

ipsogen[®] WT1 ProfileQuant[®] komplekti (ELN*) käsiraamat



1. versioon

IVD

Kvantitatiivne *in vitro* diagnostika

Kasutamiseks koos instrumentidega Rotor-Gene[®] Q, ABI PRISM[®] 7900HT SDS, Applied Biosystems[®] 7500 Real-Time PCR System ja LightCycler[®]



REF

676923



QIAGEN GmbH, QIAGEN Strasse 1, 40724 Hilden, SAKSAMAA

R2

MAT

1072503ET

ELN LeukemiaNet[®]
European



QIAGEN Sample and Assay Technologies

QIAGEN on uuenduslike proovi- ja analüüsimeetodite juhtiv tootja, kes loob võimalused mikroorganismide isoleerimiseks ja tuvastamiseks igasugusest bioloogilisest proovimaterjalist. Meie väljatöötatud kõrge kvaliteediga tooted ja teenused tagavad edu proovi analüüsimisel.

QIAGEN loob standardid järgmistes tegevustes:

- DNA, RNA ja valkude puhastamine
- nukleiinhapete ja valkude analüüsimine
- microRNA uurimine ja RNAi
- proovi- ja analüüsimeetodite automatiseerimine

Meie missiooniks on aidata teil saavutada väljapaistvat edu ja läbimurret. Lisateavet saate meie kodulehelt www.qiagen.com.

Sisukord

Sihtotstarve	4
Kokkuvõte ja selgitus	4
Protseduuri põhimõte	5
Komplekti sisu	8
Vajalikud, kuid komplektis mittesisalduvad materjalid	9
Hoiatused ja ettevaatusabinõud	10
Üldised ettevaatusabinõud	10
Reaktiivide säilitamine ja käitlemine	11
Läbiviimine	12
Proovi RNA ettevalmistamine	12
Protokoll: soovitatud standardiseeritud EAC pöördtranskriptsioon	12
Protokoll: qPCR seadmel RotorGene Q MDx 5plex HRM või Rotor	15
Protokoll: qPCR seadmetel ABI PRISM 7900HT SDS, Applied Biosystems 7500 Real-Time PCR System ja LightCycler 480	19
Protokoll: qPCR seadmel LightCycler 1.2	24
Tulemuste tõlgendamine	28
Andmeanalüüsi põhimõte	28
Tulemused	29
Tõrkeotsing	30
Kvaliteedikontroll	34
Piirangud	34
Toimekarakteristikud	35
Mittekliinilised uuringud	35
Kliinilised uuringud	37
Viited	40
Sümbolid	41
Kontaktandmed	42
Tellimisinfo	43

Sihtotstarve

Komplekt *ipsogen WT1 ProfileQuant* on mõeldud Wilmsi tuumori (WT) geeni transkribeerimiseks kogu RNA-s ägeda müeloidse leukeemiaga (AML) patsientidel. Saadud tulemused on mõeldud varase ravivastuse ja minimaalse residuaalse haiguse (*minimal residual disease*, MRD) jälgimiseks.

Kokkuvõte ja selgitus

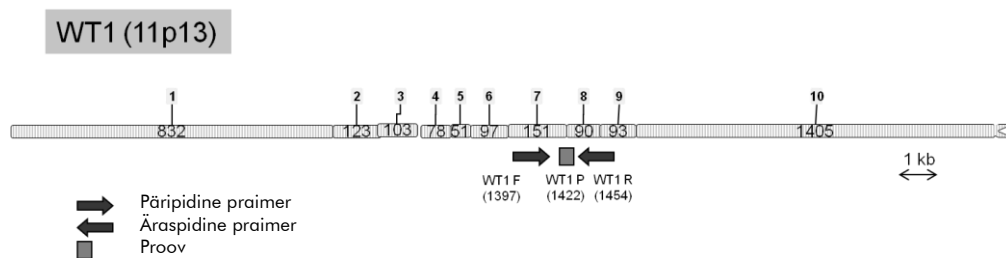
Hetkel põhinevad ägeda müeloidse leukeemia (AML) protokollid prognostilistel teguritel, mille alusel patsiendid ravigruppidesse jaotatakse. (1, 2) Seni tuvastatud prognostiliste võtmetegurite hulka kuuluvad teatud raviga mitteseotud parameetrid nagu vanus ja leukotsüütide arv (WBC), samuti patsiendi karüotüüp ja spetsiifiliste geenimutatsioonide, nt FLT3 ja NPM1 olemasolu. (3, 4) Morfoloogiline vastus induktsioonkemoteraapiale on veel üks ennustav tegur, mis on lisatud praegu kasutatavasse riskigruppidesse jaotamise skeemidesse, mida kasutatakse otsuste tegemisel konsolidatsioonteraapia kohta eriti allogeense siirdamise puhul. (5) Kui nende parameetrite abil jaotatakse patsiendid relapsi erinevate üldiste riskide alusel gruppidesse, on suur vajadus riskigruppidesse jaotamist täpsustada, et neid patsiente usaldusväärsemalt tuvastada, et nad siirdamisest kõige enam kasu saaksid. Mitmed uuringud on näidanud MRD jälgimise kasulikkust reaalsajalise kvantitatiivse polümeraasahela reaktsiooni (qPCR) abil leukeemiaspetsiifiliste sihtmärkide osas, st fusioonigeeni (FG) transkriptsioonide nagu PML-RARA, CBFβ-MYH11, AML1-ETO (RUNX1-RUNX1T1), või spetsiifiliste geenide, nt NPM1 mutatsioonide suhtes. See võimaldab suurima relapsiriskiga patsientide tuvastamise ning toob välja patsiendid, kes vajavad kiiret sekkumist. (6)

Umbes pooltel AML-i patsientidel puudub sobiv leukeemiaspetsiifiline sihtmärk ning märkimisväärne huvi on alternatiivsete lähenemiste arendamise vastu, mis võimaldavad MRD-jälgimise rakendamist suuremal hulgal patsientidel. Üks strateegiatest hõlmab voolutsütomeetria kasutamist leukeemiaga seotud aberrantsete fenotüüpide tuvastamiseks ja jälgimiseks, ent kuigi see strateegia on laialt rakendatav, on see tehniliselt väga nõudlik. (6) Teine lähenemine hõlmab qPCR-i kasutamist, et tuvastada transkriptsioone, mis on AML-i blastides võrreldes normaalse lümfotsüüdi ja verega tugevalt üleekspressioonitud, kõige enam keskendutakse *WT1* geenile. (6)

WT1 geen asub kromosoomis 11p13, kodeerib tsink-sõrme transkriptsioonitegurit, ja esmalt leiti selle geeni seotus Wilmsi tuumori patogeneesiga. (7) *WT1* geeni tugevat ekspressiooni on näidatud mitmel hematopoeetilistel kasvajatel, sh AML. (7, 8) Kuigi *WT1* üleekspressiooni põhjustavaid mehhanisme tuntakse endiselt halvasti, võib seda fenomeni kasutada markerina, mis näitab leukeemilise hematopoeesi olemasolu, püsimist või taasteket.

Protseduuri põhimõte

qPCR-meetod võimaldab PCR-produktide täpset kvantifitseerimist PCR-i amplifikatsiooniprotsessi eksponentsiaalse faasi ajal. qPCR-st saadud andmeid saab hankida kiiresti ilma PCR-järgse tötluseta, kasutades fluorestsentsete signaalide reaalaajalist tuvastamist PCR-tsükli ajal ja/või selle järel, mistõttu PCR-toote saastumise risk drastiliselt väheneb. Hetkel on saadaval 3 peamist tüüpi qPCR-meetodit: qPCR-analüüs komplekti SYBR® värvi Green I (roheline I) abil, qPCR-analüüs hüdrolüüsiproovide abil ja qPCR-analüüs hübriidiseerimisproovide abil.

