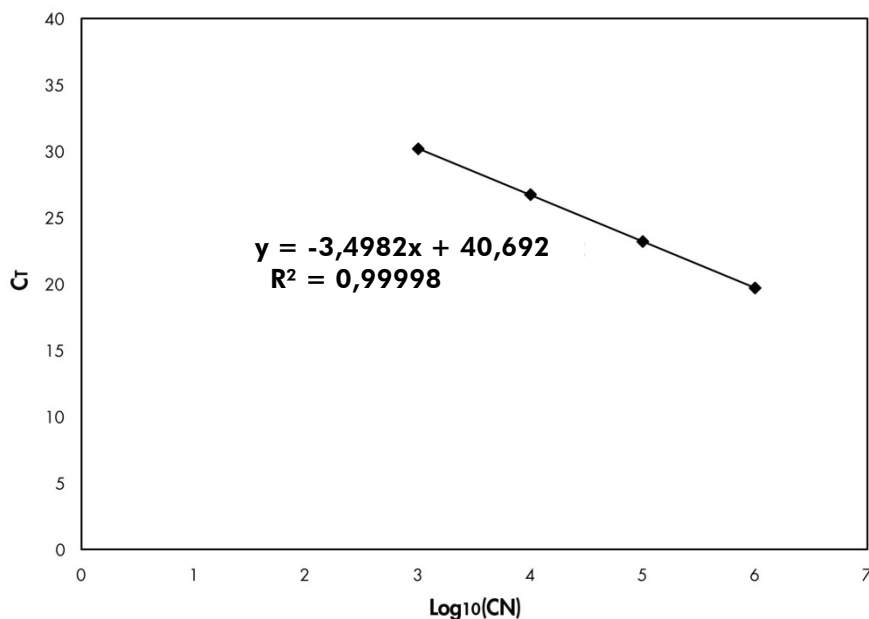
Variranje C_T vrijednosti između replikacija općenito je $<1,5$ ako je srednja C_T vrijednost replikacija <36 (7).

Napomena: Svaki korisnik treba izmjeriti svoju vlastitu ponovljivost u svom laboratoriju.

Standardne krivulje

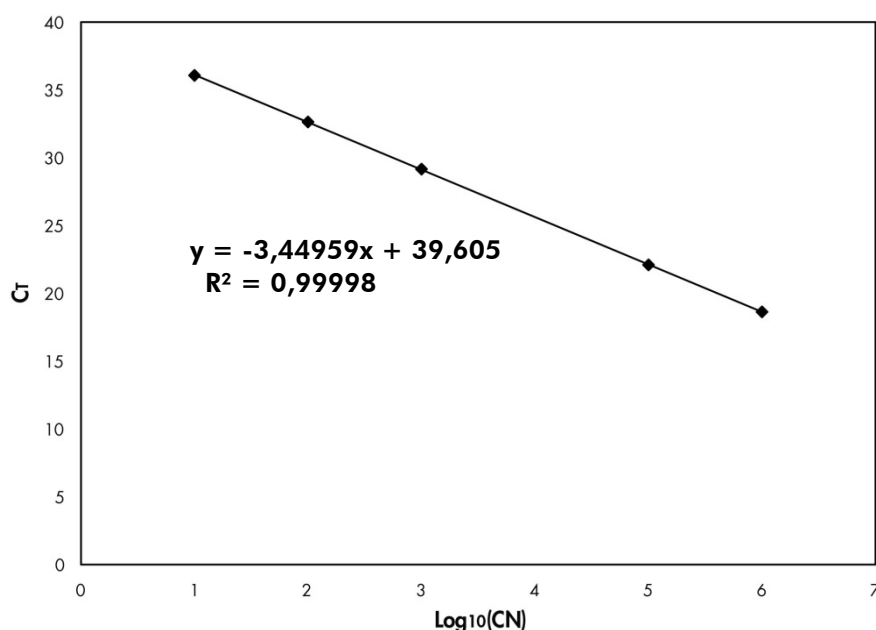
Neobrađeni podaci mogu se unijeti u Excel[®] datoteku radi analize.

