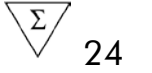


ipsogen[®] BCR-ABL1 MbcR IS-MMR Kit El Kitabı



Versiyon 1

IVD

Kantitatif in vitro diagnostik

Rotor-Gene[®] Q, Applied Biosystems[®], ABI PRISM[®] ve
LightCycler[®] aletleriyle kullanılmak üzere

CE

REF 670723



QIAGEN GmbH, QIAGEN Strasse 1, 40724 Hilden,
ALMANYA

R3 **MAT** 1072509TR



QIAGEN: Sample and Assay Technologies

QIAGEN herhangi bir biyolojik örneğin içeriğinin izolasyonu ve saptanmasını mümkün kılan yenilikçi örnek ve tahlil teknolojilerinin önde gelen lideridir. Gelişmiş, çok kaliteli ürünlerimiz ve hizmetlerimiz örnekten sonuca başarıyı garanti eder.

QIAGEN şunlarda standartları oluşturur:

- DNA, RNA ve proteinlerin saflaştırılması
- Nükleik asit ve protein tahlilleri
- microRNA araştırmaları ve RNAi
- Örnek ve tahlil teknolojilerinin otomasyonu

Misyonumuz olağanüstü başarı elde etmeniz ve yeni buluşlar yapmanızı mümkün kılmaktır. Daha fazla bilgi için www.qiagen.com adresini ziyaret edin.

İçindekiler

Kullanım Amacı	5
Özet ve Açıklama	5
KML Genel Bilgisi	5
Hastalık izlenmesi	5
İşlemin Prensibi	7
Sağlanan Materyaller	9
Kit içeriği	9
Gereken ama Sağlanmayan Materyal	10
Uyarılar ve Önlemler	11
Genel önlemler	12
Reaktif Saklama ve Muamele	12
Örnek Muamelesi ve Saklama	13
İşlem	13
Örnek RNA hazırlama	13
Protokoller	
■ SuperScript III Revers Transkriptazı kullanılarak Revers transkripsiyon	14
■ 72 tüp rotorlu Rotor Gene Q 5plex HRM veya Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM üzerinde qPCR	17
■ Applied Biosystems 7500 Real-Time PCR Sisteminde qPCR, ABI PRISM 7900HT SDS ve LightCycler 480 cihazları	21
■ LightCycler 1.2, 1.5 ve 2.0 Aletlerinde qPCR	27
Sonuçların Değerlendirilmesi	31
Veri analizi prensibi	31
Standart eğriler ve kalite kriterleri ham veriler için geçerlidir	32
Normalize kopya numarası (NCN)	34
IS dönüştürme ve MMR bildirim	35
Kalite kriterleri özeti	36
Arıza Giderme	36
Kalite Kontrol	37
Sınırlamalar	37
Performans Özellikleri	37

Kör limiti ve saptama limiti	38
Linearite	38
Girdiler	38
Kesinlik	38
Uyumluluk çalışması: ERM-AD623 BCR-ABL1 tekli plazmid (IRMM) ile ipsogen tekli plazmid (QIAGEN) standartlarının karşılaştırması	39
Referanslar	41
Semboller	42
İrtibat Bilgisi	42
Sipariş Bilgisi	43

Kullanım Amacı

ipsogen BCR-ABL1 Mbc IS-MMR Kiti daha önce bir BCR-ABL Mbc füzyon geni (FG) olayı tanısı konmuş akut lenfoblastik lösemi (ALL) veya kronik myeloid lösemi (KML) hastalarının kemik iliği veya periferel kan örneklerinde BCR-ABL p210 b2a2 veya b3a2 transkriptlerinin kantifikasyonu için kullanılması amaçlanmıştır. Testin moleküler cevap düzeyini değerlendirmek üzere kullanılması amaçlanmıştır; sonuçlar minimal rezidüel hastalık takibi için kullanılabilir.

Özet ve Açıklama

KML Genel Bilgisi

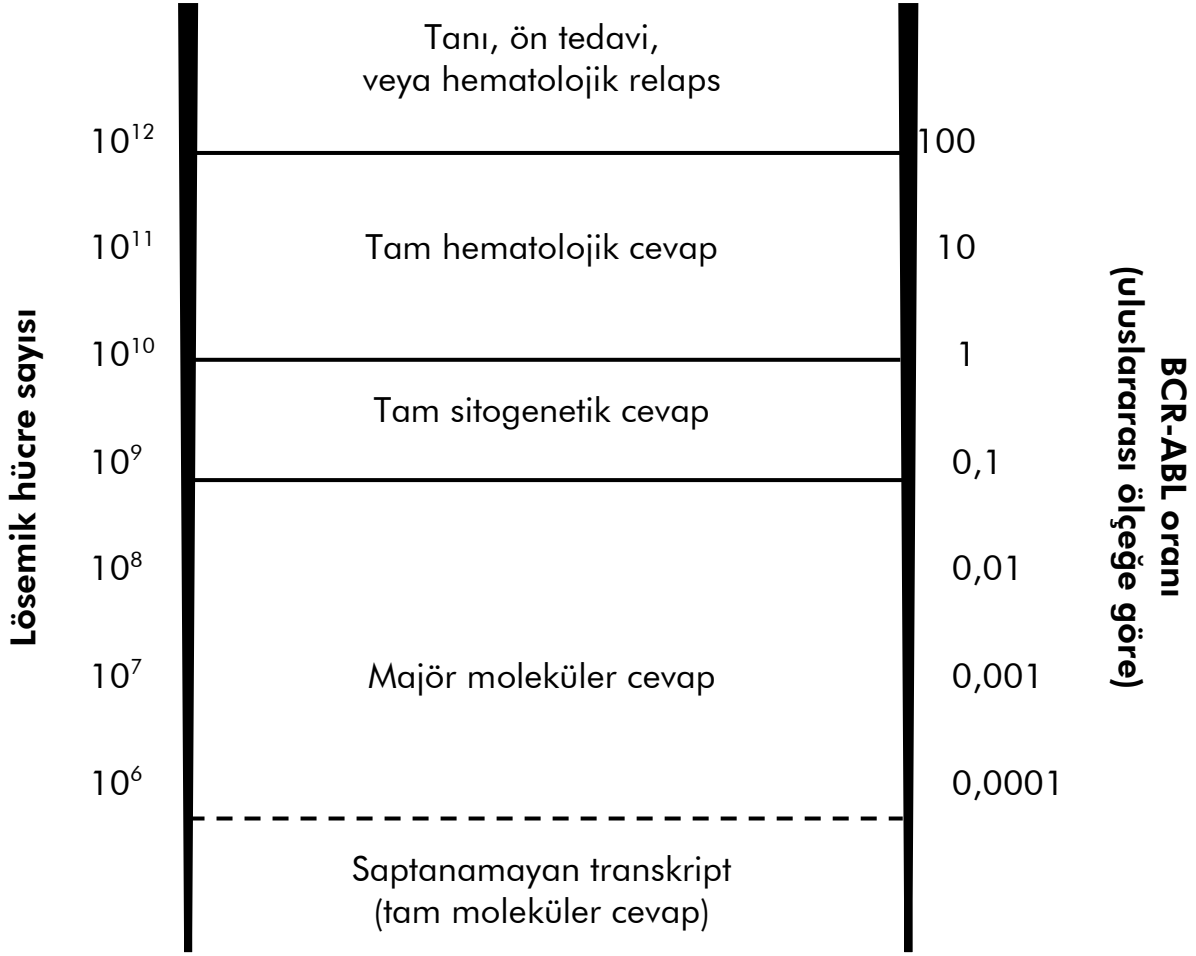
KML bir grup myeloproliferatif neoplazmın biridir ve vakaların %90'ında Philadelphia kromozomu (Ph kromozomu) varlığı ile karakterizedir.

Bu kromozom, kromozom 9 ve 22 uzun kolları, t(9;22), BCR (kırılma noktası küme bölgesi) kromozom 22'de ve c-ABL onkojeni kromozom 9'dan geliyor olarak resiprokal bir translokasyonun ürünüdür. Karşılık gelen füzyon geni BCR-ABL, bir 8,5 kb mRNA'ya transkripsiyonla dönüşür ve b2a2 (vakaların %40'ı) ve b3a2 (vakaların %55'i) şeklinde iki bileşke varyantı vardır. Artmış tirozin kinaz aktivitesiyle p210 adlı kimerik bir protein kodlar. b2a3 ve b3a3 transkriptleri vakaların %5'inden azını temsil eder. Bir Ph kromozomu yetişkin ALL hastalarının %35'inde de saptanabilir.

Yıllık KML insidansı yaklaşık 100.000'de 1–2'dir ve KML yetişkin lösemilerin %20'sini oluşturur. Klinik olarak normal şekilde diferansiyasyon ve işlev gösteren bir myeloid hücre fazlalığıyla karakterizedir. KML hastaları vakaların %90-95'inde hastalığın kronik veya stabil fazında tanı alırlar. Tarihsel olarak ortalama 4 - 6 yıl içinde hastalar daima ölümcül olan blastik kriz ve akut lösemiye geçecek şekilde hızlandırılmış bir faza girerlerdi. İmatinib ve daha yakın zamanda ikinci nesil tirozin kinaz inhibitörlerinin (TKI) geliştirilmesi hastalığın doğal seyrini dramatik olarak değiştirdi: hastaların çoğu şimdi remisyonda kalır ve uzun dönemli takip ve hastalık izlenmesini hak ederler.

Hastalık izlenmesi

Bugüne kadar KML tedavisinin hedefi %100 sağkalım ve Ph kromozomu negatifliği elde etmek olmuştur. Hastalığı izlemek bu nedenle tedaviye cevabı değerlendirmek ve her hastada erken relapsı saptamak için elzem bir araçtır. TKI tedavisi altında hastalar tipik olarak hematolojik ve sonra sitogenetik ve sonra moleküler remisyona ilerlerler ve bu durum aşağıda Şekil 1'de gösterildiği gibi azalan sayıda lösemik hücre ve BCR-ABL transkriptine karşılık gelir.



Şekil 1. Referans 1'den uyarlanmıştır.

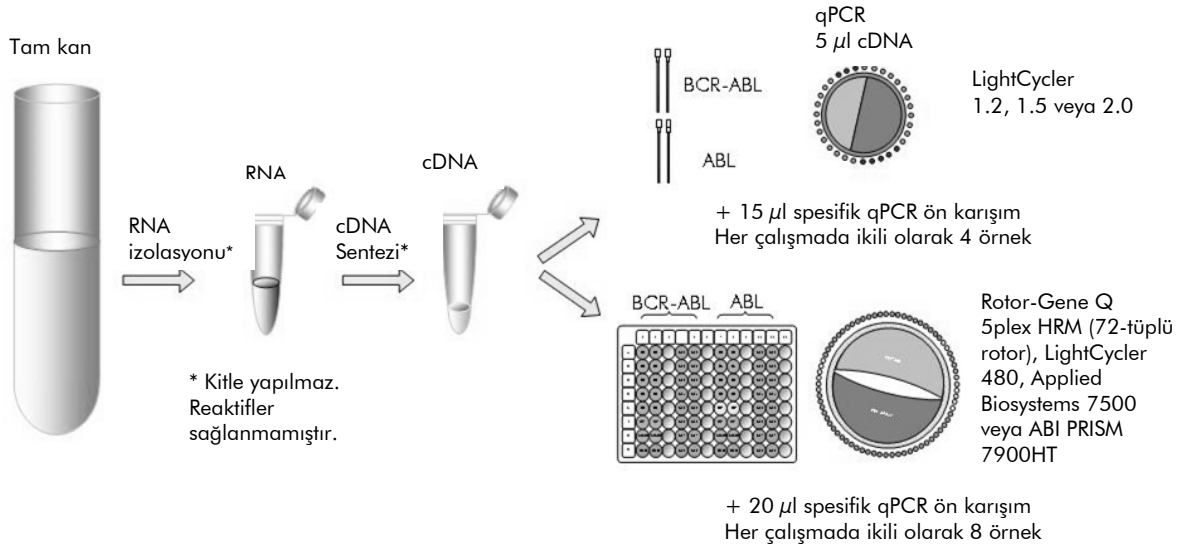
KML hastalarında tümör yükünü tahmin etmenin standart yöntemi kemik iliği metafazlarında geleneksel sitogenetik analizdir. Sitogenetik cevap en az 20 kemik iliği metafazında değerlendirilir. Sitogenetik cevap düzeyi Ph kromozomu pozitif metafaz yüzdesiyle tahmin edilir (bakınız Tablo 1, referans 2). Ancak bu değerlendirme laboratuvar performanslarına dayanır ve 20 metafaz analiz edildiğinde %5 ile düşük bir hassasiyete sahiptir.