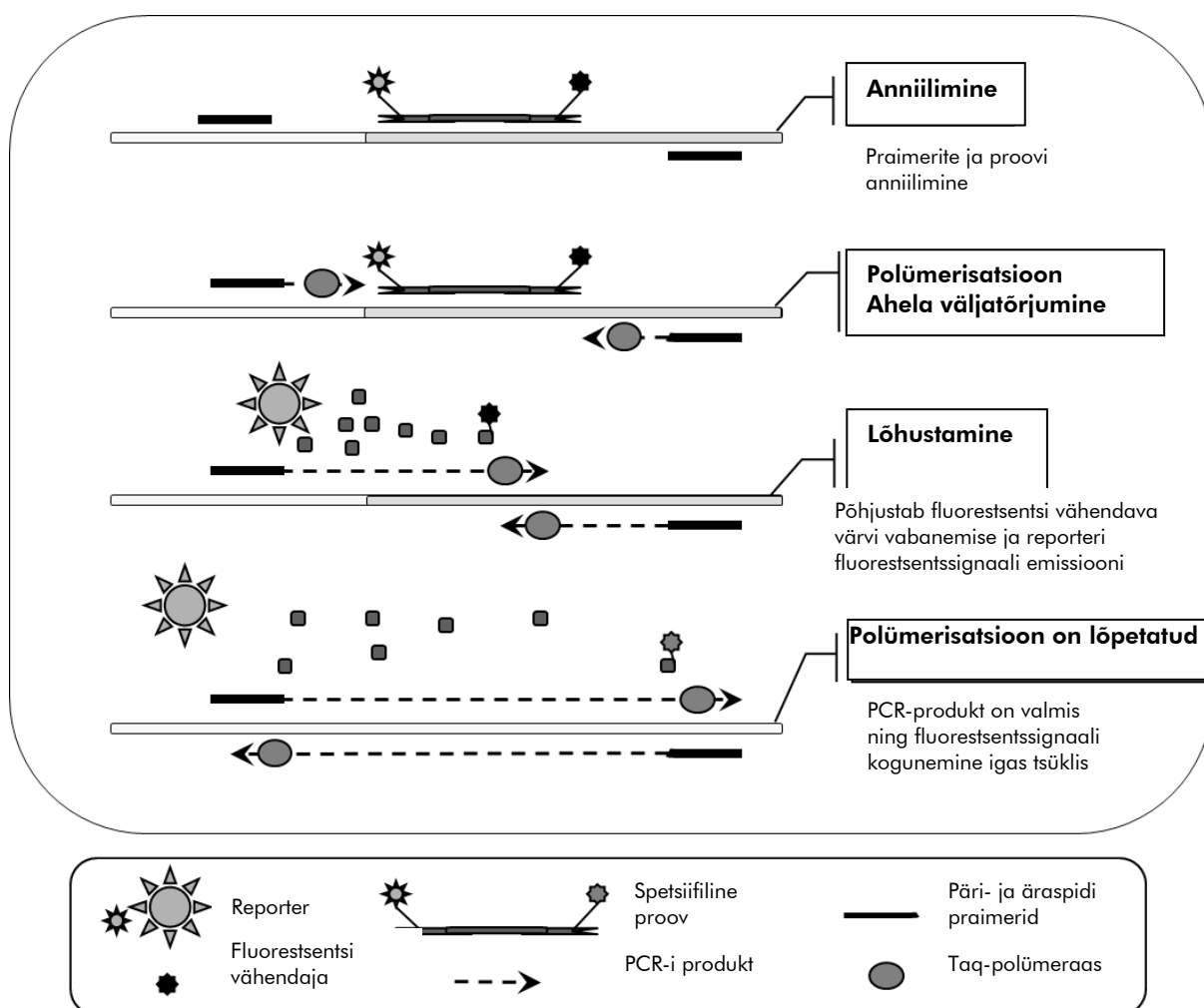


Joonis 1. ELN qPCR-praimerite ja prooviga kaetud WT1 transkriptsiooni skemaatiline diagramm: WT1-ELN F–WT1-ELN P–WT1-ELN R. Praimerite ja proovi all olev number tähistab nende nukleotiidsset asukohta normaalse geeni transkriptsioonis. Ekson 5 võib olla muul moel ühendatud.

See analüüs kasutab qPCR-i topeltvärvinguga oligonukleotiidi hüdrolüüsi põhimõtet. PCR-i ajal hübriidiseerivad päri- ja äraspidi praimerid spetsiifilise järjestuse. Topeltvärvinguga oligonukleotiid on samas segus. Proov, mis koosneb 5' reportervärviga märgistatud ja pärioolulise, 3' fluorestseerumist vähendava värviga märgistatud oligonukleotiidist, hübriidiseerib sihtjärjestust PCR-i toote piires. Hüdrolüüsiproovi qPCR-analüüsis kasutatakse *Thermus aquaticus*'e (Taq) DNA polümeraasi 5'→3' eksonukleaasi aktiivsust. Kui proov on intaktne, annab reportervärvi lähedus fluorestseerumist neelavale värvile tulemuseks reportervärvi fluorestseerumise peamiselt Förster-tüüpi energiaülekannde abil.

Kui huvipakkuv sihtmärk on olemas, anniilib proov PCR-i ajal spetsiifiliselt äras- ja päripidised praimerid. DNA polümeraasi 5'→3' eksonukleaasi aktiivsus lõhestab proovi reporteri ja fluorestsentsi vähendaja vahel vaid juhul, kui proov hübriidiseerib sihtmärgi. Proovi fragmendid tõrjutakse seejärel sihtmärgist välja ning algab ahela polümerisatsioon. Proovi 3' ots blokeeritakse, et takistada proovi pikenemist PCR-i ajal (joonis 2). See protsess toimub igas tsükli ning ei sega toote eksponentsiaalset akumulatsiooni.

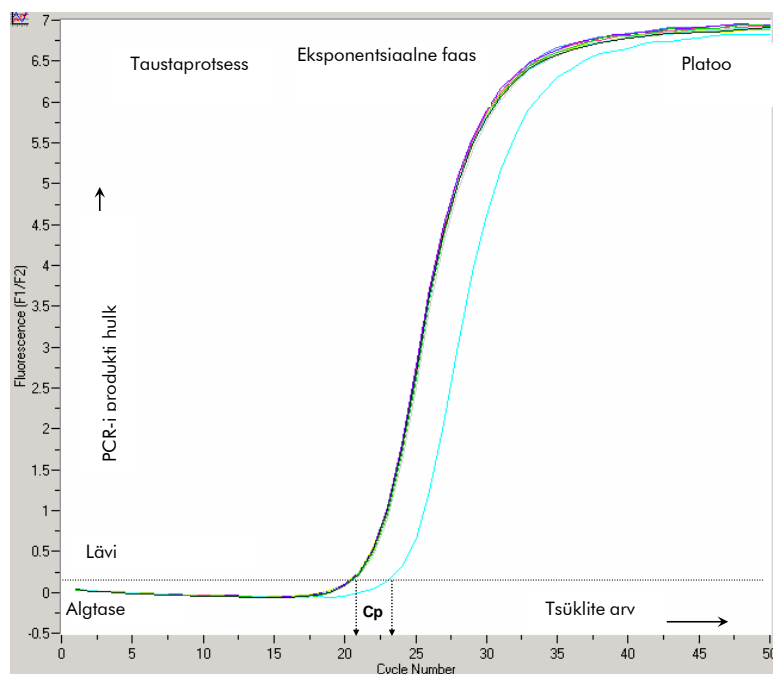
Fluorestsentssignaali tugevnemist tuvastatakse vaid juhul, kui sihtjärjestus on prooviga komplementaarne ning seega PCR-i ajal amplifitseeritud. Nende tingimuste tõttu ei tuvastata mittespetsiifilist amplifikatsiooni. Seega on fluorestsentsi tugevnemine otseselt proportsionaalne sihtmärgi amplifikatsiooniga PCR-i ajal.



Joonis 2. Reaktsiooni põhimõte. Toimub kogu RNA pöördtranskriptsioon ning saadud cDNA amplifitseeritakse PCR-i abil, kasutades spetsiifiliste praimerite paari ning spetsiifilist sisemist topeltvärvingu proovi (FAM™–TAMRA™). Proov seondub ampliconiga PCR-i iga anniilimisetapi ajal. Kui Taq laieneb ampliconiga seotud praimerist, tõrjub see välja proovi 5' otsa, mis seejärel lagundatakse Taq DNA polümeraasi 5'→3' eksonukleasi aktiivsuse abil. Lõhustamine jätkub, kuni allesjäänud proov ampliconi „ära sulatab“. Selle protsessi käigus vabaneb lahusesse fluorofoor ja fluorestsentsi vähendaja, need eraldatakse ruumiliselt ning see põhjustab FAM-i fluorestsentsi suurenemise ning TAMRA fluorestsentsi vähenemise.

Fluorestsentsi võrreldakse tsükli numbriga, PCR-i produkti kogunemine on näidatud joonisel 3. See amplifikatsioonikõver koosneb järjestikustest faasidest: varane taustafaas (instrumendi tuvastusvõimest allpool), eksponentsiaalne faas (ehk logaritmiline faas) ja plato. Kõige täpsem kvantitatiivne määramine saab toimuda vaid eksponentsiaalses faasis. Esimest tsükli, mille jooksul instrument suudab eristada fluorestsentsi tekitava amplifikatsiooni (kuna see jääb kõrgemale nn taustasignaalist), nimetatakse lävetsükliks (C_T) või ristumispunktiiks (C_p). Kui valida lävi logaritmilis-lineaarsesse faasi, on võimalik arvutada algselt olemasolevate molekulide kogus, kuna fluorestsentsi intensiivsus on otseselt proportsionaalne eksponentsiaalses faasis olemasoleva PCR-i produkti hulgaga.

Platoofaasis PCR-i produkti hulga märkimisväärselt suurenemist ei toimu. See on peamiselt tingitud PCR-i komponentide lõppemisega ning PCR-i produkti ahelate uuesti anniilimisega, mida põhjustab lõpp-produkti suur kontsentratsioon, mis takistab praimerite edasist anniilimist.



Joonis 3. Fluorestsents tsüklite ja amplifikatsiooni järjestikuste faaside ajal.

Kõige otsesem ja täpsem lähenemine kvantitatiivsete andmete analüüsimiseks on standardkõvera kasutamine, mis luuakse teadaoleva kontsentratsiooniga kontrollmatriitsi lahjendusseeriade põhjal. Seda nimetatakse standardkõveraks või absoluutseks kvantifitseerimiseks. Pärast standardsete lahjendusseeriade amplifikatsiooni luuakse standardkõver esmase matriitsi koopiade arvu suhte põhjal igas lahjenduses loodud C_p -ga. Nende punktide ühendamisel luuakse standardkõver. Selle standardkõvera võrrandi kasutamine võimaldab proovi esmase koopiade arvu määramist kvantitatiivselt.

Komplektis WT1 ProfileQuant (ELN) on spetsiifilised plasmiidid ja praimerite ja proovi segud WT1 ja ABL-i jaoks. Need komponendid on valideeritud kollaboratiivse uuringu käigus, mida juhtis organsiatsiooni *European Leukemia Net* (Euroopa Leukeemiaühendus) konsortsiumi ekspertide grupp. Varem Van Dijki ja tema kaastöötajate poolt välja töötatud analüüs oli mitmeid kordadel efektiivsem teistest analüüsides ja on tänu selle konfiguratsioonidele vähem aldis AML-i mutatsioonide tekkele. (9) Seetõttu valiti see ELN WT1 analüüsiks. Komplekt *ipsogen* WT1 ProfileQuant põhineb sellel meetodil. Selles komplektis amplifitseeritakse proovis nii endogeenne kontroll (ABL-i transkript) kui ka WT1 transkript. Kontroll-lahuse ja WT1 cDNA standardsed seerialahjendused on komplektis kaasas ning loodud standardkõverad võimaldavad igas proovis olevate WT1 transkriptide ja ABL-i koopiade arvu täpset arvutamist.

