

ipsogen[®] BCR-ABL1 Mbcr Kit rokasgrāmata



1. versija

IVD

Kvantitatīvā analīze *in vitro* diagnostikā

Lietošanai ar Rotor-Gene[®] Q, ABI PRISM[®], LightCycler[®] un
SmartCycler[®] instrumentu



REF

670123



QIAGEN GmbH, QIAGEN Strasse 1, 40724 Hilden, VĀCIJA

R2

MAT

1072507LV



QIAGEN Sample and Assay Technologies

QIAGEN ir vadošais inovatīvu paraugu un analīžu tehnoloģiju piegādātājs, kas spēj nodrošināt jebkura bioloģiska parauga satura izolēšanu un noteikšanu. Mūsu mūsdienīgie augstas kvalitātes izstrādājumi un pakalpojumi garantē sekmīgu parauga apstrādi un rezultāta ieguvu.

QIAGEN nosaka tālāk norādīto procesu standartus.

- DNS, RNS un olbaltumvielu izdalīšana
- Nukleīnskābju un olbaltumvielu analīzes
- mikroRNS izpēte un RNSi
- Paraugu un analīžu tehnoloģiju automatizācija

Mūsu mērķis ir nodrošināt iespēju iegūt izcilus rezultātus un sasniegumus. Lai iegūtu sīkāku informāciju, apmeklējiet vietni www.qiagen.com.

Saturs

Paredzētais lietojums	4
Kopsavilkums un skaidrojums	4
Slimības uzraudzība	4
Procedūras princips	7
Nodrošinātie materiāli	9
Komplekta saturs	9
Nepieciešamie materiāli, kas netiek nodrošināti	10
Brīdinājumi un piesardzības pasākumi	11
Vispārējie piesardzības pasākumi	11
Reaģentu glabāšana un lietošana	12
Procedūra	13
RNS paraugu sagatavošana	13
Protokols	
■ ieteicamā standartizētā EAC atgriezeniskā transkriptāze	13
■ qPCR instrumentos Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM vai Rotor-Gene Q 5plex HRM ar 72 stobriņu rotoru	16
■ qPCR instrumentos ABI PRISM 7000, 7700 un 7900HT SDS un LightCycler 480	20
■ qPCR instrumentos LightCycler 1.2 un 2.0	25
■ qPCR instrumentā SmartCycler	29
Rezultātu interpretācija	32
Datu analīzes princips	32
Rezultāti	33
Problēmu novēršanas ieteikumi	35
Kvalitātes kontrole	38
Ierobežojumi	39
Veiktspējas raksturojums	39
Neklīniskie pētījumi	39
Klīniskie pētījumi	42
Atsauces	44
Simboli	46
Kontaktinformācija	46
Informācija par pasūtīšanu	47

Paredzētais lietojums

ipsogen BCR-ABL1 Mbc Kit ir paredzēts, lai noteiktu BCR-ABL p210 b2a2 vai b3a2 transkriptu daudzumu kaulu smadzeņu vai perifērisko asiņu paraugos, kas ņemti no pacientiem ar akūtu limfoblastu leukēmiju (ALL) vai hronisku mieloīdu leukēmiju (HML), kuri iepriekš tika diagnosticēti ar BCR-ABL Mbc apvienoto gēnu (Fusion Gene, FG). Tests paredzēts, lai novērtētu molekulārās reakcijas līmeni; rezultātus var izmantot minimālās atlikušās slimības novērošanai.

Kopsavilkums un skaidrojums

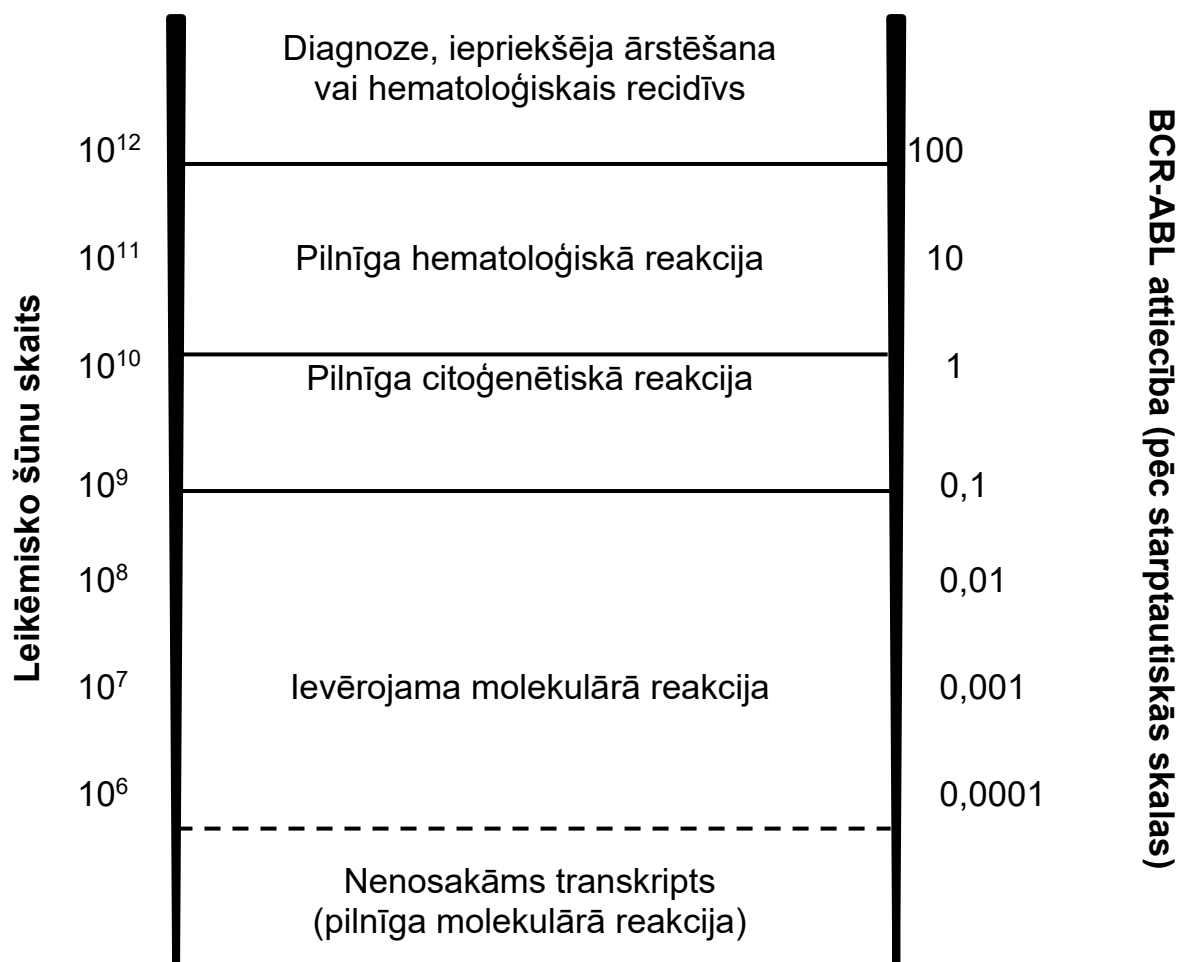
HML pieder pie mieloproliferatīvo neoplazmu grupas, un > 90 % gadījumu to raksturo Filadelfijas hromosomas (Philadelphia chromosome, Ph CHRS) klātbūtne.

Šo hromosomu veido reciproka translokācija starp 9. un 22. hromosomas, t(9;22), garajiem pleciem, turklāt BCR (pārrāvumu klasteru reģions) atrodas 22. hromosomā un c-ABL onkogēns atrodas 9. hromosomā. Attiecīgais apvienotais gēns, BCR-ABL, tiek transkribēts 8,5 kb mRNS virknē kopā ar 2 krustojuma variantiem b2a2 (40 % gadījumu) un b3a2 (55 % gadījumu). Tas šifrē hibrīdu proteīnu, p210, ar palielinātu tirozīnkināzes aktivitāti. b2a3 un b3a3 transkripts mēdz būt mazāk nekā 5 % gadījumu. Pieaugušiem ALL pacientiem 35 % gadījumu var tikt novērota arī Ph hromosoma.

HML sastopamība gadā ir aptuveni 1–2 gadījumi uz 100 000 cilvēku, un HML veido 20 % pieaugušo leukēmiju. Klīniski tā tiek izteikta kā pārmērīgs skaits mieloīdu šūnu, kas normāli diferencējas un funkcionē. HML pacienti 90–95 % gadījumu tiek diagnosticēti hroniskā vai stabilā slimības fāzē. Kā novērots, vidēji 4 līdz 6 gadu laikā pacienti sasniedza paātrināto fāzi, izraisot blastu krīzi un akūtu leukēmiju, kas vienmēr ir letāla. Imatiniba un pēdējā laikā arī otrās paaudzes tirozīnkināzes inhibitoru (Tyrosine Kinase Inhibitors, TKI) izmantošana ievērojami mainīja slimības ierasto gaitu: lielākajai daļai pacientu tagad ir remisija un viņiem ir nepieciešama ilgstoša novērošana un slimības uzraudzība.

Slimības uzraudzība

Šobrīd HML terapijas mērķis ir panākt 100 % izdzīvošanu un Ph hromosomas negatīvu rādītāju. Līdz ar to ir būtiska slimības uzraudzība, lai novērtētu atbildes reakciju uz ārstēšanu un noteiktu agrīnu recidīvu katram pacientam. Veicot TKI terapiju, parasti pacienti pāriet no hematoloģiskās uz citoģenētisko un tad uz molekulāro remisiju, kas atbilst samazinātam leukēmisko šūnu BCR-ABL transkriptu skaitam, kā norādīts tālāk redzamajā 1. attēlā.



1. attēls. Pielāgots no 1. atsauces.

Standarta metode audzēja masas noteikšanai HML pacientiem ir kaulu smadzeņu (Bone Marrow, BM) metafāžu parastā citoģenētiskā analīze (G joslas). Citoģenētiskā reakcija tiek novērtēta vismaz 20 kaulu smadzeņu metafāzēs. Citoģenētiskās reakcijas līmenis tiek noteikts, ņemot vērā Ph hromosomas pozitīvo metafāžu procentuālo daudzumu (skatīt 1. tabulu, 2. atsauci). Tomēr šis novērtējums ir atkarīgs no laboratorijas rezultātiem un tam ir zema jutība — 5 %, analizējot 20 metafāzes.

Tagad reāllaika kvantitatīvā polimerāzes ķēdes reakcija (quantitative Polymerase Chain Reaction, qPCR), ar kuru perifērisko asiņu (Peripheral Blood, PB) parauga materiālos nosaka BCR-ABL MbcR mRNS daudzumu, ir daļa no slimības uzraudzības metodēm HML ārstēšanā. Šī metode ir ne tik invazīva kā standarta kaulu smadzeņu metafāžu citoģenētika, kā arī tā ir jutīgāka.

Nesen tika atjaunināti arī ieteikumi HML slimības uzraudzībai, lai iekļautu jaunus klīnisko pētījumu klīniskos pierādījumus, kā arī iekļautu uzlabotus slimības uzraudzības mērķus un palīglīdzekļus. Jaunākos ieteikumus par reakcijas definēšanu un pacientu, kuri saņem imatiniba terapiju, uzraudzību sniedz ELN (European Leukaemia Net — Eiropas Leikozes tīkls) eksperti (2).

Tehniskajā ziņā starptautiskie eksperti ir centušies saskaņot BCR-ABL MbcR testēšanu un ziņošanu (3–5). Turklāt nesen PVO aizbildnībā tika apstiprināts

atsauces panelis, lai varētu vienkārši standartizēt BCR-ABL daudzuma noteikšanu (6).

