

# Εγχειρίδιο ΚΙΤ *ipsogen*<sup>®</sup> BCR-ABL1 Mbc



Έκδοση 1

IVD

Ποσοτική in vitro διάγνωση

Για χρήση με τα όργανα Rotor-Gene<sup>®</sup> Q, ABI PRISM<sup>®</sup>,  
LightCycler<sup>®</sup> και SmartCycler<sup>®</sup>



REF

670123



QIAGEN GmbH, QIAGEN Strasse 1, 40724 Hilden,  
Γερμανία

R2

MAT

1072507EL



## **QIAGEN Sample & Assay Technologies**

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

### **Η QIAGEN θέτει πρότυπα:**

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

Αποστολή μας είναι η διασφάλιση των δικών σας επιτυχιών και επιτευγμάτων. Για περισσότερες πληροφορίες, επισκεφθείτε μας στη διεύθυνση [www.qiagen.com](http://www.qiagen.com).

## **Περιεχόμενα**

<b>Προβλεπόμενη χρήση</b>	<b>4</b>
<b>Περίληψη και ερμηνεία</b>	<b>4</b>
Παρακολούθηση της νόσου	4
<b>Αρχές της διαδικασίας</b>	<b>8</b>
<b>Υλικά που παρέχονται</b>	<b>11</b>
Περιεχόμενα του kit	11
<b>Απαιτούμενα υλικά που δεν παρέχονται</b>	<b>12</b>
<b>Προειδοποιήσεις και προφυλάξεις</b>	<b>13</b>
Γενικές προφυλάξεις	14
<b>Φύλαξη και χειρισμός αντιδραστηρίων</b>	<b>14</b>
<b>Διαδικασία</b>	<b>16</b>
Προετοιμασία RNA δείγματος	16
Πρωτόκολλα	
■ Συνιστώμενη τυποποιημένη ανάστροφη μεταγραφή κατά EAC	16
■ qPCR σε όργανα Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM ή RotorGene Q 5plex HRM με στροφέα 72 σωληναρίων	19
■ qPCR σε ABI PRISM 7000, 7700 και 7900HT SDS και σε όργανο LightCycler 480	23
■ qPCR σε όργανα LightCycler 1.2 και 2.0	28
■ qPCR στο όργανο SmartCycler	32
<b>Ερμηνεία των αποτελεσμάτων</b>	<b>36</b>
Αρχή της ανάλυσης δεδομένων	36
Αποτελέσματα	37
Οδηγός αντιμετώπισης προβλημάτων	39
<b>Ποιοτικός έλεγχος</b>	<b>43</b>
<b>Περιορισμοί</b>	<b>43</b>
<b>Χαρακτηριστικά απόδοσης</b>	<b>43</b>
Μη κλινικές μελέτες	43
Κλινικές μελέτες	46
<b>Βιβλιογραφία</b>	<b>49</b>
<b>Σύμβολα</b>	<b>50</b>
<b>Πληροφορίες επικοινωνίας</b>	<b>51</b>
<b>Πληροφορίες παραγγελίας</b>	<b>52</b>

## Προβλεπόμενη χρήση

Το kit *ipsogen* BCR-ABL1 Mbcf προορίζεται για την ποσοτικοποίηση των μεταγραφημάτων BCR-ABL p210 b2a2 ή b3a2 σε δείγματα μυελού των οστών ή περιφερικού αίματος ασθενών με οξεία λεμφοβλαστική λευχαιμία (ΟΛΛ, ALL) ή χρόνια μυελογενή λευχαιμία (ΧΜΛ, CML) που έχουν προηγουμένως διαγνωστεί με ένα συμβάν γονιδίου σύντηξης (FG) BCR-ABL Mbcf. Η δοκιμασία προορίζεται για την αξιολόγηση του επιπέδου μοριακής ανταπόκρισης και τα αποτελέσματα μπορούν να χρησιμοποιηθούν για παρακολούθηση ελάχιστης υπολειμματικής νόσου.

## Περίληψη και ερμηνεία

Η ΧΜΛ ανήκει στην ομάδα των μυελοϋπερπλαστικών νεοπλασμάτων και χαρακτηρίζεται στο >90% των περιπτώσεων από την παρουσία του χρωμοσώματος Φιλαδέλφειας (Ph CHR5).

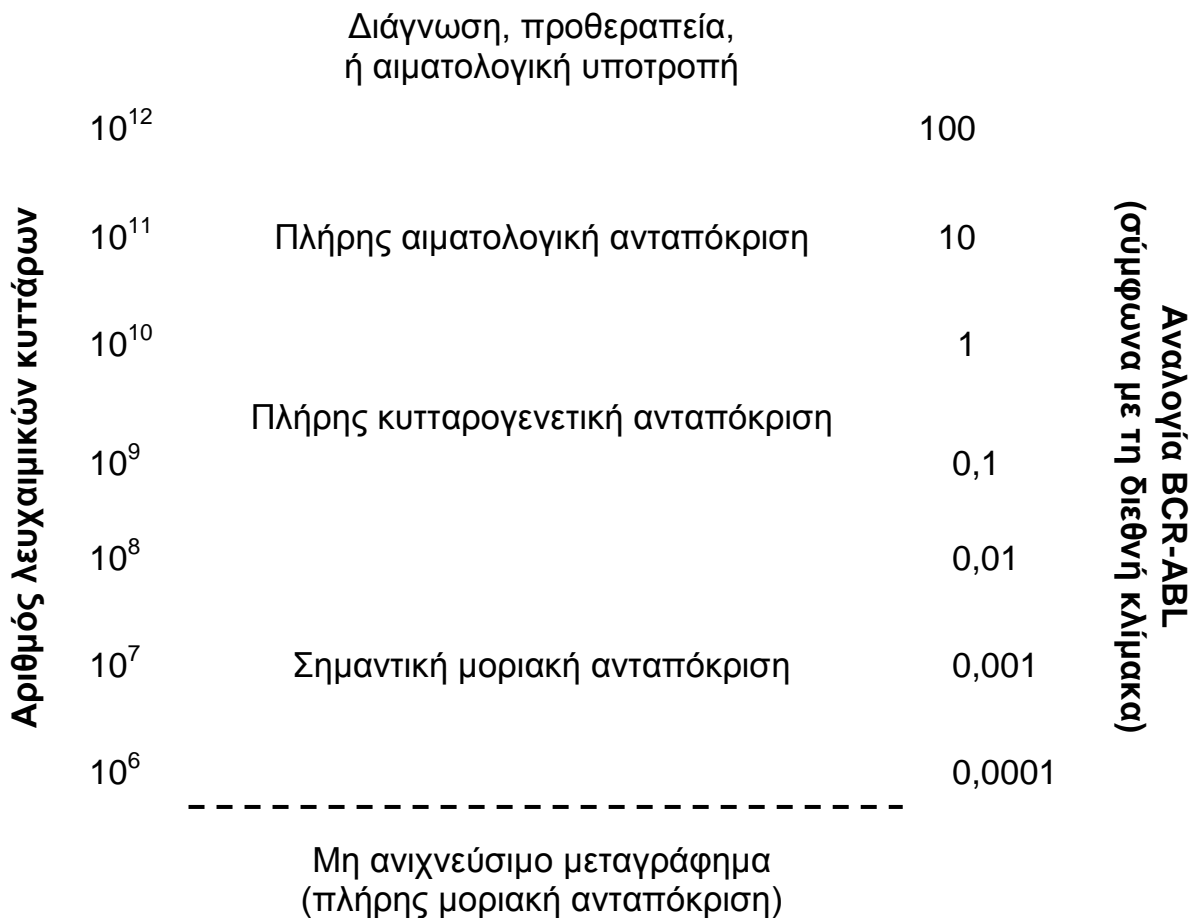
Αυτό το χρωμόσωμα είναι το προϊόν μιας αμοιβαίας μετατόπισης μεταξύ των μακρών σκελών των χρωμοσωμάτων 9 και 22, t(9;22), με το BCR (breakpoint cluster region) να βρίσκεται στο χρωμόσωμα 22 και το ογκογονίδιο c-ABL να μεταφέρεται από το χρωμόσωμα 9. Το αντίστοιχο γονίδιο σύντηξης, BCR-ABL, μεταγράφεται σε mRNA 8,5 kb, με 2 παραλλαγές σύνδεσης b2a2 (40% των περιπτώσεων) και b3a2 (55% των περιπτώσεων). Κωδικοποιεί μια χιμαιρική πρωτεΐνη, την p210, με αυξημένη δραστηριότητα τυροσινικής κινάσης. Τα μεταγραφήματα b2a3 και b3a3 αντιπροσωπεύουν λιγότερο από 5% των περιπτώσεων. Ένα χρωμόσωμα Ph μπορεί επίσης να ανιχνευθεί στο 35% των ενηλίκων ασθενών με ΟΛΛ.

Η ετήσια επίπτωση της ΧΜΛ είναι περίπου 1–2 ανά 100.000, και η ΧΜΛ αντιπροσωπεύει το 20% των λευχαιμιών των ενηλίκων. Χαρακτηρίζεται κλινικά από μια περίσσεια μυελοειδών κυττάρων που διαφοροποιούνται και λειτουργούν φυσιολογικά. Οι ασθενείς με ΧΜΛ θα διαγνωστούν στο 90–95% των περιπτώσεων στη χρόνια ή σταθερή φάση της νόσου. Ιστορικά, εντός 4 έως 6 ετών κατά μέσο όρο, οι ασθενείς εισέρχονταν σε μια επιταχυνόμενη φάση που οδηγούσε σε βλαστική κρίση και οξεία λευχαιμία, η οποία είναι πάντοτε θανατηφόρος. Η έλευση της ιματινίμπης και, πιο πρόσφατα, των αναστολέων της τυροσινικής κινάσης (TKI) δεύτερης γενιάς, άλλαξαν δραματικά τη φυσική πορεία της νόσου: οι περισσότεροι ασθενείς τώρα παραμένουν σε ύφεση και χρήζουν μακροχρόνιας παρακολούθησης και ελέγχου της νόσου.

## Παρακολούθηση της νόσου

Μέχρι σήμερα, ο στόχος της θεραπείας της ΧΜΛ είναι επίτευξη 100% επιβίωσης και αρνητικότητα στο χρωμόσωμα Ph. Η παρακολούθηση της νόσου αποτελεί επομένως ένα ουσιαστικό εργαλείο για την αξιολόγηση της ανταπόκρισης στη θεραπεία και την ανίχνευση πρώιμης υποτροπής για κάθε ασθενή ξεχωριστά. Κατά τη θεραπεία με TKI, οι ασθενείς τυπικά σημειώνουν

πρόοδο από αιματολογική σε κυτταρογενετική και στη συνέχεια μοριακή ύφεση, που αντιστοιχεί σε μειωμένους αριθμούς λευχαιμικών κυττάρων και μεταγραφημάτων BCR-ABL, όπως περιγράφεται λεπτομερώς στην Εικόνα 1 παρακάτω.



**Εικόνα 1. Προσαρμογή από την παραπομπή 1.**

Η τυπική μέθοδος για την εκτίμηση του καρκινικού φορτίου σε ασθενείς με ΧΜΛ είναι συμβατική κυτταρογενετική ανάλυση (G-banding) σε μεταφάσεις του μυελού των οστών (ΜΟ). Η κυτταρογενετική ανταπόκριση αξιολογείται σε τουλάχιστον 20 μεταφάσεις του μυελού. Το επίπεδο της κυτταρογενετικής ανταπόκρισης εκτιμάται με βάση το ποσοστό των θετικών για χρωμόσωμα Ph μεταφάσεων (βλ. Πίνακα 1, παραπομπή 2). Ωστόσο, αυτή η αξιολόγηση εξαρτάται από τις εργαστηριακές αποδόσεις και έχει χαμηλή ευαισθησία, στο 5%, όταν αναλύονται 20 μεταφάσεις.

Η ποσοτική αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (qPCR) πραγματικού χρόνου που ποσοτικοποιεί το BCR-ABL Mbcf mRNA σε δείγματα περιφερικού αίματος (ΠΑ) αποτελεί τώρα μέρος των τεχνικών παρακολούθησης της νόσου για τη ΧΜΛ κατά τη θεραπεία. Είναι λιγότερο επεμβατική από τη συμβατική κυτταρογενετική μεταφάσεων μυελού των οστών και προσφέρει μεγαλύτερη ευαισθησία.

Οι συστάσεις για την παρακολούθηση της ΧΜΛ έχουν επίσης ενημερωθεί πρόσφατα για να συμπεριλάβουν νέα κλινικά στοιχεία από κλινικές δοκιμές,

καθώς και βελτιωμένους στόχους και εργαλεία παρακολούθησης της νόσου. Οι πιο πρόσφατες συστάσεις σχετικά με τον ορισμό της ανταπόκρισης και την παρακολούθηση των ασθενών που λαμβάνουν ιματινίμη προέρχονται από εμπειρογνώμονες του Ευρωπαϊκού Δικτύου για τη Λευχαιμία (ELN) (2).