Komplektis olevad materjalid

Komplekti sisu

ipsogen WT1 ProfileQuant Kit		(24)
Kataloogi nr		676923
Reaktsioonide arv		24
ABL Control Gene Standard Dilution (ABL-geeni kontroll-standardlahus) (10^3 koopiat / $5 \mu\text{l}$)	C1-ABL	$50 \mu\text{l}$
ABL Control Gene Standard Dilution (ABL-geeni kontroll-standardlahus) (10^4 koopiat / $5 \mu\text{l}$)	C2-ABL	$50 \mu\text{l}$
ABL Control Gene Standard Dilution (ABL-geeni kontroll-standardlahus) (10^5 koopiat / $5 \mu\text{l}$)	C3-ABL	$50 \mu\text{l}$
WT1 Profile Gene Standard Dilution (WT1 geeni profiili standardlahus) (10^1 koopiat / $5 \mu\text{l}$)	P1-WT1	$50 \mu\text{l}$
WT1 Profile Gene Standard Dilution (WT1 geeni profiili standardlahus) (10^2 koopiat / $5 \mu\text{l}$)	P2-WT1	$50 \mu\text{l}$
WT1 Profile Gene Standard Dilution (WT1 geeni profiili standardlahus) (10^3 koopiat / $5 \mu\text{l}$)	P3-WT1	$50 \mu\text{l}$
WT1 Profile Gene Standard Dilution (WT1 geeni profiili standardlahus) (10^5 koopiat / $5 \mu\text{l}$)	P4-WT1	$50 \mu\text{l}$
WT1 Profile Gene Standard Dilution (WT1 geeni profiili standardlahus) (10^6 koopiat / $5 \mu\text{l}$)	P5-WT1	$50 \mu\text{l}$
Primers and Probe Mix ABL (Praimerite ja proovi segu ABL)*	PPC-ABL 25x	$90 \mu\text{l}$
Primers and Probe Mix PPP-WT1 (Praimerite ja proovi segu PPP-WT1) (ELN) †	PPP-WT1 (ELN) 25x	$110 \mu\text{l}$
ipsogen WT1 ProfileQuant Kit Handbook (inglise keeles)		1

* Segu spetsiifilistest päri- ja äraspidistest ABL-i kontrollgeeni (CG) praimeritest, lisaks spetsiifiline FAM-TAMRA proov.

† Segu spetsiifilistest päri- ja äraspidistest WT1 geeni (ekson 1-2) praimeritest, lisaks spetsiifiline FAM-TAMRA proov.

Märkus. Enne kasutamist tsentrifuugige standardlahuseid, praimerite ja proovi segusid lühiajaliselt.

Vajalikud, kuid komplektis mittesisalduvad materjalid

Kemikaalidega töötamisel kandke alati sobivat laborikitlit, ühekordseid kindaid ja kaitseprille. Lisateavet saate vastavatelt ohutuslehtedelt, mis on saadaval toote tarnija juures.

Reaktiivid

- Nukleaasivaba ja PCR-i jaoks vajaliku kvaliteediga vesi
- Reaktiivid pöördtranskriptsiooni jaoks: valideeritud reaktiiviks on Superscript® II (ehk Superscript) Reverse Transcriptase (pöördtranskriptaas), mis sisaldab 5× standardpuhvrit, 100 mM DTT (Life Technologies, kataloogi nr 18064-022)
- RNAasi inhibiitor: valideeritud reaktiiv on RNaseOUT™ (Life Technologies, kataloogi nr 10777-019)
- Komplekt dNTP-sid, PCR-i jaoks sobiva kvaliteediga
- Suvaline heksameer
- MgCl₂
- Puhver ja Taq DNA polümeraas: valideeritud reaktiivideks on TaqMan® Universal PCR Master Mix (põhisegu PCR 2×) (Life Technologies, kataloogi nr 4304437) ja LightCycler TaqMan Master (põhisegu PCR 5×) (Roche, kataloogi nr 04535286001)

Tarvikud

- Nukleaasivabad aerosoolide suhtes resistentsed steriilsed PCR-pipetiotsikud hüdrofoobsete filtritega
- 0,5 ml või 0,2 ml RNAasi- ja DNAasi-vabad PCR-katsutid
- Jää

Vahend

- Mikroliitri-pipett* mõeldud spetsiaalselt PCR-i jaoks (1–10 µl; 10–100 µl; 100–1000 µl)
- Lauapealne tsentrifuug* rootoriga, mis on mõeldud 0,2 ml / 0,5 ml reaktsioonikatsutite jaoks ning mille maksimaalne kiirus on 13 000–14 000 pööret minutis.

- Seade PCR-i reaalaajaliseks määramiseks: * Rotor-Gene Q 5plex HRM® või muu Rotor-Gene seade; LightCycler 1.2 või 480; või ABI PRISM 7900HT SDS; Applied Biosystems 7500 Real-Time PCR System ja seotud spetsiifiline materjal.
- Termotsükler* või vesivann* (pöördtranskriptsiooni etapp)

Märkus. Veenduge, et termotsükler või vesivann on kontrollitud ja kalibreeritud vastavalt tootja juhistele.

Hoiatused ja ettevaatusabinõud

In vitro diagnostiliseks kasutamiseks

Kemikaalidega töötamisel kandke alati sobivat laborikitlit, ühekordseid kindaid ja kaitseprille. Lisateavet saate vastavatelt andmelehtedelt. Need on saadaval internetis ja kompaktses PDF-vormingus kodulehel www.qiagen.com/safety, kus saate vaadata ja printida ohutuslehti QIAGENi iga komplekti ja komplekti osa kohta.

Hävitage proovide ja analüüside jäätmed vastavalt kohalikele ohutuseeskirjadele.

Üldised ettevaatusabinõud

qPCR-testide kasutamisel on vaja järgida häid laboritavasid, sh molekulaarbioloogia seadmete hooldus, mis vastab kehtivatele eeskirjadele ja asjakohastele standarditele.

Komplekt on mõeldud *in vitro* diagnostiliseks kasutamiseks. Komplektis olevad reaktiivid ja juhtnõõrid on optimaalse töökindluse osas valideeritud. Reaktiivide edasine lahjendamine või inkubatsiooniaegade ja temperatuuride muutmine võib anda ekslikud või sobimatud tulemused. PPC-ABL ja PPP-WT1 reaktiivid võivad valgusega kokku puutudes muunduda. Kõik reaktiivid on kokku pandud spetsiaalselt selle testiga kasutamiseks. Testi optimaalse töökindluse tagamiseks ei tohi neid muude reaktiividega asendada.

Transkriptsiooni tasemete määramisel qPCR-i abil on vaja nii mRNA pöördtranskriptsiooni kui saadud cDNA amplifikatsiooni PCR-i abil. Seetõttu tuleb kogu analüüsiprotseduur sooritada RNAasi- ja DNAasi-vabades tingimustes.

Olge äärmiselt ettevaatlik, et ei juhtuks järgmist:

- saastumine RNAasi/DNAasiga, mis võib põhjustada matriits-mRNA ja saadud cDNA lagunemist
- mRNA või PCR-i ülekandesaste, mis annab valepositiivse signaali

Seetõttu soovitame järgmist.

- Kasutage nukleaasivabasid laborivahendeid (nt pipetid, pipetiotsikud, reaktsiooniviaalid) ja kandke analüüsi sooritamisel kindaid.
- Proovide ja reaktiivide ristsaaste vältimiseks kasutage kõikide pipeteerimisprotseduuride ajal värskeid aerosoolide suhtes resistentseid pipetiotsikuid.
- Valmistage ette PCR-i eelne põhisegu spetsiaalsete vahenditega (pipetid, pipetiotsikud jne) spetsiaalses piirkonnas, kus DNA maatriksite (cDNA, DNA, plasmiidid) sattumine lahusesse pole võimalik. Lisage matriits eraldi tsooni (eelistatavalt eraldi ruumis), kasutades spetsiaalseid vahendeid (pipetid, pipetiotsikud jne).
- Käideldes standardlahuseid (C1–3 ja P1–5) eraldi ruumis.

Reaktiivide säilitamine ja käitlemine

Komplektid saadetakse kuival jääl ning neid tuleb pärast kättesaamist säilitada temperatuuril -30...-15 °C.

- Minimeerige praimerite ja proovi segude kokkupuudet valgusega (PPC- ja PPP-katsutid).
- Enne avamist segage ja tsentrifuugige katsuteid veidi.
- Säilitage kõiki komplekti komponente originaalpakendites.

Need säilitustingimused kehtivad nii avatud kui ka avamata pakendiga komponentide kohta. Muudel tingimustel säilitatud komponendid ei pruugi õigesti toimida ning need võivad analüüsitulemusi rikkuda.

Kõikide reaktiivide kõlblikkusajad on näidatud üksikute komponentide etikettidel. Õigete säilitustingimuste korral säilitab toode töökindluse kuni etiketil trükitud kõlblikkusaja lõpuni.

Toote ebastabiilsust ei näita ükski selgelt eristatav märk. Siiski tuleb positiivseid ja negatiivseid kontrollproove analüüsida samaaegselt tundmatu kontsentratsiooniga proovidega.

Läbiviimine

Proovi RNA ettevalmistamine

Patsiendi proovides (veres või luuüdis) oleva RNA tuleb ette valmistada valideeritud protseduuri järgides. Analüüsi kvaliteet sõltub suuresti sisend-RNA kvaliteedist. Seetõttu soovitame tõsta puhastatud RNA kvaliteeti enne analüüsimist elektroforeesi abil agar-agar* geelil või kasutada vahendit Agilent® Bioanalyzer®.