Za svaki gen (ABL i BCR-ABL) neobrađene C_T vrijednosti dobivene iz standardnih otopina plazmida obilježavaju se u skladu s brojem kopija zapisa (3, 4, 5 i 6 za SP3, SP4, SP5 i SP6; 1, 2, 3, 5 i 6 za SP1, SP2, SP3, SP5 i SP6). Na slici 9 prikazan je primjer teoretske standardne krivulje za ABL izračunat za 4 standardne otopine. Na slici 10 prikazan je primjer teoretske standardne krivulje za BCR-ABL izračunat za 5 standardne otopine.



Slika 9. Teoretska standardna krivulja za ABL izračunata iz 4 standardne otopine.

Linearna regresijska krivulja ($y = ax + b$) se izračunava tako da je a pad crte, a b je y sjecište, što predstavlja koordinata y točke gdje se crta križa s osi y . Jednadžba i koeficijent određivanja (R^2) ispisani su na grafikonu.



Slika 10. Teoretska standardna krivulja za BCR-ABL izračunata iz 5 standardnih otopina.

Linearna regresijska krivulja ($y = ax + b$) se izračunava tako da je a pad crte, a b je y sjecište, što predstavlja koordinata y točke gdje se crta križa s osi y . Jednadžba i koeficijent određivanja (R^2) ispisani su na grafikonu.

Kao standardi se koriste deseterostruke otopine, teoretski pad krivulje je $-3,3$. Pad između $-3,0$ i $-3,9$ je prihvatljiv sve dok je $R^2 > 0,95$ (7). Međutim, vrijednost za $R^2 > 0,98$ je poželjna za precizne rezultate (3).

Napomena: SP1 standardna otopina (BCR-ABL plazmid, 10 kopija) mora se detektirati i uključiti u BCR-ABL standardnu krivulju.

Kontrola kvalitete na svim vrijednostima za ABL

Loša kvaliteta RNA ili problemi tijekom koraka qPCR za rezultat imaju mali broj kopija za ABL (ABL_{CN}). Optimalna osjetljivost se postiže s uzorcima koji daju $ABL_{CN} \geq 10,000$ kopija. Ovaj kriterij za ABL_{CN} primjenjuje se i na visoko pozitivnu RNA kontrolu i kalibrator IS-MMR.

RT negativan i kontrole vode

Kontrole bez matrice (eng. no template controls, NTC) za korak PCR (kontrola vode) i korak reverzne transkripcije (RT negativna kontrola) trebale bi dati nulti CN za ABL i BCR-ABL M_{bcr}. Pozitivan rezultat za ove NTC ukazuje na križnu kontaminaciju tijekom reverzne transkripcije i/ili qPCR.

Normaliziran broj kopija (NCN)

Jednadžbu ABL standardne krivulje treba koristiti za pretvorbu neobrađenih C_T vrijednosti (dobivenih sa PPC-ABL) za nepoznate uzorke u brojeve kopija za ABL (ABL_{CN}).

Jednadžbu BCR-ABL standardne krivulje treba koristiti za pretvorbu neobrađenih C_T vrijednosti (dobivenih sa PPF-M_{bcr}) za nepoznate uzorke u brojeve kopija za BCR-ABL ($BCR-ABL_{M_{bcr}CN}$).

Omjer ovih CN vrijednosti daje normaliziran broj kopija (NCN):

$$NCN = \frac{BCR-ABL_{M_{bcr}CN}}{ABL_{CN}} \times 100$$

Izračunajte NCN rezultat za visoko pozitivnu RNA kontrolu (NCN_{HC}), kalibrator IS-MMR (NCN_{cal}) i svaki uzorak (NCN_{sample}).

Visoko pozitivna RNA kontrola i kalibrator IS-MMR

Ove kontrole omogućuju praćenje koraka reverzne transkripcije i amplifikacije ABL i BCR-ABL M_{bcr} tijekom kvantifikacije prijepisa.