Periferik kan örneklerinde gerçek zamanlı kantitatif polimeraz zincir reaksiyonu (qPCR) BCR-ABL M_{bcr} mRNA'sını kantifiye ederek şimdi tedavide KML hastalık izleme tekniklerinin bir parçasıdır. Geleneksel kemik iliği metafaz sitogenetiğinden daha az invaziv ve daha hassastır.

KML hastalığı izleme önerileri de yakın zamanlı olarak klinik çalışmalardan yeni klinik bulguların katılması ve daha iyi hastalık izleme hedefleri ve araçlarıyla güncellenmiştir. İmatinib alan hastalarda cevap tanımı ve izlenmesi hakkında en son öneriler ELN uzmanları tarafından yapılmıştır (2).

Teknik açıdan uluslararası uzmanlarca BCR-ABL M_{bcr} testi ve raporlandırmayı uyumlaştırmak için çaba gösterilmiştir (3–5). Ayrıca yakın zamanda BCR-ABL kantifikasyonunun basit bir standardizasyonunu mümkün kılmak üzere DSÖ gözetiminde bir referans paneli doğrulanmıştır (6).

İşlemin Prensipli



Şekil 2. RNA izolasyonu, cDNA sentezi ve qPCR.

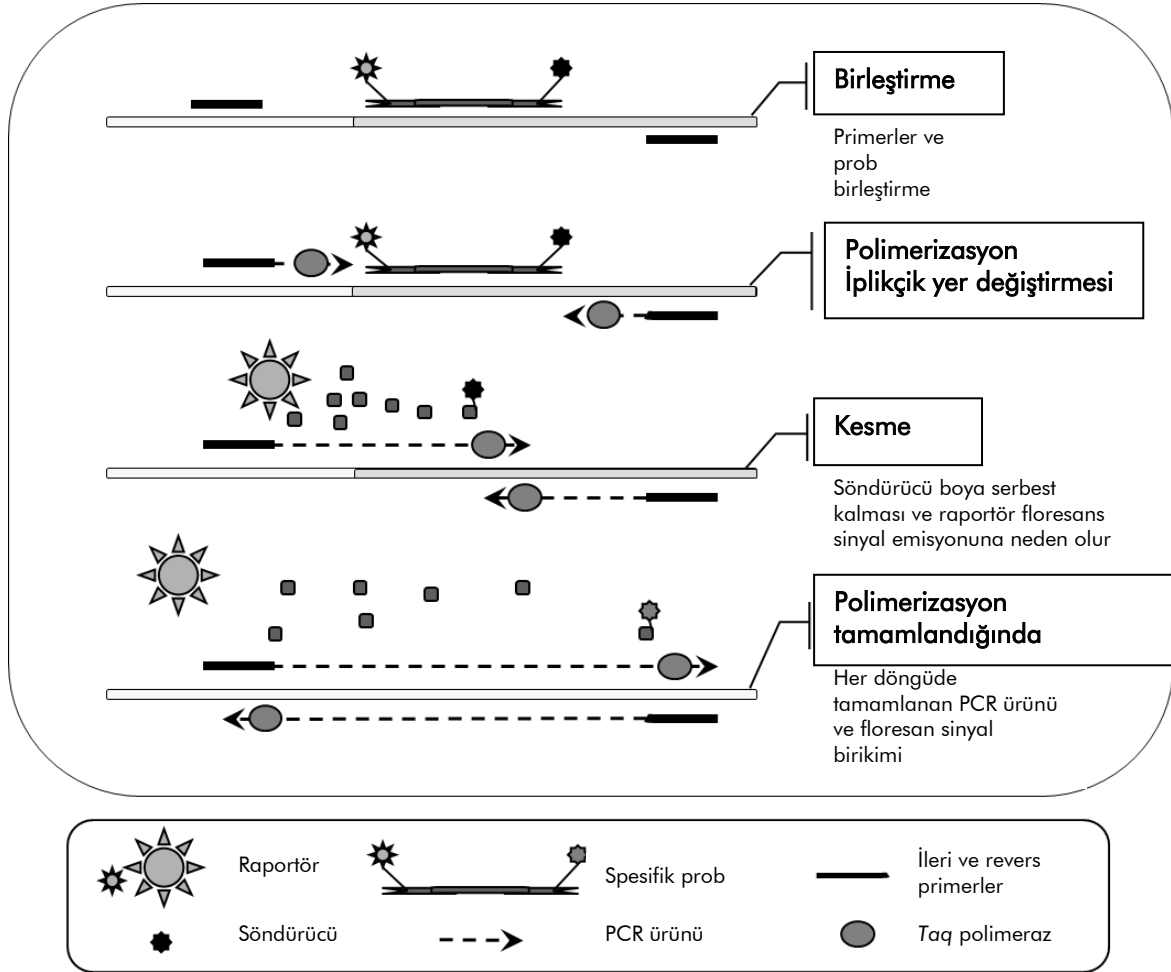
qPCR, PCR amplifikasyon sürecinin eksponensiyel fazı sırasında PCR ürünlerinin doğru kantifikasyonunu mümkün kılar. Kantitatif PCR verileri post-PCR işleme olmadan PCR cycling sırasında ve/veya sonrasında floresans sinyallerin gerçek zamanlı saptanmasıyla hızla elde edilebilir ve böylece PCR ürünü kontaminasyonu riski önemli ölçüde azalır. Şu anda 3 ana tipte qPCR tekniği mevcuttur: SYBR® Yeşil I Boya kullanılarak qPCR analizi, hidroliz probları kullanılarak qPCR analizi ve hibridizasyon probları kullanılarak qPCR analizi.

Bu test qPCR çift boya oligonükleotid hidroliz prensibini kullanır. PCR sırasında, ileri ve revers primerler belirli bir sekansa hibridize olur. Aynı karışımda bir çift boya oligonükleotid bulunur. Bir 5' raportör boya ve bir akış aşağı 3' söndürücü boyayla etiketlenmiş bir oligonükleotidden oluşan bu prob PCR ürünü içinde bir hedef sekansa hibridize olur. Hidroliz problarıyla qPCR analizi *Thermus aquaticus* (Taq) DNA polimeraz 5'→3' eksonükleaz aktivitesini kullanır. Prob sağlam olduğunda raportör boyanın söndürücü boyaya yakınlığı raportör floresansın temel olarak Förster tipi enerji transferiyle baskılanmasıyla sonuçlanır.

PCR sırasında, ilgilenilen hedef mevcutsa, prob spesifik olarak ileri ve revers primer bölgeleri arasında yapışır. DNA polimerazın 5'→3' eksonükleaz aktivitesi ancak prob hedefe hibridize olursa probu raportör ile söndürücü arasında keser. Prob fragmanları sonra hedeften ayrılır ve iplikçığın polimerizasyonu devam eder. Probu 3' ucu PCR sırasında probun uzamasını önlemek üzere bloke edilir (Şekil 3). Bu işlem her döngüde oluşur ve ürünün eksponensiyel birikimini olumsuz etkilemez.

Bu floresans sinyali artışı ancak hedef sekans probu tamamlayıcı ise ve böylece PCR sırasında amplifiye oluyorsa saptanır. Bu gereklilikler nedeniyle nonspesifik

amplifikasyon saptanmaz. Böylece, floreanstaki artış PCR sırasında hedef amplifikasyonla doğrudan orantılıdır.



Şekil 3. Reaksiyon prensibi. Total RNA revers transkripsiyona uğrar ve oluşan cDNA PCR ile bir çift spesifik primer ve spesifik internal çift boya probu (FAM - TAMRA) kullanılarak amplifiye edilir. Prob PCR'da her yapışma adımında amplicona bağlanır. Taq DNA polimeraz bağlı primerden amplicona uzandığında probun 5' ucunu yerinden oynatır ve burası Taq DNA polimerazın 5'→3' eksonükleaz aktivitesi ile degrade olur. Kesme kalan prob amplicondan eriyip ayrılınca kadar devam eder. Bu işlem florofor ve söndürücüyü solüsyona serbest bırakır, bunları uzaysal olarak ayırır ve FAM'dan floresans artmasına ve TAMRA'dan floresans azalmasına neden olur.

Sağlanan Materyaller

Kit içeriği

ipsogen BCR-ABL1 Mbcr IS-MMR Kit		(24)
Katalog no.		670723
Reaksiyon sayısı		24
High Positive RNA Control (Yüksek Pozitif RNA Kontrol)		3 x 10 µl
IS-MMR Calibrator (IS-MMR Kalibratör)		3 x 10 µl
Mbcr and ABL Single Plasmid Standard Dilution (Mbcr ve ABL Tek Plasmid Standart Dilüsyonu) (10 ¹ kopya/5 µl)	SP1-BCR-ABL Mbcr & ABL	35 µl
Mbcr and ABL Single Plasmid Standard Dilution (Mbcr ve ABL Tek Plasmid Standart Dilüsyonu) (10 ² kopya/5 µl)	SP2-BCR-ABL Mbcr & ABL	35 µl
Mbcr and ABL Single Plasmid Standard Dilution (Mbcr ve ABL Tek Plasmid Standart Dilüsyonu) (10 ³ kopya/5 µl)	SP3-BCR-ABL Mbcr & ABL	70 µl
Mbcr and ABL Single Plasmid Standard Dilution (Mbcr ve ABL Tek Plasmid Standart Dilüsyonu) (10 ⁴ kopya/5 µl)	SP4-BCR-ABL Mbcr & ABL	35 µl
Mbcr and ABL Single Plasmid Standard Dilution (Mbcr ve ABL Tek Plasmid Standart Dilüsyonu) (10 ⁵ kopya/5 µl)	SP5-BCR-ABL Mbcr & ABL	70 µl
Mbcr and ABL Single Plasmid Standard Dilution (Mbcr ve ABL Tek Plasmid Standart Dilüsyonu) (10 ⁶ kopya/5 µl)	SP6-BCR-ABL Mbcr & ABL	70 µl

ipsogen BCR-ABL1 MbcR IS-MMR Kit		(24)
Katalog no.		670723
Reaksiyon sayısı		24
Primers and Probe Mix ABL (Primerler ve Prob Karışımı ABL)*	PPC-ABL 25x	110 µl
Primers and Probe Mix BCR-ABL MbcR Fusion Gene (Primerler ve Prob Karışımı BCR-ABL MbcR Füzyon Geni) [†]	PPF-MbcR 25x	110 µl
ipsogen BCR-ABL1 MbcR IS-MMR Kit Handbook (İngilizce)		1

* ABL kontrol geni için spesifik revers ve ileri primerlerin ve ayrıca spesifik bir FAM-TAMRA probunun karışımı.

† BCR-ABL MbcR füzyon geni için spesifik revers ve ileri primerlerin ve ayrıca spesifik bir FAM-TAMRA probunun karışımı.

Not: Standart (SP1–SP6) ve primerler ile prob karışımlarını kullanımdan önce kısa bir süre karıştırın ve santrifüje edin.

Gereken ama Sağlanmayan Materyal

Kimyasallarla çalışırken daima uygun bir laboratuvar önlüğü, tek kullanımlık eldivenler ve koruyucu gözlükler kullanın. Daha fazla bilgi için, ürün tedarikçisinden elde edilebilecek uygun güvenlik veri sayfalarına (SDS'ler) başvurun.