1. tabula. Starptautiskie ieteikumi par HML pacientu pārvaldību (pielāgots no 2. atsauces)

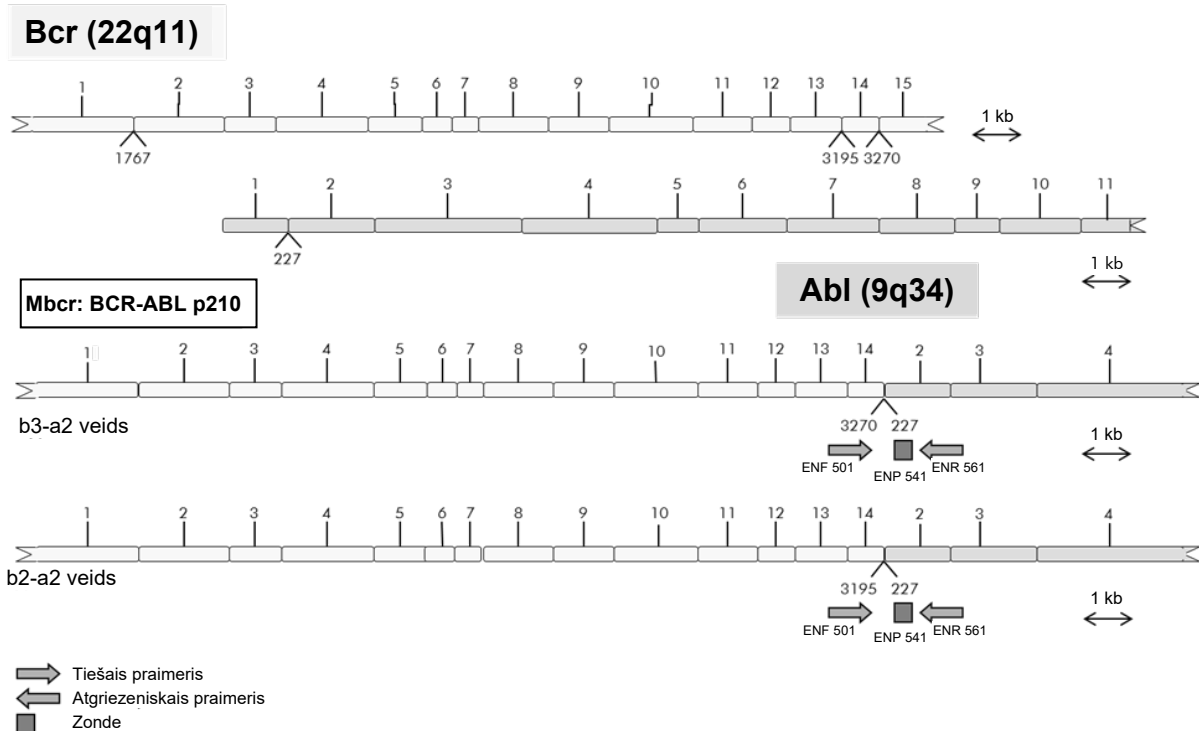
	Hematoloģiskā reakcija	Citoģenētiskā reakcija	Molekulārā reakcija (BCR-ABL, lai kontrolētu gēnu attiecību saskaņā ar starptautisko skalu)
Definīcijas	<p>Pabeigts: Trombocītu skaits < 450 x 10⁹/litrs Balto asins šūnu skaits < 10 x 10⁹/litrs Diferenciālis bez nenobriedušiem granulocītiem un ar mazāk nekā 5 % bazofilu Nepalpējama liesa</p>	<p>Pabeigts: Ph+ 0 % Daļēji: Ph+ 1–35 % Nenožīmīgi: Ph+ 36–65 % Minimāli: Ph+ 66–95 % Nav: Ph+ > 95 %</p>	<p>“Pabeigts” nozīmē, ka transkripts ir nesaskaitāms un nenosakāms Ievērojami: ≤ 0,1</p>
Uzraudzība	<p>Pārbaudiet ik pēc 2 nedēļām, līdz ir panākta un apstiprināta pilnīga reakcija, un pēc tam 3 reizes mēnesī, ja vien nav noteikts citādi</p>	<p>Pārbaudiet vismaz ik pēc 6 mēnešiem, līdz ir panākta un apstiprināta pilnīga reakcija, un pēc tam vismaz ik pēc 12 mēnešiem</p>	<p>Ja rodas kļūme, suboptimāla reakcija vai palielināts transkriptu līmenis, pārbaudiet ik pēc 3 mēnešiem mutācijas analīzi</p>

Divos nākamajos gadījumos jābūt pilnīgai hematoloģiskai, citoģenētiskai un molekulārai reakcijai. Citoģenētiskā reakcija tiek novērtēta ar vismaz 20 kaulu smadzeņu metafāžu morfoloģisko citoģenētiku. Perifērisko asins šūnu fluorescences *in situ* hibridizācija (fluorescence *in situ* hybridization, FISH) jāizmanto tikai tad, ja kaulu smadzeņu šūnas nevar iegūt. Molekulārā reakcija tiek novērtēta perifēriskajās asins šūnās.

Procedūras princips

qPCR ļauj precīzi noteikt PCR produktu daudzumu PCR amplifikācijas procesa eksponenciālajā fāzē. Kvantitatīvos PCR datus var ātri iegūt bez apstrādes pēc PCR, veicot reāllaika fluorescējošo signālu noteikšanu PCR cikla laikā un/vai pēc tā un tādējādi ievērojami samazinot PCR produkta kontaminācijas risku. Pašlaik ir pieejami 3 galvenie qPCR metožu veidi: qPCR analīze, izmantojot SYBR® Green I Dye, qPCR analīze, izmantojot hidrolīzes zondes, un qPCR analīze, izmantojot hibridizācijas zondes.

Šajā analīzē tiek izmantots qPCR divu krāsvielu oligonukleotīdu hidrolīzes princips. PCR laikā tiešie un atgriezeniskie praimeru hibridizējas noteiktā sekvencē (2. attēls). Tajā pašā maisījumā ir divu krāsvielu oligonukleotīds. Šī zonde, kuras sastāvā ir oligonukleotīds, kas ir iezīmēts ar 5' reportera krāsvielu un pakārtotu, 3' dzēsēja krāsvielu, hibridizējas ar mērķa sekvenci PCR produktā. qPCR analīze ar hidrolīzes zondēm izmanto *Thermus aquaticus* (*Taq*) DNS polimerāzes 5'→3' eksonukleāzes aktivitāti. Ja zonde ir neskartā, reportera krāsas klātbūtnē dzēsēja krāsa samazina reportera fluorescenci, ko galvenokārt izraisa Förster veida enerģijas pārnese.

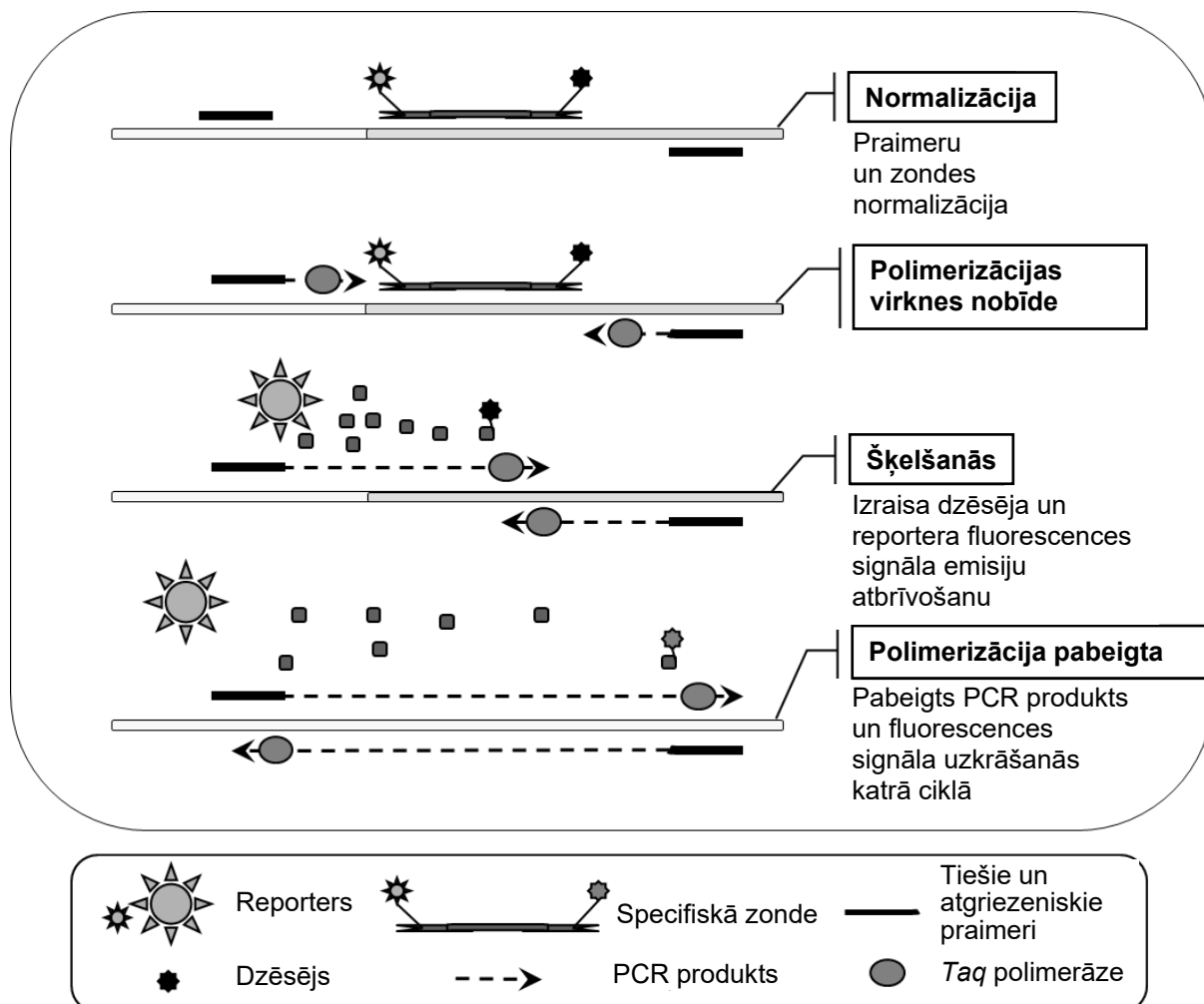


2. attēls. Shematiska diagramma ar BCR-ABL Mbcr FG transkriptu, ko aptver qPCR praimeru un zondes komplekts: ENF501–ENP541–ENR561. Skaitļi zem praimeriem un zondes norāda uz to nukleotīdu stāvokli normāla gēna transkriptā.

Ja PCR laikā ir pieejams interesējošais mērķis, zonde normalizējas īpaši starp tiešā un atgriezeniskā praimera vietām. DNS polimerāzes 5'→3' eksonukleāzes aktivitāte sašķēļ zondi starp reporteru un dzēsēju tikai tad, ja zonde hibridizējas ar mērķi. Pēc tam zondes fragmenti tiek novirzīti no mērķa, un turpinās virknes polimerizācija. Zondes 3' gals tiek bloķēts, lai novērstu

zondes pagarināšanos PCR laikā (3. attēls). Šis process notiek katrā ciklā, un tas nekavē eksponenciālu produkta uzkrāšanos.

Fluorescences signāla pieaugums tiek noteikts tikai tad, ja mērķa sekvenca ir komplementāri saistīta ar zondi un tādējādi tiek amplificēta PCR laikā. Šo prasību dēļ nespecifiskā amplifikācija netiek noteikta. Līdz ar to fluorescences pieaugums ir tieši proporcionāls mērķa amplifikācijai PCR laikā.



3. attēls. Reakcijas princips. Kopējā RNS tiek pārvērsta ar atgriezenisko transkriptāzi, un PCR veic ģenerētā cDNS amplifikāciju, izmantojot specifisku praimeru pāri un specifisku iekšējo divu krāsvielu zondi (FAM™–TAMRA™). Katras PCR normalizācijas darbības laikā zonde saistās ar amplikonu. Kad Taq DNS polimerāze pagarinās no praimera, kas ir saistīts ar amplikonu, tā nobīda zondes 5' galu, kuru pēc tam noārda Taq DNS polimerāzes 5'→3' eksonukleāzes aktivitāte. Šķelšanās turpinās līdz brīdim, kad atlikusī zonde izkausē amplikonu. Šis process šķīdumā atbrīvo fluoroforu un dzēsēju, telpiski tos atdalot un līdz ar to izraisot FAM fluorescences pieaugumu un TAMRA fluorescences samazinājumu.

Nodrošinātie materiāli

Komplekta saturs

<i>ipsogen</i> BCR-ABL1 MbcR Kit		(24)
Kataloga Nr.		670123
Reakciju skaits		24
ABL Control Gene Standard Dilution (ABL kontrolgēna standarta atšķaidījums) (10 ³ kopijas/5 µl)	C1-ABL	50 µl
ABL Control Gene Standard Dilution (ABL kontrolgēna standarta atšķaidījums) (10 ⁴ kopijas/5 µl)	C2-ABL	50 µl
ABL Control Gene Standard Dilution (ABL kontrolgēna standarta atšķaidījums) (10 ⁵ kopijas/5 µl)	C3-ABL	50 µl
BCR-ABL MbcR Fusion Gene Standard Dilution (BCR-ABL MbcR apvienotā gēna standarta atšķaidījums) (10 ¹ kopijas/5 µl)	F1-BCR- ABL MbcR	50 µl
BCR-ABL MbcR Fusion Gene Standard Dilution (BCR-ABL MbcR apvienotā gēna standarta atšķaidījums) (10 ² kopijas/5 µl)	F2-BCR- ABL MbcR	50 µl
BCR-ABL MbcR Fusion Gene Standard Dilution (BCR-ABL MbcR apvienotā gēna standarta atšķaidījums) 10 ³ kopijas/5 µl)	F3-BCR- ABL MbcR	50 µl
BCR-ABL MbcR Fusion Gene Standard Dilution (BCR-ABL MbcR apvienotā gēna standarta atšķaidījums) (10 ⁵ kopijas/5 µl)	F4-BCR- ABL MbcR	50 µl
BCR-ABL MbcR Fusion Gene Standard Dilution (BCR-ABL MbcR apvienotā gēna standarta atšķaidījums) (10 ⁶ kopijas/5 µl)	F5-BCR- ABL MbcR	50 µl
Primers and Probe Mix ABL (ABL gēnam paredzēts praimeru un zondes maisījums)*	PPC-ABL 25x	90 µl
Primers and Probe Mix BCR-ABL MbcR Fusion Gene [†] (BCR-ABL MbcR apvienotajam gēnam paredzēts praimeru un zondes maisījums [†])	PPF-MbcR 25x	110 µl
<i>ipsogen</i> BCR-ABL MbcR Kit rokasgrāmata (angļu valodā)		1

* ABL kontrolgēnam paredzēts maisījums no specifiskiem atgriezeniskiem un tiešiem praimeriem un specifiskas FAM-TAMRA zondes.