Kontrola kvalitete za NCN_{cal} rezultat

Napomena: NCN rezultat dobiven za kalibrator IS-MMR, testiran s kompletom *ipsogen* BCR-ABL M_{bcr} IS-MMR u kombinaciji s potvrđenim reagensima i instrumentima (vidjeti "Priloženi materijali", stranica 9, i "Materijali koji su potrebni, ali nisu priloženi", stranica 10), mora se nalaziti unutar intervala 0,05–0,3. U suprotnom NCN vrijednosti se ne mogu pretvoriti u vrijednosti međunarodne ljestvice. Osim toga, cijeli eksperiment se mora poništiti ako nije detektirana visoko pozitivna RNA kontrola.

IS konverzija i MMR izvještavanje

Napomena: Prije tumačenja pogledajte vrijednost navedenu na naljepnici epruvete kalibratora IS-MMR ili na certifikatu analize koja je piložena uz komplet.

Koristite eksperimentalni NCN rezultat kalibratora IS-MMR (NCN_{cal}) i njegovu dodijeljenu vrijednost (IS-Cal vrijednost) koja je navedena na certifikatu analize kako biste izračunali normalizirani broj kopija u skladu s međunarodnom ljestvicom (IS- NCN_{sample}).

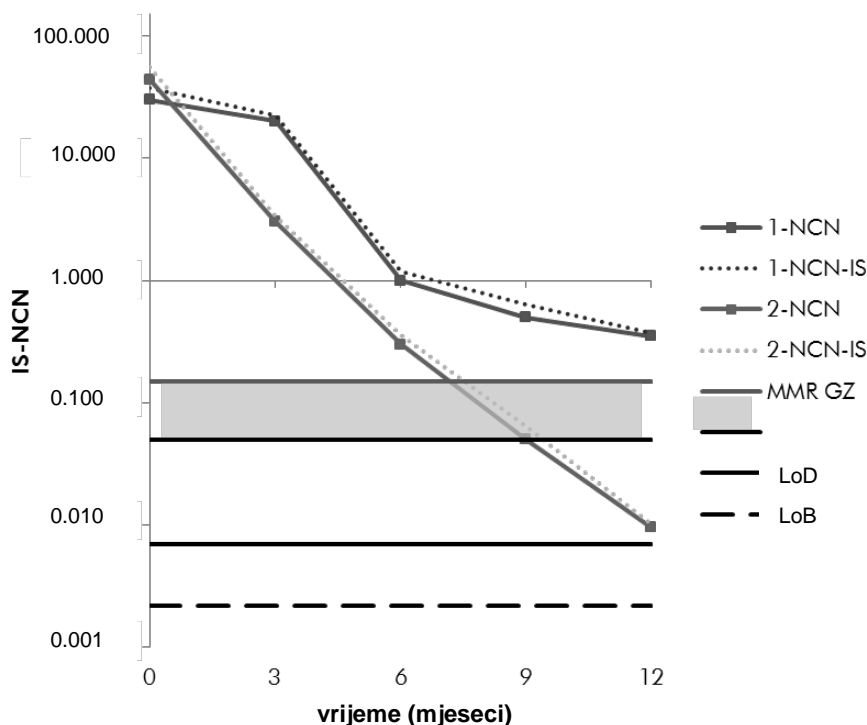
$$IS-NCN_{sample} = \frac{NCN_{sample} \times IS-Cal \text{ vrijednost}}{NCN_{cal}}$$

Odredite MMR status svakog uzorka u skladu sa sljedećim kriterijima.

- **IS- $NCN_{sample} \leq 0,05$:** značajni molekularni odgovor
- **$0,05 < IS-NCN_{sample} < 0,15$:** sivo područje oko MMR isječka, nerazriješen rezultat
- **IS- $NCN_{sample} \leq 0,15$:** nema značajnog molekularnog odgovora

IS- NCN_{HC} rezultat (NCN prema međunarodnoj ljestvici za visoko pozitivnu RNA kontrolu) ne treba dati značajni molekularni odgovor.

Na slici 11 prikazan je primjer praćenja bolesnika uz uporabu NCN i IS-NCN rezultata.



Slika 11. Krivulje za praćenje MMR statusa bolesnika s kompletom ipsogen BCR-ABL1 Mbcr IS-MMR. NCN: normaliziran broj kopija; **NCN-IS:** međunarodna ljestvica za

normaliziran broj kopija; **MMR GZ**: nerazriješen rezultat za MMR sivo područje (GZ); **LoD**: granica detekcije; **LoB**: pozadinska razina.