Protokoll: soovitatud standardiseeritud EAC pöördtranskriptsioon

Enne alustamist tehke järgmist.

- Valmistage ette dNTP-d, igaüks 10 mM. Säilitage võrdsete osadena temperatuuril $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$.
- Valmistage ette heksameer, 50 mM. Säilitage võrdsete osadena temperatuuril $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$.
- Valmistage ette MgCl_2 , 50 mM. Säilitage võrdsete osadena temperatuuril $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Läbiviimine

1. Sulatage kõik vajalikud komponendid ning asetage need jääle.
2. Inkubeerige $1\text{ }\mu\text{g}$ RNA-d ($1\text{--}4\text{ }\mu\text{l}$) 10 minutit temperatuuril $70\text{ }^{\circ}\text{C}$ ja jahutage kohe jääl 5 minutit.
3. Tsentrifugeerige veidi (u 10 sekundit, 10 000 pööret minutis), et koguda vedelik katsuti põhja. Seejärel hoidke seda jääl.
4. Valmistage järgmine RT-segu vastavalt analüüsitavaate proovide arvule (tabel 1).

* Kemikaalidega töötamisel kandke alati sobivat laborikitlit, ühekordseid kindaid ja kaitseprille.

Tabel 1. RT-segu valmistamine

Komponent	Maht proovi kohta (μl)	Lõppkontsentratsioon
First-Strand Buffer (komplektis Superscript II Reverse Transcriptase (pöördtranskriptaas)), 5 \times	4,0	1 \times
MgCl ₂ (50 mM)	2,0	5 mM
dNTP-d (igaüks 10 mM, peavad olema varem ette valmistatud ning säilitatud võrdsete osadena temperatuuril -20 °C)	2,0	1 mM
DTT (100 mM, komplektis Superscript II Reverse Transcriptase)	2,0	10 mM
RNAasi inhibiitor (40 U/ μ l)	0,5	1 U/ μ l
Suvaline heksameer (100 μ M)	5,0	25 μ M
Superscript II (200 U/ μ l)	0,5	5 U/ μ l
Soojendatud RNA proov (lisatakse etapis 5)	1,0–4,0	50 ng/ μ l
Nukleaasivaba PCR-i jaoks sobiva kvaliteediga vesi (lisatakse etapis 5)	0,0–3,0	–
Lõppmaht	20,0	–

- 5. Pipeteerige igasse PCR-i katsutisse 16 μ l RT-segu. Seejärel lisage 1–4 μ l (1 μ g) RNA-d (etapist 3) ja lisage nukleaasivaba PCR-i jaoks sobiva kvaliteediga vett kuni mahuni 20 μ l (vt tabel 2).**

Tabel 2. Pöördtranskriptsioonireaktsiooni ettevalmistamine

Komponent	Maht (μl)
RT-segu	16,0
Soojendatud proovist võetud RNA (1 μ g)	1,0–4,0
Nukleaasivaba ja PCR-i jaoks vajaliku kvaliteediga vesi	0,0–3,0
Lõppmaht	20,0

6. Segage hästi ja tsentrifuugige veidi (u 10 sekundit, 10.000 pööret minutis), et koguda vedelik katsuti põhja.
7. Inkubeerige 10 minutit temperatuuril 20 °C.
8. Inkubeerige 45 minutit termotsükleril temperatuuril 42 °C, seejärel kohe 3 minutit temperatuuril 99 °C.
9. Jahutage jääl (reaktsiooni peatamiseks) 5 minutit.
10. Tsentrifugeerige veidi (u 10 sekundit, 10.000 pööret minutis), et koguda vedelik katsuti põhja. Seejärel hoidke seda jääl.
11. Lahjendage lõplik cDNA 30 μ l nukleaasivaba PCR-i jaoks sobiva veega, nii et lõplik maht on 50 μ l.
12. Sooritage PCR vastavalt protokollidele, mis on kaasas teie qPCR-seadmega.

Märkus. Pöördtranskriptsiooni protokoll on saadud programmist „Euroopa vähi vastu“ (EAC) (10, 11).

Protokoll: qPCR seadmel RotorGene Q MDx 5plex HRM või Rotor

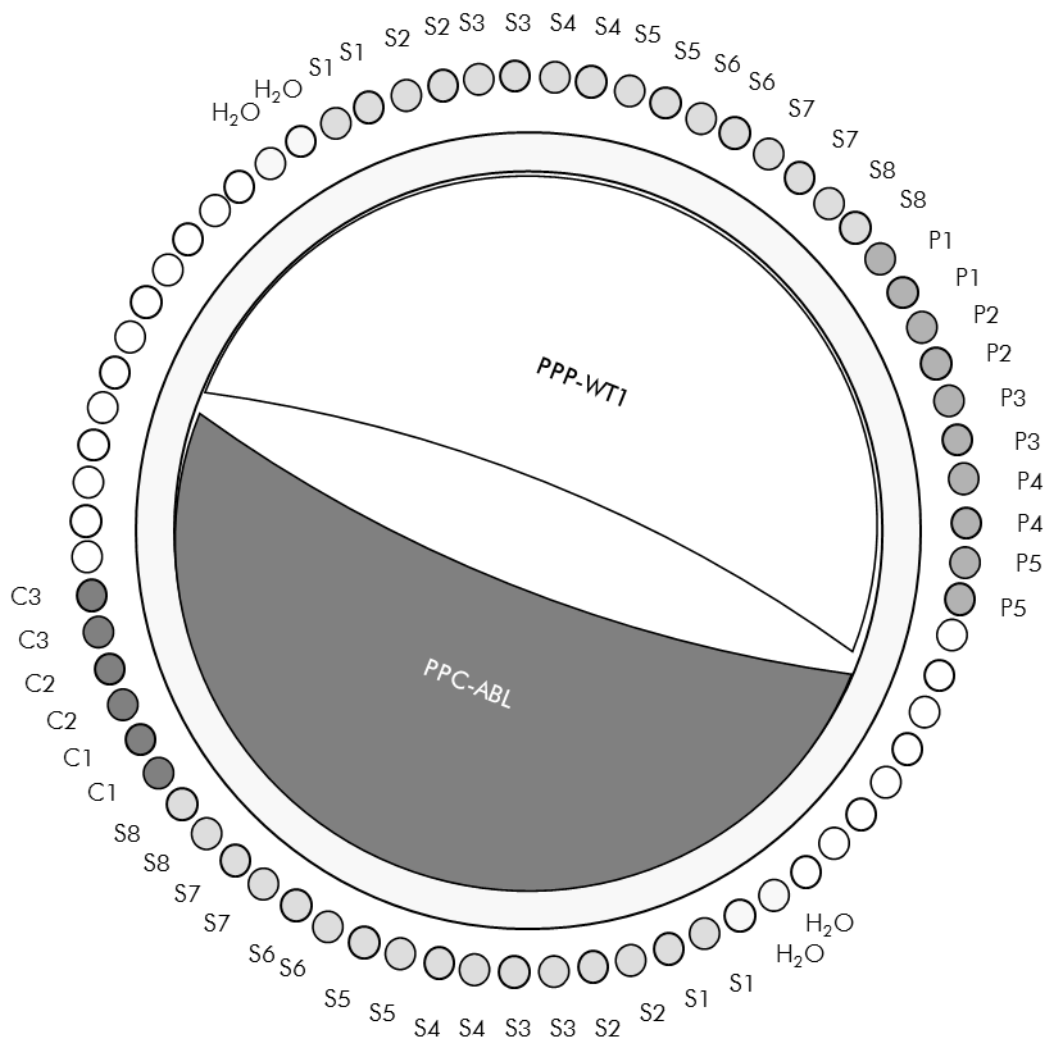
Selle seadme kasutamisel soovitame teha kõik mõõtmised kahekordselt, nagu näidatud tabelis 3.

Tabel 3. Reaktsioonide arv, kui kasutatakse 72 katsuti jaoks mõeldud rootoriga seadet Rotor

Proovid	Reaktsioonid
ABL-praimerite ja proovi seguga (PPC-ABL)	
n cDNA koeproovid	n × 2 reaktsiooni
ABL-i standard	2 × 3 reaktsiooni (3 lahjendust, kõik topelttestitud)
Vesi – kontroll	2 reaktsiooni
WT1-praimerite ja proovi seguga (PPP-WT1)	
n cDNA koeproovid	n × 2 reaktsiooni
WT1 standard	2 × 5 reaktsiooni (5 lahjendust, kõik topelttestitud)
Vesi – kontroll	2 reaktsiooni

Proovi töötlemine seadmel Rotor–Gene Q (rootor 72 katsuti jaoks)

Soovitame ühe katse käigus testida 8 cDNA proovi, et optimeerida standardlahuste, praimerite ja proovi segude kasutamist.



Joonis 4. Rootori soovitatud seadistus, kui katses kasutatakse komplekti *ipsogen WT1 ProfileQuant*. P1–5: WT1 standardid; C1–3: ABL-i standardid; S: cDNA proov; H₂O: vesi – kontroll.

Märkus. Olge tähelepanelik, et paneksite testitava proovi alati rootori asendisse 1. Vastasel korral ei soorita seade kalibreerimist korralikult ning fluorestseerumise kohta saadakse valeandmed.

Täitke kõik muud kohad tühjade katsutitega.

qPCR seadmel Rotor–Gene Q (rootor 72 katsuti jaoks)

Märkus. Kõik etapid tuleb sooritada jääl.

Läbiviimine

1. Sulatage kõik vajalikud komponendid ning asetage need jääle.
2. Valmistage järgmine qPCR-segu vastavalt analüüsitavate proovide arvule.