Από τεχνική άποψη, έχουν γίνει προσπάθειες από διεθνείς εμπειρογνώμονες για την εναρμόνιση των εξετάσεων και αναφορών BCR-ABL Mbcf (3–5). Επιπροσθέτως, μια επιτροπή αναφοράς επικυρώθηκε πρόσθετα υπό την αιγίδα του Π.Ο.Υ. έτσι ώστε να είναι δυνατή μια απλή τυποποίηση της ποσοτικοποίησης BCR-ABL (6).

**Πίνακας 1. Διεθνείς συστάσεις για τη διαχείριση των ασθενών με ΧΜΛ (προσαρμογή από την παραπομπή 2)**

	<b>Αιματολογική ανταπόκριση</b>	<b>Κυτταρογενετική ανταπόκριση</b>	<b>Μοριακή ανταπόκριση (αναλογία BCR-ABL προς γονίδιο-μάρτυρα σύμφωνα με τη διεθνή κλίμακα)</b>
<b>Ορισμοί</b>	<p>Πλήρης: Αριθμός αιμοπεταλίων &lt;math&gt;&lt;450 \times 10^9&lt;/math&gt;/λίτρο Αριθμός λευκών αιμοσφαιρίων &lt;math&gt;&lt;10 \times 10^9&lt;/math&gt;/λίτρο Διαφορική μέτρηση χωρίς ανώριμα κοκκιοκύτταρα και με λιγότερο από 5% βασεόφιλα Μη ψηλαφητός σπλήνας</p>	<p>Πλήρης: Ph+ 0% Μερική: Ph+ 1–35% Μικρή: Ph+ 36–65% Ελάχιστη: Ph+ 66–95% Καμία: Ph+ &gt;95%</p>	<p>«Πλήρης» υποδεικνύει μεταγράφημα μη ποσοτικοποιήσιμο και μη ανιχνεύσιμο Σημαντική: <math>\leq 0.1</math></p>
<b>Παρακολούθηση</b>	<p>Ελέγχετε κάθε 2 εβδομάδες μέχρι να επιτευχθεί και να επιβεβαιωθεί πλήρης ανταπόκριση, στη συνέχεια τριμηνιαία εκτός εάν απαιτείται διαφορετικά</p>	<p>Ελέγχετε τουλάχιστον κάθε 6 μήνες μέχρι να επιβεβαιωθεί πλήρης ανταπόκριση, στη συνέχεια τουλάχιστον κάθε 12 μήνες</p>	<p>Ελέγχετε κάθε 3 μήνες Ανάλυση μεταλλάξεων σε περίπτωση αποτυχίας, υποβέλτιστη ανταπόκριση ή αύξηση του επιπέδου μεταγραφημάτων</p>

Πλήρης αιματολογική ανταπόκριση, κυτταρογενετική ανταπόκριση και μοριακή ανταπόκριση πρέπει να επιβεβαιωθεί σε δύο διαδοχικές περιπτώσεις. Η κυτταρογενετική ανταπόκριση αξιολογείται μέσω μορφολογικής κυτταρογενετικής τουλάχιστον 20 μεταφάσεων του μυελού. Ο φθορίζων *in situ* υβριδισμός (FISH) κυττάρων περιφερικού αίματος πρέπει να χρησιμοποιείται μόνο εάν δεν μπορούν να ληφθούν κύτταρα μυελού. Η μοριακή ανταπόκριση αξιολογείται σε κύτταρα περιφερικού αίματος.

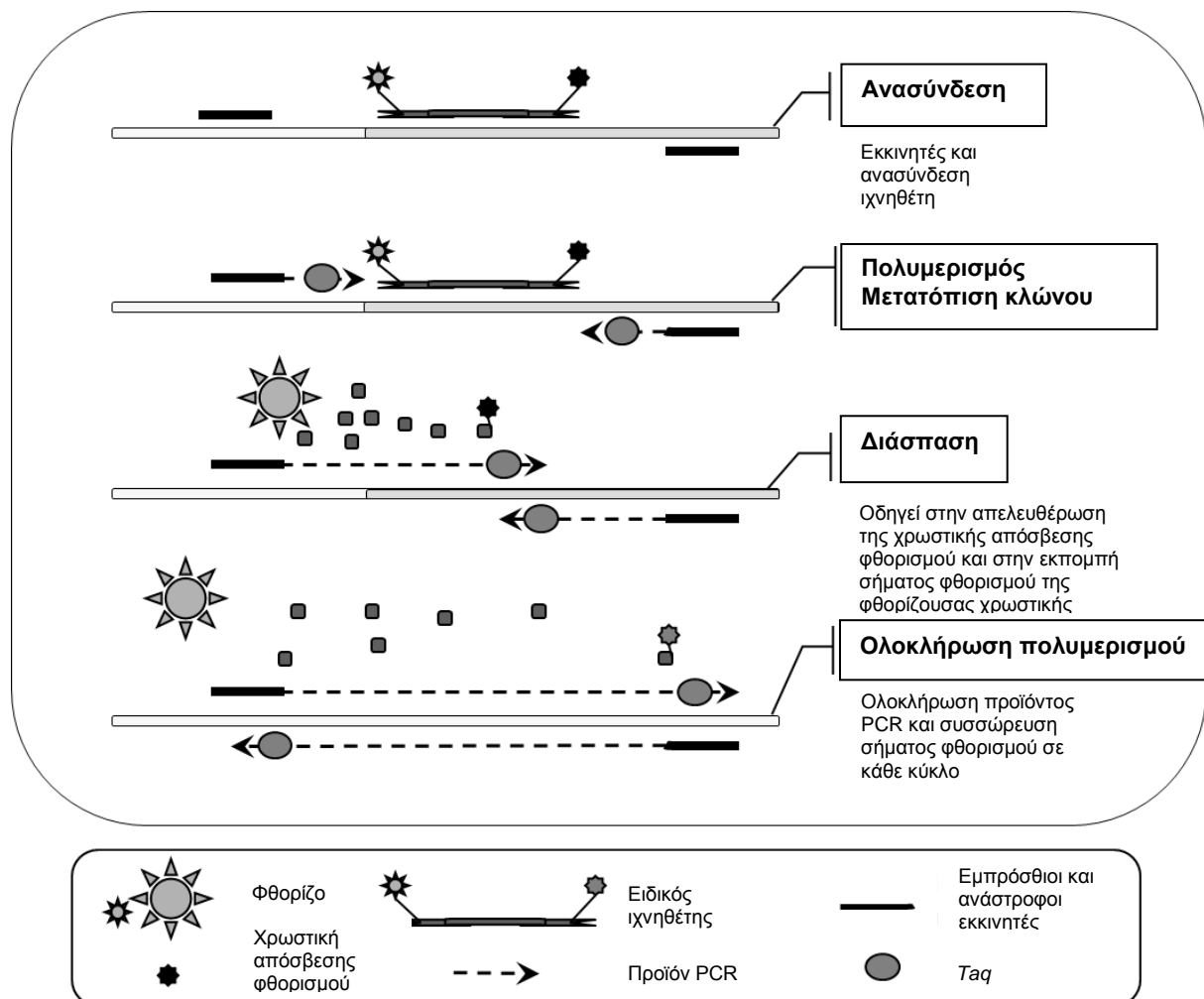




**ENR561.** Ο αριθμός κάτω από τους εκκινητές και τον ιχνηθέτη αναφέρεται στη θέση του νουκλεοτιδίου στο μεταγράφημα του φυσιολογικού γονιδίου.

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

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



**Εικόνα 3. Γενική αρχή της αντίδρασης.** Το ολικό RNA μεταγράφεται αντίστροφα και το παραγόμενο cDNA ενισχύεται μέσω της PCR χρησιμοποιώντας ένα ζεύγος ειδικών εκκινητών και έναν ειδικό εσωτερικό ιχνηθέτη διπλής χρώσης (FAM™–TAMRA™). Ο

ιχνηθέτης συνδέεται στο αμπλικόνιο κατά τη διάρκεια κάθε βήματος ανασύνδεσης της PCR. Όταν η *Taq* DNA πολυμεράση επεκτείνεται από τον εκκινητή που είναι συνδεδεμένος στο αμπλικόνιο, μετατοπίζει το 5' άκρο του ιχνηθέτη, το οποίο στη συνέχεια αποικοδομείται από τη δραστηριότητα της 5'→3' εξωνουκλεάσης της *Taq* DNA πολυμεράσης. Η διάσπαση συνεχίζεται μέχρι την τήξη του αμπλικονίου από τον υπολειπόμενο ιχνηθέτη. Αυτή η διεργασία απελευθερώνει το φθορισμοφόρο και τη χρωστική απόσβεσης φθορισμού, διαχωρίζοντάς τα στο χώρο και οδηγώντας σε μια αύξηση του φθορισμού από το FAM και μια μείωση του φθορισμού από το TAMRA.

## Υλικά που παρέχονται

### Περιεχόμενα του ΚΙΤ

<b><i>ipsogen</i> BCR-ABL1 MbcR Kit</b>		<b>(24)</b>
<b>Αρ. καταλόγου</b>		<b>670123</b>
<b>Αριθμός αντιδράσεων</b>		<b>24</b>
ABL Control Gene Standard Dilution (Πρότυπο αραιωμένο διάλυμα γονιδίου-μάρτυρα ABL) (10 <sup>3</sup> αντίγραφα/5 μl)	C1-ABL	50 μl
ABL Control Gene Standard Dilution (Πρότυπο αραιωμένο διάλυμα γονιδίου-μάρτυρα ABL) (10 <sup>4</sup> αντίγραφα/5 μl)	C2-ABL	50 μl
ABL Control Gene Standard Dilution (Πρότυπο αραιωμένο διάλυμα γονιδίου-μάρτυρα ABL) (10 <sup>5</sup> αντίγραφα/5 μl)	C3-ABL	50 μl
BCR-ABL MbcR Fusion Gene Standard Dilution (Πρότυπο αραιωμένο διάλυμα γονιδίου σύντηξης BCR-ABL MbcR) (10 <sup>1</sup> αντίγραφα/5 μl)	F1-BCR- ABL MbcR	50 μl
BCR-ABL MbcR Fusion Gene Standard Dilution (Πρότυπο αραιωμένο διάλυμα γονιδίου σύντηξης BCR-ABL MbcR) (10 <sup>2</sup> αντίγραφα/5 μl)	F2-BCR- ABL MbcR	50 μl
BCR-ABL MbcR Fusion Gene Standard Dilution (Πρότυπο αραιωμένο διάλυμα γονιδίου σύντηξης BCR-ABL MbcR) (10 <sup>3</sup> αντίγραφα/5 μl)	F3-BCR- ABL MbcR	50 μl
BCR-ABL MbcR Fusion Gene Standard Dilution (Πρότυπο αραιωμένο διάλυμα γονιδίου σύντηξης BCR-ABL MbcR) (10 <sup>5</sup> αντίγραφα/5 μl)	F4-BCR- ABL MbcR	50 μl
BCR-ABL MbcR Fusion Gene Standard Dilution (Πρότυπο αραιωμένο διάλυμα γονιδίου σύντηξης BCR-ABL MbcR) (10 <sup>6</sup> αντίγραφα/5 μl)	F5-BCR- ABL MbcR	50 μl

<b>ipsogen BCR-ABL1 Mbcf Kit</b>		<b>(24)</b>
<b>Αρ. καταλόγου</b>		<b>670123</b>
<b>Αριθμός αντιδράσεων</b>		<b>24</b>
Primers and Probe Mix ABL (Εκκινητές και μείγμα ιχνηθετών ABL)*	PPC-ABL 25x	90 μl
Primers and Probe Mix BCR-ABL Mbcf Fusion Gene (Εκκινητές και μείγμα ιχνηθετών γονιδίου σύντηξης BCR-ABL Mbcf) <sup>†</sup>	PPF-Mbcf 25x	110 μl
ipsogen BCR-ABL Mbcf Kit Handbook (Αγγλικά)		1

\* Μείγμα ειδικών αναστροφών και εμπρόσθιων εκκινητών για το γονίδιο-μάρτυρα ABL συν ειδικός ιχνηθέτης FAM–TAMRA.

<sup>†</sup> Μείγμα ειδικών αναστροφών και εμπρόσθιων εκκινητών για το γονίδιο σύντηξης BCR-ABL Mbcf συν ειδικός ιχνηθέτης FAM–TAMRA.