Pregled kriterija kvalitete

U tablici 14 naveden je pregled različitih kriterija kvalitete i odgovarajućih vrijednosti ili rezultata.

Tablica 14. Pregled kriterija kvalitete

Kriteriji	Prihvatljive vrijednosti/rezultati
Variranje C_T vrijednosti između replika	$\leq 2 C_T$ ako je srednja C_T vrijednost > 36 $\leq 1,5 C_T$ ako je srednja C_T vrijednost ≤ 36
Pad za standardne krivulje	između $-3,0$ i $-3,9$
R^2 za standardne krivulje	najmanje $> 0,95$ bolje ako je $> 0,98$
SP1 standardna otopina (BCR-ABL 10 kopija za plazmid)	Mora se detektirati i uključiti u standardnu krivulju
Kontrola kvalitete za ABL_{CN} vrijednost za uzorke bolesnika, visoko pozitivnu RNA kontrolu i kalibrator IS-MMR	$ABL_{CN} > 10.000$ kopija ABL za postizanje optimalne osjetljivosti
PCR kontrole (vode) i kontrole reverzne transkripcije (RT negativan)	za svaki $ABL_{CN} = 0$ i $M_{bcr_{CN}} = 0$
NCN dobiven za kalibrator IS-MMR (NCN_{cal})	Mora biti unutar intervala $0,05-0,3$
Visoko pozitivna RNA kontrola	Mora se detektirati
NCN dobiven za visoko pozitivnu RNA kontrolu pretvoren u skladu s međunarodnom ljestvicom ($IS-NCN_{HC}$)	Status: nema značajnog molekularnog odgovora

Uklanjanje smetnji

Za više informacija pogledajte stranicu Često postavljana pitanja u našem Centru za tehničku podršku: www.qiagen.com/FAQ/FAQList.aspx. Znanstvenici u tehničkim službama tvrtke QIAGEN uvijek će rado odgovoriti na sva pitanja koja možda imate vezano uz informacije i protokol u ovom priručniku ili uzorak

i tehnologije testiranja (za kontakt informacije pogledajte "Kontakt informacije", stranica 42).

Kontrola kvalitete

Svaki dio kompleta *ipsogen* BCR-ABL1 MbcR IS-MMR se u skladu sa QIAGENOVIM ISO-certificiranim Sustavom upravljanja kvalitetom testira prema predodređenim specifikacijama, da bi se osigurala dosljedna kvaliteta. Certifikati analize dostupni su na zahtjev na web-mjestu www.qiagen.com/support/.

Ograničenja

Korisnici moraju proći obuku i upoznati se s ovom tehnologijom prije uporabe ovog uređaja.

Svi generirani dijagnostički rezultati moraju se tumačiti ovisno o ostalim kliničkim ili laboratorijskim nalazima. U odgovornost korisnika spada da potvrdi izvedbu sustava za sve postupke koji se koriste u njegovom laboratoriju a koji nisu pokriveni ispitivanjima izvedbi od strane tvrtke QIAGEN.

Potrebno je obratiti pozornost na rokove valjanosti koji su otisnuti na kutiji i naljepnicama svih komponenti. Ne koristite komponente čiji je rok valjanosti istekao.

Napomena: Komplet je dizajniran u skladu s ispitivanjima "Europa protiv raka" (engl. "Europe Against Cancer", EAC) (8, 9) i usklađen je s aktualiziranim međunarodnim preporukama. Komplet sadržava kalibrator IS-MMR, standardiziran prema međunarodnoj ljestvici, koji omogućuje pretvorbu NCN rezultata u vrijednosti koje su u skladu s međunarodnom ljestvicom i izradu izvještaja o statusu značajnog molekularnog odgovora (engl. major molecular response, MMR).

Svaka serija kalibratora IS-MMR ima dodijeljenu vrijednost izvedenu izravno iz kalibracije prema primarnom referentnom materijalu certificiranom od strane NIBSC WHO (International Genetic Reference Panel za kvantificiranje translokacije BCR-ABL iz RQ-PCR (1. I.S.), ref. 09/138).