Kõik kontsentratsioonid kehtivad reaktsioonisaaduse lõppmahu kohta.

Tabel 4 kirjeldab ühe reaktiivisegu ettevalmistamiseks vajalikku pipeteerimisprotseduuri, kus lõplik reaktsioonisaaduse maht on 25 μ l. Segu saab ette valmistada reaktsioonide arvu järgi, kasutades samu praimerite ja proovi segusid (kas PPC-ABL või PPP-WT1). Lisamahud on mõeldud pipeteerimisvigade kompenseerimiseks.

Tabel 4. qPCR-segu valmistamine

Komponent	1 reaktsio on (μl)	ABL: 24 +1 reaktsioo ni (μl)	WT1: 28 +1 reaktsioo ni (μl)	Lõppkontsentratsi oon
TaqMan Universal PCR Master Mix, 2 \times	12,5	312,5	362,5	1 \times
Praimerite ja proovi segu, 25 \times	1,0	25,0	29,0	1 \times
Nukleaasiva ba ja PCR-i jaoks vajaliku kvaliteediga vesi	6,5	162,5	188,5	–
Proov (lisatakse etapis 4)	5,0	igaüht 5	igaüht 5	–
Kogumaht	25,0	igaüht 25	igaüht 25	–

3. Pipeteerige 20 μ l qPCR-i eellahust katsuti kohta.
4. Lisage 5 μ l RT-saadust (cDNA, ekvivalentne 100 ng RNA-ga), mis saadi pöördtranskriptsiooni käigus (vt „Protokoll: soovitatud standardiseeritud EAC pöördtranskriptsioon“, lk 12) vastavas katsutis (kogumaht 25 μ l).
5. Segage õrnalt, pipeteerides üles ja alla.
6. Asetage katsutid termotsüklerisse tootja soovitude kohaselt.
7. Programmeerige seade Rotor–Gene Q koos termotsükleri programmiga, nagu näidatud tabelis 5.

Tabel 5. Temperatuuriprofiil

Analüüsirežiim	Kvantifitseerimine
Hold	Temperatuur: 50 °C Kestus: 2 min
Hold 2	Temperatuur: 95 °C Kestus: 10 min
Cycling	50 korda 95 °C 15 sekundi jooksul 60 °C 1 min jooksul, saadakse FAM-i fluorestsents kanalil Green: Single

- 8. Seadmel Rotor–Gene Q valige analüüsimiseks „Slope Correct” (Kõver on õige). Soovitame läve seada väärtusele 0,03. Termotsükli programm käivitage nii, nagu näidatud tabelis 5.**

Protokoll: qPCR seadmetel ABI PRISM 7900HT SDS, Applied Biosystems 7500 Real-Time PCR System ja LightCycler 480

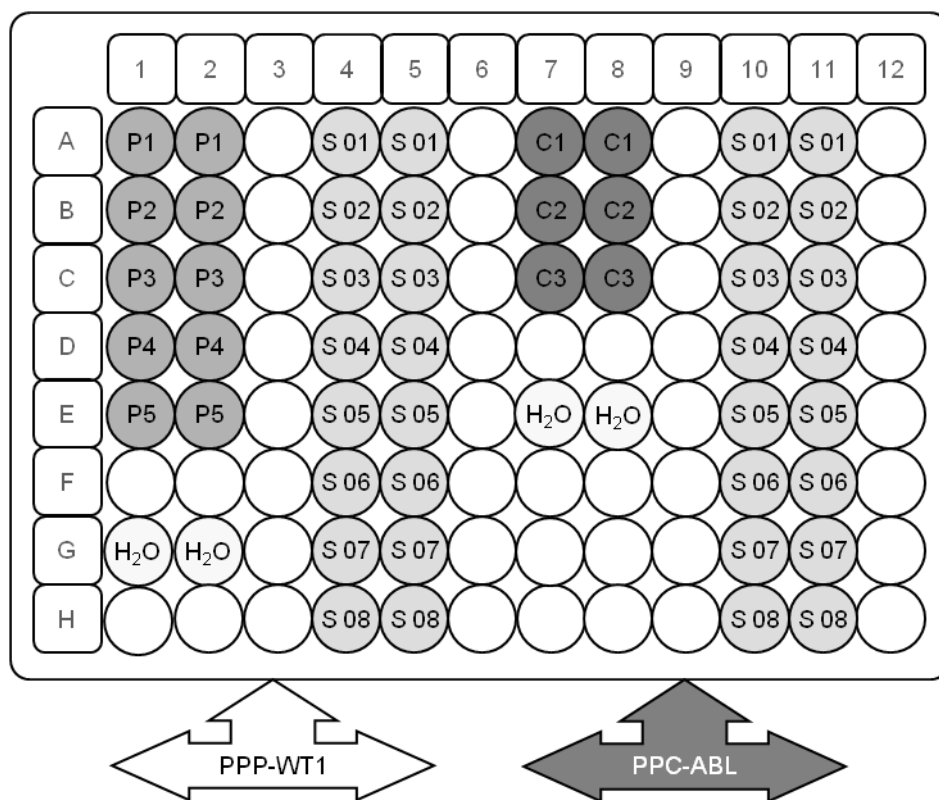
96 lohuga plaadiga qPCR-seadme kasutamisel soovime teha kõik mõõtmised kahekordselt, nagu näidatud tabelis 6.

Tabel 6. Reaktsioonide arv 96 lohuga plaadiga qPCR-seadme kasutamisel

Proovid	Reaktsioonid
ABL-praimerite ja proovi seguga (PPC-ABL)	
n cDNA koeproovid	$n \times 2$ reaktsiooni
ABL-i standard	2×3 reaktsiooni (3 lahjendust, kõik topelttestitud)
Vesi – kontroll	2 reaktsiooni
WT1-praimerite ja proovi seguga (PPP-WT1)	
n cDNA koeproovid	$n \times 2$ reaktsiooni
WT1 standard	2×5 reaktsiooni (5 lahjendust, kõik topelttestitud)
Vesi – kontroll	2 reaktsiooni

Proovi töötlemine seadmetel ABI PRISM 7900HT SDS, Applied Biosystems 7500 Real-Time PCR System ja LightCycler 480

Soovime ühe katse käigus testida vähemalt 8 cDNA proovi, et optimeerida standardlahuste, praimerite ja proovi segude kasutamist. Plaadi skeemil joonisel 5 on toodud näide sellisest katsest.



Joonis 5. Plaadi soovitatav seadistus ühe eksperimendi puhul. S: cDNA proov; **P1–5:** WT1 standardid; **C1–3:** ABL-i standardid; **H₂O:** vesi – kontroll.

qPCR seadmetel ABI PRISM 7900HT SDS, Applied Biosystems 7500 Real-Time PCR System ja LightCycler 480

Märkus. Kõik etapid tuleb sooritada jääl.

Läbiviimine

- 1. Sulatage kõik vajalikud komponendid ning asetage need jääle.**
- 2. Valmistage järgmine qPCR-segu vastavalt analüüsitavate proovide arvule.**

Kõik kontsentratsioonid kehtivad reaktsioonisaaduse lõppmahu kohta.

Tabel 7 kirjeldab ühe reaktiivisegu ettevalmistamiseks vajalikku pipeteerimisprotseduuri, kus lõplik reaktsioonisaaduse maht on 25 µl. Segu saab ette valmistada reaktsioonide arvu järgi, kasutades samu praimerite ja proovi segusid (kas PPC-ABL või PPP-WT1). Lisamahud on mõeldud pipeteerimisvigade kompenseerimiseks.

Tabel 7. qPCR-segu valmistamine

Komponent	1 reaktsioon (µl)	ABL: 24 +1 reaktsiooni (µl)	WT1: 28 +1 reaktsiooni (µl)	Lõppkontsentratsioon
TaqMan Universal PCR Master Mix, 2×	12,5	312,5	362,5	1×
Praimerite ja proovi segu, 25×	1,0	25,0	29,0	1×
Nukleasiva ja PCR-ijaoks vajaliku kvaliteediga vesi	6,5	162,5	188,5	–
Proov (lisatakse etapis 4)	5,0	igaüht 5	igaüht 5	–
Kogumaht	25,0	igaüht 25	igaüht 25	–

- 3. Pipeteerige 20 µl qPCR-i eellahust lohu kohta.**
- 4. Lisage 5 µl RT-saadust (cDNA, ekvivalentne 100 ng RNA-ga), mis saadi pöördtranskriptsiooni käigus (vt „Protokoll: soovitatud standardiseeritud EAC pöördtranskriptsioon“, lk 12) vastavas lohus (kogumaht 25 µl).**
- 5. Segage õrnalt, pipeteerides üles ja alla.**
- 6. Sulgege plaat ja tsentrifuugige veidi (300 × g, umbes 10 sekundit).**
- 7. Asetage plaat termotsüklerisse tootja soovitude kohaselt. Programmeerige termotsüklerile programm, mis on näidatud tabelis 8 seadme ABI PRISM 7900HT SDS või Applied Biosystems 7500 Real-Time PCR System kohta või tabelis 9 seadme LightCycler 480 kohta.**

Tabel 8. Temperatuuriprofiil seadmel ABI PRISM 7900HT SDS või Applied Biosystems 7500 Real-Time PCR System

Analüüsirežiim	Standardkõver – absoluutne kvantifitseerimine
Hold	Temperatuur: 50 °C Kestus: 2 minutit
Hold 2	Temperatuur: 95 °C Kestus: 10 minutit
Cycling	50 korda 95 °C 15 sekundit 60 °C 1 minut, saavutatakse FAM-i fluorestsents; fluorestsentsi vähendaja: TAMRA

Tabel 9. Temperatuuriprofiil seadmel LightCycler 480

Analüüsirežiim	Absoluutne kvantifitseerimine („Abs Quant“)
Aken Detection Formats (Tuvastamise vormingud)	Aknas Detection formats valige „Simple Probe“ (Lihtne proov)
Hold	Temperatuur: 50 °C Kestus: 2 minutit
Hold 2	Temperatuur: 95 °C Kestus: 10 minutit
Cycling	50 korda 95 °C 15 sekundit 60 °C 1 minuti jooksul FAM-i fluorestsentsi saavutamiseks, mis vastab LC versioonile 01 (483–533 nm) ja LC versioonile 02 (465–510 nm).