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

## Απαιτούμενα υλικά που δεν παρέχονται

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

## Αντιδραστήρια

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

TaqMan Master (κύριο μείγμα PCR 5x) (Roche, αρ. καταλόγου 04535286001)

### Αναλώσιμα

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

### Εξοπλισμός

- Πιπέτα μικρολίτρων\* αποκλειστική για PCR (1–10 μl, 10–100 μl, 100–1.000 μl)
- Φυγόκεντρος πάγκου\* με στροφέα για σωληνάρια αντίδρασης 0,2 ml/0,5 ml (με δυνατότητα επίτευξης 10.000 rpm)
- Όργανο PCR πραγματικού χρόνου:\* Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM ή άλλο όργανο Rotor
- Θερμικός κυκλοποιητής\* ή λουτρό νερού\* (βήμα ανάστροφης μεταγραφής)

### Συμπληρωματικά αντιδραστήρια

- Κιτ μαρτύρων *ipsogen* BCR-ABL1 Mbcf (αρ. καταλόγου 670191), που αποτελείται από κυτταρικές σειρές με αρνητική, υψηλή και χαμηλή θετική έκφραση του γονιδίου σύντηξης BCR-ABL Mbcf για την ποσοτική επικύρωση της εκχύλισης RNA και της ανάστροφης μεταγραφής

## Προειδοποιήσεις και προφυλάξεις

Για διαγνωστική χρήση in vitro

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

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

\* Βεβαιωθείτε πως τα όργανα έχουν ελεγχθεί και βαθμονομηθεί σύμφωνα με τις συστάσεις του κατασκευαστή.

## Γενικές προφυλάξεις

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

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

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

Απαιτείται ιδιαίτερη προσοχή ώστε να αποφευχθεί:

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

Συνεπώς, συνιστούμε τα ακόλουθα.

- Χρησιμοποιείτε εργαστηριακό εξοπλισμό (π.χ. πιπέτες, ρύγχη πιπέτας, φιαλίδια αντίδρασης) χωρίς νουκλεάση και φοράτε γάντια όταν εκτελείτε τον προσδιορισμό.
- Χρησιμοποιείτε νέα ανθεκτικά στα αερολύματα ρύγχη πιπέτων για όλα τα βήματα διανομής με πιπέτα προκειμένου να αποφύγετε τη διασταυρούμενη μόλυνση των δειγμάτων και των αντιδραστηρίων.
- Παρασκευάζετε το κύριο προ-μείγμα PCR με αποκλειστικά για το σκοπό αυτό υλικά (πιπέτες, ρύγχη κτλ.) σε αποκλειστικό χώρο όπου δεν έχουν εισαχθεί μήτρες DNA (cDNA, DNA, πλασμίδιο). Προσθέτετε τη μήτρα σε ξεχωριστή ζώνη (κατά προτίμηση σε ξεχωριστό δωμάτιο) με ειδικά υλικά (πιπέτες, ρύγχη κτλ.).
- Χειρίζετε τα πρότυπα αραιωμένα διαλύματα (C1–3 και F1–5) σε ξεχωριστό δωμάτιο.

## Φύλαξη και χειρισμός αντιδραστηρίων

Τα kit αποστέλλονται σε ξηρό πάγο και πρέπει να φυλάσσονται σε θερμοκρασία  $-30^{\circ}\text{C}$  έως  $-15^{\circ}\text{C}$  κατά την παραλαβή.

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

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

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

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

## Διαδικασία

### Προετοιμασία RNA δείγματος

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

### Πρωτόκολλο: Συνιστώμενη τυποποιημένη ανάστροφη μεταγραφή κατά EAC

#### Απαραίτητες ενέργειες πριν από την έναρξη

- Προετοιμάστε dNTP, 10 mM έκαστο. Φυλάξτε στους  $-20^{\circ}\text{C}$  σε κλάσματα.

#### Διαδικασία

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

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



**Πίνακας 2. Προετοιμασία του μείγματος RT**

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

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

**Πίνακας 3. Προετοιμασία της αντίδρασης ανάστροφης μεταγραφάσης**

<b>Συστατικό</b>	<b>Όγκος (μl)</b>
Μείγμα RT	16
Θερμασμένο RNA δείγματος (1 μg)	1–4
Νερό κατηγορίας εφαρμογών PCR χωρίς νουκλεάση	0–3
Τελικός όγκος	20

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

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

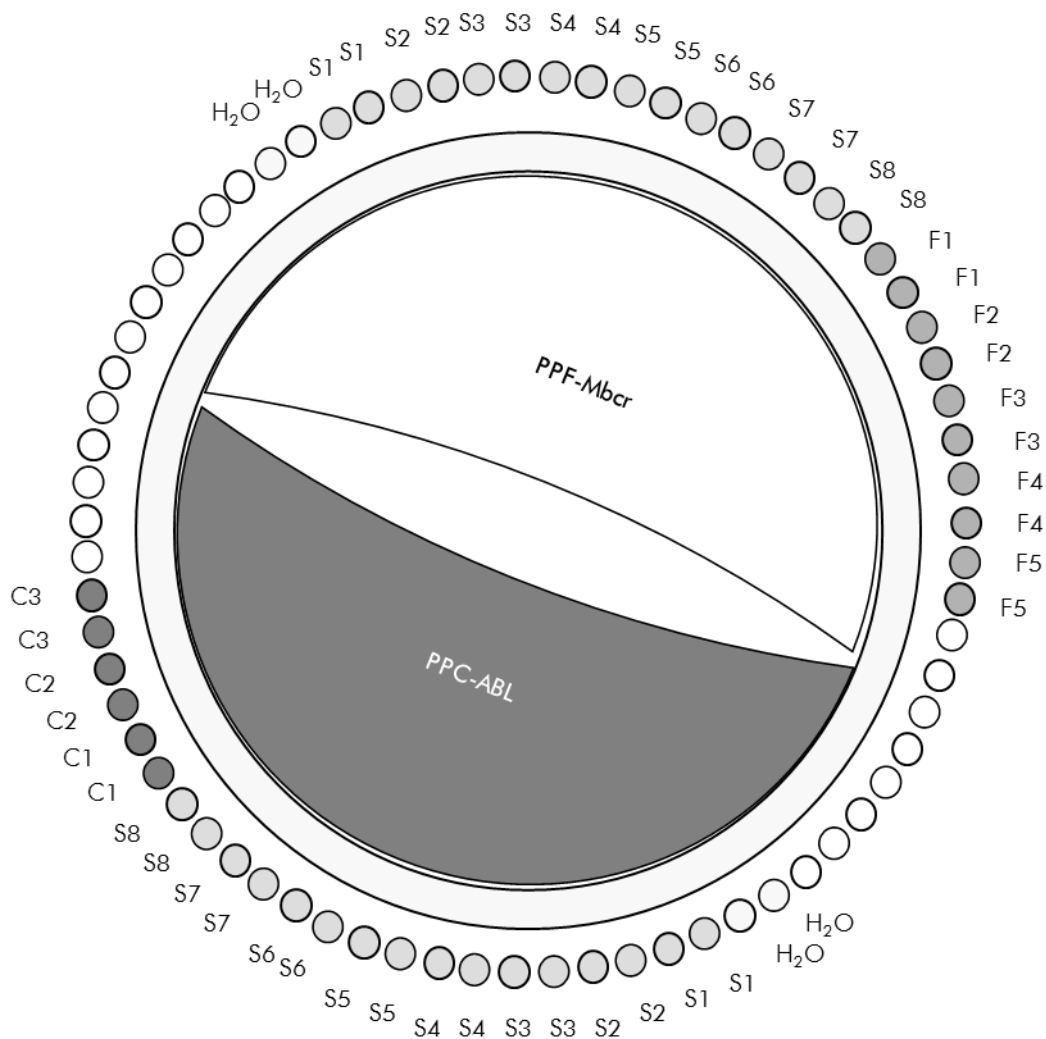
Κατά τη χρήση αυτού του οργάνου, συνιστούμε την εκτέλεση όλων των μετρήσεων εις διπλούν, όπως υποδεικνύεται στον Πίνακα 4.

**Πίνακας 4. Αριθμός αντιδράσεων για όργανα Rotor-Gene Q με στροφέα 72**

Δείγματα	Αντιδράσεις
<b>Με τους εκκινήτες και το μείγμα ιχνηθετών ABL (PPC-ABL)</b>	
n δείγματα cDNA	n x 2 αντιδράσεις
Πρότυπο ABL	2 x 3 αντιδράσεις (3 πρότυπα αραιωμένα διαλύματα, έναστο εξεταζόμενο εις διπλούν)
Μάρτυρας νερού	2 αντιδράσεις
<b>Με τους εκκινήτες και το μείγμα ιχνηθετών BCR-ABL Mbcr (PPF-Mbcr)</b>	
n δείγματα cDNA	n x 2 αντιδράσεις
Πρότυπο Mbcr	2 x 5 αντιδράσεις (5 πρότυπα αραιωμένα διαλύματα, έναστο εξεταζόμενο εις διπλούν)
Μάρτυρας νερού	2 αντιδράσεις

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

Συνιστούμε την εξέταση τουλάχιστον 8 δειγμάτων cDNA στο ίδιο πείραμα για τη βελτιστοποίηση της χρήσης των προτύπων και των εκκινήτων και μειγμάτων ιχνηθετών. Κάθε kit *ipsogen* BCR-ABL1 Mbcr παρέχει αρκετά αντιδραστήρια για την εκτέλεση ενός πειράματος 8 δειγμάτων 3 φορές χρησιμοποιώντας στροφέα 72 σωληναρίων.



**Εικόνα 4. Προτεινόμενη προετοιμασία στροφέα για κάθε πείραμα με το κιτ *ipsogen* BCR-ABL1 Mbcf. F1–5: πρότυπα BCR-ABL Mbcf, C1–3: πρότυπα ABL, S: δείγμα cDNA, H<sub>2</sub>O: μάρτυρας νερού.**

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

Γεμίστε όλες τις άλλες θέσεις με κενά σωληνάρια.

### qPCR σε όργανα Rotor-Gene Q με στροφέα 72 σωληναρίων

**Σημείωση:** Εκτελέστε όλα τα βήματα σε πάγο.

#### Διαδικασία

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

Όλες οι συγκεντρώσεις αφορούν τον τελικό όγκο της αντίδρασης.

Ο Πίνακας 5 περιγράφει το σχήμα διανομής με πιπέτα για την προετοιμασία ενός μείγματος αντιδραστηρίων, υπολογισμένο για την επίτευξη τελικού όγκου αντίδρασης 25 μl. Μπορεί να προετοιμαστεί ένα προ-μείγμα, σύμφωνα με τον αριθμό των αντιδράσεων, χρησιμοποιώντας τον ίδιο εκκινητή και μείγμα ιχνηθετών (είτε PPC-ABL είτε PPF-Mbcr). Συμπεριλαμβάνονται επιπλέον όγκοι για αντιστάθμιση σφάλματος διανομής με πιπέτα.

**Πίνακας 5. Προετοιμασία του μείγματος qPCR**

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

3. Χορηγήστε 20 μl από το προ-μείγμα qPCR ανά σωληνάριο.
4. Προσθέστε 5 μl προϊόντος RT (cDNA, 100 ng RNA ισοδύναμο) που ελήφθη στην ανάστροφη μεταγραφή (βλ. «Πρωτόκολλο: Συνιστώμενη τυποποιημένη ανάστροφη μεταγραφή κατά EAC», σελίδα 16) στο αντίστοιχο σωληνάριο (συνολικός όγκος 25 μl).

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

**Πίνακας 6. Προφίλ θερμοκρασίας**

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

8. Για όργανα Rotor-Gene Q, επιλέξτε «Slope Correct» (διόρθωση κλίσης) για την ανάλυση. Συνιστούμε τη ρύθμιση του κατωφλίου στο 0,03. Ξεκινήστε το πρόγραμμα θερμικής κυκλοποίησης, όπως υποδεικνύεται στον Πίνακα 6.