† BCR-ABL MbcR apvienotajam gēnam paredzēts maisījums no specifiskiem atgriezeniskiem un tiešiem praimeriem un specifiskas FAM-TAMRA zondes.

Piezīme. Pirms lietošanas uz īsu brīdi centrifugējiet standarta atšķaidījumus un praimeru un zondes maisījumus.

Nepieciešamie materiāli, kas netiek nodrošināti

Strādājot ar ķīmiskām vielām, vienmēr valkājiet piemērotu laboratorijas halātu, vienreizējas lietošanas cimdsus un aizsargbrilles. Lai saņemtu papildinformāciju, iepazīstieties ar attiecīgajām drošības datu lapām (DDL), kas ir pieejamas pie produkta piegādātāja.

Reāģenti

- PCR kategorijas ūdens bez nukleāzes
- Atgriezeniskajai transkriptāzei paredzētie reāģenti: apstiprinātais reāģents ir Superscript® II (vai Superscript) Reverse Transcriptase, ietver 5x pirmās virknes buferšķīdumu, 100 mM DTT (Life Technologies, kat. Nr. 18064-022)
- RNāzes inhibitors: apstiprinātais reāģents ir RNaseOUT™ (Life Technologies, kat. Nr. 10777-019)
- dNTP komplekts, PCR kategorijas
- Nejaušs heksamērs
- MgCl₂
- Buferšķīdums un Taq DNS polimerāze: apstiprinātie reāģenti ir TaqMan® Universal PCR Master Mix (Master Mix PCR 2x) (Life Technologies, kat. Nr. 4304437) un LightCycler TaqMan Master (Master Mix PCR 5x) (Roche, kat. Nr. 04535286001)

Palīgmateriāli

- Nukleāzi nesaturoši, pret aerosolu izturīgi sterili PCR pipešu uzgaļi ar hidrofobiem filtriem
- 0,5 ml vai 0,2 ml PCR stobriņi bez RNāzes un DNāzes
- Ledus

Aprīkojums

- Mikrolitru pipete*, kas paredzēta PCR (1–10 µl; 10–100 µl; 100–1000 µl)
- Galda centrifūga* ar rotoru 0,2 ml/0,5 ml reakcijas stobriņiem (ar centrifugēšanas jaudu 10 000 apgr./min.)
- Real-time PCR instruments:* Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM vai cits Rotor-Gene instruments; LightCycler 1.2, 2.0 vai 480; ABI PRISM 7000, 7700 vai 7900HT SDS vai SmartCycler instruments un saistīts specifisks materiāls
- Termālais amplifikators* vai ūdens pelde* (atgriezeniskā transkriptāze)

* Pārlicinieties, vai instrumenti ir pārbaudīti un kalibrēti saskaņā ar ražotāja ieteikumiem.

Papildu reaģenti

- *ipsogen* BCR-ABL1 Mbc Control Kit (kat. Nr. 670191), kas sastāv no šūnu līnijām ar BCR-ABL Mbc apvienotā gēna negatīvu, augsti un zemi pozitīvu ekspresiju, lai veiktu RNS ekstrakcijas un atgriezeniskās transkriptāzes kvalitatīvu validāciju

Brīdinājumi un piesardzības pasākumi

Lietošanai *in vitro* diagnostikā

Strādājot ar ķīmiskām vielām, vienmēr valkājiet piemērotu laboratorijas halātu, vienreizējas lietošanas cimdus un aizsargbrilles. Lai iegūtu papildinformāciju, skatiet attiecīgās drošības datu lapas (DDL). Tās ērtā un kompaktā PDF formātā ir pieejamas vietnē www.qiagen.com/safety, kur DDL skatīšanai un izdrukāšanai ir pieejamas katram QIAGEN komplektam un tā komponentiem.

Izmetiet paraugu un testu atkritumus atbilstoši vietējiem drošības noteikumiem.

Vispārējie piesardzības pasākumi

qPCR testiem nepieciešama laba laboratorijas prakse, tostarp aprīkojuma apkope, kas ir veltīta molekulārajai bioloģijai un atbilst piemērojamajiem noteikumiem un attiecīgajiem standartiem.

Šis komplekts ir paredzēts lietošanai *in vitro* diagnostikā. Šajā komplektā iekļautie reaģenti un instrukcijas ir apstiprinātas, lai nodrošinātu optimālu darbību. Tālāka reaģentu atšķaidīšana vai inkubācijas laika un temperatūras maiņa var radīt kļūdainus vai pretrunīgus datus. Ja PPC un PPF reaģenti tiek pakļauti gaismas iedarbībai, to struktūra var izmainīties. Visi reaģenti ir izstrādāti lietošanai tieši šajā testā. Lai iegūtu optimālus testa rezultātus, nedrīkst neko aizvietot.

Lai noteiktu transkriptu līmeņus, izmantojot qPCR, ir nepieciešama gan mRNS atgriezeniskā transkriptāze, gan ģenerētās cDNS amplifikācija ar PCR. Līdz ar to visa analīzes procedūra jāveic bez RNāzes/DNāzes.

Ievērojiet īpašu piesardzību, lai novērstu tālāk minētās situācijas.

- RNāzes/DNāzes kontaminācija, kas var izraisīt matricas mRNS un ģenerētās cDNS noārdīšanos
- mRNS vai PCR kontaminācijas pārnese, izraisot viltus pozitīvu signālu

Līdz ar to mēs iesakām veikt tālāk minētās darbības.

- Veicot analīzi, izmantojiet laboratorijas aprīkojumu bez nukleāzes (piemēram, pipešu uzgaļus, reakcijas flakonus) un cimdus.

* Pārliecinieties, vai instrumenti ir pārbaudīti un kalibrēti saskaņā ar ražotāja ieteikumiem.

- Lai izvairītos no paraugu un reaģentu krusteniskās kontaminācijas, visās pipetēšanas darbībās izmantojiet jaunus piepešu uzgaļus, kas ir izturīgi pret aerosolu.
- Sagatavojiet pirms PCR paredzēto Master maisījumu ar tam paredzētajiem materiāliem (pipetēm, uzgaļiem u. c.) tam paredzētajā vietā, kur nav nevienas DNS matricas (cDNS, DNS, plazmīda). Atsevišķā zonā (vēlams atsevišķā telpā) ar konkrētu materiālu (pipetēm, uzgaļiem u. c.) pievienojiet matricu.
- Darbu ar standarta atšķaidījumiem (C1–3 un F1–5) veiciet atsevišķā telpā.

Reaģentu glabāšana un lietošana

Komplekti tiek piegādāti uz sausa ledus, un tie pēc saņemšanas ir jāglabā no –30 °C līdz –15 °C temperatūrā.

- Samaziniet gaismas iedarbību praimeru un zondes maisījumiem (PPC un PPF stobriņiem).
- Pirms atvēršanas stobriņus uzmanīgi sajauciet un centrifugējiet.
- Glabājiet visus komplekta komponentus oriģinālajos iepakojumos.

Šie glabāšanas apstākļi attiecas gan uz atvērtiem, gan uz neatvērtiem komponentiem. Ja komponenti tiek glabāti apstākļos, kas nav norādīti uz etiķetēm, tie var darboties nepareizi un var nelabvēlīgi ietekmēt analīzes rezultātus.

Katra reaģenta derīguma termiņš ir norādīts uz katra komponenta etiķetes. Pareizos glabāšanas apstākļos izstrādājums saglabās veikspēju līdz derīguma termiņa beigām, kas uzdrukāts uz etiķetes.

Nav acīmredzamu pazīmju, kas norādītu uz šī izstrādājuma nestabilitāti. Tomēr pozitīvo un negatīvo kontroles materiālu apstrāde jāveic vienlaikus ar nezināmiem parauga materiāliem.

Procedūra

RNS paraugu sagatavošana

RNS sagatavošana no pacienta paraugiem (asins vai kaulu smadzeņu) jāveic ar apstiprinātu procedūru. Analīzes kvalitāte ir lielākoties atkarīga no izmantojamās RNS kvalitātes. Līdz ar to mēs iesakām pirms analīzes veikšanas pārbaudīt izdalīto RNS, izmantojot agarozes* gela elektroforēzi vai Agilent® Bioanalyzer®.

Protokols: ieteicamā standartizētā EAC atgriezeniskā transkriptāze

Pirms darba sākšanas veicamās darbības

- Sagatavojiet dNTP, katru 10 mM. Glabājiet –20 °C temperatūrā alikvotās daļās.

Procedūra

1. **Atkausējiet visus nepieciešamos komponentus un novietojiet tos uz ledus.**
2. **Inkubējiet 1 µg RNS (1–4 µl) 10 minūtes 70 °C temperatūrā un uzreiz atdzesējiet uz ledus 5 minūtes.**
3. **Uz īsu brīdi centrifugējiet (aptuveni 10 sekundes ar 10 000 apgr./min., lai šķidrums nokristu stobriņa apakšdaļā). Pēc tam glabājiet uz ledus.**
4. **Sagatavojiet tālāk minēto RT maisījumu atkarībā no apstrādājamo paraugu skaita (2. tabula).**

* Strādājot ar ķīmiskām vielām, vienmēr valkājiet piemērotu laboratorijas halātu, vienreizējas lietošanas cimdus un aizsargbrilles.

2. tabula. RT maisījuma sagatavošana

Komponents	Katra parauga tilpums (µl)	Gala koncentrācija
Pirmās virknes buferšķīdums (piegādāts ar Superscript II Reverse Transcriptase), 5x	4,0	1x
MgCl ₂ (50 mM)	2,0	5 mM
dNTP (katrs 10 mM, iepriekš sagatavots un glabāts –20 °C temperatūrā alikvotās daļās)	2,0	1 mM
DTT (100 mM, piegādāts ar Superscript II Reverse Transcriptase)	2,0	10 mM
RNāzes inhibitors (40 U/µl)	0,5	1 U/µl
Nejaušs heksamērs (100 mM)	5,0	25 µM
Superscript II vai Superscript Reverse Transcriptase (200 U/µl)	0,5	5 U/µl
Uzsildīts RNS paraugs (pievienošanai 5. darbībā)	1,0–4,0	50 ng/µl
PCR kategorijas ūdens bez nukleāzes (pievienošanai 5. darbībā)	0,0–3,0	–
Gala tilpums	20,0	–

5. Pipetējiet 16 µl RT maisījumu katrā PCR stobriņā. Pēc tam pievienojiet 1–4 µl (1 µg) RNS (no 3. darbības) un pielāgojiet tilpumu līdz 20 µl ar PCR kategorijas ūdeni bez nukleāzes (skatiet 3. tabulu).

3. tabula. Atgriezeniskās transkriptāzes reakcijas sagatavošana

Komponents	Tilpums (µl)
RT maisījums	16
Uzsildīts RNS paraugs (1 µg)	1–4
PCR kategorijas ūdens bez nukleāzes	0–3
Gala tilpums	20

6. Kārtīgi sajauciet un uz īsu brīdi centrifugējiet (aptuveni 10 sekundes ar 10 000 apgr./min., lai šķidrums nokristu stobriņa apakšdaļā).
7. Inkubējiet 20 °C temperatūrā 10 minūtes.
8. Inkubējiet termālā amplifikatorā 42 °C temperatūrā 45 minūtes un pēc tam uzreiz 99 °C temperatūrā 3 minūtes.
9. Atdzesējiet uz ledu (lai apturētu reakciju) 5 minūtes.
10. Uz īsu brīdi centrifugējiet (aptuveni 10 sekundes ar 10 000 apgr./min., lai šķidrums nokristu stobriņa apakšdaļā). Pēc tam glabājiet uz ledu.
11. Atšķaidiet gala cDNS ar 30 µl PCR kategorijas ūdens bez nukleāzes tā, lai gala tilpums būtu 50 µl.
12. Veiciet PCR saskaņā ar tālāk norādītajiem protokoliem un savu qPCR instrumentu.