Reaktifler

- RNA saflaştırma işlemi için reaktifler: Onaylanmış reaktifler: RNeasy® Midi Kit (QIAGEN, kat. no. 75144) veya TRIzol® Reaktifi (Thermo Fisher Scientific Inc, kat. no. 15596018 veya 15596026)
- Nükleaz içermeyen PCR sınıfı su
- Tampon ve Taq DNA polimeraz: Onaylanmış reaktifler: *Premix Ex Taq™* DNA Polimerazı (Perfect Gerçek Zamanlı) (TaKaRa, kat. no. RR039A) ve *Premix Ex Taq DNA Polimerazı* (Prob qPCR) (TaKaRa, kat. no. RR390A). İki reaktif de 2× Taq DNA polimerazı ana karışımı ve ROX™ referans boyalarını içerir
- Ters transkripsiyon reaktifleri: Onaylanmış reaktifler: *ipsogen RT Kiti*, ters transkriptaz, 5× RT tamponu, 100 mM DTT, RNaz inhibitörü, rastgele primer ve dNTP'ler (QIAGEN, kat. no. 679923) içerir veya SuperScript® III Ters Transkriptaz, ters transkriptaz, 5× tek iplikçik tamponu ve 100 mM DTT (Thermo Fisher Scientific Inc., kat. no. 18080044) içerir

- SuperScript III kullanırken, aşağıdaki ilave reaktifler gereklidir:
 - RNaz inhibitörü: Onaylanmış reaktif: RNaseOUT™ Rekombinant Ribonükleaz İnhibitörü (Thermo Fisher Scientific Inc., kat. no. 10777019)
 - dNTP seti, PCR sınıfı
 - Rastgele nonamer

Sarf Malzemesi

- Hidrofobik filtreli nükleaz içermeyen aerosole dirençli steril PCR pipet uçları
- 0,5 ml veya 0,2 ml RNaz- ve DNaz içermeyen PCR tüpleri
- Buz

Ekipman

- PCR için ayrılmış mikrolitre pipetler* (1–10 µl; 10–100 µl; 100–1000 µl)
- 0,2 ml/0,5 ml reaksiyon tüpleri için rotorlu masaüstü santrifüj* (10.000 rpm değerine ulaşabilen)
- Gerçek zamanlı PCR cihazı:* Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM veya diğer Rotor-Gene cihazı; LightCycler 1.2, 1.5, 2.0 veya 480; Applied Biosystems 7500 Real-Time PCR Sistemi; ABI PRISM 7900HT SDS; ve ilgili spesifik materyal
- Termal cyclus* veya su banyosu* (revers transkripsiyon adımı)

Uyarılar ve Önlemler

İn vitro diagnostik kullanım için

Kimyasallarla çalışırken daima uygun bir laboratuvar önlüğü, tek kullanımlık eldivenler ve koruyucu gözlükler kullanın. Daha fazla bilgi için, lütfen uygun güvenlik veri sayfalarına (SDS'ler) başvurun. Bunlar çevrim içi olarak PDF halinde www.qiagen.com/safety adresinde yer almaktadır ve kullanıcılar burada her QIAGEN kiti ve kit bileşeni için SDS'yi bulabilir, okuyabilir ve yazdırabilir.

Örnek ve tahlil atığını yerel güvenlik düzenlemelerinize göre atın.

* Aletlerin üreticinin önerilerine göre kontrol edilip kalibre edildiğinden emin olun.

Genel önlemler

qPCR testleri geçerli düzenlemeler ve ilgili standartlarla uyumlu ve moleküler biyolojiye özel ekipman bakımı dahil iyi laboratuvar uygulamaları gerektirir.

Bu kitin in vitro diagnostik kullanım için olması amaçlanmıştır. Bu kitte sağlanan reaktifler ve talimat optimum performans için doğrulanmıştır. Reaktiflerin daha fazla seyreltilmesi veya inkübasyon süreleri ve sıcaklıklarının değiştirilmesi hatalı veya uyumsuz verilerle sonuçlanabilir. PPC ve PPF reaktifleri ışığa maruz kalırlarsa değişebilir. Tüm reaktifler özellikle bu test için formüle edilmiştir. Testin optimum performansı için yerine başka bir şey kullanılmamalıdır.

qPCR kullanılarak transkript düzeylerinin belirlenmesi hem mRNA revers transkripsiyonu hem de oluşan cDNA'nın PCR ile amplifikasyonunu gerektirir. Bu nedenle tüm test işlemi RNaz/DNaz içermeyen koşullarda yapılmalıdır.

Aşağıdakileri önlemek için çok dikkatli olun:

- Şablon mRNA ve oluşan cDNA'nın degradasyonuna yol açabilecek RNaz/DNaz kontaminasyonu
- Yalancı pozitif sinyalle sonuçlanan mRNA veya PCR bulaşma kontaminasyonu

Bu nedenle şunları öneririz.

- Testi yaparken nükleaz içermeyen laboratuvar gereçleri (örn. pipetler, pipet uçları, reaksiyon şişeleri) kullanın ve eldiven takın.
- Örnekler ve reaktiflerin çapraz kontaminasyonunu önlemek üzere tüm pipetleme adımları için taze aerosole dirençli pipet uçları kullanın.
- Ön PCR ana karışımını belirlenmiş materyalle (pipetler, uçlar, vs.) DNA matrislerinin (cDNA, DNA, plasmid) giremeyeceği belirlenmiş bir bölgede hazırlayın. Şablonu belirli materyalle (pipetler, uçlar, vs.) ayrı bir bölgede (tercihen ayrı bir odada) ekleyin.
- Standartları (SP1–SP6) ayrı bir odada kullanın.

Reaktif Saklama ve Muamele

Kitler kuru buzda gönderilir ve alındığında -30°C ila -15°C 'de saklanmalıdır.

- Primerler ve prob karışımlarının (PPC ve PPF tüpleri) ışığa maruz kalmasını minimuma indirin.
- Açmadan önce tüpleri yavaşça karıştırın ve santrifüje edin.
- Tüm kit bileşenlerini orijinal kaplarda saklayın.

Bu saklama koşulları hem açılmış hem açılmamış bileşenler için geçerlidir. Etiketlerde belirtilenlerden farklı koşullar altında saklanan bileşenler uygun performans göstermeyebilir ve test sonuçlarını olumsuz etkileyebilir.

Her reaktif için son kullanma tarihleri ayrı bileşen etiketlerinde belirtilmiştir. Doğru saklama koşulları altında ürün performansını etikette yazılı son kullanma tarihine kadar korur.

Bu ürünün stabil olmamasını belirtecek bariz bir işaret yoktur. Ancak, bilinmeyen örneklerle aynı anda pozitif ve negatif kontroller çalışmalıdır.

Örnek Muamelesi ve Saklama

Tam kan örnekleri potasyum EDTA ile antikoagüle edilmeli ve RNA ekstraksiyonundan önce 2–8°C'de en fazla 5 gün saklanmalıdır.

İşlem

Örnek RNA hazırlama

Hasta örneklerinden (kan veya kemik iliği) RNA hazırlama onaylanmış bir işlemle yapılmış olmalıdır. Testin kalitesi büyük ölçüde giriş RNA kalitesine bağlıdır. Bu nedenle saflaştırılmış RNA'yı agaroz* jel elektroforezi ile vasıflandırmanızı veya analiz öncesinde Agilent® Bioanalyzer® veya spektrofotometri kullanmanızı öneririz.†

* Kimyasallarla çalışırken daima uygun bir laboratuvar önlüğü, tek kullanımlık eldivenler ve koruyucu gözlükler kullanın.

† Optik dansite 260 ve 280 nm'de ölçülür: 260 nm'de 1,0 OD yaklaşık 40 µg/ml tek iplikçikli RNA'ya eşdeğerdir. A_{260}/A_{280} oranının 1,8 ile 2,1 arasında olması yüksek ölçüde saflaştırılmış RNA'ya işaret eder.

Protokol: SuperScript III Revers Transkriptazı kullanılarak Revers transkripsiyon

Bu protokol SuperScript III Revers Transkriptaz kullanılarak revers transkripsiyon içindir. *ipsogen RT Kitini kullanırken ipsogen RT Kit El Kitabı* protokolünü kullanın.

Başlamadan önce yapılacaklar

- Her biri için 10 mM dNTP hazırlayın. Alikotlar halinde -20°C 'de saklayın.

İşlem

1. Tüm gerekli bileşenleri çözün ve buz üzerine koyun.
2. İyice karıştırın (vortekslemeyin) ve kısa süre santrifüje edin (sıvıyı tüpün altında toplamak amacıyla yaklaşık 10 s, 10.000 rpm). Sonra buz üzerinde tutun.
3. RNA örneklerini $0,1 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ olarak ayarlayın. Her RNA örneğinden $10 \mu\text{l}$ 'yi ($1 \mu\text{g}$) ayrı, etiketli tüplere pipetleyin. $10 \mu\text{l}$ yüksek pozitif RNA kontrol, $10 \mu\text{l}$ IS-MMR Kalibratör ve $10 \mu\text{l}$ nükleaz içermeyen suyu (RT negatif kontrol olarak) ayrı, etiketlenmiş tüplere pipetleyin ve bunları aşağıda tanımlandığı gibi RNA örnekleriyle paralel olarak işleme koyun.
4. Her örnek, kontrol ve kalibratörü (her birinden $10 \mu\text{l}$) 65°C 'de 5 dakika inkübe edin ve hemen buzda 5 dakika soğutun.
5. Kısa süre santrifüje edin (sıvıyı tüpün altında toplamak amacıyla yaklaşık 10 saniye, 10.000 rpm). Sonra buz üzerinde tutun.
6. Aşağıdaki RT karışımını işlenen örnek, kontrol ve kalibratör sayısına göre hazırlayın (Tablo 1).

Tablo 1. RT karışımı hazırlama

Bileşen	Örnek başına hacim (μl)	Son konsantrasyon
Birinci İplikçik Tamponu, 5x (SuperScript II Revers Transkriptaz ile sağlanır)	5,0	1x
dNTP (her birinden 10 mM, önceden hazırlanacak ve alikotlar halinde – 20°C'de saklanacak)	2,0	0,8 mM
Rastgele nonamer (100 μ M)	5,25	21 μ M
RNaseOUT (40 U/ μ l)	0,5	0,8 U/ μ l
SuperScript III Revers Transkriptaz (200 U/ μ l)	1,0	8 U/ μ l
DTT (SuperScript III Revers Transkriptaz ile sağlanır)	1,25	–
Isıtılmış RNA örneği, kontrol veya IS-MMR Kalibratörü (adım 7'de eklenecek)	10,0	40 ng/ μ l
Son hacim	25,0	–

- 7. Her PCR tüpüne RT karışımından 15 μ l pipetleyin. Sonra 10 μ l (1 μ g) örnek RNA, kontrol veya kalibratör (adım 4'ten) ekleyin.**
- 8. Dikkatle karıştırın (vortekslemeyin) ve kısa süre santrifüje edin (sıvıyı tüpün altında toplamak amacıyla yaklaşık 10 saniye, 10.000 rpm).**
- 9. Termal cyler'ı Tablo 2'de belirtildiği şekilde revers transkripsiyon programıyla programlayın.**

Tablo 2. Sıcaklık profili

Revers transkripsiyon 1	Sıcaklık: 25°C Süre: 10 dakika
Revers transkripsiyon 2	Sıcaklık: 50°C Süre: 60 dakika
İnaktivasyon	Sıcaklık: 85°C Süre: 5 dakika
Soğutma	Sıcaklık: 4°C Süre: 5 dakika

10. Tüpleri termal cycler'a koyun ve termal cycling programını Tablo 2'de belirtildiği şekilde başlatın.

11. Program bittikten sonra tüpleri kısa süre santrifüje edin (sıvıyı tüpün altında toplamak amacıyla yaklaşık 10 saniye, 10.000 rpm). Tüpleri qPCR aşağıdaki protokollere göre qPCR aletinize göre yapılıncaya kadar buzda veya -20°C'de tutun.

Not: LightCycler 1.2, 1.5 ve 2.0 aletleri için her RT hazırlığı iki qPCR çalışmalık cDNA sağlar.