## Πρωτόκολλο: qPCR σε ABI PRISM 7000, 7700 και 7900HT SDS και σε όργανο LightCycler 480

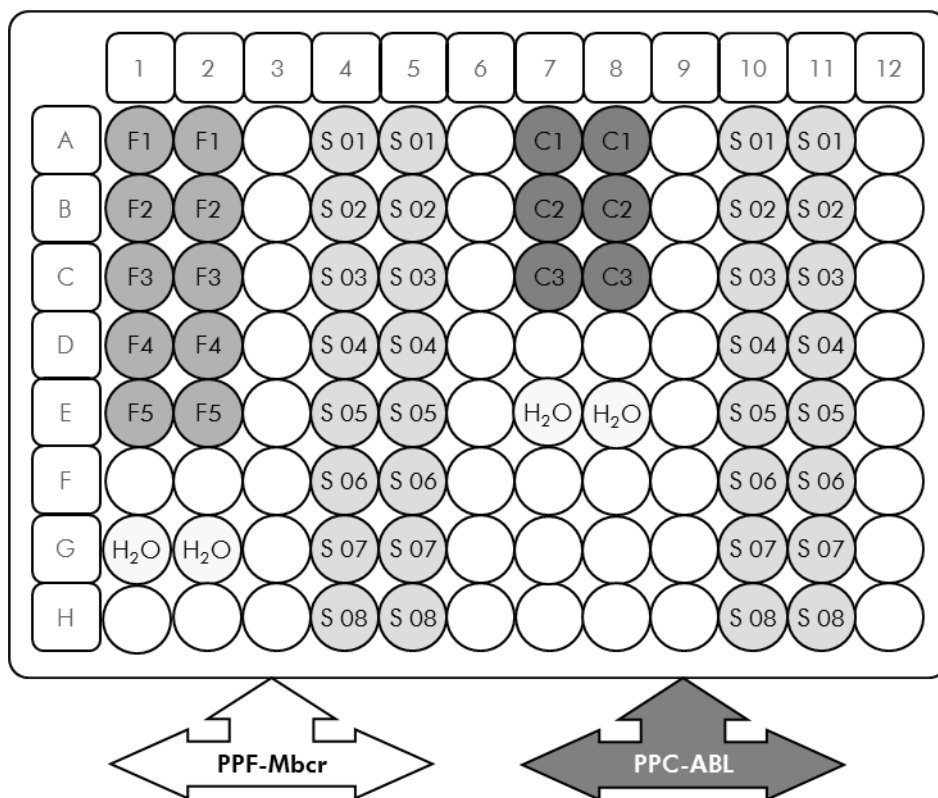
Κατά τη χρήση εξοπλισμού qPCR πλακιδίων 96 φρεατίων, συνιστούμε την εκτέλεση όλων των μετρήσεων εις διπλούν, όπως υποδεικνύεται στον Πίνακα 7.

**Πίνακας 7. Αριθμός αντιδράσεων με χρήση εξοπλισμού qPCR πλακιδίων 96 φρεατίων**

<b>Δείγματα</b>	<b>Αντιδράσεις</b>
<b>Με τους εκκινητές και το μείγμα ιχνηθετών ABL (PPC-ABL)</b>	
n δείγματα cDNA	n x 2 αντιδράσεις
Πρότυπο ABL	2 x 3 αντιδράσεις (3 πρότυπα αραιωμένα διαλύματα, ένα στο εξεταζόμενο εις διπλούν)
Μάρτυρας νερού	2 αντιδράσεις
<b>Με τους εκκινητές και το μείγμα ιχνηθετών BCR-ABL Mbcf (PPF-Mbcf)</b>	
n δείγματα cDNA	n x 2 αντιδράσεις
Πρότυπο Mbcf	2 x 5 αντιδράσεις (5 πρότυπα αραιωμένα διαλύματα, ένα στο εξεταζόμενο εις διπλούν)
Μάρτυρας νερού	2 αντιδράσεις

### Επεξεργασία δείγματος σε ABI PRISM 7000, 7700 και 7900 SDS και σε όργανο LightCycler 480

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



**Εικόνα 5. Προτεινόμενη προετοιμασία πλακιδίων για ένα πείραμα. S:** δείγμα cDNA, **F1–5:** πρότυπα BCR-ABL Mbcr, **C1–3:** πρότυπα ABL, **H<sub>2</sub>O:** μάρτυρας νερού.

## qPCR σε ABI PRISM 7000, 7700 και 7900 SDS και σε όργανο LightCycler 480

**Σημείωση:** Εκτελέστε όλα τα βήματα σε πάγο.

### Διαδικασία

1. Αποψύξτε όλα τα απαραίτητα συστατικά και τοποθετήστε τα σε πάγο.
2. Προετοιμάστε το ακόλουθο μείγμα qPCR σύμφωνα με τον αριθμό των δειγμάτων υπό επεξεργασία. Εάν χρησιμοποιείτε εξοπλισμό qPCR πλακιδίων 96 φρεατίων, συνιστούμε την εκτέλεση όλων των μετρήσεων εις διπλούν.

Όλες οι συγκεντρώσεις αφορούν τον τελικό όγκο της αντίδρασης.

Ο Πίνακας 8 περιγράφει το σχήμα διανομής με πιπέτα για την προετοιμασία ενός μείγματος αντιδραστηρίων, υπολογισμένο για την επίτευξη τελικού όγκου αντίδρασης 25 μl. Μπορεί να προετοιμαστεί ένα προ-μείγμα, σύμφωνα με τον αριθμό των αντιδράσεων, χρησιμοποιώντας τον ίδιο εκκινητή και μείγμα ιχνηθετών (είτε PPC-ABL είτε PPF-Mbcr). Συμπεριλαμβάνονται επιπλέον όγκοι για αντιστάθμιση σφάλματος διανομής με πιπέτα.



**Πίνακας 8. Προετοιμασία του μείγματος qPCR**

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

3. Χορηγήστε 20 μl από το προ-μείγμα qPCR ανά φρεάτιο.
4. Προσθέστε 5 μl προϊόντος RT (cDNA, 100 ng RNA ισοδύναμο) που ελήφθη στην ανάστροφη μεταγραφή (βλ. «Πρωτόκολλο: Συνιστώμενη τυποποιημένη ανάστροφη μεταγραφή κατά EAC», σελίδα 16) στο αντίστοιχο φρεάτιο (συνολικός όγκος 25 μl).
5. Αναμείξτε απαλά, με επαναλαμβανόμενη αναρρόφηση/εξώθηση με πιπέτα.
6. Κλείστε το πλακίδιο και φυγοκεντρήστε σύντομα (300 x g, περίπου 10 δευτερόλεπτα).
7. Τοποθετήστε το πλακίδιο στο θερμικό κυκλοποιητή σύμφωνα με τις συστάσεις του κατασκευαστή. Προγραμματίστε τον θερμικό κυκλοποιητή με το πρόγραμμα θερμικής κυκλοποίησης όπως υποδεικνύεται στον Πίνακα 9 για ABI PRISM 7000, 7700 και 7900HT SDS, ή στον Πίνακα 10 για το όργανο LightCycler 480.

## Πίνακας 9. Προφίλ θερμοκρασίας για ABI PRISM 7000, 7700 και 7900HT SDS

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

## Πίνακας 10. Προφίλ θερμοκρασίας για το όργανο LightCycler 480

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

8. Για ABI PRISM 7000, 7700 και 7900HT SDS, ακολουθήστε το βήμα 8α. Για το όργανο LightCycler 480, ακολουθήστε το βήμα 8β.

8α. ABI PRISM 7000, 7700 και 7900HT SDS: Συνιστούμε ένα κατώφλι ρυθμισμένο στο 0,1 όπως περιγράφεται στο πρωτόκολλο EAC στο βήμα ανάλυσης στο ABI PRISM SDS και γραμμή βάσης ρυθμισμένη μεταξύ των κύκλων 3 και 15. Ξεκινήστε το πρόγραμμα κυκλοποίησης, όπως υποδεικνύεται στον Πίνακα 9.

**8β. Όργανο LightCycler 480: Συνιστούμε μια λειτουργία ανάλυσης Fit point (σημεία προσαρμογής) με υπόβαθρο στο 2,0 και κατώφλι στο 2,0. Ξεκινήστε το πρόγραμμα θερμικής κυκλοποίησης, όπως υποδεικνύεται στον Πίνακα 10.**

## Πρωτόκολλο: qPCR σε όργανα LightCycler 1.2 και 2.0

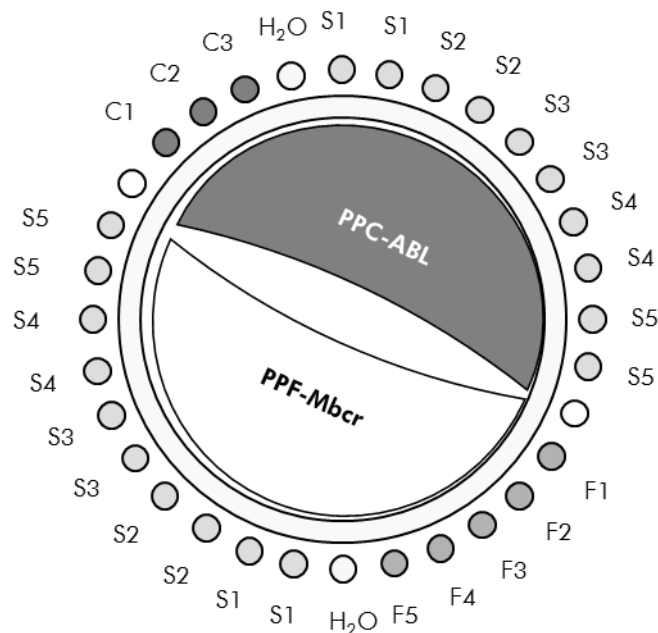
Κατά τη χρήση τριχοειδών οργάνων, συνιστούμε τη μέτρηση των δειγμάτων εις διπλούν και των μαρτύρων μόνο εις απλούν, όπως υποδεικνύεται στον Πίνακα 11.

Πίνακας 11. Αριθμός αντιδράσεων για τα όργανα LightCycler 1.2 και 2.0

Δείγματα	Αντιδράσεις
<b>Με τους εκκινητές και το μείγμα ιχνηθετών ABL (PPC-ABL)</b>	
n δείγματα cDNA	n x 2 αντιδράσεις
Πρότυπο ABL	1 x 3 αντιδράσεις (3 πρότυπα αραιωμένα διαλύματα, έναστο εξεταζόμενο εις απλούν)
Μάρτυρας νερού	1 αντίδραση
<b>Με τους εκκινητές και το μείγμα ιχνηθετών BCR-ABL Mbcr (PPF-Mbcr)</b>	
n δείγματα cDNA	n x 2 αντιδράσεις
Πρότυπο Mbcr	1 x 5 αντιδράσεις (5 πρότυπα αραιωμένα διαλύματα, έναστο εξεταζόμενο εις απλούν)
Μάρτυρας νερού	1 αντίδραση

### Επεξεργασία δείγματος στα όργανα LightCycler 1.2 και 2.0

Συνιστούμε την εξέταση τουλάχιστον 5 δειγμάτων cDNA στο ίδιο πείραμα για τη βελτιστοποίηση της χρήσης των προτύπων και των εκκινητών και μειγμάτων ιχνηθετών. Η διάταξη τριχοειδών στην Εικόνα 6 δείχνει ένα παράδειγμα πειράματος.



**Εικόνα 6. Προτεινόμενη προετοιμασία στροφέα για κάθε πείραμα με το κιτ *ipsogen* BCR-ABL1 Mbcr. F1–5: πρότυπα BCR-ABL Mbcr, C1–3: πρότυπα ABL, S: άγνωστο δείγμα DNA προς ανάλυση, H<sub>2</sub>O: μάρτυρας νερού.**

### qPCR σε όργανα LightCycler 1.2 και 2.0

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

**Σημείωση:** Εκτελέστε όλα τα βήματα σε πάγο.

### Διαδικασία

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

Όλες οι συγκεντρώσεις αφορούν τον τελικό όγκο της αντίδρασης.

Ο Πίνακας 12 περιγράφει το σχήμα διανομής με πιπέτα για την προετοιμασία ενός μείγματος αντιδραστηρίων, υπολογισμένο για την επίτευξη τελικού όγκου αντίδρασης 20 μl. Μπορεί να προετοιμαστεί ένα προ-μείγμα, σύμφωνα με τον αριθμό των αντιδράσεων, χρησιμοποιώντας τον ίδιο εκκινητή και μείγμα ιχνηθετών (είτε PPC-ABL είτε PPF-Mbcr). Συμπεριλαμβάνονται επιπλέον όγκοι για αντιστάθμιση σφάλματος διανομής με πιπέτα.

**Πίνακας 12. Προετοιμασία του μείγματος qPCR**

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

3. Χορηγήστε 15 μl από το προ-μείγμα qPCR ανά τριχοειδές.
4. Προσθέστε 5 μl προϊόντος RT (cDNA, 100 ng RNA ισοδύναμο) που ελήφθη στην ανάστροφη μεταγραφή (βλ. «Πρωτόκολλο: Συνιστώμενη τυποποιημένη ανάστροφη μεταγραφή κατά EAC», σελίδα 16) στο αντίστοιχο σωληνάριο (συνολικός όγκος 20 μl).
5. Αναμείξτε απαλά, με επαναλαμβανόμενη αναρρόφηση/εξώθηση με πιπέτα.
6. Τοποθετήστε τα τριχοειδή στους προσαρμογείς που παρέχονται με τη συσκευή, φυγοκεντρήστε σύντομα (700 x g, περίπου 10 δευτερόλεπτα).
7. Φορτώστε τα τριχοειδή στο θερμικό κυκλοποιητή σύμφωνα με τις συστάσεις του κατασκευαστή.
8. Προγραμματίστε το όργανο LightCycler 1.2 ή 2.0 με το πρόγραμμα θερμικής κυκλοποίησης, όπως υποδεικνύεται στον Πίνακα 13.