Protokols: qPCR instrumentos Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM vai Rotor-Gene Q 5plex HRM ar 72 stobriņu rotoru

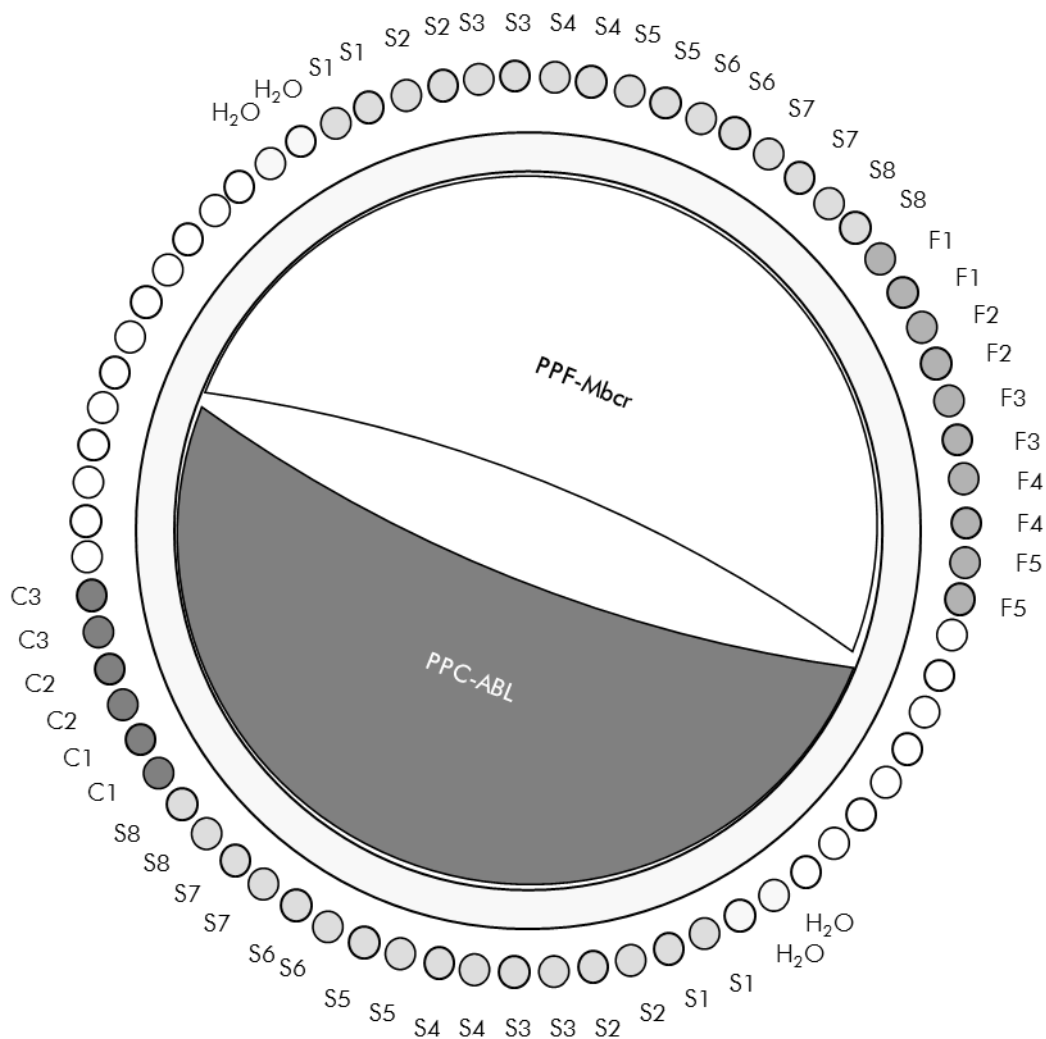
Izmantojot šo instrumentu, mēs iesakām visus mērījumus veikt divreiz, kā norādīts 4. tabulā.

4. tabula. Reakciju skaits Rotor-Gene Q instrumentiem ar 72 stobriņu rotoru

Paraugi	Reakcijas
Ar ABL praimeru un zondes maisījumu (PPC-ABL)	
n cDNS paraugi	n x 2 reakcijas
ABL standarts	2 x 3 reakcijas (3 atšķaidījumi, katrs testēts divreiz)
Ūdens kontroles materiāls	2 reakcijas
Ar BCR-ABL Mbcpraimeru un zondes maisījumu (PPF-Mbcpr)	
n cDNS paraugi	n x 2 reakcijas
Mbcpr standarts	2 x 5 reakcijas (5 atšķaidījumi, katrs testēts divreiz)
Ūdens kontroles materiāls	2 reakcijas

Paraugu apstrāde Rotor-Gene Q instrumentos ar 72 stobriņu rotoru

Mēs iesakām vienā eksperimentā testēt vismaz 8 cDNS paraugus, lai optimizētu standartu un praimeru un zondes maisījumu lietojumu. Katrā *ipsogen* BCR-ABL1 Mbcpr Kit ir pieejams pietiekams daudzums reaģentu, lai 3 reizes veiktu 8 paraugu eksperimentu, izmantojot 72 stobriņu rotoru.



4. attēls. Ieteicamais rotora iestatījums katram eksperimentam ar *ipsogen* BCR-ABL1 Mbcr Kit. F1–5: BCR-ABL Mbcr standarti; C1–3: ABL standarti; S: cDNS paraugs; H₂O: ūdens kontrols materiāls.

Piezīme. Vienmēr atcerieties ievietot testējamo paraugu rotora 1. pozīcijā. Pretējā gadījumā kalibrācijas laikā instruments kalibrāciju neveiks un tiks iegūti nepareizi fluorescences dati.

Aizpildiet visas pārējās pozīcijas ar tukšiem stobriņiem.

qPCR, kas veicams Rotor-Gene Q instrumentos ar 72 stobriņu rotoru

Piezīme. Visas darbības veiciet uz ledus.

Procedūra

- 1. Atkausējiet visus nepieciešamos komponentus un novietojiet tos uz ledus.**
- 2. Sagatavojiet tālāk minēto qPCR maisījumu atkarībā no apstrādājamo paraugu skaita.**

Visas koncentrācijas ir paredzētas reakcijas gala tilpumam.

5. tabulā aprakstīta pipetēšanas shēma viena reaģenta maisījuma sagatavošanai, kas aprēķināta, lai iegūtu 25 µl gala reakcijas tilpumu. Maisījumu var sagatavot iepriekš atkarībā no reakciju skaita, izmantojot to pašu praimeru un zondes maisījumu (PPC-ABL vai PPF-Mbcr). Lai kompensētu pipetēšanas kļūdu, ir iekļauti papildu tilpumi.

5. tabula. qPCR maisījuma sagatavošana

Komponents	BCR-ABL			Gala koncentrācija
	1 reakcija (µl)	ABL: 24+1 reakcija (µl)	Mbcr: 28+1 reakcija (µl)	
TaqMan Universal PCR Master Mix, 2x	12,5	312,5	362,5	1x
Praimeru un zondes maisījums, 25x	1	25	29	1x
PCR kategorijas ūdens bez nukleāzes	6,5	162,5	188,5	–
Paraugšs (pievienošanai 4. darbībā)	5	Katrā 5	Katrā 5	–
Kopējais tilpums	25	Katrā 25	Katrā 25	–

3. Pievienojiet katrā stobriņā 20 µl iepriekš sagatavota qPCR maisījuma.
4. Pievienojiet attiecīgajā stobriņā 5 µl RT produkta (cDNS, 100 ng RNS ekvivalents), kas tika iegūts atgriezeniskās transkriptāzes laikā (skatīt “Protokols: ieteicamā standartizētā EAC atgriezeniskā transkriptāze” 13. lpp.) (kopējais tilpums 25 µl).
5. Nedaudz sajauciet, pipetējot uz augšu un uz leju.
6. Ievietojiet stobriņus termālajā amplifikatorā saskaņā ar ražotāja ieteikumiem.
7. Ieprogramējiet Rotor-Gene Q instrumentam termālā cikla programmu, kā norādīts 6. tabulā.

6. tabula. Temperatūras profils

Mode of analysis (Analīzes režīms)	Kvantitatīvā noteikšana
Hold (Aizture)	Temperatūra: 50 grādi Laiks: 2 min.
Hold 2 (2. aizture)	Temperatūra: 95 grādi Laiks: 10 min.
Cycling (Cikla izpilde)	50 reizes 95 grādi 15 sek. 60 grādi 1 min., iegūstot FAM fluorescenci kanālā Green: Single (Viens)

8. Izmantojot Rotor-Gene Q instrumentus, analīzei atlasiet “Slope Correct” (Slīpums pareizs). Mēs iesakām iestatīt robežvērtību 0,03. Palaidiet termālā cikla programmu, kā norādīts 6. tabulā.

Protokols: qPCR instrumentos ABI PRISM 7000, 7700 un 7900HT SDS un LightCycler 480

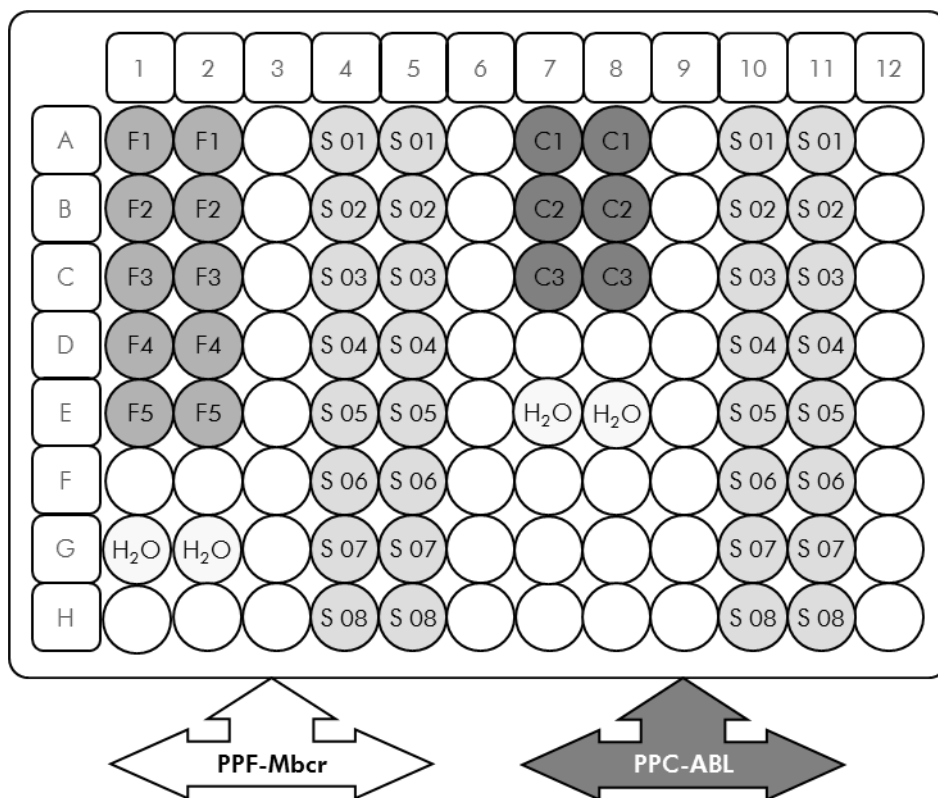
Izmantojot qPCR iekārtu ar 96 iedobīšu plati, mēs iesakām veikt visus mērījumus divreiz, kā norādīts 7. tabulā.

7. tabula. Reakciju skaits, izmantojot qPCR iekārtu ar 96 iedobīšu plati

Paraugi	Reakcijas
Ar ABL praimeru un zondes maisījumu (PPC-ABL)	
n cDNS paraugi	n x 2 reakcijas
ABL standarts	2 x 3 reakcijas (3 atšķaidījumi, katrs testēts divreiz)
Ūdens kontroles materiāls	2 reakcijas
Ar BCR-ABL Mbc r praimeru un zondes maisījumu (PPF-Mbc r)	
n cDNS paraugi	n x 2 reakcijas
Mbc r standarts	2 x 5 reakcijas (5 atšķaidījumi, katrs testēts divreiz)
Ūdens kontroles materiāls	2 reakcijas

Paraugu apstrāde instrumentos ABI PRISM 7000, 7700 un 7900 SDS un LightCycler 480

Mēs iesakām vienā eksperimentā testēt vismaz 8 cDNS paraugus, lai optimizētu standartu un praimeru un zondes maisījumu lietojumu. Plates shēmā 5. attēlā parādīts šāda eksperimenta paraugs.



5. attēls. Ieteicamais plates iestatījums vienam eksperimentam. S: cDNS paraugs; F1–5: BCR-ABL Mbcr standarti; C1–3: ABL standarti; H₂O: ūdens kontroles materiāls.

qPCR instrumentos ABI PRISM 7000, 7700 un 7900 SDS un LightCycler 480

Piezīme. Visas darbības veiciet uz ledus.

Procedūra

- 1. Atkausējiet visus nepieciešamos komponentus un novietojiet tos uz ledus.**
- 2. Sagatavojiet tālāk minēto qPCR maisījumu atkarībā no apstrādājamo paraugu skaita. Ja tiek izmantota qPCR iekārta ar 96 iedobīšu plati, mēs iesakām visus mērījumus veikt divreiz.**

Visas koncentrācijas ir paredzētas reakcijas gala tilpumam.

8. tabulā aprakstīta pipetēšanas shēma viena reaģenta maisījuma sagatavošanai, kas aprēķināta, lai iegūtu 25 µl gala reakcijas tilpumu. Maisījumu var sagatavot iepriekš atkarībā no reakciju skaita, izmantojot to pašu praimeru un zondes maisījumu (PPC-ABL vai PPF-Mbcr). Lai kompensētu pipetēšanas kļūdu, ir iekļauti papildu tilpumi.