Protokol: 72 tüp rotorlu Rotor Gene Q 5plex HRM veya Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM üzerinde qPCR

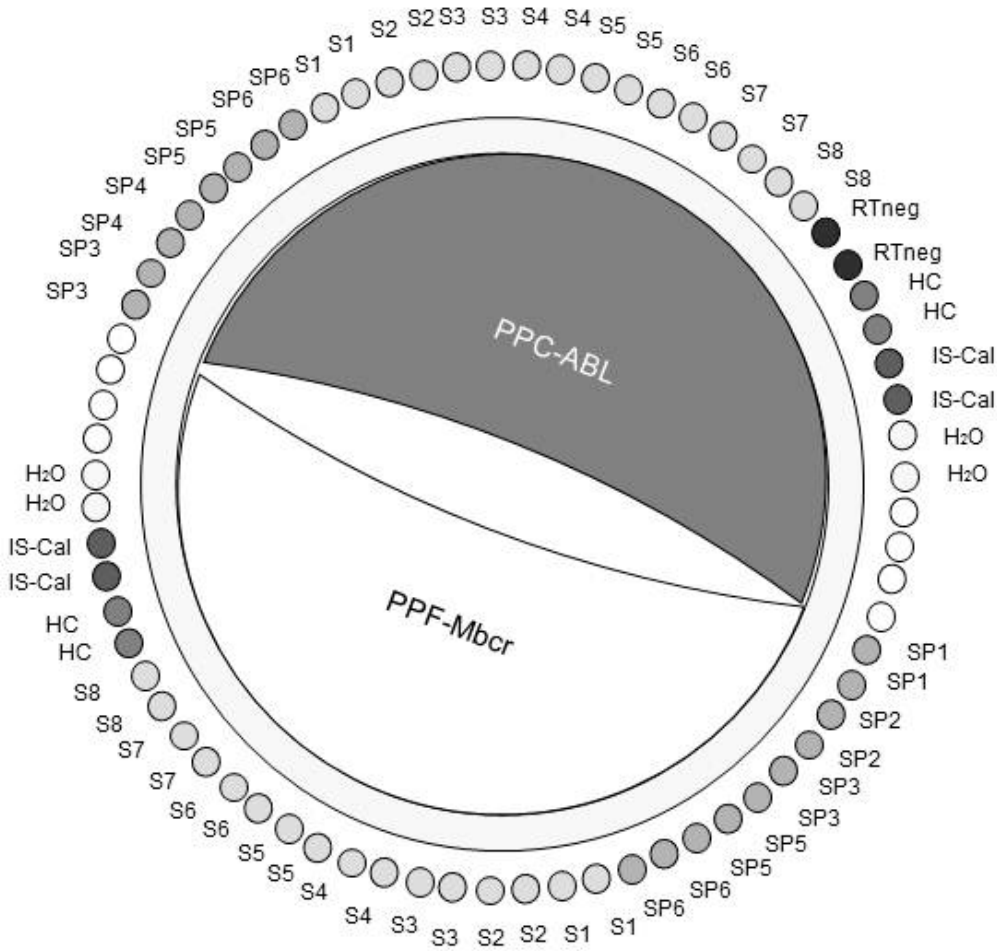
Bu aleti kullanarak Tablo 3'te gösterildiği gibi tüm ölçümleri ikili olarak yapmanızı öneririz. Bu kit aynı deneyde 3 kez 8 farklı cDNA örneği test etmek üzere tasarlanmıştır.

Tablo 3. 72 tüp rotorlu Rotor-Gene Q aletlerinde reaksiyon sayısı

Örnekler	Reaksiyonlar
ABL primerleri ve prob karışımıyla (PPC-ABL) (32 reaksiyon)	
8 cDNA örneği	8 x 2 reaksiyon
1 cDNA yüksek pozitif kontrol	2 reaksiyon
1 cDNA IS-MMR Kalibratörü	2 reaksiyon
Tek plasmid standartları	2 x 4 reaksiyon (SP3, SP4, SP5 ve SP6 dilüsyon, her biri ikili olarak test edilir)
RT negatif kontrol	2 reaksiyon
Su kontrol	2 reaksiyon
BCR-ABL Mbc primerleri ve prob karışımıyla (PPF-Mbc) (32 reaksiyon)	
8 cDNA örneği	8 x 2 reaksiyon
1 cDNA yüksek pozitif kontrol	2 reaksiyon
1 cDNA IS-MMR Kalibratörü	2 reaksiyon
Tek plasmid standartları	2 x 5 reaksiyon (SP1, SP2, SP3, SP5 ve SP6, her biri ikili olarak test edilir)
Su kontrol	2 reaksiyon

72 tüp rotorlu Rotor-Gene Q aletlerinde örnek işleme

Standartların ve primerler ve prob karışımlarının kullanımını optimize etmek üzere aynı deneyde en az 8 cDNA örneği test edilmesini öneririz. Şekil 4'teki rotor şeması böyle bir deneyin örneğini vermektedir.



Şekil 4. ipsogen BCR-ABL1 Mbcr IS-MMR Kitiyle her deney için önerilen rotor kurulumu. SP1–SP6: BCR-ABL Mbcr ve ABL standartları; **HC:** Yüksek cDNA pozitif kontrol; **IS-Cal:** IS-MMR kalibratör; **RTneg:** RT negatif kontrol; **S:** cDNA örneği; **H₂O:** su kontrol.

Not: Daima test edilecek bir örneği rotorda pozisyon 1'e koyduğunuzdan emin olun. Aksi halde kalibrasyon adımı sırasında alet kalibrasyon yapmaz ve hatalı floresans verileri alınır.

Tüm diğer pozisyonları boş tüplerle doldurun.

72 tüp rotorlu Rotor-Gene Q aletlerinde qPCR

Not: Tüm adımları buz üzerinde yapın.

İşlem

1. Tüm gerekli bileşenleri çözün ve buz üzerine koyun.
2. Standartlar, PPF-Mbcr ve PPC-ABL tüpleri vorteksleyin ve kısa süre santrifüje edin (sıvıyı tüpün altında toplamak amacıyla yaklaşık 10 saniye, 10.000 rpm).
3. Aşağıdaki qPCR karışımını işlenen örnek sayısına göre hazırlayın.

Tüm konsantrasyonlar son reaksiyon hacmi içindir.

Tablo 4 25 µl son reaksiyon hacmi elde etmek üzere hazırlanmış olarak bir reaktif karışımı hazırlanması için pipetleme şemasını tanımlar. Reaksiyon sayısına göre aynı primerler ve prob karışımı kullanılarak bir ön karışım hazırlanabilir (PPC-ABL veya PPF-Mbcr). Pipetleme hatasını dengelemek için ekstra hacimler dahil edilmiştir.

Tablo 4. qPCR karışımı hazırlama

Bileşen	1 reaksiyon (µl)	ABL: 32+1 reaksiyon (µl)	BCR-ABL Mbcr: 32+1 reaksiyon (µl)	Son konsantrasyon
Ön karışım Ex Taq, 2x	12,5	412,5	412,5	1x
Primerler ve prob karışımı, 25x	1	33	33	1x
Nükleaz içermeyen PCR sınıfı su	6,5	214,5	214,5	–
Örnek (adım 5'te eklenecek)	5	Her birinden 5	Her birinden 5	–
Toplam hacim	25	Her birinden 25	Her birinden 25	–

4. Tüp başına 20 µl qPCR ana karışımı verin.
5. Farklı bir lab alanında ve tahsis edilmiş ekipmanla, karşılık gelen tüpe (toplam hacim 25 µl) revers transkripsiyonda elde edilen (bakınız "Protokol: SuperScript III Revers Transkriptazı kullanılarak", sayfa 13) RT ürününden (cDNA, 200 ng RNA eşdeğeri) 5 µl ekleyin.
6. Yavaşça, yukarı ve aşağı pipetleyerek karıştırın.
7. Tüm tüpleri kapatın ve tüpleri üretici önerilerine göre termal cyclers'a koyun.
8. Rotor-Gene Q aletini Tablo 5'te belirtildiği şekilde termal cycling programıyla programlayın.

Tablo 5. Sıcaklık profili

Analiz modu	Kantifikasyon
Tutma 1	Sıcaklık: 95°C Süre: 10 sn
Döngüleme	50 kez 5 sn için 95°C 30 sn için 60°C ve Yeşil kanalında FAM floresans alınması: Tek
Tutma 2	Sıcaklık: 36°C Süre: 1 min

9. **“Auto-Gain Optimisation Setup” (Otomatik Optimizasyon Sağlama Kurulumu)** iletişim kutusunu açmak için **“New Run Wizard” (Yeni Çalışma Sihirbazı)** iletişim kutusundaki **“Gain Optimisation” (Optimizasyon Sağlama)** düğmesini tıklatın. Yeşil kanalın **“Min Reading” (Minimum Değer)** aralığını **“5 Fl”** ve **“Max Reading” (Maksimum Değer)** aralığını **“10 Fl”** olarak ayarlayın, kabul edilebilir Tarama aralığını -10 ila 10 olarak belirleyin.
10. **“Perform Optimisation Before 1st Acquisition” (Optimizasyonu İlk Taramadan Önce Gerçekleştir)** onay kutusunu işaretleyin ve **“Auto-Gain Optimisation Setup” (Otomatik Optimizasyon Sağlama Kurulumu)** diyalog kutusunu kapatın.
11. Isıl döngüleme programını başlatın.
12. Analiz için **“Slope Correct” (Eğim Düzeltme)** ögesini seçin. Eşik değerini 0,03 olarak ayarlanmasını öneririz.

Protokol: Applied Biosystems 7500 Real-Time PCR Sisteminde qPCR, ABI PRISM 7900HT SDS ve LightCycler 480 cihazları

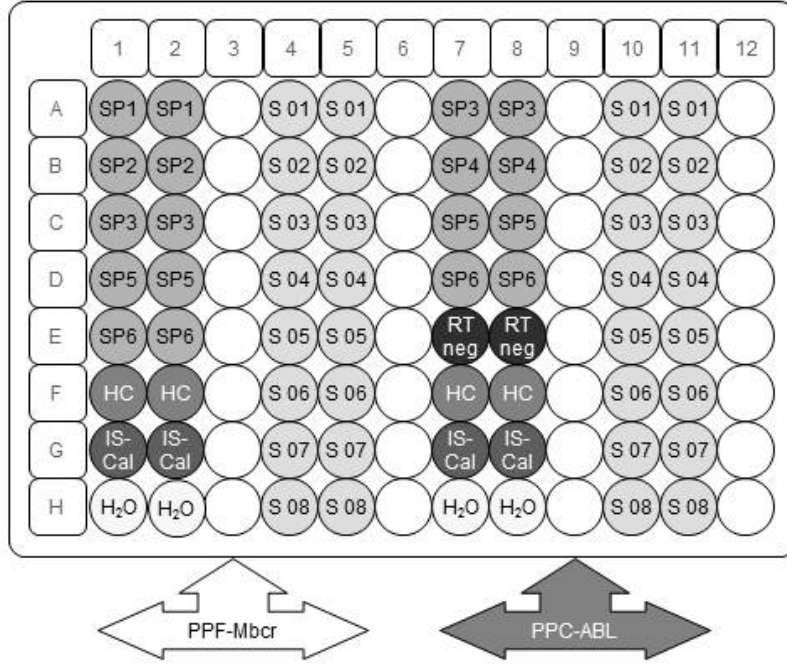
96 kuyucuklu plaka qPCR ekipmanını kullanarak Tablo 6'da gösterildiği gibi tüm ölçümleri ikili olarak yapmanızı öneririz. Bu kit aynı deneyde 3 kez 8 farklı cDNA örneği test etmek üzere tasarlanmıştır.

Tablo 6. 96 kuyulu plakalı qPCR ekipmanında reaksiyon sayısı

Örnekler	Reaksiyonlar
ABL primerleri ve prob karışımıyla (PPC-ABL) (32 reaksiyon)	
8 cDNA örneği	8 x 2 reaksiyon
1 cDNA yüksek pozitif kontrol	2 reaksiyon
1 cDNA IS-MMR Kalibratörü	2 reaksiyon
Tek plasmid standartları	2 x 4 reaksiyon (SP3, SP4, SP5 ve SP6 dilüsyon, her biri ikili olarak test edilir)
RT negatif kontrol	2 reaksiyon
Su kontrol	2 reaksiyon
BCR-ABL Mbc primerleri ve prob karışımıyla (PPF-Mbc) (32 reaksiyon)	
8 cDNA örneği	8 x 2 reaksiyon
1 cDNA yüksek pozitif kontrol	2 reaksiyon
1 cDNA IS-MMR Kalibratörü	2 reaksiyon
Tek plasmid standartları	2 x 5 reaksiyon (SP1, SP2, SP3, SP5 ve SP6, her biri ikili olarak test edilir)
Su kontrol	2 reaksiyon

Applied Biosystems, ABI PRISM ve LightCycler 480 aletlerinde örnek işleme

Standartların ve primerler ve prob karışımlarının kullanımını optimize etmek üzere aynı deneyde en az 8 cDNA örneği test edilmesini öneririz. Şekil 5'teki plaka şeması böyle bir deneyin örneğini vermektedir.