### Πίνακας 13. Προφίλ θερμοκρασίας

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

9. Για το LightCycler 1.2, ακολουθήστε το βήμα 9α. Για το LightCycler 2.0, ακολουθήστε το βήμα 9β.

9α. LightCycler 1.2: Συνιστάται η λειτουργία F1/F2 και «2<sup>nd</sup> derivative analysis» (ανάλυση 2ης παραγώγου). Ξεκινήστε το πρόγραμμα θερμικής κυκλοποίησης, όπως υποδεικνύεται στον Πίνακα 13.

9β. LightCycler 2.0: Συνιστούμε τη χρήση αυτοματοποιημένης (F''max) ανάλυσης στο LightCycler 2.0 έκδοση λογισμικού 4.0 για τη λήψη αναπαραγωγίμων αποτελεσμάτων. Ξεκινήστε το πρόγραμμα θερμικής κυκλοποίησης, όπως υποδεικνύεται στον Πίνακα 13.

## Πρωτόκολλο: qPCR στο όργανο SmartCycler

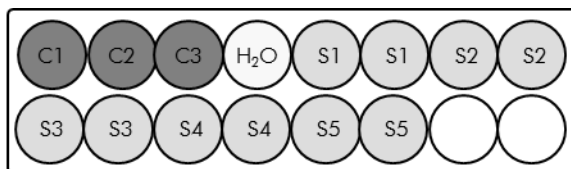
Κατά τη χρήση αυτού του οργάνου, συνιστούμε τη μέτρηση των δειγμάτων εις διπλούν και των μαρτύρων μόνο εις απλούν, όπως υποδεικνύεται στον Πίνακα 14.

Πίνακας 14. Αριθμός αντιδράσεων για το όργανο SmartCycler

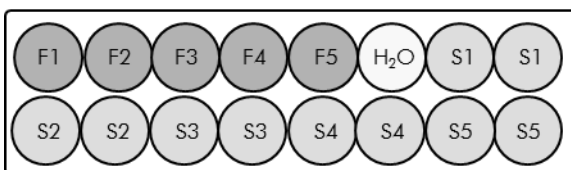
Δείγματα	Αντιδράσεις
<b>Με τους εκκινητές και το μείγμα ιχνηθετών ABL (PPC-ABL)</b>	
n δείγματα cDNA	n x 2 αντιδράσεις
Πρότυπο ABL	1 x 3 αντιδράσεις (3 πρότυπα αραιωμένα διαλύματα, έκαστο εξεταζόμενο εις απλούν)
Μάρτυρας νερού	1 αντίδραση
<b>Με τους εκκινητές και το μείγμα ιχνηθετών BCR-ABL Mbcf (PPF-Mbcf)</b>	
n δείγματα cDNA	n x 2 αντιδράσεις
Πρότυπο Mbcf	1 x 5 αντιδράσεις (5 πρότυπα αραιωμένα διαλύματα, έκαστο εξεταζόμενο εις απλούν)
Μάρτυρας νερού	1 αντίδραση

### Επεξεργασία δείγματος στο όργανο SmartCycler

Συνιστούμε την εξέταση τουλάχιστον 5 δειγμάτων cDNA στο ίδιο πείραμα για τη βελτιστοποίηση της χρήσης των προτύπων και των εκκινητών και μειγμάτων ιχνηθετών. Η διάταξη δύο μπλοκ στην Εικόνα 7 δείχνει ένα παράδειγμα.



Όλοι οι προσδιορισμοί σε αυτό το πρώτο μπλοκ πραγματοποιούνται με PPC-ABL.



Όλοι οι προσδιορισμοί σε αυτό το δεύτερο μπλοκ πραγματοποιούνται με PPF-Mbcf.

Εικόνα 7. Προτεινόμενη προετοιμασία πλακιδίων για ένα πείραμα. S: δείγμα cDNA, F1–5: πρότυπα BCR-ABL Mbcf, C1–3: πρότυπα ABL, H<sub>2</sub>O: μάρτυρας νερού.



## qPCR στο όργανο SmartCycler

**Σημείωση:** Εκτελέστε όλα τα βήματα σε πάγο.

### Διαδικασία

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

Όλες οι συγκεντρώσεις αφορούν τον τελικό όγκο της αντίδρασης.

Ο Πίνακας 15 περιγράφει το σχήμα διανομής με πιπέτα για την προετοιμασία ενός μείγματος αντιδραστηρίων, υπολογισμένο για την επίτευξη τελικού όγκου αντίδρασης 25 μl. Μπορεί να προετοιμαστεί ένα προ-μείγμα, σύμφωνα με τον αριθμό των αντιδράσεων, χρησιμοποιώντας τον ίδιο εκκινητή και μείγμα ιχνηθετών (είτε PPC-ABL είτε PPF-Mbcr). Συμπεριλαμβάνονται επιπλέον όγκοι για αντιστάθμιση σφάλματος διανομής με πιπέτα.

**Πίνακας 15. Προετοιμασία του μείγματος qPCR**

Συστατικό	1 αντίδραση (μl)	ABL: 14+1 αντιδράσεις (μl)	BCR-ABL Mbc: 16+1 αντιδράσεις (μl)	Τελική συγκέντρωση
Κύριο μείγμα TaqMan Universal PCR, 2x	12,5	187,5	212,5	1x
Εκκινητές και μείγμα ιχνηθετών, 25x	1	15	17	1x
Νερό κατηγορίας εφαρμογών PCR χωρίς νουκλεάση	6,5	97,5	110,5	–
Δείγμα (για προσθήκη στο βήμα 4)	5	5 έκαστο	5 έκαστο	–
Συνολικός όγκος	25	25 έκαστο	25 έκαστο	–

3. Χορηγήστε 20 μl από το προ-μείγμα qPCR ανά φρεάτιο.
4. Προσθέστε 5 μl προϊόντος RT (cDNA, 100 ng RNA ισοδύναμο) που ελήφθη στην ανάστροφη μεταγραφή (βλ. «Πρωτόκολλο: Συνιστώμενη τυποποιημένη ανάστροφη μεταγραφή κατά EAC», σελίδα 16) στο αντίστοιχο φρεάτιο (συνολικός όγκος 25 μl).
5. Αναμείξτε απαλά, με επαναλαμβανόμενη αναρρόφηση/εξώθηση με πιπέτα.
6. Φορτώστε τα δείγματα στο θερμικό κυκλοποιητή σύμφωνα με τις συστάσεις του κατασκευαστή.
7. Προγραμματίστε το όργανο SmartCycler με το πρόγραμμα θερμικής κυκλοποίησης, όπως υποδεικνύεται στον Πίνακα 16.

## Πίνακας 16. Προφίλ θερμοκρασίας

<b>Διατήρηση</b>	Θερμοκρασία: 50°C Χρόνος: 2 λεπτά
<b>Διατήρηση 2</b>	Θερμοκρασία: 95°C Χρόνος: 10 λεπτά
<b>Κυκλοποίηση</b>	50 φορές 95°C για 15 δευτερόλεπτα 60°C για 1 λεπτό με λήψη: Μονό

8. Συνιστούμε ένα κατώφλι ρυθμισμένο στο 30. Ξεκινήστε το πρόγραμμα θερμικής κυκλοποίησης, όπως υποδεικνύεται στον Πίνακα 16.

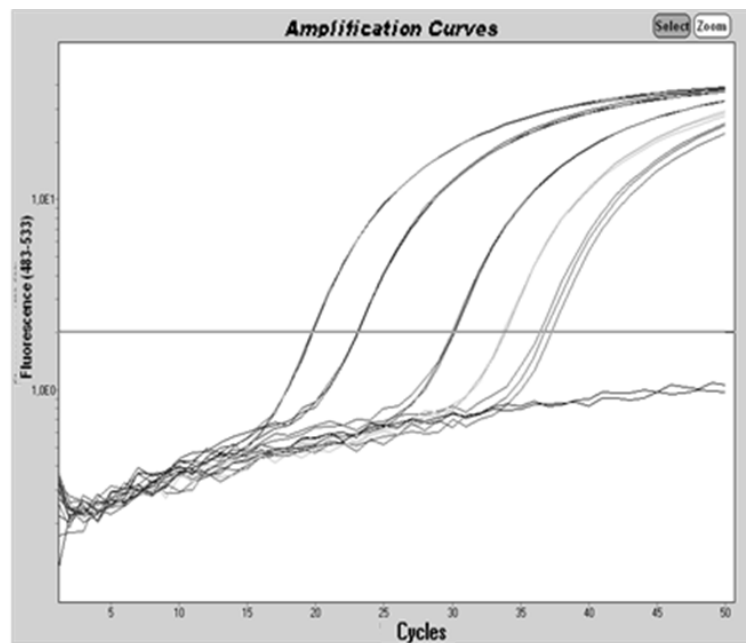
# Ερμηνεία των αποτελεσμάτων

## Αρχή της ανάλυσης δεδομένων

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

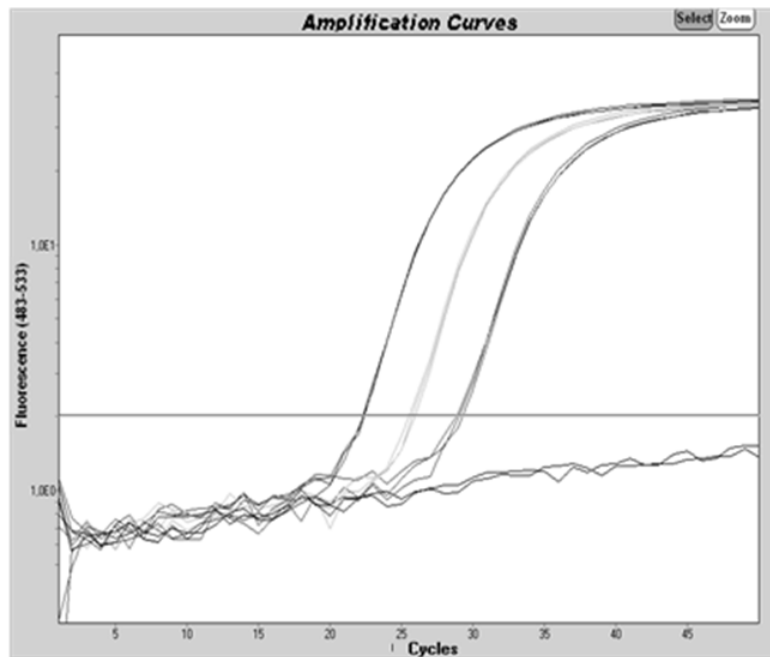
Χρησιμοποιώντας πρότυπα με γνωστό αριθμό μορίων, είναι δυνατή η δημιουργία μιας πρότυπης καμπύλης και ο καθορισμός της ακριβούς ποσότητας του στόχου που είναι παρών στο εξεταζόμενο δείγμα. Οι πρότυπες καμπύλες *ipsogen* βασίζονται σε πλασμίδια. Χρησιμοποιούμε 3 πρότυπα αραιωμένα διαλύματα πλασμιδίου για CG (γονίδιο-μάρτυρα), και 5 πρότυπα αραιωμένα διαλύματα για FG (γονίδιο σύντηξης), προκειμένου να διασφαλίσουμε ακριβείς πρότυπες καμπύλες. Οι εικόνες 8 και 9 δείχνουν ένα παράδειγμα των καμπυλών ενίσχυσης TaqMan που λαμβάνονται με το kit *ipsogen* BCR-ABL Mbcf.

- M-bcr  $10^1$
- M-bcr  $10^2$
- M-bcr  $10^3$
- M-bcr  $10^5$
- M-bcr  $10^6$



**Εικόνα 8. Ανίχνευση προτύπων BCR-ABL Mbcf (F1–F5).  $10^1$ ,  $10^2$ ,  $10^3$ ,  $10^5$ ,  $10^6$  αντίγραφα/5  $\mu$ l.**

- ABL 10<sup>3</sup>
- ABL 10<sup>4</sup>
- ABL 10<sup>5</sup>



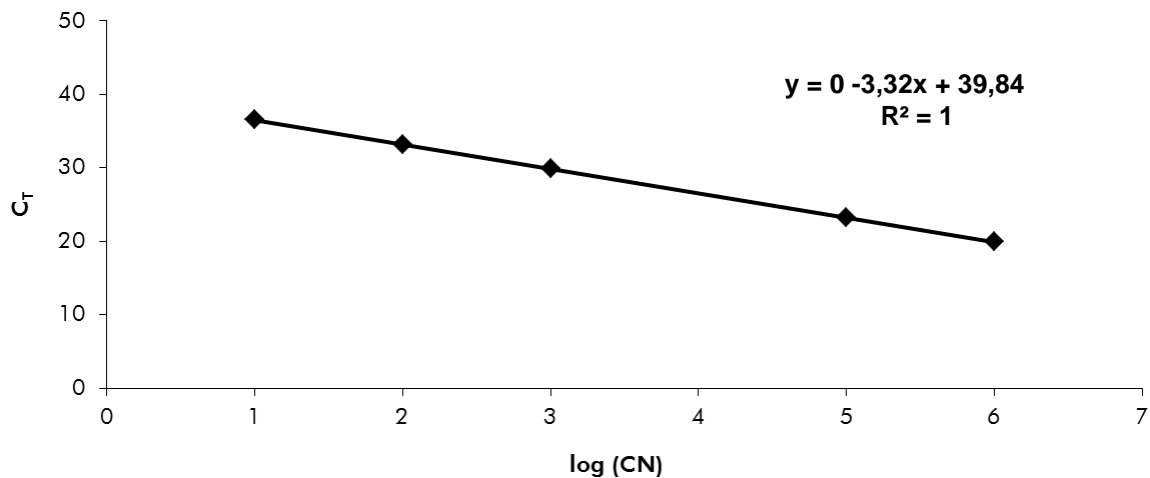
Εικόνα 9. Ανίχνευση προτύπων ABL (C1, C2, C3). 10<sup>3</sup>, 10<sup>4</sup> και 10<sup>5</sup> αντίγραφα/5 μl.