8. tabula. qPCR maisījuma sagatavošana

Komponents	ABL:			Gala koncentrācija
	1 reakcija (µl)	24+1 reakcija (µl)	BCR-ABL Mbc: 28+1 reakcija (µl)	
TaqMan Universal PCR Master Mix, 2x	12,5	312,5	362,5	1x
Praimeru un zondes maisījums, 25x	1	25	29	1x
PCR kategorijas ūdens bez nukleāzes	6,5	162,5	188,5	–
Paraugs (pievienošanai 4. darbībā)	5	Katrā 5	Katrā 5	–
Kopējais tilpums	25	Katrā 25	Katrā 25	–

3. Pievienojiet katrā iedobē 20 µl iepriekš sagatavota qPCR maisījuma.
4. Pievienojiet attiecīgajā iedobē 5 µl RT produkta (cDNS, 100 ng RNS ekvivalents), kas tika iegūts atgriezeniskās transkriptāzes laikā (skatīt "Protokols: ieteicamā standartizētā EAC atgriezeniskā transkriptāze" 13. lpp.) (kopējais tilpums 25 µl).
5. Nedaudz sajauciet, pipetējot uz augšu un uz leju.
6. Aizveriet plati un uz īsu brīdi centrifugējiet (300 x g, aptuveni 10 sekundes).
7. Ievietojiet plati termālajā amplifikatorā saskaņā ar ražotāja ieteikumiem. Ieprogramējiet termālajam amplifikatoram termālā cikla programmu, kā norādīts 9. tabulā attiecībā uz ABI PRISM 7000, 7700 un 7900HT SDS vai 10. tabulā instrumentam LightCycler 480.

9. tabula. Temperatūras profils instrumentiem ABI PRISM 7000, 7700 un 7900HT SDS

Mode of analysis (Analīzes režīms)	Standarta līkne — absolūtā daudzuma noteikšana
Hold (Aizture)	Temperatūra: 50 °C Laiks: 2 minūtes
Hold 2 (2. aizture)	Temperatūra: 95 °C Laiks: 10 minūtes
Cycling (Cikla izpilde)	50 reizes 95 °C 15 sek. 60 °C 1 min., iegūstot FAM fluorescenci; dzēsējs: TAMRA

10. tabula. Temperatūras profils instrumentam LightCycler 480

Mode of analysis (Analīzes režīms)	Absolūtā daudzuma noteikšana ("Abs Quant")
Detection formats (Noteikšanas formāti)	Logā Detection formats (Noteikšanas formāti) atlasiet "Simple Probe" (Vienkāršā zonde)
Hold (Aizture)	Temperatūra: 50 °C Laiks: 2 minūtes
Hold 2 (2. aizture)	Temperatūra: 95 °C Laiks: 10 minūtes
Cycling (Cikla izpilde)	50 reizes 95 °C 15 sek. 60 °C 1 min., iegūstot FAM fluorescenci, kas atbilst (483–533 nm) LC versijai 01 un (465–510 nm) LC versijai 02

8. Instrumentiem ABI PRISM 7000, 7700 un 7900HT SDS veiciet 8a. darbību. Instrumentam LightCycler 480 veiciet 8b. darbību.

8a. ABI PRISM 7000, 7700 un 7900HT SDS: mēs iesakām iestatīt robežvērtību uz 0,1, kā norādīts EAC protokola analīzes darbībā ar ABI PRISM SDS, un sākumstāvokli iestatiet starp 3. un 15. ciklu. Palaidiet cikla programmu, kā norādīts 9. tabulā.

8b. LightCycler 480 instruments: mēs iesakām izmantot analīzes režīmu Fit point (Atbilstības punkts) ar fona vērtību 2,0 un robežvērtību 2,0. Palaidiet termālā cikla programmu, kā norādīts 10. tabulā.

Protokols: qPCR instrumentos LightCycler 1.2 un 2.0

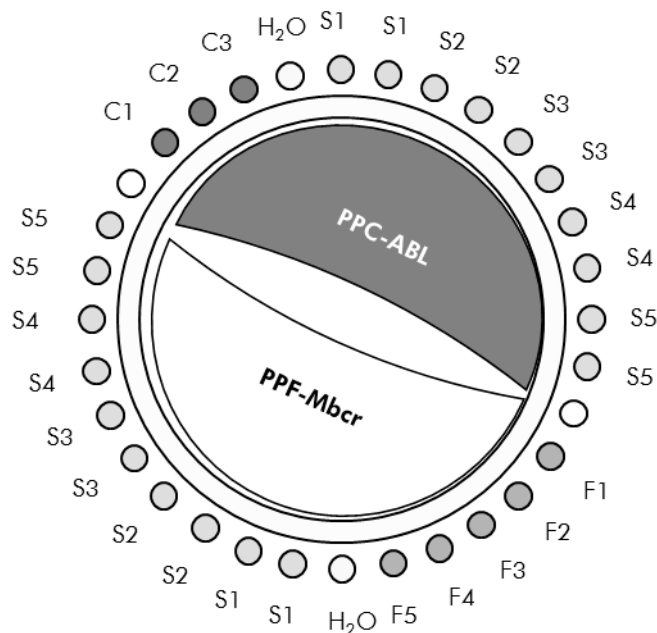
Izmantojot kapilāru instrumentus, mēs iesakām izmērīt paraugus divreiz un kontroles materiālus izmērīt vienreiz, kā norādīts 11. tabulā.

11. tabula. Reakciju skaits instrumentiem LightCycler 1.2 un 2.0

Paraugi	Reakcijas
Ar ABL praimeru un zondes maisījumu (PPC-ABL)	
n cDNS paraugi	n x 2 reakcijas
ABL standarts	1 x 3 reakcijas (3 standarta atšķaidījumi, katrs testēts vienreiz)
Ūdens kontroles materiāls	1 reakcija
Ar BCR-ABL Mbcr praimeru un zondes maisījumu (PPF-Mbcr)	
n cDNS paraugi	n x 2 reakcijas
Mbcr standarts	1 x 5 reakcijas (5 standarta atšķaidījumi, katrs testēts vienreiz)
Ūdens kontroles materiāls	1 reakcija

Paraugu apstrāde instrumentos LightCycler 1.2 un 2.0

Mēs iesakām viena eksperimenta laikā testēt vismaz 5 cDNS paraugus, lai optimizētu standartu un praimeru un zondes maisījumu lietojumu. Kapilāru shēmā 6. attēlā parādīts šāda eksperimenta piemērs.



6. attēls. Ieteicamais rotora iestatījums katram eksperimentam ar *ipsogen* BCR-ABL1 Mbcr Kit. F1–5: BCR-ABL Mbcr standarti; C1–3: ABL standarti; S: analizējамais nezināmais DNS paraugs; H₂O: ūdens kontroles materiāls.

qPCR instrumentos LightCycler 1.2 un 2.0

Piezīme. Īpašu tehnoloģisko prasību dēļ LightCycler eksperimenti jāveic, izmantojot specifiskus reaģentus. Lai sagatavotu Master Mix 5x, mēs iesakām izmantot LightCycler TaqMan Master un ievērot ražotāja norādījumus.

Piezīme. Visas darbības veiciet uz ledus.

Procedūra

- 1. Atkausējiet visus nepieciešamos komponentus un novietojiet tos uz ledus.**
- 2. Sagatavojiet tālāk minēto qPCR maisījumu atkarībā no apstrādājamo paraugu skaita.**

Visas koncentrācijas ir paredzētas reakcijas gala tilpumam.

12. tabulā aprakstīta pipetēšanas shēma viena reaģenta maisījuma sagatavošanai, kas aprēķināta, lai iegūtu 20 µl gala reakcijas tilpumu. Maisījumu var sagatavot iepriekš atkarībā no reakciju skaita, izmantojot to pašu praimeru un zondes maisījumu (PPC-ABL vai PPF-Mbcr). Lai kompensētu pipetēšanas kļūdu, ir iekļauti papildu tilpumi.

12. tabula. qPCR maisījuma sagatavošana

Komponents	1 reakcija (μ l)	ABL: 14+1 reakcija (μ l)	BCR-ABL Mbcr: 16+1 reakcija (μ l)	Gala koncentrācija
Tikko sagatavots LightCycler TaqMan Master Mix, 5x	4,0	60	68,0	1x
Praimeru un zondes maisījums, 25x	0,8	12	13,6	1x
PCR kategorijas ūdens bez nukleāzes	10,2	153	173,4	–
Paraugs (pievienošanai 4. darbībā)	5,0	Katrā 5	Katrā 5,0	–
Kopējais tilpums	20,0	Katrā 20	Katrā 20,0	–

- Pievienojiet katrā kapilārā 15 μ l iepriekš sagatavota qPCR maisījuma.
- Pievienojiet attiecīgajā stobriņā 5 μ l RT produkta (cDNS, 100 ng RNS ekvivalents), kas tika iegūts atgriezeniskās transkriptāzes laikā (skatīt "Protokols: ieteicamā standartizētā EAC atgriezeniskā transkriptāze" 13. lpp.) (kopējais tilpums 20 μ l).
- Nedaudz sajauciet, pipetējot uz augšu un uz leju.
- Ievietojiet kapilārus adapteros, kas iekļauti komplektācijā ar iekārtu, un uz īsu brīdi centrifugējiet (700 x g, aptuveni 10 sekundes).
- Ievietojiet kapilārus termālajā amplifikatorā saskaņā ar ražotāja ieteikumiem.
- Ieprogramējiet instrumentiem LightCycler 1.2 vai 2.0 termālā cikla programmu, kā norādīts 13. tabulā.

13. tabula. Temperatūras profils

Mode of analysis (Analīzes režīms)	Daudzuma noteikšana
Hold (Aizture)	Temperatūra: 95 °C Laiks: 10 minūtes Paātrinājums: 20
Cycling (Cikla izpilde)	50 reizes 95 °C 10 sek.; paātrinājums: 20 60 °C 1 min.; paātrinājums: 20; iegūstot FAM fluorescenci: Single (Viens)
Hold 2 (2. aizture)	45 °C 1 min.; paātrinājums: 20

9. Instrumentam LightCycler 1.2 veiciet 9a. darbību. Instrumentam LightCycler 2.0 veiciet 9b. darbību.

9a. LightCycler 1.2: ieteicams izmantot F1/F2 un režīmu “2nd derivative analysis” (Otrā derivāta analīze). Palaidiet termālā cikla programmu, kā norādīts 13. tabulā.

9b. LightCycler 2.0: lai iegūtu reproducējamus rezultātus, mēs iesakām LightCycler 2.0 programmatūras versijā 4.0 izmantot Automated (Automatizēts) (F''maks.) analīzi. Palaidiet termālā cikla programmu, kā norādīts 13. tabulā.

Protokols: qPCR instrumentā SmartCycler

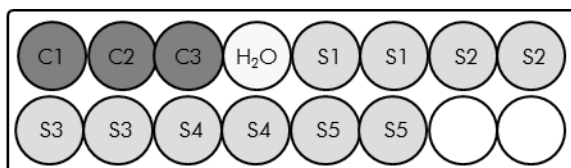
Izmantojot šo instrumentu, mēs iesakām mērīt paraugus divreiz un kontroles materiālus vienreiz, kā norādīts 14. tabulā.

14. tabula. Reakciju skaits instrumentam SmartCycler

Paraugi	Reakcijas
Ar ABL praimeru un zondes maisījumu (PPC-ABL)	
n cDNS paraugi	n x 2 reakcijas
ABL standarts	1 x 3 reakcijas (3 standarta atšķaidījumi, katrs testēts vienreiz)
Ūdens kontroles materiāls	1 reakcija
Ar BCR-ABL Mbcpraimeru un zondes maisījumu (PPF-Mbcpr)	
n cDNS paraugi	n x 2 reakcijas
Mbcpr standarts	1 x 5 reakcijas (5 standarta atšķaidījumi, katrs testēts vienreiz)
Ūdens kontroles materiāls	1 reakcija

Paraugu apstrāde instrumentā SmartCycler

Mēs iesakām viena eksperimenta laikā testēt vismaz 5 cDNS paraugus, lai optimizētu standartu un praimeru un zondes maisījumu lietojumu. Divu bloku shēmā 7. attēlā parādīts piemērs.



Visas analīzes pirmajā blokā tiek veiktas ar PPC-ABL.



Visas analīzes otrajā blokā tiek veiktas ar PPF-Mbcpr.

7. attēls. Ieteicamais plates iestatījums vienam eksperimentam. S: cDNS paraugs; F1–5: BCR-ABL Mbcpr standarti; C1–3: ABL standarti; H₂O: ūdens kontroles materiāls.

qPCR instrumentā SmartCycler

Piezīme. Visas darbības veiciet uz ledus.

Procedūra

1. **Atkausējiet visus nepieciešamos komponentus un novietojiet tos uz ledus.**
2. **Sagatavojiet tālāk minēto qPCR maisījumu atkarībā no apstrādājamo paraugu skaita.**

Visas koncentrācijas ir paredzētas reakcijas gala tilpumam.

15. tabulā aprakstīta pipetēšanas shēma viena reaģenta maisījuma sagatavošanai, kas aprēķināta, lai iegūtu 25 µl gala reakcijas tilpumu. Maisījumu var sagatavot iepriekš atkarībā no reakciju skaita, izmantojot to pašu praimeru un zondes maisījumu (PPC-ABL vai PPF-Mbcr). Lai kompensētu pipetēšanas kļūdu, ir iekļauti papildu tilpumi.