Certifikat analize koji označava dodijeljenu vrijednost kalibratora IS-MMR priložen je uz svaki komplet.

Komplet treba koristiti uz slijeđenje uputa koje su navedene u ovom priručniku, u kombinaciji s validiranim reagensima i instrumentima (vidjeti "Materijali koji su potrebni, ali nisu priloženi", stranica 10). Svaka uporaba ovog proizvoda koja odstupa od uputa na naljepnici i/ili modificiranje komponenti poništavaju jamstvo tvrtke QIAGEN.

Karakteristike izvedbe

Napomena: Karakteristike izvedbe su utvrđene uz uporabu Applied Biosystems 7500 Real-Time PCR System u kombinaciji s kompletom *ipsogen* BCR-ABL MbcR IS-MMR i validiranim dodatnim reagensima (vidjeti "Materijali koji su potrebni, ali nisu priloženi", stranica 10).

Granica praznine i granica detekcije

Granica praznine (LoB) i granica detekcije (LoD) određene su uz slijeđenje smjernice CLS/NCCLS EP17-A.

Pozadinska razina (LoB) utvrđena je na negativnim uzorcima zdravih davatelja (11 uzoraka, 69 mjerenja) i ustanovljeno je da je jednaka 0,0022 BCR-ABL MbcR NCN.

Granica detekcije (LoD ili analitička osjetljivost) utvrđena je na poznatim nisko pozitivnim uzorcima ($n = 8$, 74 mjerenja) i ustanovljeno je da je jednaka 0,0069 BCR-ABL MbcR NCN.

- **NCN \leq LoB:** BCR-ABL MbcR nije detektirano
- **LoB < NCN < LoD:** BCR-ABL MbcR detektirano, ali nije kvantificirano
- **NCN \geq LoD:** BCR-ABL MbcR kvantificirano

Linearnost

Linearnost je utvrđena uz slijeđenje smjernice CLSI/NCCLS EP6-A.

Ispitivanje je provedeno na mješavinama pozitivne i negativne RNA koja je izdvojena iz staničnih linija. Jedanaest različitih razina testirano je tri puta. Rezultati dobiveni iz ovih uzoraka pokazuju da je *ipsogen* BCR-ABL MbcR IS-MMR testiranje linearno u rasponu od 0,003 do 65 BCR-ABL MbcR NCN.

Prijenosi

Za ovo ispitivanje odabrano je pet različitih RNA s različitim razinama NCN BCR-ABL MbcR. Različite količine RNA i cDNA testirane su kako bi se procijenio utjecaj prijenosa na NCN rezultate. Rezultati su pokazali da je varijacija prijenosa RNA imala ograničen utjecaj na NCN rezultate, dok je unos cDNA bio osjetljiviji čimbenik ako je korišteno više ili manje materijala. Prema tomu, preporučeno je da se za provođenje testiranja prenese 1 μ g RNA i 5 μ l cDNA.

Preciznost

Preciznost je utvrđena uz slijeđenje smjernice CLSI/NCCLS EP5-A2.

Ispitivanje preciznosti provedeno je na 13 različitih uzoraka koji su testirani 42 puta u dvostrukim primjercima ($n = 84$). Ovi uzorci su bili reprezentativni za različitu razinu BCR-ABL MbcR ekspresije u uzorcima bolesnika oko i iznad MMR

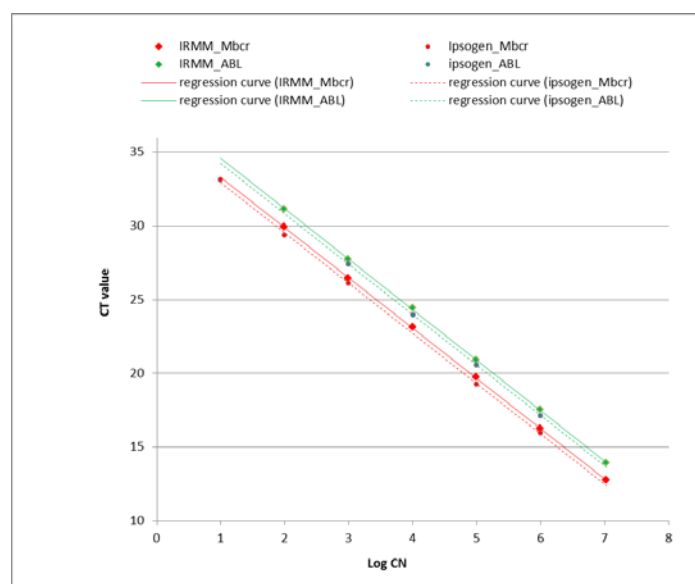
vrijednosti. Utvrđeno je da je globalni koeficijent varijacije oko MMR vrijednosti bio jednak 25%.