8. Seadmetel ABI PRISM 7900HT SDS ja Applied Biosystems 7500 Real-Time PCR System jätkake etapist 8a. Seadmel LightCycler 480 jätkake etapist 8b.

8a. Seadmed ABI PRISM 7900HT SDS ja Applied Biosystems 7500 Real-Time PCR System: soovitame läve seada väärtusele 0,1, nagu on

- kirjeldatud analüüsi etapi EAC protokollis, algväärtuse seada 3. ja 15. tsükli vahele. Alustage tsükliprogrammi vastavalt tabelile 8.
- 8b. Seade LightCycler 480: soovitame analüüsirežiimi Fit point, mille taustväärtuseks oleks 2,0 ja läviväärtus 2,0. Termotsükli programm käivitage nii, nagu näidatud tabelis 9.**

Protokoll: qPCR seadmel LightCycler 1.2

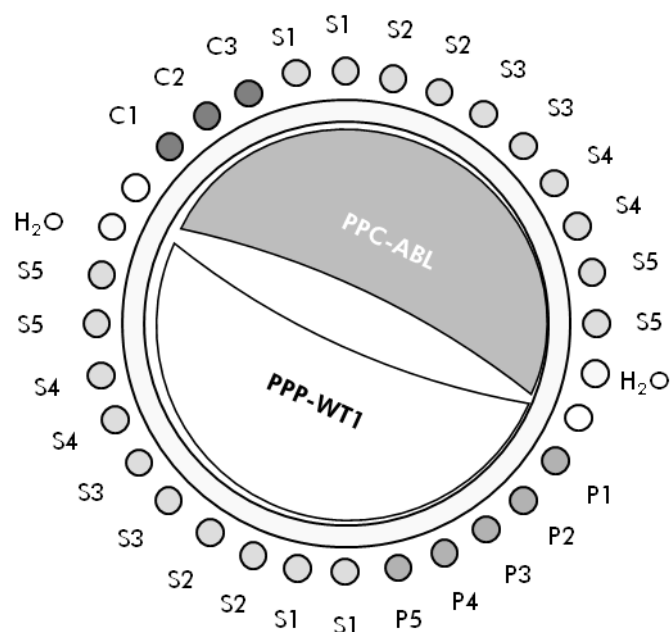
Kapillaarsete instrumentide kasutamisel soovitame mõõta proove kaks korda ja kontroll-lahuseid vaid korra, nagu näidatud tabelis 10.

Tabel 10. Reaktsioonide arv seadmel LightCycler 1.2

Proovid	Reaktsioonid
ABL-praimerite ja proovi seguga (PPC-ABL)	
n cDNA koeproovid	n × 2 reaktsiooni
ABL-i standard	1 × 3 reaktsiooni (3 standardlahjendust, kõik ühe korra testitud)
Vesi – kontroll	1 reaktsioon
WT1-praimerite ja proovi seguga (PPP-WT1)	
n cDNA koeproovid	n × 2 reaktsiooni
WT1 standard	1 × 5 reaktsiooni (5 standardlahjendust, kõik ühe korra testitud)
Vesi – kontroll	1 reaktsioon

Proovi analüüsimine seadmel LightCycler 1.2

Soovitame ühe katse käigus testida 5 cDNA proovi, et optimeerida standardlahuste, praimerite ja proovi segude kasutamist. Kapillaari skeemil joonisel 6 on toodud näide sellisest katsest.



Joonis 6. Rootori soovitatud seadistus, kui katses kasutatakse komplekti *ipsogen WT1 ProfileQuant*. P1–5: WT1 standardid; C1–3: ABL-i standardid; S: analüüsimiseks tundmatu DNA proov; H₂O: vesi – kontroll.

qPCR seadmel LightCycler 1.2

Märkus. Teatud tehniliste nõudmiste tõttu tuleb katsed seadmel LightCycler sooritada kindlaid reaktiive kasutades. Soovitame Master Mix 5× (5× põhisegu) valmistamiseks kasutada LightCycler TaqMan Masteri komplekti ning järgida tootja juhiseid.

Märkus. Kõik etapid tuleb sooritada jääl.

Läbiviimine

- 1. Sulatage kõik vajalikud komponendid ning asetage need jääle.**
- 2. Valmistage järgmine qPCR-segu vastavalt analüüsitavate proovide arvule.**

Kõik kontsentratsioonid kehtivad reaktsioonisaaduse lõppmahu kohta.

Tabel 11 kirjeldab ühe reaktiivisegu ettevalmistamiseks vajalikku pipeteerimisprotseduuri, kus lõplik reaktsioonisaaduse maht on 20 µl. Segu saab ette valmistada reaktsioonide arvu järgi, kasutades samu praimerite ja proovi segusid (kas PPC-ABL või PPP-WT1). Lisamahud on mõeldud pipeteerimisvigade kompenseerimiseks.

Tabel 11. qPCR-segu valmistamine

Komponent	ABL: 14		WT1: 16	
	1 reaktsioon (μ l)	+1 reaktsiooni (μ l)	+1 reaktsiooni (μ l)	Lõppkontsentratsioon
Äsja valmistatud LightCycler TaqMan Master Mix, 5 \times	4,0	60,0	68,0	1 \times
Praimerite ja proovi segu, 25 \times	0,8	12,0	13,6	1 \times
Nukleaasivaba ja PCR-i jaoks vajaliku kvaliteediga vesi	10,2	153,0	173,4	–
Proov (lisatakse etapis 4)	5,0	igaüht 5	igaüht 5	–
Kogumaht	20,0	igaüht 20	igaüht 20	–

3. Pipeteerige 15 μ l qPCR-i eellahust kapillaari kohta.
4. Lisage 5 μ l RT-saadust (cDNA, ekvivalentne 100 ng RNA-ga), mis saadi pöördtranskriptsiooni käigus (vt „Protokoll: soovitatud standardiseeritud EAC pöördtranskriptsioon“, lk 12) vastavas katsutis (kogumaht 20 μ l).
5. Segage õrnalt, pipeteerides üles ja alla.
6. Asetage kapillaarid aparaadiga kaasas olevatesse adapteritesse ning tsentrifuugige veidi (700 \times g, u 10 sekundit).
7. Asetage kapillaarid termotsüklerisse tootja soovitude kohaselt.
8. Programmeerige seade LightCycler 1.2 koos termotsükleri programmiga, nagu näidatud tabelis 12.

Tabel 12. Temperatuuriprofiil

Analüüsirežiim	Kvantifitseerimine
Hold	Temperatuur: 95 °C Kestus: 10 minutit Ramp: 20
Cycling	50 korda 95 °C 10 sekundit; ramp: 20 60 °C 1 minut; ramp: 20; FAM-i fluorestsentsi saavutamiseks: Single
Hold 2	45 °C 1 minut; ramp: 20

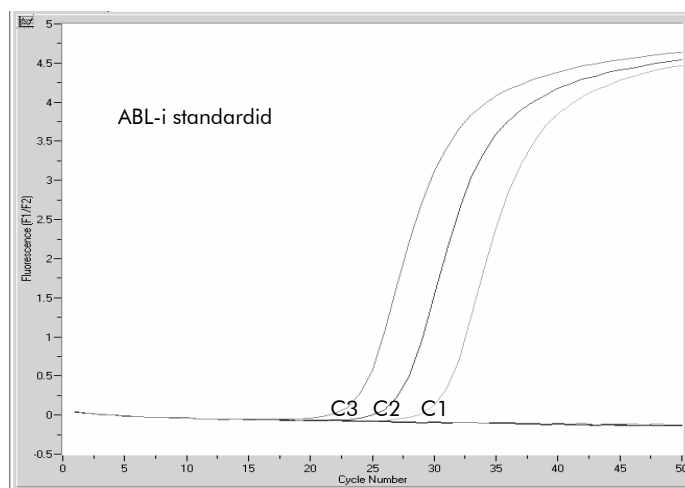
9. Seadmel LightCycler 1.2 on soovitatav kasutada režiime F1/F2 ja „2nd derivative analysis” (2. tuletatav analüüs). Termotsükli programm käivitage nii, nagu näidatud tabelis 12.

Tulemuste tõlgendamine

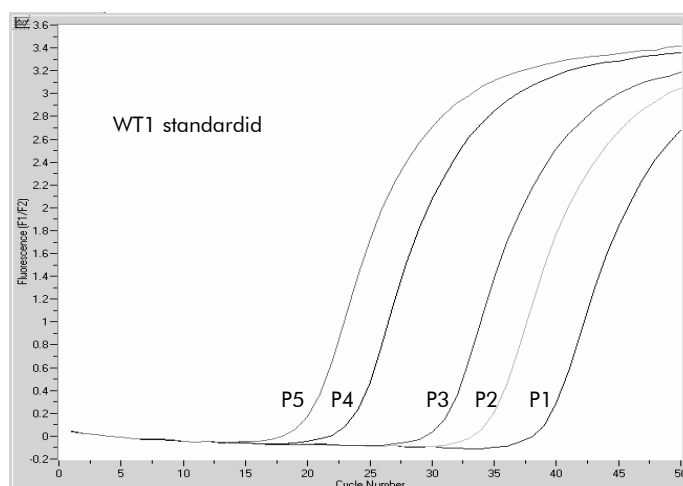
Andmeanalüüsi põhimõte

TaqMani meetodi kasutamisel nimetatakse läve ületava signaali tuvastamiseks vajalike PCR-tsüklite arvu lüütsükliks C_T ja see on otseselt proportsionaalne sihtmärgi hulgaga reaktsiooni alguses.