## Αποτελέσματα

### Πρότυπη καμπύλη και κριτήρια ποιότητας

Ανεπεξέργαστα δεδομένα μπορούν να επικολληθούν σε ένα αρχείο Excel<sup>®</sup> για ανάλυση.

Για κάθε γονίδιο (ABL και BCR-ABL), ανεπεξέργαστες τιμές C<sub>T</sub> που λαμβάνονται από πρότυπα αραιωμένα διαλύματα πλασμιδίου σχεδιάζονται σύμφωνα με τον αριθμό αντιγράφων log (3, 4 και 5 για C1, C2 και C3, και 1, 2, 3, 5 και 6 για F1, F2, F3, F4 και F5). Η Εικόνα 10 δείχνει ένα παράδειγμα της θεωρητικής καμπύλης που υπολογίζεται σε 5 πρότυπα αραιωμένα διαλύματα.



**Εικόνα 10. Θεωρητική καμπύλη υπολογιζόμενη σε 5 πρότυπα αραιωμένα διαλύματα.** Μια καμπύλη γραμμικής παλινδρόμησης ( $y = ax + b$ ) υπολογίζεται για κάθε γονίδιο (ABL και BCR-ABL), όπου  $a$  είναι η κλίση της γραμμής και  $b$  είναι η τομή  $y$ , η οποία είναι η συντεταγμένη  $y$  του σημείου όπου η γραμμή τέμνει τον άξονα  $y$ . Η εξίσωσή της και ο συντελεστής προσδιορισμού ( $R^2$ ) αναγράφονται στο γράφημα.

Καθώς τα πρότυπα είναι δεκαπλάσιες αραιώσεις, η θεωρητική κλίση της καμπύλης είναι  $-3,3$ . Μια κλίση μεταξύ  $-3,0$  και  $-3,9$  είναι αποδεκτή εφόσον  $R^2$  είναι  $>0,95$  (7). Ωστόσο, μια τιμή για  $R^2 >0,98$  είναι επιθυμητή για ακριβή αποτελέσματα (3).

### Κανονικοποιημένος αριθμός αντιγράφων (NCN)

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

Η εξίσωση πρότυπης καμπύλης BCR-ABL πρέπει να χρησιμοποιηθεί για τη μετατροπή ανεπεξέργαστων τιμών  $C_T$  (που λαμβάνονται με PPF-Mbcr) για τα άγνωστα δείγματα σε αριθμούς αντιγράφων BCR-ABL ( $BCR-ABL_{Mbcr_{CN}}$ ).

Η αναλογία αυτών των τιμών CN δίνει τον κανονικοποιημένο αριθμό αντιγράφων (NCN):

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

### Τιμή MRD

Η τιμή ελάχιστης υπολειμματικής νόσου (MRD) είναι η αναλογία μεταξύ της CG-κανονικοποιημένης έκφρασης του FG κατά την παρακολούθηση  $(FG_{CN}/CG_{CN})_{FUP}$  και των διαγνωστικών δειγμάτων  $(FG_{CN}/CG_{CN})_{DX}$ .

$$\text{Τιμή MRD (MRDv)} = \frac{(FG_{CN}/CG_{CN})_{FUP}}{(FG_{CN}/CG_{CN})_{DX}}$$

### Ευαισθησία

Η ευαισθησία (SENS<sub>v</sub>) υπολογίζεται σύμφωνα με τη σχετική έκφραση του FG κατά τη διάγνωση (FG<sub>CN</sub>/CG<sub>CN</sub>)<sub>DX</sub> και την έκφραση του CG (CG<sub>CN,FUP</sub>) στο δείγμα παρακολούθησης.

$$\text{Ευαισθησία (SENS}_v) = \frac{CG_{CN,DX}}{CG_{CN,FUP} \times FG_{CN,DX}}$$

### Έλεγχος ποιότητας στις τιμές ABL

Κακή ποιότητα του RNA ή προβλήματα κατά τη διάρκεια των βημάτων qPCR οδηγούν σε χαμηλό ABL<sub>CN</sub>. Συνιστούμε την απόρριψη των αποτελεσμάτων από δείγματα που δίνουν ABL<sub>CN</sub> <4246,2 (τιμή χαμηλότερη από το 95% CI από δείγματα ασθενών με ΧΜΛ στη μελέτη EAC, παραπομπή 8).

### Αναπαραγωγιμότητα μεταξύ θυγατρικών κλώνων

Η διακύμανση στις τιμές C<sub>T</sub> μεταξύ των θυγατρικών κλώνων πρέπει να είναι <2, που αντιστοιχεί σε μια τετραπλάσια μεταβολή στις τιμές αριθμού αντιγράφων.

Η διακύμανση στις τιμές C<sub>T</sub> μεταξύ των θυγατρικών κλώνων είναι γενικά <1,5 εάν η μέση τιμή C<sub>T</sub> των θυγατρικών κλώνων είναι <36 (7).

**Σημείωση:** Κάθε χρήστης πρέπει να μετρά τη δική του επαναληψιμότητα στο εκάστοτε εργαστήριο.

### Μάρτυρες νερού

Οι αρνητικοί μάρτυρες πρέπει να δίνουν μηδενικό CN.

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

### Οδηγός αντιμετώπισης προβλημάτων

Αυτός ο οδηγός αντιμετώπισης προβλημάτων μπορεί να σας βοηθήσει στην επίλυση οποιωνδήποτε προβλημάτων που ενδεχομένως προκύψουν. Για περισσότερες πληροφορίες, ανατρέξτε στη σελίδα Frequently Asked Questions (συχνές ερωτήσεις) του Κέντρου Τεχνικής Υποστήριξης της εταιρείας μας: [www.qiagen.com/FAQ/FAQList.aspx](http://www.qiagen.com/FAQ/FAQList.aspx). Οι επιστήμονες των Τεχνικών Υπηρεσιών της QIAGEN είναι πάντοτε πρόθυμοι/-ες να απαντήσουν σε οποιοσδήποτε απορίες σας σχετικά με τις πληροφορίες και το πρωτόκολλο αυτού του εγχειριδίου ή τεχνολογίες δειγμάτων και προσδιορισμών (για πληροφορίες επικοινωνίας, βλ. «Πληροφορίες επικοινωνίας», σελίδα 51).

## Σχόλια και προτάσεις

---

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

- α) Κακή ποιότητα RNA Πάντοτε να ελέγχετε την ποιότητα του RNA και τη συγκέντρωση προτού ξεκινήσετε.  
Εκτελέστε ένα θετικό μάρτυρα RNA κυτταρικής σειράς (κιτ *ipsogen* BCR-ABL1 Mbcf Controls, αρ. καταλόγου 670191) παράλληλα.
- β) Αποτυχία βήματος αναστροφής μεταγραφής Πάντοτε να ελέγχετε την ποιότητα του RNA και τη συγκέντρωση προτού ξεκινήσετε.  
Εκτελέστε ένα θετικό μάρτυρα RNA κυτταρικής σειράς (κιτ *ipsogen* BCR-ABL1 Mbcf Controls, αρ. καταλόγου 670191) παράλληλα.

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

- α) Κακή ποιότητα RNA Πάντοτε να ελέγχετε την ποιότητα του RNA και τη συγκέντρωση προτού ξεκινήσετε.  
Εκτελέστε ένα θετικό μάρτυρα RNA κυτταρικής σειράς (κιτ *ipsogen* BCR-ABL1 Mbcf Controls, αρ. καταλόγου 670191) παράλληλα.
- β) Αποτυχία βήματος αναστροφής μεταγραφής Πάντοτε να ελέγχετε την ποιότητα του RNA και τη συγκέντρωση προτού ξεκινήσετε.  
Εκτελέστε ένα θετικό μάρτυρα RNA κυτταρικής σειράς (κιτ *ipsogen* BCR-ABL1 Mbcf Controls, αρ. καταλόγου 670191) παράλληλα.

### Αρνητικό σήμα προτύπου

- a) Σφάλμα διανομής με πιπέτα Ελέγξτε το σχήμα διανομής με πιπέτα και την προετοιμασία της αντίδρασης.  
Επαναλάβετε την εκτέλεση PCR.
- b) Ακατάλληλη φύλαξη των συστατικών του κιτ Φυλάσσετε το κιτ *ipsogen* BCR-ABL1 Mbcf στους  $-15$  έως  $-30^{\circ}\text{C}$  και διατηρείτε τους εκκινητές και τα μείγματα ιχνηθετών (PPC και PPF) προστατευμένα από το φως. Βλ. «Φύλαξη και χειρισμός αντιδραστηρίων», σελίδα 14.  
Αποφεύγετε την επαναλαμβανόμενη κατάψυξη και απόψυξη.  
Φυλάσσετε τα αντιδραστήρια σε κλάσματα.



## Σχόλια και προτάσεις

---

### Οι αρνητικοί μάρτυρες είναι θετικοί

Διασταυρούμενη μόλυνση

Αντικαταστήστε όλα τα κρίσιμα αντιδραστήρια.

Επαναλάβετε το πείραμα με νέα κλάσματα όλων των αντιδραστηρίων.

Πάντοτε να χειρίζεστε τα δείγματα, τα συστατικά του κιτ και τα αναλώσιμα σύμφωνα με τις κοινώς αποδεκτές πρακτικές προκειμένου να αποφύγετε επιμόλυνση από μεταφορά.

### Απουσία σήματος, ακόμα και στους πρότυπους μάρτυρες

a) Σφάλμα διανομής με πιπέτα ή παράλειψη αντιδραστηρίων

Ελέγξτε το σχήμα διανομής με πιπέτα και την προετοιμασία της αντίδρασης.

Επαναλάβετε την εκτέλεση PCR.

b) Ανασταλτικές επιδράσεις του υλικού του δείγματος, προκαλούμενες από ανεπαρκή καθαρισμό

Επαναλάβετε την προετοιμασία RNA.

c) LightCycler: Επιλέχθηκε λανθασμένο κανάλι ανίχνευσης

Ορίστε τη ρύθμιση καναλιού σε F1/F2 ή 530 nm/640 nm.

d) LightCycler: Δεν προγραμματίστηκε λήψη δεδομένων

Ελέγξτε τα προγράμματα κύκλων.

Επιλέξτε τη λειτουργία λήψης «Single» (μονό) στο τέλος κάθε τμήματος ανασύνδεσης του προγράμματος PCR.

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

a) Κακή ποιότητα RNA ή χαμηλή συγκέντρωση

Πάντοτε να ελέγχετε την ποιότητα του RNA και τη συγκέντρωση προτού ξεκινήσετε.

Εκτελέστε ένα θετικό μάρτυρα RNA κυτταρικής σειράς (κιτ *ipsogen* BCR-ABL1 Mbcr Controls, αρ. καταλόγου 670191) παράλληλα.

β) Αποτυχία βήματος αναστροφής μεταγραφής

Πάντοτε να ελέγχετε την ποιότητα του RNA και τη συγκέντρωση προτού ξεκινήσετε.

Εκτελέστε ένα θετικό μάρτυρα RNA κυτταρικής σειράς (κιτ *ipsogen* BCR-ABL1 Mbcr Controls, αρ. καταλόγου 670191) παράλληλα.