Istraživanje podudarnosti: Usporedba standarda ERM-AD623 BCR-ABL1 jedan plazmid (IRMM) s *ipsogen* jednim plazmidom (QIAGEN)

Najnovije radne definicije BCR-ABL1 Mbcr molekularnog odgovora u CML-u nudi grupa ELN/EUTOS Molecular Monitoring Steering Group i preporuča upotrebu ERM-AD623 BCR-ABL1 plazmida (IRMM, Belgija): Cross, N.C., et al. Laboratory recommendations for scoring deep molecular responses following treatment for chronic myeloid leukemia (2015) *Leukemia*. 29, 999.

U svrhu sukladnosti s ovom preporukom QIAGEN je proveo istraživanje podudarnosti i usporedio *ipsogen* višeciljni jedan plazmid koji se upotrebljava u kompletu *ipsogen* BCR-ABL1 Mbcr IS-MMR Kit (24) CE (kat. no. 670723) s ERM-AD623 BCR-ABL1 plazmidom (IRMM).

Usporedba se temelji na BCR-ABL1 Mbcr/ABL1 omjeru normaliziranog broja kopija (NCN), ocijenjenom pomoću bilo koje od dviju standardnih otopina (*ipsogen* ili ERM-AD623 BCR-ABL1), na kontrolnim uzorcima uključenima u *ipsogen* komplete i certificiranom referentnom materijalu dobivenom od NIBSC-a: White, H.E., et al. (2010) Establishment of the first World Health Organization International Genetic Reference Panel for quantitation of BCR-ABL mRNA. *Blood* 116, e111.

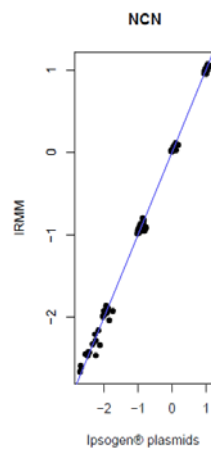


regresijska krivulja

C_T vrijednost

Log CN

Slika 12. Standardne krivulje *ipsogen* i ERM-AD623 BCR-ABL1 plazmida poravnate su.



NCN

IRMM

ipsogen® plazmida

Komplet *ipsogen* BCR-ABL1 Mbc IS-MMR.

Slika 13. Usporedba ERM-AD623 BCR-ABL1 i *ipsogen* NCN vrijednosti.

Istraživanje tvrtke QIAGEN zaključuje da ne postoji statistička razlika: Standardi ERM-AD623 BCR-ABL1 jedan plazmid i *ipsogen* jedan plazmid nude ujednačene rezultate.