Şekil 5. *ipsogen BCR-ABL1 Mbcr IS-MMR Kitiyle bir deney için önerilen plaka kurulumu. SP1–SP6:* BCR-ABL Mbcr ve ABL standartları; **HC:** Yüksek cDNA pozitif kontrol; **IS-Cal:** IS-MMR kalibratör; **RTneg:** RT negatif kontrol; **S:** cDNA örneği; **H₂O:** su kontrol.

Applied Biosystems'da qPCR, ABI PRISM veya LightCycler 480 aletleri

Not: Tüm adımları buz üzerinde yapın.

İşlem

1. Tüm gerekli bileşenleri çözün ve buz üzerine koyun.
2. Standartlar, ROX, PPF-Mbcr ve PPC-ABL tüpleri vorteksleyin ve kısa süre santrifüje edin (sıvıyı tüpün altında toplamak amacıyla yaklaşık 10 saniye, 10.000 rpm).
3. Aşağıdaki qPCR karışımını işlenen örnek sayısına göre hazırlayın. 96 kuyulu plakalı qPCR aletini kullanarak tüm ölçümleri ikili olarak yapmanızı öneririz.

Tüm konsantrasyonlar son reaksiyon hacmi içindir.

Tablo 7 Applied Biosystems ve ABI PRISM aletlerinde 25 µl son reaksiyon hacmi elde etmek üzere hazırlanmış olarak bir reaktif karışımı hazırlanması

için pipetleme şemasını tanımlar. Tablo 8 LightCycler 480 aletinde 25 µl son reaksiyon hacmi elde etmek üzere hazırlanmış olarak bir reaktif karışımı hazırlanması için pipetleme şemasını tanımlar. Reaksiyon sayısına göre aynı primerler ve prob karışımı kullanılarak bir ön karışım hazırlanabilir (PPC-ABL veya PPF-Mbcr). Pipetleme hatasını dengelemek için ekstra hacimler dahil edilmiştir.

Tablo 7. Applied Biosystems ve ABI PRISM aletleri için qPCR karışımının hazırlanması

Bileşen	1 reaksiyon (µl)	ABL: 32+1 reaksiyon (µl)	BCR-ABL Mbcr: 32+1 reaksiyon (µl)	Son konsantrasyon
Ön karışım Ex Taq, 2x	12,5	412,5	412,5	1x
Primerler ve prob karışımı, 25x	1	33	33	1x
ROX I boya, 50x (ABI PRISM 7900HT) veya ROX II boya, 50x (Applied Biosystems 7500)	0,5	16,5	16,5	1x
Nükleaz içermeyen PCR sınıfı su	6	198	198	–
Örnek (adım 5'te eklenecek)	5	Her birinden 5	Her birinden 5	–
Toplam hacim	25	Her birinden 25	Her birinden 25	–

Table 8. LightCycler 480 için qPCR karışımı hazırlama

Bileşen	1 reaksiyon (μl)	ABL: 32+1 reaksiyon (μl)	BCR-ABL Mbc: 32+1 reaksiyon (μl)	Son konsantrasyon
Ön karışım Ex Taq, 2x	12,5	412,5	412,5	1x
Primerler ve prob karışımı, 25x	1	33	33	1x
Nükleaz içermeyen PCR sınıfı su	6,5	214,5	214,5	–
Örnek (adım 5'te eklenecek)	5	Her birinden 5	Her birinden 5	–
Toplam hacim	25	Her birinden 25	Her birinden 25	–

4. Kuyucuk başına 20 μ l qPCR ana karışımı verin.
5. Farklı bir lab alanında ve tahsis edilmiş ekipmanla, karşılık gelen kuyucuğa (toplam hacim 25 μ l) revers transkripsiyonda elde edilen (bakınız "Protokol: SuperScript III Revers Transkriptazı kullanılarak", sayfa 13) RT ürününden (cDNA, 200 ng RNA eşdeğeri) 5 μ l ekleyin.
6. Yavaşça, yukarı ve aşağı pipetleyerek karıştırın.
7. Plakayı kapatın ve kısa süre santrifüje edin (300 x g, yaklaşık 10 saniye).
8. Plakayı üretici önerilerine göre termal cycler'a koyun. Termal cycler'ı Tablo 9'da Applied Biosystems ve ABI PRISM aletleri için ve Tablo 10'da LightCycler 480 Aleti için belirtildiği şekilde termal cycling programıyla programlayın.

Tablo 9. Applied Biosystems ve ABI PRISM aletleri için sıcaklık profili

Analiz modu	Standart Eğri — Mutlak Kantifikasyon
Tutma 1	Sıcaklık: 95°C Süre: 10 saniye
Döngüleme	50 kez 5 saniye için 95°C FAM floresansı almayla 30 saniye için 60°C: Tek; söndürücü: TAMRA
Tutma 2	Sıcaklık: 36°C Süre: 1 dakika

Tablo 10. LightCycler 480 Aleti için Sıcaklık profili

Analiz modu	Mutlak Kantifikasyon ("Abs Quant")
Format saptama	Detection formats (Saptama formatları) penceresinde "Simple Probe" (Basit Prob) seçin
Tutma 1	Sıcaklık: 95°C Süre: 10 saniye
Döngüleme	50 kez 5 saniye için 95°C LC versiyon 01 için 483–533 nm, LC versiyon 02 için 465–510 nm'ye karşılık gelen FAM floresansı almayla 30 saniyede 60°C
Tutma 2	Sıcaklık: 36°C Süre: 1 dakika

- 9. Applied Biosystems 7500 ve ABI PRISM 7900HT SDS için adım 9a'yı izleyin. LightCycler 480 Aleti için adım 9b'yi izleyin.**
- 9a. Applied Biosystems ve ABI PRISM: Aletin analiz adımında 0,1'e ayarlı bir eşik öneriyoruz. Cycling programını Tablo 9'da belirtildiği şekilde başlatın.**
- 9b. LightCycler 480 Aleti: Zemin 2,0 ve eşik 2,0 olarak bir Uyum noktası analiz modu öneriyoruz. Termal cycling programını Tablo 10'da belirtildiği şekilde başlatın.**

Protokol: LightCycler 1.2, 1.5 ve 2.0 Aletlerinde qPCR

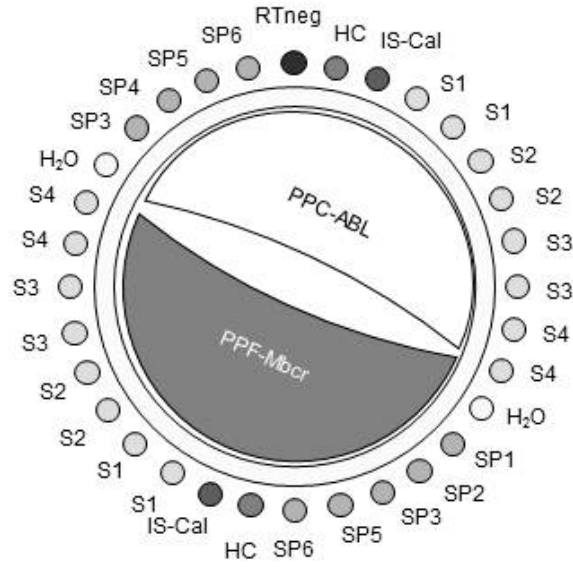
Kapiller aletler kullanarak Tablo 11'de gösterildiği gibi örnekleri ikili olarak ve kontrolleri sadece bir kez ölçmeyi öneriyoruz. Bu kit aynı deneyde 6 kez 4 farklı cDNA örneği test etmek üzere tasarlanmıştır.

Tablo 11. LightCycler 1.2, 1.5 ve 2.0 aletlerinde reaksiyon sayısı

Örnekler	Reaksiyonlar
ABL primerleri ve prob karışımıyla (PPC-ABL) (16 reaksiyon)	
4 cDNA örneği	4 x 2 reaksiyon
1 cDNA yüksek pozitif kontrol	1 reaksiyon
1 cDNA IS-MMR Kalibratörü	1 reaksiyon
Tek plasmid standartları	1 x 4 reaksiyon (SP3, SP4, SP5 ve SP6)
RT negatif kontrol	1 reaksiyon
Su kontrol	1 reaksiyon
BCR-ABL Mbc primerleri ve prob karışımıyla (PPF-Mbc) (16 reaksiyon)	
4 cDNA örneği	4 x 2 reaksiyon
1 cDNA yüksek pozitif kontrol	1 reaksiyon
1 cDNA IS-MMR Kalibratörü	1 reaksiyon
Tek plasmid standartları	1 x 5 reaksiyon (SP1, SP2, SP3, SP5 ve SP6)
Su kontrol	1 reaksiyon

LightCycler 1.2, 1.5 ve 2.0 Aletleri örnek işleme

Standartların ve primerler ve prob karışımlarının kullanımını optimize etmek üzere aynı deneyde en az 4 cDNA örneği test edilmesini öneririz. Şekil 6'daki kapiller şeması bir deneyin örneğini vermektedir.



Şekil 6. ipsogen BCR-ABL1 MbcR IS-MMR Kitiyle her deney için önerilen rotor kurulumu. SP1–SP6: BCR-ABL MbcR ve ABL standartları; **HC:** Yüksek cDNA pozitif kontrol; **IS-Cal:** IS-MMR kalibratör; **RTneg:** RT negatif kontrol; **S:** cDNA örneği; **H₂O:** su kontrol.

LightCycler 1.2, 1.5 ve 2.0 Aletlerinde qPCR

Not: Tüm adımları buz üzerinde yapın.

İşlem

1. Tüm gerekli bileşenleri çözün ve buz üzerine koyun.
2. Standartlar, PPF-MbcR ve PPC-ABL tüpleri vorteksleyin ve kısa süre santrifüje edin (sıvıyı tüpün altında toplamak amacıyla yaklaşık 10 saniye, 10.000 rpm).
3. Aşağıdaki qPCR karışımını işlenen örnek sayısına göre hazırlayın.
Tüm konsantrasyonlar son reaksiyon hacmi içindir.

Tablo 12 20 µl son reaksiyon hacmi elde etmek üzere hazırlanmış olarak bir reaktif karışımı hazırlanması için pipetleme şemasını tanımlar. Reaksiyon sayısına göre aynı primerler ve prob karışımı kullanılarak bir ön karışım hazırlanabilir (PPC-ABL veya PPF-MbcR). Pipetleme hatasını dengelemek için ekstra hacimler dahil edilmiştir.

Tablo 12. LightCycler 1.2, 1.5 ve 2.0 aletleri için qPCR karışımı hazırlama

Bileşen	1 reaksiyon (μl)	ABL: 16+1 reaksiyon (μl)	BCR-ABL Mbc: 16+1 reaksiyon (μl)	Son konsantrasyon
Ön karışım Ex Taq, 2x	10	170	170	1x
Primerler ve prob karışımı, 25x	0,8	13,6	13,6	1x
Nükleaz içermeyen PCR sınıfı su	4,2	71,4	71,4	–
Örnek (adım 5'te eklenecek)	5	Her birinden 5	Her birinden 5	–
Toplam hacim	20	Her birinden 20	Her birinden 20	–

- 4. Kapiller başına 15 μ l qPCR ana karışımı verin.**
- 5. Farklı bir lab alanında ve tahsis edilmiş ekipmanla, karşılık gelen kapillere (toplam hacim 20 μ l) revers transkripsiyonda elde edilen (bakınız "Protokol: SuperScript III Revers Transkriptazı kullanılarak", sayfa 13) RT ürününden (cDNA, 200 ng RNA eşdeğeri) 5 μ l ekleyin.**
- 6. Yavaşça, yukarı ve aşağı pipetleyerek karıştırın.**
- 7. Kapillerleri aparat ile sağlanan adaptörlere yerleştirin ve kısa süre santrifüje edin (700 x g, yaklaşık 10 saniye).**
- 8. Kapillerleri üreticinin önerilerine göre termal cycler'a yükleyin.**
- 9. LightCycler 1.2, 1.5 veya 2.0 Aletini Tablo 13'te belirtildiği şekilde termal cycling programıyla programlayın.**

Tablo 13. Sıcaklık profili

Analiz modu	Kantifikasyon
Tutma 1	Sıcaklık: 95°C Süre: 10 saniye Rampa: 20
Döngüleme	50 kez 5 saniye için 95°C; rampa: 20 30 saniye için 60°C; rampa: 20; FAM floresansı almayla: Tek
Tutma 2	Sıcaklık: 36°C Süre: 1 dakika Rampa: 20

10. LightCycler 1.2 ve 1.5 için adım 10a'yı izleyin. LightCycler 2.0 için adım 10b'yi izleyin.

10a. LightCycler 1.2 ve 1.5: F1/F2 ve "2nd derivative analysis" (2 derivatif analizi) modu önerilir. Termal cycling programını Tablo 13'te belirtildiği şekilde başlatın.