15. tabula. qPCR maisījuma sagatavošana

Komponents	BCR-ABL			Gala koncentrācija
	1 reakcija (µl)	ABL: 14+1 reakcija (µl)	Mbcr: 16+1 reakcija (µl)	
TaqMan Universal PCR Master Mix, 2x	12,5	187,5	212,5	1x
Praimeru un zondes maisījums, 25x	1	15	17	1x
PCR kategorijas ūdens bez nukleāzes	6,5	97,5	110,5	–
Paraugi (pievienošanai 4. darbībā)	5	Katrā 5	Katrā 5	–
Kopējais tilpums	25	Katrā 25	Katrā 25	–

3. **Pievienojiet katrā iedobē 20 µl iepriekš sagatavota qPCR maisījuma.**
4. **Pievienojiet attiecīgajā iedobē 5 µl RT produkta (cDNS, 100 ng RNS ekvivalents), kas tika iegūts atgriezeniskās transkriptāzes laikā (skatīt “Protokols: ieteicamā standartizētā EAC atgriezeniskā transkriptāze” 13. lpp.) (kopējais tilpums 25 µl).**
5. **Nedaudz sajauciet, pipetējot uz augšu un uz leju.**

6. Ievietojiet paraugus termālajā amplifikatorā saskaņā ar ražotāja ieteikumiem.
7. Ieprogramējiet instrumentam SmartCycler termālā cikla programmu, kā norādīts 16. tabulā.

16. tabula. Temperatūras profils

Hold (Aizture)	Temperatūra: 50 °C Laiks: 2 minūtes
Hold 2 (2. aizture)	Temperatūra: 95 °C Laiks: 10 minūtes
Cycling (Cikla izpilde)	50 reizes 95 °C 15 sek. 60 °C 1 min. ar fluorescences iegūšanu: Single (Viens)

8. Mēs iesakām iestatīt robežvērtību uz 30. Palaidiet termālā cikla programmu, kā norādīts 16. tabulā.

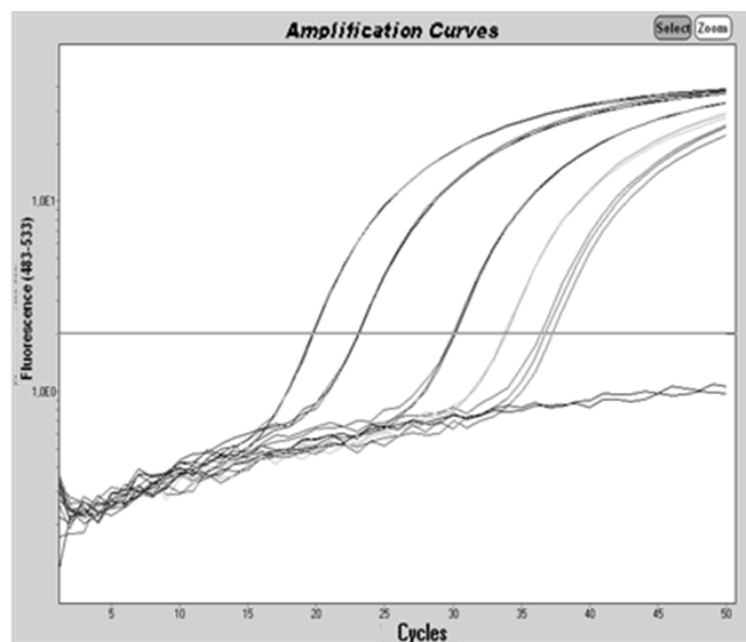
Rezultātu interpretācija

Datu analīzes princips

Izmantojot TaqMan tehnoloģiju, PCR ciklu skaitu, kas nepieciešams signāla noteikšanai virs robežvērtības, sauc par robežvērtības ciklu (C_T), un tas ir tieši proporcionāls mērķa daudzumam reakcijas sākumā.

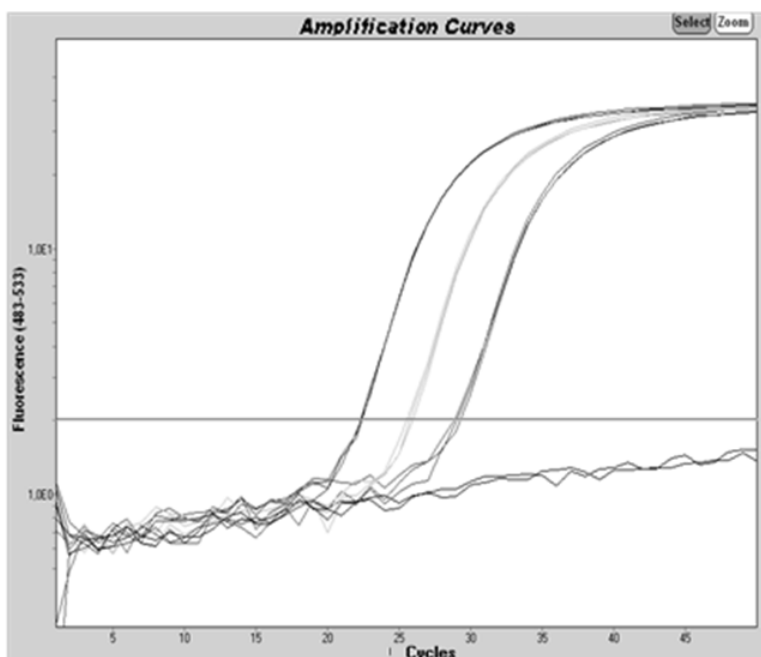
Izmantojot standartus ar zināmu molekulu skaitu, var izveidot standarta līkni un noteikt precīzu mērķa daudzumu testa paraugā. *ipsogen* standarta līknes ir atkarīgas no plazmīdām; mēs izmantojam 3 plazmīdu standarta atšķaidījumus CG gēnam un 5 standarta atšķaidījumus FG gēnam, lai nodrošinātu precīzas standarta līknes. Ar *ipsogen* BCR-ABL Mbc Kit iegūto TaqMan amplifikācijas līkņu piemērs parādīts 8. un 9. attēlā.

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



8. attēls. BCR-ABL Mbcr standartu noteikšana (F1–F5). 10^1 , 10^2 , 10^3 , 10^5 , 10^6 kopijas/5 μ l.

- ABL 10^3
- ABL 10^4
- ABL 10^5



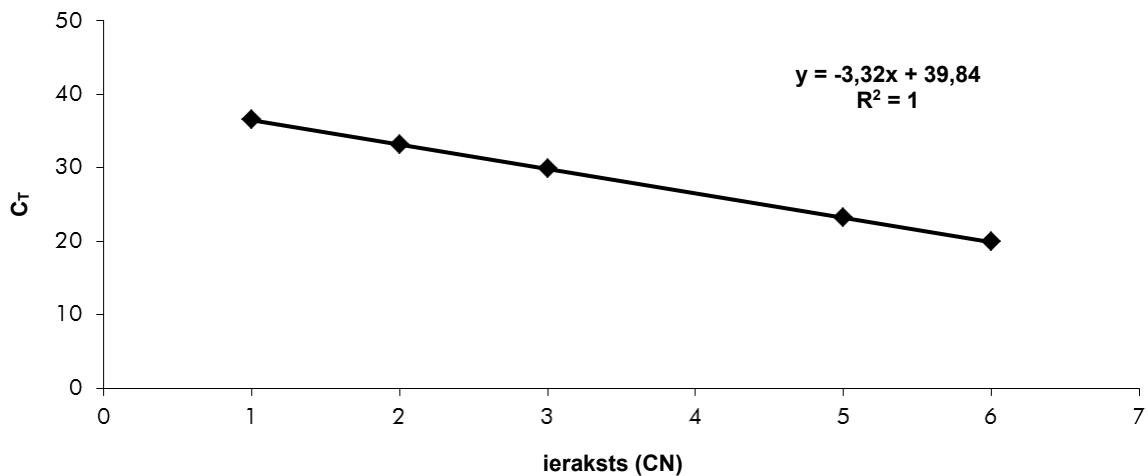
9. attēls. ABL standartu noteikšana (C1, C2, C3). 10^3 , 10^4 un 10^5 kopijas/5 μ l.

Rezultāti

Standarta līkne un kvalitātes kritēriji

Iegūtos datus var iekopēt Excel[®] failā analīzei.

Diagrammā atkarībā no ieraksta kopijas numura (3, 4 un 5 cikliem C1, C2 un C3; 1, 2, 3, 5 un 6 cikliem F1, F2, F3, F4 un F5) katram gēnam (ABL un BCR-ABL) tiek attēlotas C_T vērtības, kas iegūtas no plazmīdu standarta atšķaidījumiem. 10. attēla piemērā parādīta teorētiskā līkne, kas aprēķināta ar 5 standarta atšķaidījumiem.



10. attēls. Teorētiskā līkne, kas aprēķināta ar 5 standarta atšķaidījumiem. Katram gēnam (ABL un BCR-ABL) tiek aprēķināta lineārā regresijas līkne ($y = ax + b$), kur a ir līnijas slīpums un b ir y krustojums, kas ir y koordināta punktam, kur līnija šķērso y asi. Tās vienādojums un noteikšanas koeficients (R^2) tiek uzdrukāts diagrammā.

Tā kā standarti ir desmitkārtīgi atšķaidījumi, līknes teorētiskais slīpums ir $-3,3$. Slīpums no $-3,0$ līdz $-3,9$ ir pieņemams, ja R^2 ir $> 0,95$ (7). Tomēr, lai iegūtu precīzus rezultātus, ieteicamā vērtība ir $R^2 > 0,98$ (3).

Normalizēto kopiju skaits (Normalized Copy Number, NCN)

ABL standarta līknes vienādojums jāizmanto, lai nezināmo paraugu iegūtās C_T vērtības (iegūtas ar PPC-ABL) pārveidotu par ABL kopiju skaitu (ABL_{CN}).

BCR-ABL standarta līknes vienādojums jāizmanto, lai nezināmo paraugu iegūtās C_T vērtības (iegūtas ar PPF-Mbcr) pārveidotu par BCR-ABL kopiju skaitu ($BCR-ABL_{Mbcrcn}$).

Šo CN vērtību attiecība sniedz normalizēto kopiju skaitu (NCN):

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

MRD vērtība

Minimālās atlikušās slimības (minimal residual disease, MRD) vērtība ir attiecība starp CG normalizēto FG ekspresiju novērošanas paraugu ($(FG_{CN}/CG_{CN})_{FUP}$) un diagnostikas paraugu ($(FG_{CN}/CG_{CN})_{DX}$).

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

Jutība

Jutība (SENS_v) tiek aprēķināta, ņemot vērā FG relatīvo ekspresiju diagnozes noteikšanas laikā (FG_{CN}/CG_{CN})_{DX} un CG ekspresiju (CG_{CN,FUP}) novērošanas paraugā.

$$\text{Jutība (SENS}_v\text{)} = \frac{\text{CG}_{\text{CN,DX}}}{\text{CG}_{\text{CN,FUP}} \times \text{FG}_{\text{CN,DX}}}$$

Kvalitātes kontrole ABL vērtībām

RNS zemas kvalitātes vai qPCR darbību laikā radušos problēmu dēļ ABL_{CN} var būt zems. Mēs iesakām atņemt rezultātus no paraugiem, kuru ABL_{CN} < 4246,2 (zemāka 95 % TI vērtība no CML pacienta paraugiem EAC pētījumā, 8. atsauce).

Reproducējamība starp atkārtojumiem

CT vērtību variācijas starp atkārtojumiem jābūt < 2, kas atbilst četrkārtīgām kopiju skaita vērtību izmaiņām.

C_T vērtību variācijas starp atkārtojumiem parasti ir < 1,5, ja vidējā atkārtojumu C_T vērtība ir < 36 (7).

Piezīme. Katram lietotājam ir jāizmēra reproducējamība savā laboratorijā.

Ūdens kontroles materiāli

Negatīvās kontroles materiāliem jābūt nulle CN.

Pozitīvs ūdens kontroles materiāls rodas krusteniskās kontaminācijas rezultātā. Risinājumu skatiet tālāk sniegtajā sadaļā "Problēmu novēršanas ieteikumi".

Problēmu novēršanas ieteikumi

Šie problēmu novēršanas ieteikumi var būt noderīgi, risinot radušās problēmas. Vairāk informācijas skatiet arī bieži uzdotu jautājumu lapā mūsu Tehniskā atbalsta centrā: www.qiagen.com/FAQ/FAQList.aspx. QIAGEN Tehniskā atbalsta darbinieki vienmēr labprāt atbildēs uz jūsu jautājumiem par informāciju un protokolu šajā rokasgrāmatā, vai arī paraugu un testu metodēm (kontaktinformāciju skatiet "Kontaktinformācija" 46. lpp.).

Komentāri un ieteikumi

Kontrolgēnam (ABL) un BCR-ABL MbcR visos paraugos negatīvs rezultāts — ar standartu viss ir kārtībā

- a) Zema RNS kvalitāte Pirms analīzes sākuma vienmēr pārbaudiet RNS kvalitāti un koncentrāciju.
Paralēli palaidiet šūnu līnijas RNS pozitīvu kontroles materiālu (*ipsogen* BCR-ABL1 MbcR Controls Kit, kat. Nr. 670191).
- b) Kļūda atgriezeniskās transkriptāzes darbības laikā Pirms analīzes sākuma vienmēr pārbaudiet RNS kvalitāti un koncentrāciju.
Paralēli palaidiet šūnu līnijas RNS pozitīvu kontroles materiālu (*ipsogen* BCR-ABL1 MbcR Controls Kit, kat. Nr. 670191).