Teadaoleva arvu molekulidega standardlahuste kasutamisel saab luua standardkõvera ning määrata proovis oleva sihtmärgi väga täpse koguse. *ipsogen* standardkõverad on plasmiidipõhised ning nende puhul kasutatakse täpsete standardkõverate saamiseks plasmidi 3 standardlahjendust ABL-i kontrollgeeni (CG) puhul ning 5 standardlahjendust WT1 geeni puhul. Joonistel 7 ja 8 on kujutatud näide TaqMani amplifikatsioonikõverast, mis on saadud komplektiga *ipsogen* WT1 ProfileQuant.



Joonis 7. ABL-i standardite (C1, C2, C3) tuvastamine. 10^3 , 10^4 ja 10^5 koopiat / $5 \mu\text{l}$.



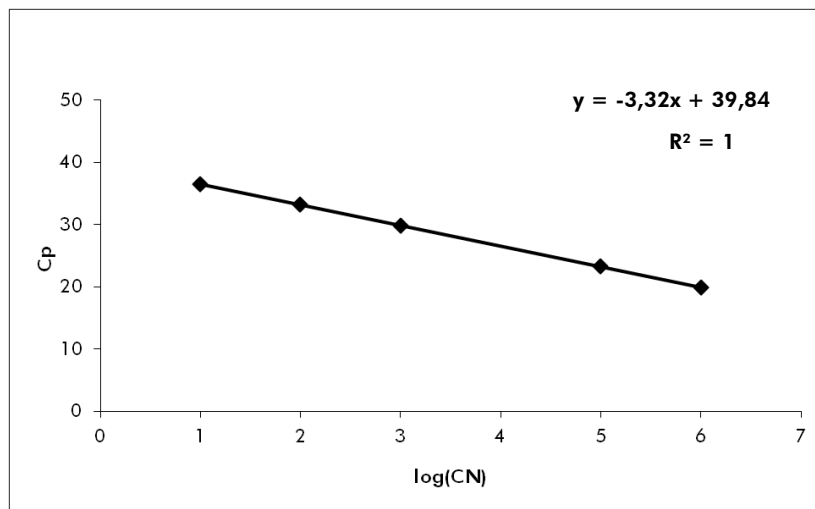
Joonis 8. WT1 standardite tuvastamine (P1–P5). 10^1 , 10^2 , 10^3 , 10^5 , 10^6 koopiat / $5 \mu\text{l}$.

Tulemused

Standardkõver ja kvaliteedi kriteeriumid

Töötlemata andmed saab analüüsimiseks kleepida Excel®-i faili.

Kummagi geeni (ABL ja WT1) kohta saadud töötlemata C_p / C_T plasmidi standardlahjenduste andmeid analüüsitakse logis olevate koopiate arvuga (3, 4 ja 5 koopiat C1, C2 ja C3 puhul; 1, 2, 3, 5 ja 6 koopiat P1, P2, P3, P4 ja P5 puhul). Joonisel 9 on toodud näide 5 standardlahjenduse põhjal arvatud teoreetilisest kõverast.



Joonis 9. Teoreetiline kõver, mis on arvatud 5 standardlahjenduse põhjal. Kummagi geeni (ABL ja WT1) kohta arvutatakse lineaarne regressioonikõver ($y = ax + b$), kus a on joone kõver ja b on y -lõikaja, mis on selle punkti y -koordinaat, kus joon ületab y -telge. Selle võrrand ja määramiskordaja (R^2) prinditakse graafikule.

Kuna standardlahused on 10-kordsed lahjendused, on kõvera teoreetiline kalle $-3,32$. Vahemikku $-3,0$ ja $-3,9$ jääv kalle on aktsepteeritav, kuni $R^2 > 0,95$. (12) Siiski on täpsete tulemuste saamiseks soovitatav $R^2 > 0,98$. (13)

Normalized copy number (NCN, normaliseeritud koopiate arv)

Tundmatu proovi töötlemata C_p väärtuste (saadud PPC-ABL-iga) teisendamiseks ABL-i koopiate arvuks (ABL_{CN}) tuleks kasutada ABL-i standardkõvera võrrandit.

$$\text{Log}_{10} \text{ proovi } ABL_{CN} = \frac{\text{Keskmine } ABL C_p - \text{ABL-i standardkõvera lõikaja}}{\text{ABL-i standardkõvera kalle}}$$

Tundmatu proovi töötlemata C_p väärtuste (saadud PPP-WT1-ga) teisendamiseks WT1 koopiate arvuks ($WT1_{CN}$) tuleks kasutada WT1 standardkõvera võrrandit.

$$\text{Log}_{10} \text{ proovi WT1}_{\text{CN}} = \frac{\text{Keskmine WT1 } C_p - \text{WT1 standardkõvera lõikaja}}{\text{WT1 standardkõvera kalle}}$$

Nende CN väärtuste suhe annab normaliseeritud koopiate arvu (NCN) ABL-i 10.000 koopia kohta:

$$\text{NCN} = \frac{\text{WT1}_{\text{CN}}}{\text{ABL}_{\text{CN}}} \times 10.000$$

ABL-i väärtuste kvaliteedikontroll

RNA halb kvaliteet või qPCR-i ajal tekkinud probleemid annavad tulemuseks madala ABL_{CN} . Me soovime $\text{ABL}_{\text{CN}} < 4246$ proovidest saadud tulemused välja jätta.

Replikaatide vaheline korratavus

Varieeruvus C_p väärtustes replikaatide vahel peab olema < 2 , mis vastab koopiate arvu 4-kordsele muutusele.

Varieeruvus replikaatide C_p väärtustes on tavaliselt $< 1,5$, kui replikaatide keskmine C_p väärtus on < 36 . (12)

Märkus. Iga kasutaja peab oma laboris korratavust mõõtma.

Vesi – kontroll-lahused

Negatiivsed kontroll-lahused annavad nii ABL-i kui ka WT1 puhul CN-arvuks nulli.

Positiivne kontroll-lahus tähendab ristsaastumist. Lahenduse leiate lõigust „Tõrkeotsing“ allpool.

Tõrkeotsing

Käesolev tõrkeotsing võib abiks olla tekkivate probleemide puhul. Lisateavet saate ka meie tehnilise toe leheküljelt *Frequently Asked Questions* (Korduma kippuvad küsimused): www.qiagen.com/FAQ/FAQList.aspx. QIAGENi tehnilise toe teadlased vastad rõõmuga kõikidele küsimustele, mis teil tekivad käesolevas käsiraamatus oleva teabe ja protokolliga kohta või proovi ja analüüsimeetodite kohta (kontaktandmeid vt „Kontaktandmed“, lk 42).

Kommentaariid ja soovitusid

Kontrollgeeni (ABL) ja WT1 negatiivne tulemus kõikides proovides – tavaliselt normis.

- a) RNA halb kvaliteet Enne alustamist kontrollige alati RNA kvaliteeti ja kontsentratsiooni.
Paralleelselt käivitage rakuliini RNA-positiivne kontroll-lahus.
- b) Pöördtranskriptsiooni ebaõnnestumine Enne alustamist kontrollige alati RNA kvaliteeti ja kontsentratsiooni.
Paralleelselt käivitage rakuliini RNA-positiivne kontroll-lahus.

Kontrollgeeni (ABL) negatiivne tulemus proovides – tavaliselt normis.

- a) RNA halb kvaliteet Enne alustamist kontrollige alati RNA kvaliteeti ja kontsentratsiooni.
Paralleelselt käivitage rakuliini RNA-positiivne kontroll-lahus.
- b) Pöördtranskriptsiooni ebaõnnestumine Enne alustamist kontrollige alati RNA kvaliteeti ja kontsentratsiooni.
Paralleelselt käivitage rakuliini RNA-positiivne kontroll-lahus.

Standardsignaali negatiivne

- a) Pipeteerimisviga Kontrollige pipeteerimisskeemi ja reaktsiooni seadistust.
Korrake PCR-i tsükli.
- b) Komplekti komponendid on valesti säilitatud. Säilitage komplekti *ipsogen WT1 ProfileQuant* temperatuuril -15 ... -30 °C ning hoidke praimerite ja proovi segusid (PPC ja PPP) valguse eest kaitstuna. Vt „Reaktiivide säilitamine ja käitlemine“, lk 11.
Vältige korduvat külmutamist ja sulatamist.
Säilitamisel jagage reaktiivid osadeks.

Kommentaariid ja soovitusid

Negatiivsed kontroll-lahused annavad positiivse vastuse

Ristsaastumine	Asendage kõik olulised reaktiivid. Korrake katset uuesti pipeteeritud reaktiividega. Ristsaastumise vältimiseks käsitsege proove, komplekti komponente ja tarvikuid alati üldiselt tunnustatud praktika kohaselt.
----------------	---

Puudub signaal, isegi standardsetes kontroll-lahustes

a) Pipeteerimisviga või puuduv reaktiiv	Kontrollige pipeteerimisskeemi ja reaktsiooni seadistust. Korrake PCR-i tsüklit.
b) Proovimaterjali inhibitsioon, mida põhjustab ebapiisav puhastamine	Korrake RNA ettevalmistust.
c) LightCycler: valitud on vale tuvastuskanal	Seadistage parameeter Channel Setting (Kanali seadistus) väärtusele F1/F2 või 530 nm / 640 nm.
d) LightCycler: andmevalmendus on programmeerimata	Kontrollige tsükliprogramme. PCR-programmi iga anniilimissegmendi lõpus valige valmendusrežiimiks „single“ (üksik).