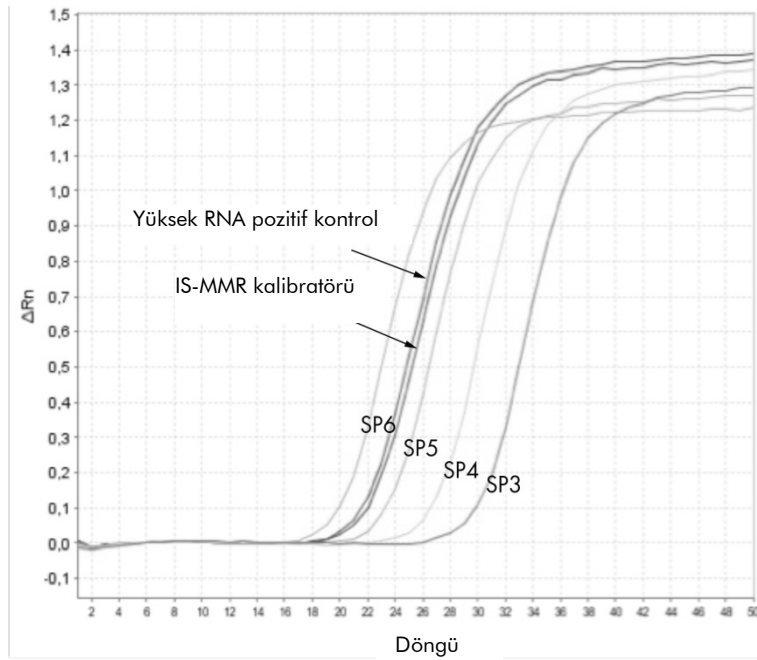
10b. LightCycler 2.0: Tekrar üretilebilir sonuçlar elde etmek üzere LightCycler 2.0 Yazılım versiyon 4.0 üzerinde Otomatik (F''maks) analizi kullanmanızı öneririz. Termal cycling programını Tablo 13'te belirtildiği şekilde başlatın.

Sonuçların Değerlendirilmesi

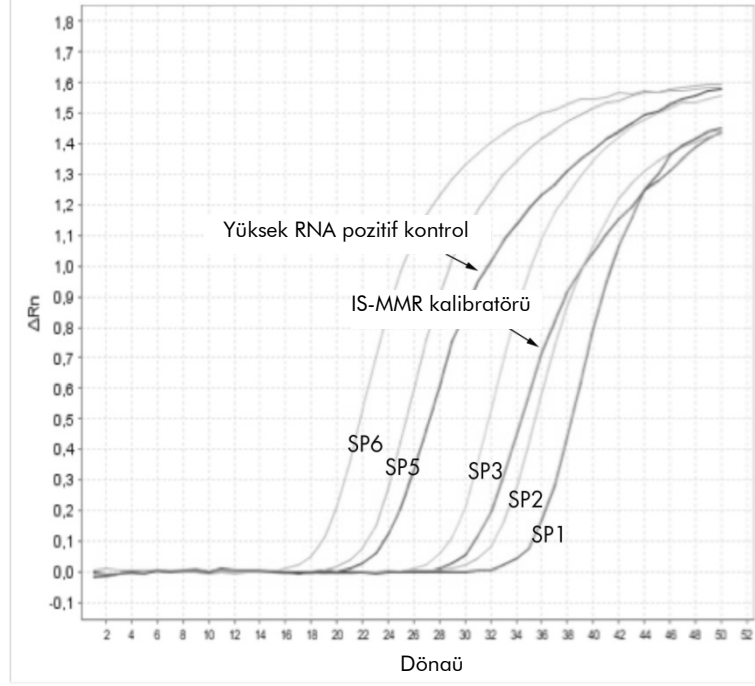
Veri analizi prensibi

TaqMan® teknolojisi kullanılarak, eşik üzerinde bir sinyal saptamak için gerekli PCR döngüsü sayısına eşik döngüsü (C_T) denir ve reaksiyon başında bulunan hedef miktarıyla doğrudan orantılıdır.

Bilinen sayıda molekülle standartlar kullanarak standart bir eğri oluşturulabilir ve test örneğinde bulunan kesin hedef miktarı belirlenebilir. *ipsogen* standart eğrileri plasmid tabanlıdır. Doğru standart eğrileri sağlamak üzere ABL için 4 standart dilüsyon ve MbcR için 5 standart dilüsyon kullanıyoruz. Kit ayrıca sonuçların uluslararası ölçeğe dönüştürülmesini mümkün kılan bir IS-MMR kalibratörü içerir. Şekil 7 ve 8 standartlar, IS-MMR Kalibratörü ve yüksek pozitif RNA kontrol ile *ipsogen* BCR-ABL1 MbcR IS-MMR Kitiyle elde edilen TaqMan amplifikasyon eğrilerine örnekler verir.



Şekil 7. Standart SP3, SP4, SP5 ve SP6 ile ABL saptanması. 10^3 , 10^4 , 10^5 ve 10^6 kopya/ 5μ l.



Şekil 8. Standart SP1, SP2, SP3, SP5 ve SP6 ile BCR-ABL Mbc saptanması. 10^1 , 10^2 , 10^3 , 10^5 , 10^6 kopya/5 μ l.

Standart eğriler ve kalite kriterleri ham veriler için geçerlidir

Replikatlar arasında tekrar üretilebilirlik

Replikatlar arasında C_T değerleri değişkenliği kopya sayısı değerlerinde dört kat değişikliğe karşılık gelecek şekilde <2 olmalıdır.

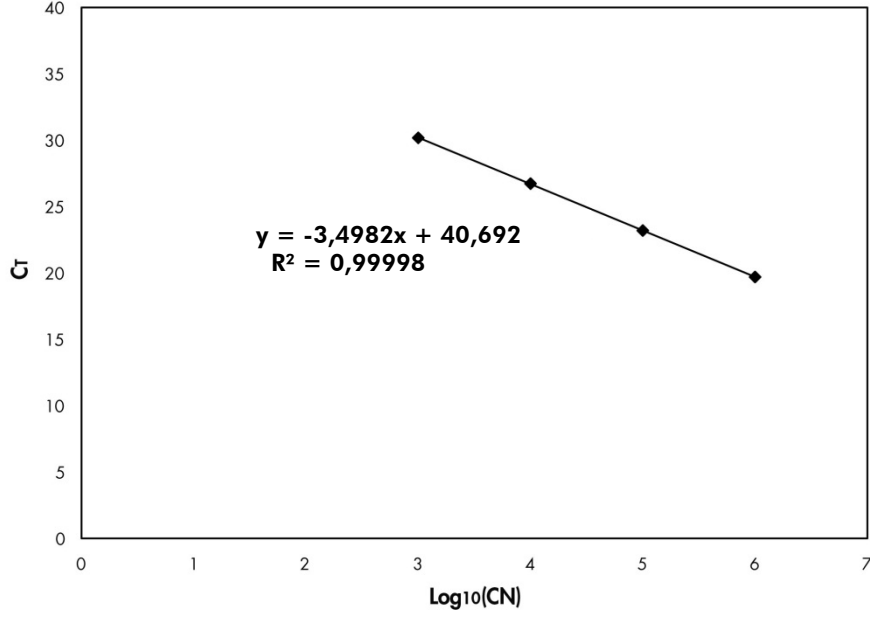
Replikatlar arasında C_T değerleri değişikliği replikatların ortalama C_T değeri <36 (7) ise genelde $<1,5$ 'tir.

Not: Her kullanıcı laboratuvarında kendi tekrar üretilebilirliğini ölçmelidir.

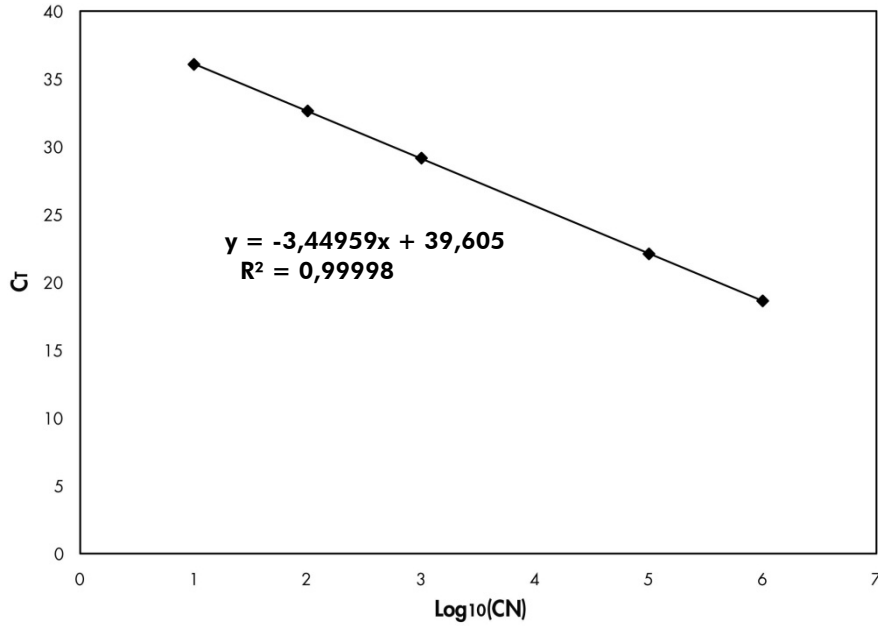
Standart eğriler

Ham veriler analiz için bir Excel® dosyasına yapıştırılabilir.

Her gen için (ABL ve BCR-ABL), plasmid standart dilüsyonlarından elde edilen ham C_T değerleri log kopya numarasına göre plotlanır (SP3, SP4, SP5 ve SP6 için 3, 4, 5 ve 6; SP1, SP2, SP3, SP5 ve SP6 için 1, 2, 3, 5 ve 6). Şekil 9 4 standart dilüsyonda hesaplanmış teorik ABL standart eğri örneği gösterir. Şekil 10 5 standart dilüsyonda hesaplanmış teorik BCR-ABL standart eğri örneği gösterir.



Şekil 9. ABL için 4 standart dilüsyondan hesaplanmış teorik standart eğri. Bir lineer regresyon eğrisi ($y = ax + b$) hesaplanır ve burada a çizginin eğimi ve b y-kesişimidir ve burası çizginin y eksenini geçtiği noktada y koordinatıdır. Belirlemenin katsayısı (R^2) ve denklem grafikte yazdırılır.



Şekil 10. BCR-ABL için 5 standart dilüsyondan hesaplanmış teorik standart eğri. Bir lineer regresyon eğrisi ($y = ax + b$) hesaplanır ve burada a çizginin eğimi ve b y-kesişimidir ve burası çizginin y eksenini geçtiği noktada y koordinatıdır. Belirlemenin katsayısı (R^2) ve denklem grafikte yazdırılır.

Standartlar on kat dilüsyon olduğundan eğrinin teorik eğimi $-3,3$ 'tür. $-3,0$ ile $-3,9$ arasında bir eğim $R^2 > 0,95$ olduğu sürece kabul edilebilir (7). Ancak hassas sonuçlar için $R^2 > 0,98$ istenir (3).

Not: SP1 standart dilüsyonu (BCR-ABL plasmid, 10 kopya) saptanıp BCR-ABL standart eğrisine dahil edilmelidir.