Kontrolgēnam (ABL) paraugos negatīvs rezultāts — ar standartu viss ir kārtībā

- a) Zema RNS kvalitāte Pirms analīzes sākuma vienmēr pārbaudiet RNS kvalitāti un koncentrāciju.
Paralēli palaidiet šūnu līnijas RNS pozitīvu kontroles materiālu (*ipsogen* BCR-ABL1 MbcR Controls Kit, kat. Nr. 670191).
- b) Kļūda atgriezeniskās transkriptāzes darbības laikā Pirms analīzes sākuma vienmēr pārbaudiet RNS kvalitāti un koncentrāciju.
Paralēli palaidiet šūnu līnijas RNS pozitīvu kontroles materiālu (*ipsogen* BCR-ABL1 MbcR Controls Kit, kat. Nr. 670191).

Negatīvs standarta signāls

- a) Pipetēšanas kļūda Pārbaudiet pipetēšanas shēmu un reakcijas iestatījumu.
Vēlreiz palaidiet PCR.
- b) Neatbilstoša komplekta komponentu glabāšana Glabājiet *ipsogen* BCR-ABL1 MbcR Kit temperatūrā no $-15\text{ }^{\circ}\text{C}$ līdz $-30\text{ }^{\circ}\text{C}$ un aizsargājiet praimeru un zondes maisījumus (PPC un PPF) no gaismas. Skatīt "Reaģentu glabāšana un lietošana" 12. lpp.
Nesasadējiet un neatkausējiet atkārtoti.
Glabāšanas nolūkā sadaliet reaģentus alikvotās daļās.

Komentāri un ieteikumi

Negatīvie kontroles materiāli ir pozitīvi

Krusteniskā kontaminācija

Nomainiet visus kritiskos reaģentus.

Atkārtojiet eksperimentu ar jaunajām visu reaģentu alikvotajām daļām.

Lai novērstu pārneses kontamināciju, vienmēr lietojiet paraugus, komplekta komponentus un palīgmateriālus saskaņā ar vispārpieņemto praksi.

Nav signāla, arī standarta kontroles materiālos

- a) Pipetēšanas kļūda vai izlaisti reaģenti
- Pārbaudiet pipetēšanas shēmu un reakcijas iestatījumu.
- Vēlreiz palaidiet PCR.
- b) Parauga materiālam ir inhibējoša iedarbība nepietiekamas izdalīšanas dēļ
- Atkārtojiet RNS sagatavošanu.
- c) LightCycler: izvēlēts nepareizs noteikšanas kanāls
- Iestatiet Channel Setting (Kanāla iestatījums) uz F1/F2 vai 530 nm/640 nm.
- d) LightCycler: nav ieprogrammēta datu iegūšana
- Pārbaudiet cikla programmas.
- PCR programmas katra normalizācijas segmenta beigās atlasiet datu iegūšanas režīmu "single" (viens).

Paraugos trūkstošs vai zems signāls, bet ar standarta kontroles materiāliem viss ir kārtībā

- a) Zema RNS kvalitāte vai zema koncentrācija
- Pirms analīzes sākuma vienmēr pārbaudiet RNS kvalitāti un koncentrāciju.
- Paralēli palaidiet šūnu līnijas RNS pozitīvu kontroles materiālu (*ipsogen* BCR-ABL1 Mbc Controls Kit, kat. Nr. 670191).
- b) Kļūda atgriezeniskās transkriptāzes darbības laikā
- Pirms analīzes sākuma vienmēr pārbaudiet RNS kvalitāti un koncentrāciju.
- Paralēli palaidiet šūnu līnijas RNS pozitīvu kontroles materiālu (*ipsogen* BCR-ABL1 Mbc Controls Kit, kat. Nr. 670191).

Komentāri un ieteikumi

Fluorescences intensitāte ir pārāk zema

- a) Neatbilstoša komplekta komponentu glabāšana
Glabājiet *ipsogen* BCR-ABL1 MbcR Kit temperatūrā no –15 °C līdz –30 °C un aizsargājiet praimeru un zondes maisījumus (PPC un PPF) no gaismas. Skatīt “Reaģentu glabāšana un lietošana” 12. lpp.
Nesasaldējiet un neatkausējiet atkārtoti.
Glabāšanas nolūkā sadaliet reaģentus alikvotās daļās.
- b) Ļoti zems mērķa RNS sākotnējais daudzums
Palieliniet parauga RNS daudzumu.
Piezīme. Atkarībā no izvēlētās RNS sagatavošanas metodes var rasties inhibējoša iedarbība.

LightCycler: fluorescences intensitāte mainās

- a) Pipetēšanas kļūda
Pipetēšanas kļūdas izraisīto mainīgumu var mazināt, analizējot datus režīmā F1/F2 vai 530 nm/640 nm.
- b) Nepietiekama kapilāru centrifugēšana
Sagatavotais PCR maisījums joprojām var atrasties kapilāra augšējā vadā, vai arī kapilāra galā varētu būt gaisa burbulis.
Vienmēr centrifugējiet ar reakcijas maisījumu piepildītos kapilārus, kā aprakstīts konkrētās iekārtas lietošanas rokasgrāmatā.
- c) Kapilāra gala ārējā virsma ir netīra
Rīkojoties ar kapilāriem, vienmēr izmantojiet cimdus.

LightCycler: standarta līknes kļūda

- Pipetēšanas kļūda
Pipetēšanas kļūdas izraisīto mainīgumu var mazināt, analizējot datus režīmā F1/F2 vai 530 nm/640 nm.

Kvalitātes kontrole

Visa komplekta kvalitātes kontrole tika veikta instrumentā LightCycler 480. Šis komplekts ir ražots saskaņā ar standartu ISO 13485:2003. Analīzes sertifikāti ir pieejami pēc pieprasījuma vietnē www.qiagen.com/support/.

Ierobežojumi

Pirms šis ierīces izmantošanas lietotājiem jābūt apmācītiem un jāpārzina šī tehnoloģija.

Visi iegūtie diagnostikas rezultāti jāinterpretē kopā ar citiem klīniskiem vai laboratoriskiem konstatējumiem. Lietotāja pienākums ir pārbaudīt sistēmas veiktspēju attiecībā uz visām viņu laboratorijā izmantotajām procedūrām, kas nav ietvertas QIAGEN veiktspējas pētījumos.

Pievērsiet uzmanību derīguma termiņiem, kas norādīti uz kastītes un visu komponentu etiķetēm. Komponentus, kam beidzies derīguma termiņš, izmantot nedrīkst.

Piezīme. Komplekts ir izstrādāts saskaņā ar “Eiropa pret vēzi” (Europe Against Cancer, EAC) pētījumiem (8), un tas atbilst atjauninātajiem starptautiskajiem ieteikumiem (3, 5). Tas jāizmanto, ievērojot šajā rokasgrāmatā sniegtos norādījumus, kombinācijā ar apstiprinātiem reaģentiem un instrumentiem (skatīt “Nepieciešamie materiāli, kas netiek nodrošināti” 10. lpp.). Jebkura šī izstrādājuma izmantošana un/vai sastāvdaļu modifikācija ārpus etiķetē sniegtajiem norādījumiem anulēs QIAGEN atbildību.

Veiktspējas raksturojums

Neklīniskie pētījumi

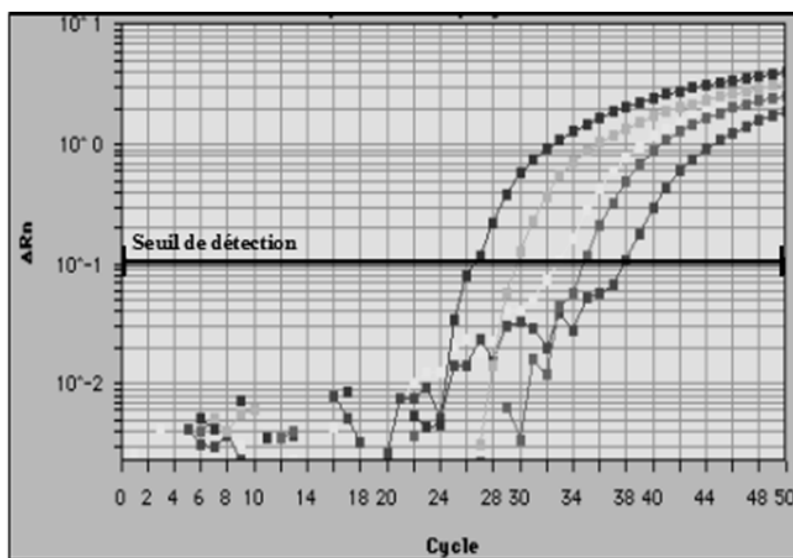
Materiāli un metodes

Iekārtā ABI PRISM 7700 SDS kopā ar sadaļā “Nepieciešamie materiāli, kas netiek nodrošināti” 10. lpp. uzskaitītajiem reaģentiem tika veikts veiktspējas novērtējums. Ekvivalences pētījumos tika apstiprināts tās lietojums šādos instrumentos: ABI PRISM 7000 un 7900HT SDS, LightCycler 1.2 un 480 instrumentā, Rotor-Gene 3000 un SmartCycler instrumentā (9).

Tika veikti neklīniski pētījumi, lai noteiktu *ipsogen* BCR-ABL1 Mbc Kit analītisko veiktspēju. Šie neklīniskie laboratorijas pētījumi tika veikti ar kopējo RNS no K562 šūnu līnijas, kas atšķaidīta ar MV4-11 šūnu līnijas kopējās RNS nemainīgu galīgo daudzumu.

Lai noteiktu analīzes atkārtojamību, vienā izpildes reizē veicot 5 atkārtojumus un veicot 4 dažādas izpildes, tika analizētas 5 dažādas K562 kopējās RNS koncentrācijas (5 ng, 500 pg, 50 pg, 5 pg un 0,5 pg), kas atšķaidītas MV4-11 kopējā RNS, ar nemainīgu galīgo kopējo daudzumu 200 ng (11. attēls).

- 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 $2,5 \times 10^{-6}$



11. attēls. Amplifikācijas diagrammas K562 kopējās RNS atšķaidījumiem $2,5 \times 10^{-2}$ (5 ng), $2,5 \times 10^{-4}$ (0,05 ng), $2,5 \times 10^{-5}$ (0,005 ng) un $2,5 \times 10^{-6}$ (0,0005 ng), kas iegūti MV4-11 negatīvā kopējā RNS.

Analītiskie dati

17.–20. tabulā parādītas startestu analīzes ar vidējo robežvērtības ciklu (C_T), standartnovirzi (Standard Deviation, SD), paraugu skaitu (n), variācijas koeficientu (Coefficient of Variation, CV), vidējo kopiju skaitu (Copy Number, CN) un vidējo normalizēto kopiju skaitu (Normalized Copy Number, NCN).

17. tabula. Starptestu analīze — šūnu līnijas BCR-ABL Mbcr un ABL

Šūnu līnija	Atšķaidījums	Vidēji C_T	SD	n	CV (%)
BCR-ABL Mbcr	$2,5 \times 10^{-2}$ (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

18. tabula. Starptestu analīze — plazmīdas

Gēns	Plazmīda	Vidēji C _T	SD	n	CV (%)
BCR-ABL Mbc	F1 (10 ¹ kopijas)	34,47	1,25	8	3,64
	F2 (10 ² kopijas)	31,48	0,54	8	1,71
	F3 (10 ³ kopijas)	28,17	1,11	7	3,95
	F4 (10 ⁵ kopijas)	21,20	0,65	8	3,06
	F5 (10 ⁶ kopijas)	18,22	0,09	6	0,49
ABL	C1 (10 ³ kopijas)	28,47	0,34	8	1,18
	C2 (10 ⁴ kopijas)	25,25	0,31	8	1,22
	C3 (10 ⁵ kopijas)	21,92	0,70	8	3,19

19. tabula. Starptestu analīze — šūnu līnijas BCR-ABL Mbc un ABL (vidējais CN)

Šūnu līnija	Atšķaidījums	Vidējais CN	SD	n	CV (%)
BCR-ABL Mbc	2,5 x 10 ⁻² (5 ng/200 ng)	4134,27	2512,40	20	60,77
	2,5 x 10 ⁻³ (0,5 ng/200 ng)	512,8	479,51	19	93,51
	2,5 x 10 ⁻⁴ (0,05 ng/200 ng)	42,94	22,05	20	51,36
ABL	—	33 831,51	13 637,7	94	40,31

20. tabula. Starptestu analīze — šūnu līnija BCR-ABL Mbc (vidējais NCN)

Šūnu līnija	Atšķaidījums	Vidējais NCN*	SD	n	CV (%)
BCR-ABL Mbc	2,5 x 10 ⁻² (5 ng/200 ng)	12,6338	532,79	20	42,17
	2,5 x 10 ⁻³ (0,5 ng/200 ng)	1,1605	94,69	19	81,61
	2,5 x 10 ⁻⁴ (0,05 ng/200 ng)	0,1782	10,73	20	60,23

* Tikai šiem pētījuma rezultātiem NCN tiek sniegts kā $\frac{Mbc_{CN}}{ABL_{CN}} \times 100$.