## Σχόλια και προτάσεις

---

### Η ένταση του φθορισμού είναι πολύ χαμηλή

- a) Ακατάλληλη φύλαξη των συστατικών του κιτ Φυλάσσετε το κιτ *ipsogen* BCR-ABL1 Mbcf στους  $-15$  έως  $-30^{\circ}\text{C}$  και διατηρείτε τους εκκινητές και τα μείγματα ιχνηθετών (PPC και PPF) προστατευμένα από το φως. Βλ. «Φύλαξη και χειρισμός αντιδραστηρίων», σελίδα 14.  
Αποφεύγετε την επαναλαμβανόμενη κατάψυξη και απόψυξη.  
Φυλάσσετε τα αντιδραστήρια σε κλάσματα.
- b) Πολύ χαμηλή αρχική ποσότητα RNA-στόχου Αυξήστε την ποσότητα του RNA δείγματος.  
**Σημείωση:** Ανάλογα με την επιλεγμένη μέθοδο προετοιμασίας RNA, ενδέχεται να υπάρξουν ανασταλτικές επιδράσεις.

### LightCycler: Η ένταση φθορισμού ποικίλλει

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

### LightCycler: Σφάλμα της πρότυπης καμπύλης

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

## Ποιοτικός έλεγχος

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

Πιστοποιητικά ανάλυσης είναι διαθέσιμα κατόπιν αιτήματος στο [www.qiagen.com/support/](http://www.qiagen.com/support/).

## Περιορισμοί

Οι χρήστες πρέπει να έχουν εκπαιδευτεί και εξοικειωθεί με την τεχνολογία πριν από τη χρήση αυτής της συσκευής.

Κάθε παραγόμενο διαγνωστικό αποτέλεσμα θα πρέπει να ερμηνεύεται στο πλαίσιο των υπόλοιπων κλινικών ή εργαστηριακών ευρημάτων. Η επαλήθευση της απόδοσης του συστήματος για οποιεσδήποτε διαδικασίες που εφαρμόζονται στο εκάστοτε εργαστήριο και δεν καλύπτονται από τις μελέτες αξιολόγησης απόδοσης της QIAGEN αποτελούν ευθύνη του χρήστη.

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

Σημείωση: Το κιτ έχει σχεδιαστεί σύμφωνα με τις μελέτες «Europe Against Cancer» (Η Ευρώπη κατά του καρκίνου, EAC) (8), και συμμορφώνεται με τις ενημερωμένες διεθνείς συστάσεις (3, 5). Πρέπει να χρησιμοποιείται σύμφωνα με τις οδηγίες που παρέχονται στο παρόν εγχειρίδιο, σε συνδυασμό με επικυρωμένα αντιδραστήρια και όργανα (βλ. «Απαιτούμενα υλικά που δεν παρέχονται», σελίδα 12). Οποιαδήποτε μη προβλεπόμενη χρήση αυτού του προϊόντος ή/και τροποποίηση των συστατικών θα επισύρει ακύρωση της ευθύνης της QIAGEN.

## Χαρακτηριστικά απόδοσης

### Μη κλινικές μελέτες

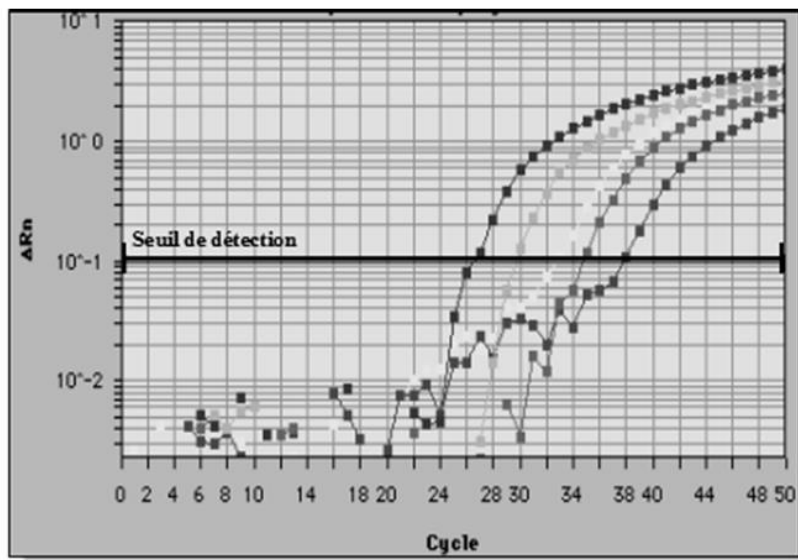
#### Υλικά και μέθοδοι

Η αξιολόγηση της απόδοσης διενεργήθηκε σε ένα ABI PRISM 7700 SDS, σε συνδυασμό με αντιδραστήρια που παρατίθενται στην ενότητα «Απαιτούμενα υλικά που δεν παρέχονται», σελίδα 12. Μελέτες ισοδυναμίας επικύρωσαν τη χρήση του στα ακόλουθα όργανα: ABI PRISM 7000 και 7900HT SDS, όργανα LightCycler 1.2 και 480, Rotor

Μη κλινικές μελέτες διενεργήθηκαν για τον καθορισμό της αναλυτικής απόδοσης του κιτ *ipsogen* BCR-ABL1 Mbcf. Αυτές οι μη κλινικές εργαστηριακές μελέτες διενεργήθηκαν σε ολικό RNA από την K562 κυτταρική σειρά αραιωμένο σε μια σταθερή τελική ποσότητα ολικού RNA MV4-11 κυτταρικής σειράς.

Για τον καθορισμό της επαναληψιμότητας του προσδιορισμού, 5 διαφορετικές συγκεντρώσεις του K562 ολικού RNA (5 ng, 500 pg, 50 pg, 5 pg και 0,5 pg) αραιωμένες σε MV4-11 ολικό RNA, σε σταθερό τελικό συνολικό όγκο 200 ng, αναλύθηκαν σε 5 θυγατρικούς κλώνους ανά εκτέλεση και σε 4 διαφορετικές εκτελέσεις (Εικόνα 11).

- K562  $2,5 \times 10^{-2}$
- ▣ K562  $2,5 \times 10^{-3}$
- K562  $2,5 \times 10^{-4}$
- ▤ K562  $2,5 \times 10^{-5}$
- ▥ K562  $2,5 \times 10^{-6}$



Εικόνα 11. Διαγράμματα ενίσχυσης αραιώσεων  $2,5 \times 10^{-2}$  (5 ng),  $2,5 \times 10^{-4}$  (0,05 ng),  $2,5 \times 10^{-5}$  (0,005 ng) και  $2,5 \times 10^{-6}$  (0,0005 ng) K562 ολικού RNA σε MV4-11 αρνητικό ολικό RNA.

### Αναλυτικά δεδομένα

Οι Πίνακες 17–20 δείχνουν τις αναλύσεις μεταξύ προσδιορισμών με το μέσο κύκλο κατωφλίου ( $C_T$ ), τυπική απόκλιση (TA), αριθμό δειγμάτων (n), συντελεστή διακύμανσης (ΣΔ), μέσο αριθμό αντιγράφων (CN), και μέσο κανονικοποιημένο αριθμό αντιγράφων (NCN).

### Πίνακας 17. Ανάλυση μεταξύ προσδιορισμών — BCR-ABL Mbcf και ABL κυτταρικών σειρών

Κυτταρική σειρά	Αραίωση	Μέσος $C_T$	TA	n	ΣΔ (%)
BCR-ABL Mbcf	$2,5 \times 10^{-2}$ (5 ng/200 ng)	26,18	0,40	20	1,54
	$2,5 \times 10^{-3}$ (0,5 ng/200 ng)	29,32	0,53	19	1,82
	$2,5 \times 10^{-4}$ (0,05 ng/200 ng)	32,62	0,62	20	1,91
ABL	—	23,59	0,20	95	0,83

**Πίνακας 18. Ανάλυση μεταξύ προσδιορισμών — πλασμίδια**

Γονίδιο	Πλασμίδιο	Μέσος C <sub>T</sub>	TA	n	ΣΔ (%)
BCR- ABL Mbc <sub>r</sub>	F1 (10 <sup>1</sup> αντίγραφα)	34,47	1,25	8	3,64
	F2 (10 <sup>2</sup> αντίγραφα)	31,48	0,54	8	1,71
	F3 (10 <sup>3</sup> αντίγραφα)	28,17	1,11	7	3,95
	F4 (10 <sup>5</sup> αντίγραφα)	21,20	0,65	8	3,06
	F5 (10 <sup>6</sup> αντίγραφα)	18,22	0,09	6	0,49
ABL	C1 (10 <sup>3</sup> αντίγραφα)	28,47	0,34	8	1,18
	C2 (10 <sup>4</sup> αντίγραφα)	25,25	0,31	8	1,22
	C3 (10 <sup>5</sup> αντίγραφα)	21,92	0,70	8	3,19

**Πίνακας 19. Ανάλυση μεταξύ προσδιορισμών — BCR-ABL Mbc<sub>r</sub> και ABL κυτταρικών σειρών (μέσος CN)**

Κυτταρική σειρά	Αραίωση	Μέσος CN	TA	n	ΣΔ (%)
BCR-ABL Mbc <sub>r</sub>	2,5 x 10 <sup>-2</sup> (5 ng/200 ng)	4.134,27	2.512,40	20	60,77
	2,5 x 10 <sup>-3</sup> (0,5 ng/200 ng)	512,8	479,51	19	93,51
	2,5 x 10 <sup>-4</sup> (0,05 ng/200 ng)	42,94	22,05	20	51,36
ABL	—	33.831,51	13.637,7	94	40,31

**Πίνακας 20. Ανάλυση μεταξύ προσδιορισμών — BCR-ABL Mbcf κυτταρικής σειράς (μέσος NCN)**

Κυτταρική σειρά	Αραίωση	Μέσος NCN*	TA	n	ΣΔ (%)
BCR-ABL Mbcf	$2,5 \times 10^{-2}$ (5 ng/200 ng)	12,6338	532,79	20	42,17
	$2,5 \times 10^{-3}$ (0,5 ng/200 ng)	1,1605	94,69	19	81,61
	$2,5 \times 10^{-4}$ (0,05 ng/200 ng)	0,1782	10,73	20	60,23

\* Για αυτά τα αποτελέσματα μελέτης μόνο, ο NCN δίνεται ως  $\frac{Mbcf_{CN}}{ABL_{CN}} \times 100$ .

## Κλινικές μελέτες

Η αξιολόγηση της απόδοσης διενεργήθηκε σε ένα ABI PRISM 7700 SDS, σε συνδυασμό με αντιδραστήρια που παρατίθενται στην ενότητα «Απαιτούμενα υλικά που δεν παρέχονται», σελίδα 12. Μελέτες ισοδυναμίας επικύρωσαν τη χρήση του στα ακόλουθα όργανα: ABI PRISM 7000 και 7900HT SDS, όργανα LightCycler 1.2 και 480, Rotor

Μια ομάδα 26 εργαστηρίων, σε 10 Ευρωπαϊκές χώρες, οργανωμένα σε μια συντονισμένη δράση του Europe Against Cancer (EAC), χρησιμοποίησαν πλασμίδια παρεχόμενα από την IPSOGEN για να καθορίσουν ένα τυποποιημένο πρωτόκολλο για την ανάλυση qPCR των κύριων σχετιζόμενων με τη λευχαιμία γονιδίων σύντηξης στο κλινικό περιβάλλον. Το μεταγράφημα BCR-ABL p210 ήταν ένα από τα γονίδια σύντηξης (FG) που συμπεριλήφθηκαν στη μελέτη. Παρουσιάζουμε εδώ μια σύνοψη αυτής της μελέτης επικύρωσης. Τα πλήρη αποτελέσματα έχουν δημοσιευθεί (8, 10).

## Επαναληψιμότητα μεταξύ εργαστηρίων για τα πρότυπα πλασμιδίων CG και FG

Ένδεκα εργαστήρια πραγματοποίησαν ένα πείραμα επαναληψιμότητας μεταξύ εργαστηρίων για την αξιολόγηση της διακύμανσης στη μέτρηση των πρότυπων αραιωμένων διαλυμάτων πλασμιδίων CG και FG. Τα αραιωμένα διαλύματα εκτελέστηκαν εις διπλούν σε κάθε εγκατάσταση. Ο Πίνακας 21 αναφέρει τη μέση τιμή, την τυπική απόκλιση και τον ΣΔ (%) για κάθε αραιωμένο διάλυμα.

**Πίνακας 21. Επαναληψιμότητα μεταξύ εργαστηρίων για τα πρότυπα πλασμιδίων CG και FG**

Γονίδιο	Αραίωση	Μέσος όρος	C <sub>T</sub> TA	ΣΔ (%)
Γονίδιο-μάρτυρας ABL	C1	29,59	1,34	4,54
	C2	26,33	1,02	3,90
	C3	22,75	1,59	6,97
Γονίδιο σύντηξης BCR-ABL p210	F1	41,11	2,26	5,50
	F2	37,43	1,51	4,04
	F3	33,76	1,28	3,81
	F4	26,50	1,03	3,90
	F5	22,98	0,97	4,21

#### Τιμές έκφρασης του μεταγραφήματος BCR-ABL Mbcf FG

Οι Πίνακες 22 και 23 δείχνουν τις τιμές έκφρασης μεταγραφήματος BCR-ABL Mbcf FG και ABL CG, για την K562 κυτταρική σειρά, σε ασθενείς με ΧΜΛ και and ΟΛΛ κατά τη διάγνωση και φυσιολογικούς ασθενείς.