Reference

1. Baccarani, M. et al. (2006) Evolving concepts in the management of chronic myeloid leukemia: recommendations from an expert panel on behalf of the European LeukemiaNet. *Blood* **108**, 1809.
2. Baccarani, M. et al. (2009) Chronic myeloid leukemia: an update of concepts and management recommendations of European LeukemiaNet. *J. Clin. Oncol.* **27**, 6041.
3. Branford, S. et al. (2006) Rationale for the recommendations for harmonizing current methodology for detecting BCR-ABL transcripts in patients with chronic myeloid leukaemia. *Leukemia* **20**, 1925.
4. Branford, S. et al. (2008) Desirable performance characteristics for BCR-ABL measurement on an international reporting scale to allow consistent interpretation of individual patient response and comparison of response rates between clinical trials. *Blood* **112**, 3330.
5. Hughes, T. et al. (2006) Monitoring CML patients responding to treatment with tyrosine kinase inhibitors: review and recommendations for harmonizing current methodology for detecting BCR-ABL transcripts and kinase domain mutations and for expressing results. *Blood* **108**, 28.
6. White, H.E. et al. (2010) Establishment of the first World Health Organization International Genetic Reference Panel for quantitation of BCR-ABL mRNA. *Blood* **116**, e111.
7. van der Velden, V.H., Hochhaus, A., Cazzaniga, G., Szczepanski, T., Gabert, J., and van Dongen, J.J. (2003) Detection of minimal residual disease in hematologic malignancies by real-time quantitative PCR: principles, approaches, and laboratory aspects. *Leukemia* **17**, 1013.
8. Gabert, J. et al. (2003) Standardization and quality control studies of 'real-time' quantitative reverse transcriptase polymerase chain reaction of fusion gene transcripts for residual disease detection in leukemia — a Europe Against Cancer program. *Leukemia* **17**, 2318.
9. Beillard, E. et al. (2003) Evaluation of candidate control genes for diagnosis and residual disease detection in leukemic patients using 'real-time' quantitative reverse-transcriptase polymerase chain reaction (RQ-PCR) - a Europe against cancer program. *Leukemia* **17**, 2474.

Simboli

Sljedeći simboli se mogu pojaviti na pakiranju i naljepnici:



<N>

Sadržava reagens koji je dovoljan za <N> reakcija



Upotrijebiti do



In vitro dijagnostički medicinski uređaj



Kataloški broj



Broj serije



Broj materijala



Global broj proizvoda (GTIN)



Ograničenje temperature



Proizvođač



Pogledati upute za uporabu

Kontakt informacije

Za tehničku pomoć i više informacija molimo pogledajte naš Centar za tehničku podršku na poveznici **www.qiagen.com/Support**, pozovite 00800-22-44-6000 ili kontaktirajte jedan od odjela tehničke službe tvrtke QIAGEN ili lokalne distributere (pogledajte stražnju koranicu ili posjetite **www.qiagen.com**).

Informacije za naručivanje

Proizvod	Sadržaj	Kat. br.
<i>ipsogen</i> BCR-ABL1 Mbcrl IS-MMR Kit (24)	Za 24 reakcije: Standardi s pojedinačnim plazmidom za Mbcrl i ABL, visoko pozitivna RNA kontrola, kalibrator IS-MMR, mješavina primera i proba za ABL, mješavina primera i proba za BCR-ABL Mbcrl fuzijski gen	670723
Rotor-Gene Q MDx — za IVD validiranu analizu PCR u realnom vremenu u kliničkim primjenama		
Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM Platform	PCR uređaj u realnom vremenu i uređaj za analizu mekšanja velike razlučivosti (engl. High Resolution Melt analyzer, HRM) s 5 kanala (zeleni, žuti, narančasti, crveni, grimizni) plus HRM kanal, prijenosno računalo, softver, pribor, 1-godišnje jamstvo na dijelove i izradu, instalacija i obuka nisu uključene	9002032
Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM System	PCR uređaj u realnom vremenu i uređaj za analizu mekšanja velike razlučivosti (engl. High Resolution Melt analyzer, HRM) s 5 kanala (zeleni, žuti, narančasti, crveni, grimizni) plus HRM kanal, prijenosno računalo, softver, pribor, 1-godišnje jamstvo na dijelove i izradu, instalacija i obuka	9002033
Komplet <i>ipsogen</i> RT — za reverznu transkripciju		
<i>ipsogen</i> RT Kit	Reverzna transkriptaza, proizvoljni primer, DTT, dNTP, ribonukleazni inhibitor, RT pufer	679923
Komplet RNeasy — za pročišćavanje ukupne RNA		
RNeasy Midi Kit (50)	Za 50 RNA preparacija: 50 srednjih spin kolona RNeasy, epruvete za prikupljanje (15 ml), reagensi i puferi bez ribonukleaze	75144

Za aktualizirane informacije o licenciranju i izjave o odricanju specifične za određen proizvod pogledajte odgovarajući priručnik za QIAGEN komplet ili korisnički priručnik. Priručnici za QIAGEN komplete i korisnički priručnici dostupni su na poveznici **www.qiagen.com** ili se mogu zatražiti od tehničkih službi tvrtke QIAGEN ili vašeg lokalnog distributera.