Klīniskie pētījumi

Iekārtā ABI PRISM 7700 SDS kopā ar sadaļā “Nepieciešamie materiāli, kas netiek nodrošināti” 10. lpp. uzskaitītajiem reaģentiem tika veikts veikspējas novērtējums. Ekvivalences pētījumos tika apstiprināts tās lietojums šādos instrumentos: ABI PRISM 7000 un 7900HT SDS, LightCycler 1.2 un 480 instrumentā, Rotor-Gene 3000 un SmartCycler instrumentā (9).

Programmas “Eiropa pret vēzi” (Europe Against Cancer, EAC) saskaņotās rīcības ietvaros organizētā 26 laboratoriju grupa no 10 Eiropas valstīm izmantoja IPSOGEN piedāvātās plazmīdas, lai izveidotu standartizētu protokolu, kas paredzēts galveno, ar leukēmiju saistīto apvienoto gēnu qPCR analīzei klīniskajā vidē. BCR-ABL p210 transkripts bija viens no apvienotajiem gēniem (Fusion Gene, FG), kas tika iekļauts pētījumā. Šeit ir pieejams šī apstiprinājuma pētījuma kopsavilkums; visi rezultāti ir publicēti (8, 10).

Starplaboratoriju reproducējamība CG un FG plazmīdu standartiem

Vienpadsmit laboratorijas veica starplaboratoriju reproducējamības eksperimentu, lai novērtētu mainīgumu CG un FG plazmīdu standarta atšķaidījumos. Atšķaidījumi tika veikti divreiz katrā iestādē. 21. tabulā norādīts vidējais rādītājs, standartnovirze un CV (%) katram atšķaidījumam.

21. tabula. Starplaboratoriju reproducējamība CG un FG plazmīdu standartiem

Gēns	Atšķaidījums	Vidējais	C _T SD	CV (%)
ABL kontrolgēns	C1	29,59	1,34	4,54
	C2	26,33	1,02	3,90
	C3	22,75	1,59	6,97
BCR-ABL p210 apvienotais gēns	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

BCR-ABL Mbc FG transkripta ekspresijas vērtības

22. un 23. tabulā parādītas BCR-ABL Mbc FG transkripta un ABL CG ekspresijas vērtības K562 šūnu līnijai, CML un ALL pacientiem diagnozes noteikšanas laikā un normāliem pacientiem.

22. tabula. BCR-ABL Mbcr FG transkripta un ABL CG ekspresijas vērtības — C_T vērtības

	C _T vērtības (95 % diapazons)	
	BCR-ABL Mbcr	ABL
K562 šūnu līnija	20,5	20,7
CML pacientu paraugi		
BM (n = 15)	25,1 (21,5–27,0)	25,2 (20,7–26,8)
PB (n = 14)	23,1 (21,9–25,8)	23,7 (22,6–26,7)
ALL pacientu paraugi		
BM un PB (n = 17)	24,1 (21,5–29,9)	24,0 (21,6–26,4)
Negatīvie pacientu paraugi		
BM (n = 26)	–	25,35 (24,68–26,02)
PB (n = 74)	–	25,15 (24,83–25,48)

23. tabula. BCR-ABL Mbcr FG transkripta un ABL CG ekspresijas vērtības — CN un attiecības vērtības

	CN vērtības (95 % diapazons)		Attiecības vērtības (95 % diapazons)* CN BCR-ABL Mbcr/CN ABL
	BCR-ABL Mbcr	ABL	
CML pacientu paraugi			
BM (n = 15)	8710 (2089–112 202)	10 115,8 (4786,3–37 153,52)	0,86 (0,44–3,02)
PB (n = 14)	17 783 (2042–112 202)	15 237 (4246,2–25 568,3)	1,17 (0,48–4,41)
Negatīvie pacientu paraugi			
BM (n = 26)	–	19 201 (12 922–25 480)	–
PB (n = 74)	–	21 136 (17 834–24 437)	–

* Rezultāti izteikti kā vienkāršas BCR-ABL/ABL attiecības.

ABL C_T vērtības neatšķirās ne starp parastiem un leukēmijas paraugiem, ne starp paraugu veidiem (PB vai BM) vai leukēmijas paraugiem (ALL, AML, CML).

Viltus pozitīvās un viltus negatīvās vērtības

Viltus negatīvās un viltus pozitīvās vērtības tika aprēķinātas, izmantojot tālāk norādītos kontroles materiālus.

- Pozitīvās kontroles materiāli: K562 šūnas — šūnu līnijas, kas BCR-ABL p210 apvienotajam gēnam parasti rada pozitīvus rādītājus; pacienta paraugi ir jau novērtēti attiecībā uz p210 pozitīvajiem rādītājiem
- Negatīvās kontroles materiāli: negatīvi RNS paraugi, nav neviena amplifikācijas kontroles materiāla (no amplification controls, NAC), kas tiktu izgatavots no *E. coli* RNS, nevis cilvēka RNS, lai pārbaudītu PCR kontamināciju, kā arī nav neviena veidnes kontroles materiāla (no template controls, NTC), kas cilvēka RNS vietā saturētu ūdeni

FG RNS paraugu amplifikācija tika veikta trīs reizes un CG gēnam divas reizes.

Viltus negatīvs paraugs tika definēts kā pozitīvs RNS paraugs ar mazāk nekā 50 % pozitīvo iedobju (0/2, 0/3 vai 1/3).

Viltus pozitīvs paraugs tika definēts kā negatīvs paraugs ar vismaz 50 % pozitīvu iedobju (1/2, 2/3 vai 3/3).

24. tabulā parādīts viltus negatīvu un viltus pozitīvu paraugu skaits un procentuālais daudzums.

24. tabula. Viltus negatīvi un viltus pozitīvi paraugi

Viltus negatīvi rādītāji		Viltus pozitīvi rādītāji	
10 ⁻³	10 ⁻⁴	FG negatīvas kontroles materiāls	NAC/NTC
0 % (0/33)	6,1 % (2/33)	10,9 % (6/55)	4,1 % (14/340)

Atsauces

QIAGEN uztur plašu atjauninātu tiešsaistes zinātnisku publikāciju par QIAGEN produktiem datu bāzi. Vispusīgas meklēšanas iespējas ļauj meklēt nepieciešamos rakstus, vai nu vienkārši norādot atslēgas vārdu, vai norādot procedūru, izpētes jomu, nosaukumu utt.











Lai iegūtu pilnīgu atsauču sarakstu, apmeklējiet QIAGEN atsauču datu bāzi vietnē www.qiagen.com/RefDB/search.asp vai sazinieties ar QIAGEN tehniskā atbalsta dienestu vai vietējo izplatītāju.

Citētās atsauces

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.

Simboli

Uz iepakojuma un marķējuma var būt šādi simboli:

 Σ <N>	Satur reagentus, kuru daudzums ir pietiekams <N> reakcijām
	Izlietot līdz
	<i>In vitro</i> diagnostikas medicīnas ierīce
	Kataloga numurs
	Partijas numurs
	Materiāla numurs
	Globālais tirdzniecības identifikācijas numurs (GTIN)
	Temperatūras ierobežojums
	Ražotājs
	Skatīt lietošanas norādījumus

Kontaktinformācija

Lai saņemtu tehnisku palīdzību un papildu informāciju, lūdzu apskatiet mūsu tehniskā atbalsta centra vietni www.qiagen.com/Support, zvaniet pa tālruņa numuru 00800-22-44-6000 vai sazinieties ar kādu no QIAGEN tehnisko pakalpojumu dienesta nodaļām (skatiet izmugurējo vāku vai apmeklējiet vietni www.qiagen.com).

Informācija par pasūtīšanu

Produkts	Saturs	Kat. nr.
<i>ipsogen</i> BCR-ABL1 Mbc Kit (24)	24 reakcijām: ABL kontrolgēna standarti, BCR-ABL Mbc apvienotā gēna standarti, praimera un zondes maisījums ABL, praimera un zondes maisījums BCR-ABL Mbc apvienotajam gēnam	670123
Rotor-Gene Q MDx — IVD apstiprinātajai real-time PCR analīzei klīniskajos pielietojumos		
Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM Platform	Real-time PCR amplifikators un augstas izšķirtspējas kušanas analizators ar 5 kanāliem (zaļš, dzeltens, oranžs, sarkans, sārts) un HRM kanālu, klēpjdatore, programmatūra, piederumi, 1 gada garantija daļām un darbam, bet instalācija un apmācība nav iekļauta	9002032
Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM System	Real-time PCR amplifikators un augstas izšķirtspējas kušanas analizators ar 5 kanāliem (zaļš, dzeltens, oranžs, sarkans, sārts) un HRM kanālu, klēpjdatore, programmatūra, piederumi, 1 gada garantija daļām un darbam, instalācija un apmācība	9002033
<i>ipsogen</i> BCR-ABL1 Mbc Controls Kit — RNS ekstrakcijas un BCR-ABL Mbc apvienotā gēna atgriezeniskās transkriptāzes kvalitatīvai validācijai		
<i>ipsogen</i> BCR-ABL1 Mbc Controls Kit	Šūnu līnijas ar negatīvo, augsti un zemi pozitīvo BCR-ABL Mbc apvienotā gēna ekspresiju	670191

Jaunāko informāciju par licencēšanu un preču juridiskās atrunas skatīt attiecīgā QIAGEN komplekta rokasgrāmatā vai lietotāja rokasgrāmatā. QIAGEN komplektu lietotāja rokasgrāmatas un lietotāja instrukcijas ir pieejamas vietnē www.qiagen.com, kā arī tās var pieprasīt QIAGEN tehniskā atbalsta centros vai pie vietējiem izplatītājiem.

Šī lappuse atstāta tukša ar nolūku

Šī lappuse atstāta tukša ar nolūku

Šī lappuse atstāta tukša ar nolūku

Šis izstrādājums ir paredzēts lietošanai *in vitro* diagnostikā. *ipsogen* izstrādājumus nedrīkst pārdot tālāk, izmainīt tālākpārdošanai vai izmantot, lai ražotu komerciālus izstrādājumus, bez QIAGEN rakstiskas atļaujas.

Šajā dokumentā pieejamā informācija var tikt mainīta bez iepriekšēja paziņojuma. QIAGEN neuzņemas atbildību par jebkādam kļūdām, kas var būt šajā dokumentā. Tiek uzskatīts, ka publicēšanas brīdī šis dokuments ir pilnīgs un precīzs. QIAGEN nekādā gadījumā nav atbildīgs par nejausiem, tīšiem, daudzkārtīgiem vai izrietošiem zaudējumiem, kas ir saistīti ar šī dokumenta izmantošanu vai rodas no tā izmantošanas.

ipsogen izstrādājumiem tiek garantēta atbilstība noteiktajām specifikācijām. QIAGEN vienīgais pienākums un klienta vienīgais tiesiskās aizsardzības līdzeklis ir izstrādājuma nomaiņa bez maksas, ja izstrādājumi nedarbojas, kā norādīts.

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

Ierobežotās licences līgums

Šī izstrādājuma izmantošana apliecina katra *ipsogen* BCR-ABL1 Mbc Kit pircēja vai lietotāja piekrišanu tālāk minētajiem nosacījumiem.

1. BCR-ABL1 Mbc Kit drīkst izmantot tikai saskaņā ar norādījumiem *ipsogen BCR-ABL1 Mbc Kit rokasgrāmatā* un tikai ar komplektā iekļautajiem komponentiem. Uzņēmums QIAGEN nepiešķir nekāda veida licenci uz nevienu no tā intelektuālajiem īpašumiem, lai šajā komplektā iekļautos komponentus izmantotu kopā ar jebkādiem komponentiem, kas nav iekļauti šajā komplektā, vai ar tām apvienotu, izņemot gadījumus, kas aprakstīti *BCR-ABL1 Mbc Kit rokasgrāmatā* un papildu protokolos, kas pieejami vietnē www.qiagen.com.
2. Uzņēmums QIAGEN nesniedz citas garantijas, izņemot skaidri norādītās licences, ka šis komplekts un/vai tā lietošana pārkāpj trešo pušu tiesības.
3. Šis komplekts un tā komponenti ir licencēti vienreizējai lietošanai, un tos nedrīkst izmantot atkārtoti, atjaunot vai pārdot tālāk.
4. Uzņēmums QIAGEN īpaši atsakās no jebkādam citām tiesām vai netiesām licencēm, kas nav skaidri norādītas.
5. Komplekta pircējs un lietotājs piekrīt neveikt un neatļaut citiem veikt nekādas darbības, kas varētu izraisīt vai veicināt jebkuras no iepriekš aizliegtajām darbībām. Uzņēmums QIAGEN var pieprasīt šī ierobežotā licences līguma aizliegumu īstenošanu jebkurā tiesā un apņemas atgūt visus savus izmeklēšanas un tiesas izdevumus, ieskaitot advokātu honorārus, kas radušies, īstenojot šī ierobežotā licences līguma nosacījumus vai jebkuru no uzņēmuma intelektuālā īpašuma tiesībām saistībā ar komplektu un/vai tā komponentiem.

Jaunākos licences nosacījumus skatiet vietnē www.qiagen.com.

HB-1360-002 © 2013–2015 QIAGEN, visas tiesības aizsargātas.

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