**Πίνακας 22. Τιμές έκφρασης μεταγραφήματος BCR-ABL Mbcf FG και ABL CG — Τιμές C<sub>T</sub>**

	Τιμές C <sub>T</sub> (95% εύρος)	
	BCR-ABL Mbcf	ABL
<b>K562 κυτταρική σειρά</b>	20,5	20,7
<b>Δείγματα ασθενών με ΧΜΛ</b>		
ΜΟ (n = 15)	25,1 (21,5–27,0)	25,2 (20,7–26,8)
ΠΑ (n = 14)	23,1 (21,9–25,8)	23,7 (22,6–26,7)
<b>Δείγματα ασθενών με ΟΛΛ</b>		
ΜΟ και ΠΑ (n = 17)	24,1 (21,5–29,9)	24,0 (21,6–26,4)
<b>Αρνητικά δείγματα ασθενών</b>		
ΜΟ (n = 26)	–	25,35 (24,68–26,02)
ΠΑ (n = 74)	–	25,15 (24,83–25,48)

**Πίνακας 23. Τιμές έκφρασης μεταγραφήματος BCR-ABL Mbcf FG και ABL CG — Τιμές CN και αναλογίας**

	Τιμές CN (95% εύρος)		Τιμές αναλογίας (95% εύρος)*
	BCR-ABL Mbcf	ABL	CN BCR-ABL Mbcf/CN ABL
<b>Δείγματα ασθενών με ΧΜΛ</b>			
ΜΟ (n = 15)	8.710 (2.089–112.202)	10.115,8 (4.786,3–37.153,52)	0,86 (0,44–3,02)
ΠΑ (n = 14)	17.783 (2.042–112.202)	15.237 (4246.2–25.568,3)	1,17 (0,48–4,41)
<b>Αρνητικά δείγματα ασθενών</b>			
ΜΟ (n = 26)	–	19.201 (12.922–25.480)	–
ΠΑ (n = 74)	–	21.136 (17.834–24.437)	–

\* Τα αποτελέσματα εκφράζονται ως απλές αναλογίες BCR-ABL/ABL.

Οι τιμές ABL C<sub>T</sub> δεν διέφεραν σημαντικά μεταξύ των φυσιολογικών και των λευχαιμικών δειγμάτων, ούτε μεταξύ των τύπων δειγμάτων (ΠΑ ή ΜΟ) ή των λευχαιμικών δειγμάτων (ΟΛΛ, ΑΜΛ, ΧΜΛ).

### Ποσοστά ψευδών θετικών και ψευδών αρνητικών

Τα ποσοστά των ψευδών θετικών και ψευδών αρνητικών υπολογίστηκαν χρησιμοποιώντας τους ακόλουθους μάρτυρες.

- Θετικοί μάρτυρες: K562 κύτταρα, μια κυτταρική σειρά γνωστή για τη θετικότητά της για το γονίδιο σύντηξης BCR
- Αρνητικοί μάρτυρες: Αρνητικά δείγματα RNA, μάρτυρες μη ενίσχυσης (NAC) από *E. coli* RNA αντί για ανθρώπινο RNA για τον έλεγχο για επιμόλυνση PCR, και μάρτυρες χωρίς μήτρα (NTC), οι οποίοι περιείχαν νερό αντί για ανθρώπινο RNA

Ενίσχυση στα δείγματα RNA του FG διενεργήθηκε εις τριπλούν, και εις διπλούν για CG.

Ένα ψευδές αρνητικό δείγμα ορίστηκε ως ένα θετικό δείγμα RNA με λιγότερο από 50% θετικών φρεατίων (0/2, 0/3 ή 1/3).

Ένα ψευδές θετικό δείγμα ορίστηκε ως ένα αρνητικό δείγμα με τουλάχιστον 50% θετικών φρεατίων (1/2, 2/3 ή 3/3).



Ο Πίνακας 24 δείχνει τον αριθμό και το ποσοστό των ψευδών αρνητικών και ψευδών θετικών δειγμάτων.

**Πίνακας 24. Ψευδή αρνητικά και ψευδή θετικά δείγματα**

Ψευδής αρνητικότητα		Ψευδής θετικότητα	
$10^{-3}$	$10^{-4}$	Αρνητικός μάρτυρας FG	NAC/NTC
0% (0/33)	6,1% (2/33)	10,9% (6/55)	4,1% (14/340)

## Βιβλιογραφία

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

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

### Παρατιθέμενη βιβλιογραφία

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. Silvy, M., Mancini, J., Thirion, X., Sigaux, F., and Gabert, J. (2005) Evaluation of real-time quantitative PCR machines for the monitoring of fusion gene transcripts using the Europe against cancer protocol. *Leukemia* **19**, 305.
10. 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.

## Σύμβολα

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



<N>

Περιέχει αντιδραστήρια που επαρκούν για <N> αντιδράσεις



Ημερομηνία λήξης



In vitro διαγνωστικό ιατροτεχνολογικό προϊόν



Αριθμός καταλόγου



Αριθμός παρτίδας



Αριθμός υλικού



Διεθνής κωδικός μονάδας εμπορίας



Περιορισμός θερμοκρασίας



Κατασκευαστής



Συμβουλευθείτε τις οδηγίες χρήσης

## Πληροφορίες επικοινωνίας

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

## Πληροφορίες παραγγελίας

Προϊόν	Περιεχόμενα	Αρ. καταλ.
<i>ipsogen</i> BCR-ABL1 Mbcf Kit (24)	Για 24 αντιδράσεις: Πρότυπα γονιδίου-μάρτυρα ABL, πρότυπα γονιδίου σύντηξης BCR-ABL Mbcf, εκκινητής και μείγμα ιχνηθετών ABL, εκκινητής και μείγμα ιχνηθετών γονιδίου σύντηξης BCR-ABL Mbcf	670123
<b>Rotor-Gene Q MDx — για επικυρωμένη για IVD ανάλυση PCR πραγματικού χρόνου σε κλινικές εφαρμογές</b>		
Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM Platform	Κυκλοποιητής PCR πραγματικού χρόνου και αναλυτής Melt υψηλής ανάλυσης με 5 κανάλια (πράσινο, κίτρινο, πορτοκαλί, κόκκινο, μπορντώ) και κανάλι HRM, φορητός υπολογιστής, λογισμικό, παρελκόμενα, εγγύηση 1 έτους στα εξαρτήματα και την εργασία, δεν περιλαμβάνει εγκατάσταση και κατάρτιση	9002032
Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM System	Κυκλοποιητής PCR πραγματικού χρόνου και αναλυτής Melt υψηλής ανάλυσης με 5 κανάλια (πράσινο, κίτρινο, πορτοκαλί, κόκκινο, μπορντώ) και κανάλι HRM, φορητός υπολογιστής, λογισμικό, παρελκόμενα, εγγύηση 1 έτους στα εξαρτήματα και την εργασία, εγκατάσταση και κατάρτιση	9002033
<b>Κιτ <i>ipsogen</i> BCR-ABL1 Mbcf Controls — για ποσοτική επικύρωση της εκχύλισης RNA και της ανάστροφης μεταγραφής του γονιδίου σύντηξης BCR-ABL Mbcf</b>		
<i>ipsogen</i> BCR-ABL1 Mbcf Controls Kit	Κυτταρικές σειρές με αρνητική, υψηλή και χαμηλή θετική έκφραση του γονιδίου σύντηξης BCR-ABL Mbcf	670191

Για τις τρέχουσες πληροφορίες άδειας και αποποιήσεις σχετικά με συγκεκριμένα προϊόντα, ανατρέξτε στο σχετικό εγχειρίδιο ή οδηγίες χρήσης του κιτ QIAGEN. Τα εγχειρίδια και οι οδηγίες χρήσης των κιτ QIAGEN είναι διαθέσιμα στη διεύθυνση [www.qiagen.com](http://www.qiagen.com). Μπορείτε επίσης να τα ζητήσετε από τις Τεχνικές Υπηρεσίες της QIAGEN ή τον τοπικό σας αντιπρόσωπο.

Αυτή η σελίδα έχει παραμείνει σκοπίμως κενή

Αυτή η σελίδα έχει παραμείνει σκοπίμως κενή

Αυτή η σελίδα έχει παραμείνει σκοπίμως κενή





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

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

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

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

### Άδεια περιορισμένης χρήσης

Η χρήση αυτού του προϊόντος ισοδυναμεί με την αποδοχή από πλευράς οποιουδήποτε αγοραστή ή χρήστη του κιτ *ipsogen* BCR-ABL1 Mbc των εξής όρων:

1. Η χρήση του κιτ *ipsogen* BCR-ABL1 Mbc επιτρέπεται μόνο σύμφωνα με το *Εγχειρίδιο κιτ ipsogen BCR-ABL1 Mbc* και μόνο μαζί με τα συστατικά που περιέχει το κιτ. Η QIAGEN δεν παρέχει άδεια χρήσης υπό οποιαδήποτε πνευματική ιδιοκτησία της για τη χρήση ή ενσωμάτωση των παρεχόμενων συστατικών αυτού του κιτ σε οποιαδήποτε συστατικά που δεν περιλαμβάνονται σε αυτό το κιτ, εκτός και αν περιγράφεται διαφορετικά στο *Εγχειρίδιο κιτ ipsogen BCR-ABL1 Mbc* και πρόσθετα πρωτόκολλα στη διεύθυνση [www.qiagen.com](http://www.qiagen.com).
2. Με την εξαίρεση των ρητά αναφερόμενων αδειών, η QIAGEN δεν παρέχει καμία εγγύηση πως αυτό το κιτ και/ή η χρήση/-εις του δεν παραβιάζουν τα δικαιώματα τρίτων.
3. Αυτό το κιτ και τα συστατικά του φέρουν άδεια χρήσης για μία μόνο χρήση και δεν επιτρέπεται η επανάχρηση, η εκ νέου επεξεργασία ή η μεταπώλησή του.
4. Η QIAGEN αποποιείται ειδικά οποιοσδήποτε άλλες άδειες, ρητές ή έμμεσες εκτός από αυτές που αναφέρονται ρητά.
5. Ο αγοραστής ή ο χρήστης του κιτ συμφωνεί να μην προβεί και να μην επιτρέψει σε κανέναν άλλο να προβεί σε οποιοσδήποτε ενέργειες που θα μπορούσαν να οδηγήσουν σε ή να διευκολύνουν οποιοσδήποτε πράξεις που απαγορεύονται σύμφωνα με τα προαναφερθέντα. Η QIAGEN διατηρεί το δικαίωμα να επιβάλλει τις απαγορεύσεις της παρούσας Άδειας περιορισμένης χρήσης σε οποιοδήποτε δικαστήριο και θα αποζημιωθεί για όλες τις δαπάνες ανάκρισης και δικαστηρίου, συμπεριλαμβανομένων των δαπανών υπεράσπισης στο πλαίσιο οποιασδήποτε ενέργειας για την επιβολή αυτής της Άδειας περιορισμένης χρήσης ή οποιοδήποτε των πνευματικών δικαιωμάτων της σχετικά με το κιτ και/ή τα συστατικά του.

Για τους ενημερωμένους όρους της άδειας, βλ. [www.qiagen.com](http://www.qiagen.com).

HB-1360-002 © 2013–2015 QIAGEN, με την επιφύλαξη κάθε δικαιώματος.

---

**www.qiagen.com**

**Australia** ■ techservice-au@qiagen.com

**Austria** ■ techservice-at@qiagen.com

**Belgium** ■ techservice-bnl@qiagen.com

**Brazil** ■ suportetecnico.brasil@qiagen.com

**Canada** ■ techservice-ca@qiagen.com

**China** ■ techservice-cn@qiagen.com

**Denmark** ■ techservice-nordic@qiagen.com

**Finland** ■ techservice-nordic@qiagen.com

**France** ■ techservice-fr@qiagen.com

**Germany** ■ techservice-de@qiagen.com

**Hong Kong** ■ techservice-hk@qiagen.com

**India** ■ techservice-india@qiagen.com

**Ireland** ■ techservice-uk@qiagen.com

**Italy** ■ techservice-it@qiagen.com

**Japan** ■ techservice-jp@qiagen.com

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

**Luxembourg** ■ techservice-bnl@qiagen.com

**Mexico** ■ techservice-mx@qiagen.com

**The Netherlands** ■ techservice-bnl@qiagen.com

**Norway** ■ techservice-nordic@qiagen.com

**Singapore** ■ techservice-sg@qiagen.com

**Sweden** ■ techservice-nordic@qiagen.com

**Switzerland** ■ techservice-ch@qiagen.com

**UK** ■ techservice-uk@qiagen.com

**USA** ■ techservice-us@qiagen.com