Ovaj proizvod je namijenjen za in vitro dijagnostičku uporabu. *ipsogen* proizvodi se ne smiju preprodavati, modificirati u svrhu preprodaje ili koristiti za izradu komercijalnih proizvoda bez pismenog odobrenja tvrtke QIAGEN.

Informacije u ovom dokumentu podložne su izmjenama bez prethodnog obavještenja. Tvrtka QIAGEN ne preuzima nikakvu odgovornost za bilo kakve greške koje se mogu pojaviti u ovom dokumentu. Ovaj dokument važi kao potpun i točan u trenutku objavljivanja. Ni u kojem slučaju tvrtka QIAGEN se ne može smatrati odgovornom za slučajne, posebne, višestruke ili posljedične štete koje nastanu u svezi s ovim dokumentom ili proizađu iz njegove uporabe.

Zajamčeno je da *ipsogen* proizvodi odgovaraju svojim navedenim specifikacijama. Jedina odgovornost tvrtke QIAGEN i jedini lijek za korisnika ograničeni su na besplatnu zamjenu proizvoda u slučaju da proizvodi ne funkcioniraju onako kako je zajamčeno.

Zaštitni znakovi: QIAGEN®, Sample to Insight®, *ipsogen*®, RNeasy®, Rotor-Gene® (QIAGEN Group); ABI PRISM®, Applied Biosystems®, FAM[], RNaseOUT™, ROX™, SuperScript®, SYBR®, TAMRA™, TRIzol® (Thermo Fisher Scientific Inc.); Agilent®, Bioanalyzer® (Agilent Technologies, Inc.); Excel® (Microsoft Corporation); LightCycler®, TaqMan® (Roche Group); Premix Ex Taq™ (Takara Bio, Inc.).

Ugovor o ograničenom licenciranju

Uporaba ovog proizvoda znači prihvaćanje sljedećih uvjeta od strane svakog kupca ili korisnika kompleta *ipsogen* BCR-ABL1 Mbcr IS-MMR:

1. Komplet *ipsogen* BCR-ABL1 Mbcr IS-MMR smije se koristiti samo u skladu s *priručnikom za komplet* *ipsogen* BCR-ABL1 Mbcr IS-MMR i namijenjen je samo za uporabu s komponentama koje su sadržane u kompletu. QIAGEN ne dodjeljuje licencu niti za jedno svoje intelektualno vlasništvo radi uporabe ili povezivanja priloženih komponenti ovog kompleta s bilo kojom komponentom koja nije uključena u ovaj komplet osim onog što je opisano u *priručniku za komplet* *ipsogen* BCR-ABL1 Mbcr IS-MMR i dodatnim protokolima koji su dostupni na poveznici **www.qiagen.com**.
2. Osim kako je izričito navedeno u licencama, tvrtka QIAGEN ne daje nikakvo jamstvo da ovaj komplet i/ili njegova uporaba ne krše prava trećih strana.
3. Ovaj komplet i njegove komponente su licencirani za jednokratnu uporabu i ne smiju se ponovno koristiti, prerađivati ili preprodavati.
4. Tvrtka QIAGEN posebice ne prihvaća nikakve druge licence, izričite ili implicirane, osim onih koje su izričito navedene.
5. Kupac i korisnik kompleta prihvaćaju da neće angažirati nikog drugog ili mu dopustiti da poduzima bilo kakve korake koji bi doveli do ili olakšali bilo kakve aktivnosti koje su gore zabranjene. Tvrtka QIAGEN na bilo kojem sudu može osporiti ovaj Ugovor o ograničenom licenciranju i može tražiti naknadu za sve troškove istrage i sudske troškove, uključujući troškove odvjetnika, na bilo koji način može nametnuti poštovanje ovog ugovora o ograničenom licenciranju ili bilo kojeg prava na svoje intelektualno vlasništvo vezano uz ovaj komplet i/ili njegove komponente.

Za aktualizirane uvjete o licenciranju posjetite **www.qiagen.com**.

HB-1362-003 © 2013–2016 QIAGEN, sva prava pridržana.

www.qiagen.com