Tüm ABL değerlerinde kalite kontrol

Kötü RNA kalitesi veya qPCR adımları sırasında problemler düşük ABL kopya numaralarıyla sonuçlanır (ABL_{CN}). Optimum hassasiyet ABL_{CN} ≥ 10.000 kopya veren örneklerle elde edilir. Bu ABL_{CN} kriteri yüksek pozitif RNA kontrol ve IS-MMR Kalibratörü için de geçerlidir.

RT negatif kontrol ve su kontrolleri

PCR adımı (su kontrolü) ve revers transkripsiyon adımı (RT negatif kontrol) için şablon yok kontrolleri (NTC) hem ABL hem BCR-ABL Mbc_r için sıfır CN vermelidir. Bu NTC'ler için pozitif bir sonuç revers transkripsiyon ve/veya qPCR sırasında çapraz kontaminasyona işaret eder.

Normalize kopya numarası (NCN)

ABL standart eğri denklemi bilinmeyen örnekler için ham C_T verilerini (PPC-ABL ile elde edilen) ABL kopya numaralarına (ABL_{CN}) dönüştürmek üzere kullanılmalıdır.

BCR-ABL standart eğri denklemi bilinmeyen örnekler için ham C_T verilerini (PPF-Mbc_r ile elde edilen) BCR-ABL kopya numaralarına (BCR-ABL Mbc_r_{CN}) dönüştürmek üzere kullanılmalıdır.

Bu CN değerlerinin oranı normalize kopya numarasını (NCN) verir:

$$NCN = \frac{BCR-ABL Mbc_{rCN}}{ABL_{CN}} \times 100$$

Yüksek pozitif RNA kontrol (NCN_{HC}), IS-MMR kalibratör (NCN_{cal}) ve her örnek (NCN_{sample}) için NCN sonucunu hesaplayın.

Yüksek pozitif RNA kontrol ve IS-MMR Kalibratörü

Bu kontroller transkript kantifikasyonu sırasında ABL ve BCR-ABL Mbc_r revers transkripsiyon ve amplifikasyon adımlarının izlenmesini mümkün kılar.

NCN_{cal} sonucunda kalite kontrol

Not: Elde edilen NCN sonucu IS-MMR-Kalibratörü için *ipsogen* BCR-ABL Mbc_r IS-MMR Kitiyle doğrulanmış reaktifler ve aletlerle kombinasyon halinde test edilmiş olarak (bakınız "Sağlanan Materyaller", sayfa 9 ve "Gereken ama Sağlanmayan Materyal", sayfa 10) 0,05–0,3 aralığında olmalıdır. Aksi halde, NCN değerleri Uluslararası Ölçeğe dönüştürülemez. Ayrıca, yüksek pozitif RNA kontrol saptanmazsa tüm deney reddedilir.

IS dönüştürme ve MMR bildirim

Not: Yorumlamadan önce IS-MMR kalibratör tüp etiketinde belirtilen değer veya kitle sağlanan analiz sertifikasına başvurun.

Uluslararası ölçekte normalize kopya numarasını hesaplamak için (IS-NCN_{örnek}) deneysel IS-MMR kalibratörü NCN sonucunu (NCN_{cal}) ve analiz sertifikasyonda belirtilen tahsis edilmiş değerini (IS-Cal değeri) kullanın.

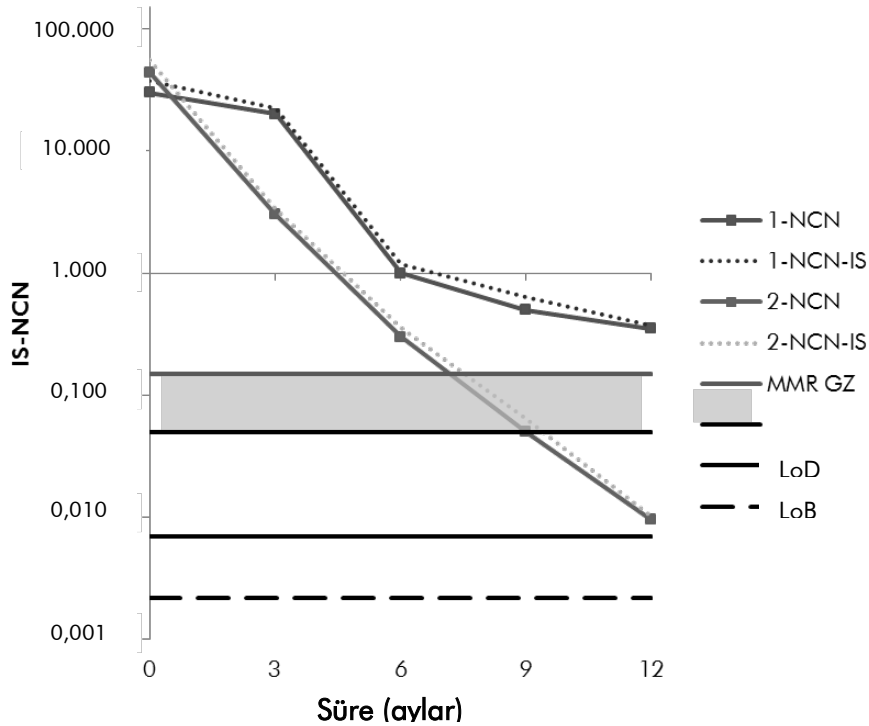
$$IS-NCN_{\text{örnek}} = \frac{NCN_{\text{örnek}} \times IS-Cal \text{ değeri}}{NCN_{\text{cal}}}$$

Her örnek için MMR durumunu şu kriterlere göre belirleyin.

- **IS-NCN_{örnek} ≤ 0,05:** Majör moleküler cevap
- **0,05 < IS-NCN_{örnek} < 0,15:** MMR kesme noktası etrafında gri bölge, kesin olmayan sonuç
- **IS-NCN_{örnek} ≥ 0,15:** Majör moleküler cevap yok

IS-NCN_{HC} sonucu (yüksek pozitif RNA kontrol için uluslararası ölçekte NCN) majör moleküler cevap vermemelidir.

Şekil 11 NCN ve IS-NCN sonuçları kullanarak hasta izlemeye bir örnek verir.



Şekil 11. ipsogen BCR-ABL1 Mbcr IS-MMR Kitiyle hasta MMR durumu için izleme eğrileri NCN: normalize kopya numarası; NCN-IS: normalize kopya numarası uluslararası ölçek; MMR GZ: MMR gri bölge (GZ) kesin olmayan sonuç; LoD: saptama limiti; LoB: arka plan düzeyi.

Kalite kriterleri özeti

Tablo 14 çeşitli kalite kriterleri ve ilgili değerler veya sonuçları özetler.

Tablo 14. Kalite kriterleri özeti

Kriterler	Kabul edilebilir değerler/sonuçlar
Replikatlar arasında C_T değerleri değişiklikleri	≤ 2 C_T ortalama C_T değeri > 36 ise $\leq 1,5$ C_T ortalama C_T değeri ≤ 36 ise
Standart eğriler için eğim	-3,0 ile -3,9 arasında
Standart eğriler için R^2	En az $> 0,95$ eğer $> 0,98$ ise daha iyi
SP1 standart dilüsyon (BCR-ABL 10 kopya plasmid)	Saptanmalı ve standart eğriye dahil edilmelidir
Hasta örnekleri, yüksek pozitif RNA kontrol ve IS-MMR-Kalibratör için ABL_{CN} değeri kalite kontrol	$ABL_{CN} > 10.000$ kopya ABL, optimum hassasiyete ulaşmak için
PCR (su) ve revers transkripsiyon (RT negatif) kontrolleri	Her $ABL_{CN} = 0$ ve $Mbcr_{CN} = 0$ için
IS-MMR Kalibratörü ile elde edilen NCN (NCN_{cal})	0,05–0,3 aralığında olmalıdır
Yüksek pozitif RNA kontrol	Saptanmalıdır
Yüksek pozitif RNA kontrol için elde edilen uluslararası ölçeğe dönüştürülmüş NCN ($IS-NCN_{HC}$)	Durum: Majör moleküler cevap yok

Arıza Giderme

Daha fazla bilgi için Teknik Destek Merkezimizde Sık Sorulan Sorular sayfasına bakınız: www.qiagen.com/FAQ/FAQList.aspx. QIAGEN Teknik Servisindeki bilim insanları bu el kitabındaki bilgiler ve protokol veya tahlil ve örnek teknolojileri ile ilgili herhangi bir sorunuzu cevaplamaktan daima mutlu olacaktır (irtibat bilgisi için bakınız "İrtibat Bilgisi", sayfa 42).

Kalite Kontrol

QIAGEN ISO sertifikalı Kalite Yönetim Sistemi uyarınca, *ipsogen* BCR-ABL1 MbcR IS-MMR Kitinin her bir lotu tutarlı ürün kalitesi sağlamak için önceden belirlenmiş özelliklere göre test edilir. Analiz sertifikaları talep üzerine www.qiagen.com/support/ adresinde alınabilir.

Sınırlamalar

Kullanıcılar bu cihazın kullanılmasından önce bu teknoloji konusunda eğitimli ve aşina olmalıdır.

Oluşan herhangi bir diagnostik sonuç diğer klinik veya laboratuvar bulgularıyla birlikte yorumlanmalıdır. Laboratuvarlarında QIAGEN performans çalışmalarının kapsamında olmadan kullanılan herhangi bir işlem için sistem performansını doğrulamak kullanıcının sorumluluğundadır.

Tüm bileşenlerin kutu ve etiketlerinde basılı son kullanma tarihlerine dikkat edilmelidir. Son kullanma tarihi geçmiş bileşenleri kullanmayın.

Not: Bu kit "Europe Against Cancer" (EAC) çalışmalarına göre tasarlanmıştır (8, 9) ve güncellenmiş uluslararası önerilerle uyumludur. Kit uluslararası ölçüğe standardize edilmiş ve NCN sonuçlarını uluslararası ölçüğe dönüştürüp MMR (majör moleküler cevap) durumunun bildirilmesini sağlayan bir IS-MMR Kalibratörü kullanır.

Her IS-MMR Kalibratörü lotunun NIBSC DSÖ sertifikasyonlu primer referans materyali (RQ-PCR (1st I.S.) ile BCR-ABL translokasyonunun kantifikasyonu için Uluslararası Genetik Referans Paneli (1. I.S.) ref. 09/138) karşı kalibrasyondan doğrudan elde edilmiş bir tahsis edilmiş değeri vardır.

IS-MMR Kalibratörünün tahsis edilmiş değerini belirten bir analiz sertifikası her kitle sağlanır.

Kit bu el kitabında verilen talimat izlenerek, onaylanmış reaktifler ve aletlerle kombinasyon halinde kullanılmalıdır (bakınız "Gereken ama Sağlanmayan Materyal", sayfa 10). Bu ürünün etiket dışı herhangi bir kullanımı ve/veya bileşenlerin modifikasyonu QIAGEN'in yükümlülüğünü ortadan kaldırır.

Performans Özellikleri

Not: Performans özellikleri Applied Biosystems 7500 Real-Time PCR Sisteminde *ipsogen* BCR-ABL1 MbcR IS-MMR Kiti ve doğrulanmış ek reaktiflerle (bakınız "Gereken ama Sağlanmayan Materyal", sayfa 10) kombinasyon halinde belirlenmiştir.

Kör limiti ve saptama limiti

Kör limiti (LoB) ve saptama limiti (LoD) CLSI/NCCLS EP17-A kılavuz ilkeleri kullanılarak belirlenmiştir.

Zemin düzeyi (LoB) sağlıklı donörlerden negatif örneklerde belirlenmiştir (11 örnek, 69 ölçüm) ve 0,0022 BCR-ABL Mbc NCN'ye eşit olduğu bulunmuştur.

Saptama limiti (LoD veya analitik hassasiyet) bilinen düşük pozitif örneklerde belirlenmiştir (n = 8, 74 ölçüm) ve 0,0069 BCR-ABL Mbc NCN'ye eşit olduğu bulunmuştur.

- **NCN ≤ LoB:** BCR-ABL Mbc saptanmadı
- **LoB < NCN < LoD:** BCR-ABL Mbc saptandı ama kantifiye edilmedi
- **NCN ≥ LoD:** BCR-ABL Mbc kantifiye edildi

Linearite

Linearite CLSI/NCCLS EP6-A kılavuz ilkelerine göre belirlenmiştir.

Çalışma hücre hatlarından ekstrakte edilmiş pozitif ve negatif RNA karışımlarında yapılmıştır. On bir farklı düzey üçlü olarak test edilmiştir. Bu örneklerde elde edilen sonuçlar *ipsogen* BCR-ABL Mbc IS-MMR testinin 0,003 ile 65 BCR-ABL Mbc NCN aralığında lineer olduğunu göstermektedir.

Girdiler

Çalışma için çeşitli NCN BCR-ABL Mbc düzeylerine sahip beş farklı RNA kullanılmıştır. NCN sonuçlarına girdi etkisini değerlendirmek için farklı RNA ve cDNA miktarları test edilmiştir. Sonuçlar RNA girdi değişkenliğinin NCN sonuçları üzerinde sınırlı bir etkisi olduğunu ve daha fazla ve daha az materyal kullanılırsa cDNA girdisinin daha hassas bir faktör olduğunu göstermiştir. Bunun sonucunda testin çalışılması için 1 µg RNA ve 5 µl cDNA şeklinde girdi önerilir.

Kesinlik

Kesinlik CLSI/NCCLS EP5-A2 kılavuz ilkelerine göre belirlenmiştir.

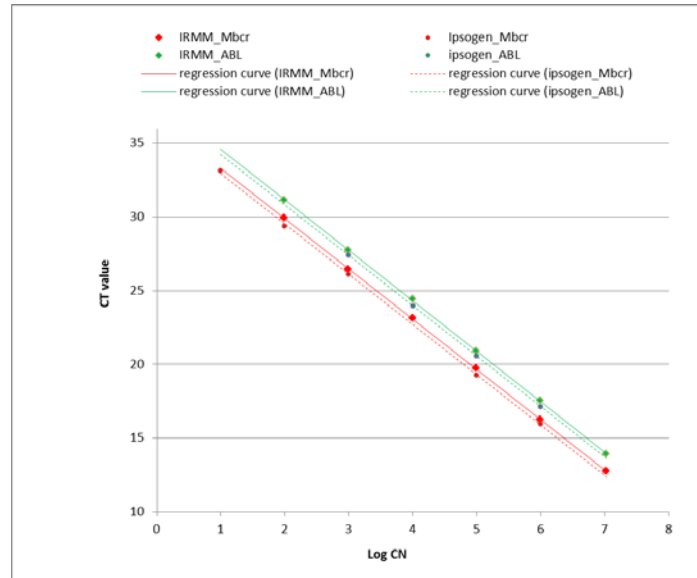
Kesinlik çalışması ikili olarak 42 kez test edilen (n = 84) 13 farklı örnekte yapılmıştır. Bu örnekler hasta örneklerinde MMR değerinde ve üzerinde farklı BCR-ABL Mbc ekspresyonu düzeyini temsil etmiştir. MMR değeri etrafında global varyasyon katsayısı %25'e eşit bulunmuştur.

Uyumluluk çalışması: ERM-AD623 BCR-ABL1 tekli plazmid (IRMM) ile ipsogen tekli plazmid (QIAGEN) standartlarının karşılaştırması

KML'de BCR-ABL1 Mbcrl'nin moleküler yanıtı ile ilgili en yakın zamanlı çalışma tanımları, ELN/EUTOS Moleküler Takip Yürütme Kurulu tarafından yapılmıştır ve ERM-AD623 BCR-ABL1 plazmid kullanımı önerilmektedir (IRMM, Belçika): Cross, N.C., et al. Laboratory recommendations for scoring deep molecular responses following treatment for chronic myeloid leukemia (2015) Leukemia. **29**, 999.

Bu öneriye uygun olarak QIAGEN, *ipsogen* BCR-ABL1 Mbcrl IS-MMR Kiti (24) CE (kat. no. 670723) içinde kullanılan *ipsogen* çok hedefli tekli plazmid ile ERM-AD623 BCR-ABL1 plazmidini karşılaştırmıştır (IRMM).

Karşılaştırma; *ipsogen* kitlerinde ve NIBSC kaynaklı onaylı referans materyalde yer alan kontrol örnekleri üzerindeki BCR-ABL1 Mbcrl/ABL1 normalize kopya sayısı oranı (NCN) baz alınarak yapılmıştır ve iki standardın dilüsyonları (*ipsogen* veya ERM-AD623 BCR-ABL1) kullanılarak değerlendirilmiştir: 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.

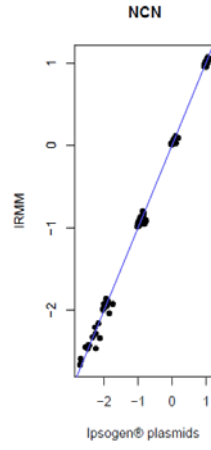


regresyon eğrisi

C_T değeri

Log CN

Şekil 12. *ipsogen* ve ERM-AD623 BCR-ABL1 plazmid standart eğrileri paraleldir.



NCN

IRMM

ipsogen® plazmidleri

ipsogen BCR-ABL1 Mbcr IS-MMR Kiti.

Şekil 13. ERM-AD623 BCR-ABL1 ile *ipsogen* NCN değerlerinin karşılaştırması.

QIAGEN araştırması, istatistiksel bir fark olmadığı sonucuna varmıştır: ERM-AD623 BCR-ABL1 tekli plazmid ve *ipsogen* tekli plazmid standartları eşit sonuçlar vermektedir.

Referanslar

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.

Semboller

Aşağıdaki semboller paketler ve etiketlerde belirebilir:



<N>

<N> reaksiyon için yeterli reaktif içerir



Son Kullanma Tarihi



İn vitro diagnostik tıbbi cihaz



Katalog numarası



Lot numarası



Materyal numarası



Küresel Ticaret Parça Numarası



Sıcaklık sınırlaması



Üretici



Kullanma talimatına başvurun

İrtibat Bilgisi

Teknik yardım ve daha fazla bilgi için lütfen www.qiagen.com/Support adresindeki Teknik Destek Merkezimize gidin, 00800-22-44-6000 numarasından arayın veya QIAGEN Teknik Servis Bölümlerinden veya yerel distribütörlerden birini arayın (arka kapağa bakınız veya www.qiagen.com adresine gidiniz).

Sipariş Bilgisi

Ürün	İçindekiler	Kat. no.
<i>ipsogen</i> BCR-ABL1 MbcR IS-MMR Kit (24)	24 reaksiyon için: MbcR ve ABL Tek Plasmid Standartlar, Yüksek RNA Pozitif Kontrol, IS-MMR Kalibratör, Primerler ve Prob Karışımı ABL, Primerler ve Prob Karışımı BCR-ABL MbcR Füzyon Geni	670723
Rotor-Gene Q MDx — Klinik uygulamalarda IVD ile doğrulanmış gerçek zamanlı PCR analizi için		
Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM Platform	5 kanallı (yeşil, sarı, turuncu, kırmızı, kırmızı) ve HRM kanallı gerçek zamanlı PCR cyclus ve Yüksek Çözünürlüklü Melt analizörü, dizüstü bilgisayar, yazılım, aksesuarlar, malzeme ve işçilik için 1 yıl garanti; kurulum ve eğitim dahil değildir	9002032
Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM System	5 kanallı (yeşil, sarı, turuncu, kırmızı, kırmızı) ve HRM kanallı gerçek zamanlı PCR cyclus ve Yüksek Çözünürlüklü Melt analizörü, dizüstü bilgisayar, yazılım, aksesuarlar, malzeme ve işçilik için 1 yıl garanti; kurulum ve eğitim	9002033
<i>ipsogen</i> RT Kit — revers transkripsiyon için		
<i>ipsogen</i> RT Kit	Revers Transkriptaz, Rastgele Primer, DTT, dNTP, RNase İnhibitörü, RT Tamponu	679923
RNeasy Kitleri — total RNA saflaştırma için		
RNeasy Midi Kit (50)	50 RNA hazırlama için: 50 RNeasy Midi Spin Sütunu, Toplama Tüpleri (15 ml), RNase-içermeyen Reaktifler ve Tamponlar	75144

Güncel lisanslama bilgisi ve ürüne spesifik red beyanları için ilgili QIAGEN kiti el kitabı veya kullanıcı el kitabına bakınız. QIAGEN kiti el kitapları ve kullanıcı el kitapları www.qiagen.com adresinde bulunabilir veya QIAGEN Teknik Servisi veya yerel distribütörünüzden istenebilir.

Bu ürünün in vitro diagnostik kullanım için olması amaçlanmıştır. *ipsogen* ürünleri önceden QIAGEN'in yazılı onayı olmadan tekrar satılamaz, tekrar satış için modifiye edilemez veya ticari ürünler üretmek için kullanılamaz.

Bu belgedeki bilgi haber verilmeden değiştirilebilir. QIAGEN bu belgede görülebilen herhangi bir hata için sorumluluk almaz. Bu belgenin yayın tarihinde eksiksiz ve doğru olduğuna inanılmaktadır. QIAGEN, hiçbir şekilde bu belgenin kullanımından doğrudan veya dolaylı olarak kaynaklanan her türlü özel, arızı veya çoklu veya sonuçsal kayıplardan sorumlu değildir.

ipsogen ürünlerinin belirtilen spesifikasyonları karşılayacağı garanti edilir. Ürünler garanti edildiği şekilde performans göstermezse QIAGEN'in tek yükümlülüğü ve müşterinin tek çözümü ürünlerin ücretsiz değiştirilmesiyle sınırlıdır.

Ticari markalar: QIAGEN®, *ipsogen*®, RNeasy®, Rotor-Gene® (QIAGEN Group); ABI PRISM®, Applied Biosystems®, FAM®, RNaseOUT®, ROX®, SuperScript®, SYBR®, TAMRA® (Life Technologies Corporation); Agilent®, Bioanalyzer® (Agilent Technologies, Inc.); Excel® (Microsoft Corporation); LightCycler®, TaqMan® (Roche Group); Premix Ex Taq® (Takara Bio, Inc.); Herculase® (Stratagene, Inc.).

Sınırlı Lisans Sözleşmesi

Bu ürünün kullanımı *ipsogen* BCR-ABL1 Mbc IS-MMR Kitini satın alan veya kullanıcının şu şartları kabul ettiğini belirler:

1. *ipsogen* BCR-ABL1 Mbc IS-MMR Kiti sadece *ipsogen* BCR-ABL1 Mbc IS-MMR Kit El Kitabı uyarınca ve sadece bu Kite bulunan bileşenlerle kullanılabilir. QIAGEN fikri mülkiyeti altında bu Kite sağlanan bileşenleri bu Kite sağlanmayan herhangi bir bileşenle, *ipsogen* BCR-ABL1 Mbc IS-MMR Kiti El Kitabı ve www.qiagen.com adresinde bulunan ek protokoller içinde tanımlanan durumlar haricinde kullanma veya birlikte işleme sokma açısından bir lisans vermez.
2. Açık olarak ifade edilmiş lisanslar dışında, QIAGEN bu Kit ve/veya kullanımının üçüncü tarafların haklarını ihlal etmeyeceği konusunda herhangi bir garanti vermez.
3. Bu Kit ve bileşenleri sadece tek kullanım için lisanslıdır ve tekrar kullanılamaz, tekrar işlemde geçirilemez veya tekrar satılamaz.
4. QIAGEN spesifik olarak açık olarak belirtilen dışında ister açık ister zımnî olsun her türlü başka lisansı reddeder.
5. Kitin satın alanı ve kullanıcısı yukarıda yasaklanan işlemlerden herhangi birine yol açabilecek veya bunları kolaylaştırabilecek herhangi bir adım atmamayı ve başkasının da atmasına izin vermemeyi kabul eder. QIAGEN bu Sınırlı Lisans Sözleşmesinin yasaklarını herhangi bir Mahkemede yürürlüğe sokabilir ve Avukat ücretleri dışında tüm araştırma ve mahkeme masraflarını bu Sınırlı Lisans Sözleşmesini veya Kit ve/veya bileşenleriyle ilgili herhangi bir fikri mülkiyet haklarını yürürlüğe sokmak için yapılan bir davada geri alacaktır.

Güncellenmiş lisans şartları için bakınız www.qiagen.com.

HB-1362-002 © 2013–2015 QIAGEN, tüm hakları saklıdır.

www.qiagen.com