Proovide signaal puudub või on nõrk, kuid kontroll-lahuste signaaliga on kõik korras

a) Halva kvaliteediga või liiga madala kontsentratsiooniga RNA	Enne alustamist kontrollige alati RNA kvaliteeti ja kontsentratsiooni. Paralleelselt käivitage rakuliini RNA-positiivne kontroll-lahus.
b) Pöördtranskriptsiooni ebaõnnestumine	Enne alustamist kontrollige alati RNA kvaliteeti ja kontsentratsiooni. Paralleelselt käivitage rakuliini RNA-positiivne kontroll-lahus.

Kommentaariid ja soovitusid

Fluorestsentsi intensiivsus on liiga madal

- a) Komplekti komponente on valesti säilitatud. Säilitage komplekti *ipsogen* WT1 ProfileQuant temperatuuril $-15 \dots -30 \text{ }^\circ\text{C}$ ning hoidke praimerite ja proovi segusid (PPC ja PPP) valguse eest kaitstuna. Vt „Reaktiivide säilitamine ja käitlemine”, lk 11.
- Vältige korduvat külmutamist ja sulatamist.
- Säilitamisel jagage reaktiivid osadeks.
- b) Siht-RNA-d on väga väike kogus Suurendage proovi RNA kogust.
- Märkus.** Sõltuvalt RNA ettevalmistusmeetodi valikust võib tekkida RNA inhibitsioon.

Kommentaariid ja soovitusid

LightCycler: fluorestsentsi intensiivsus varieerub

- a) Pipeteerimisviga Nn pipeteerimisveast tingitud varieeruvust saab vähendada, kui analüüsida andmeid režiimis F1/F2 või 530 nm / 640 nm.
- b) Kapillaaride ebapiisav tsentrifuugimine Ettevalmistatud PCR-segu võib endiselt olla kapillaari ülemises osas, kapillaaris võib olla õhumull.
Tsentrifuugige kapillaarid reaktsiooniseguga alati nii, nagu on soovitatud seadme kasutusjuhendis.
- c) Kapillaariotsa välispind on määrdunud Kandke kapillaaride käsitlemisel alati kindaid.

LightCycler: standardkõvera tõrge

- Pipeteerimisviga Nn pipeteerimisveast tingitud varieeruvust saab vähendada, kui analüüsida andmeid režiimis F1/F2 või 530 nm / 640 nm.

Kvaliteedikontroll

Kogu komplekti kvaliteedikontroll on läbi viidud seadmel LightCycler 480. Komplekt on toodetud vastavalt standardile ISO 13485:2003. Analüüsi sertifikaate saate tellida aadressil www.qiagen.com/support/.

Piirangud

Enne seadme kasutamist peab kasutaja olema koolitatud ning meetodit tundma. Komplekti tuleb kasutada käesolevas käsiraamatus toodud juhiste järgi koos valideeritud seadmega, mida mainitakse lõigus „Vajalikud, kuid komplektis mittesisalduvad materjalid“ lk 9.

Kõiki saadud diagnostilisi tulemusi tuleb tõlgendada koos muude kliiniliste või laboratoorsete näitajatega. Kasutaja vastutusele jääb süsteemi töökindluse valideerimine vastavas laboris kasutatud protseduuride korral, kui need pole kaetud ettevõtte QIAGEN töökindluse uuringutega.

Tähelepanu tuleb pöörata kõikide komponentide karpidele ja etikettidele trükitud kõlblikusaegadele. Aegunud komponente ärge kasutage.

Märkus. Komplekt on loodud vastavalt võrgustiku „European LeukemiaNet“ (ELN) uuringutele. (10, 11) Seda tuleb kasutada käesoleva käsiraamatu juhiste järgi koos valideeritud reaktiivide ja instrumentidega. Igasugune toote

mittesihipärane kasutamine ja/või selle komponentide muutmine muudab ettevõtte QIAGEN vastutuse kehtetuks.

Toimekarakteristikud

Mittekliinilised uuringud

Materjalid ja meetodid

Lineaarsuse uuringud viidi läbi 14 prooviga; igaühe põhjal saadi erinev suure WT1 geeniekspressiooniga rakuliini ja tervete, madala WT1 geeni ekspressiooniga doonorite proovidest võetud RNA segu. Iga proovi testiti kolm korda. NCN-i puhul olid väärtused vahemikus 2,20 ... 3838,11. NCN ja selle uuring näitas, et komplektiga *ipsogen* WT1 ProfileQuant saadi selles vahemikus lineaarsed tulemused.

Täpsus

Täpsuse uuring viidi läbi 4 proovil; igaühe puhul saadi kõrge ja madala WT1 ekspressiooniga rakuliinidest erinev RNA segu. Neid analüüse korrati iga proovi puhul kuni 16 korda. Andmeanalüüs on kokku võetud järgmistes tabelites.

Tabel 13. Analüütilised andmed täpsuse uuringust – plasmiidid

	Lahjendus	Keskmine C _T	σ	n	CV (%)
WT1 plasmiidid	P1: 10 ¹ koopiat / 5 μl	36,13	0,87	15	2,42
	P2: 10 ² koopiat / 5 μl	32,70	0,40	16	1,21
	P3: 10 ³ koopiat / 5 μl	29,39	0,43	16	1,45
	P4: 10 ⁵ koopiat / 5 μl	22,62	0,41	16	1,80
	P5: 10 ⁶ koopiat / 5 μl	19,25	0,38	16	1,98
ABL-i plasmiidid	C1: 10 ³ koopiat / 5 μl	29,59	0,35	16	1,20
	C2: 10 ⁴ koopiat / 5 μl	26,11	0,40	15	1,52
	C3: 10 ⁵ koopiat / 5 μl	22,77	0,28	16	1,22

Tabel 14. Analüütilised andmed täpsuse uuringust – rakuliinid

	Lahjendus	Keskmine NCN	σ	n	CV (%)
Rakuliini RNA lahjendus	10%	10,472	5598,76	16	53
	1,5%	1880	747,01	16	40
	0,05%	86	37,79	16	44
	0,0025%	3	1,90	16	57

Tulemuse puudumise piir ja tuvastuspiir

Uuringu ülesehitus põhines NCCLS-i dokumendis „EP17-A Protocols for Determination of Limits of Detection and Limits of Quantitation; Approved Guideline” (EP17-A tuvastuspiiride ja kvantifitseerimispiiride

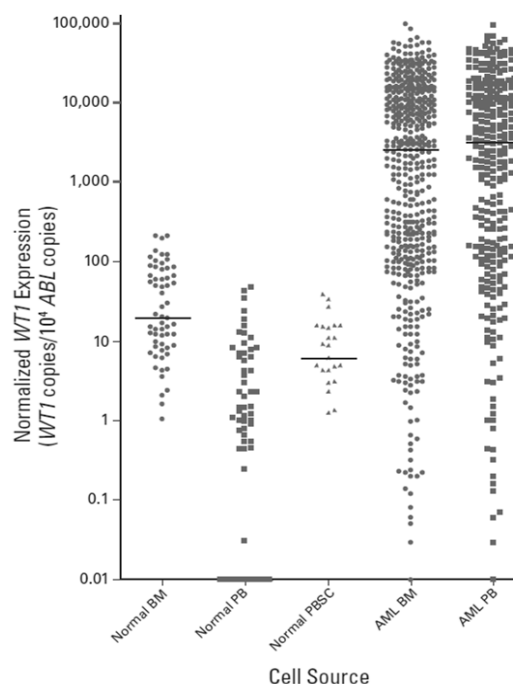
määramisprotokollid; tunnustatud juhised) kirjeldatud soovitusel.

Taustkontsentratsioon või tulemuse puudumise piir (*limit of blank, LOB*) määrati tervete doonorite normaalsetest proovidest (4 proovi, 73 mõõtmist). See oli võrdne väärtusega 3,66 WT1 NCN.

Tuvastuspiir (*limit of detection, LOD*), mis näitab analüüsi tundlikkust, määrati tervetelt doonoritelt WT1 teadaolevalt madala ekspressiooniga proovidest, kuhu oli lisatud kõrge WT1 ekspressiooniga rakke. Nii tagati NCN-i eeldatavaks väärtuseks 4-kordne LOB. Kokku tehti 72 mõõtmist 4 proovil ning LOD oli võrdne 13,08 WT1 NCN.

Kliinilised uuringud

Kuna WT1 ekspresseeritakse normaalsetes hematopoeetilistes rakkudes, on ülioluline määrata normaalsetes kontrollproovides olev ekspressioonitase, nii et saaks määrata läve, mis eristaks residuaalset leukeemiat ja nn taustaamplifikatsiooni. Tervetelt vabatahtlikelt saadud 204 kontrollproovi uuring ELN-analüüsi abil, kus kasutati komplekti *ipsogen* WT1 ProfileQuant, kinnitas, et perifeersest verest, luuüdist ja perifeersetest tüvirakkudest saadud proovides on WT1 ekspressioon väga madal. Mediaanväärtused olid 19,8 WT1 koopiat /10⁴ ABL-i koopiat (vahemik 0–213) luuüdis, 0,01 (vahemik 0,01–47,6) perifeerses veres ja 6,1 (vahemik 0–39) perifeersetes tüvirakkudes (vt joonis 10). WT1 ekspressioon perifeerses veres oli märkimisväärselt madalam kui luuüdis ($p < 0,0001$). Nende tulemuste põhjal määrati normi ülempiiriks 250 NCN luuüdi ning 50 NCN perifeerse vere puhul.



Joonis 10. WT1 ekspressioon tervetelt doonoritelt saadud proovides. Äge müeloidne leukeemia (AML); luuüdi (BM); perifeerne veri (PB); perifeersest verest saadud tüvirakud (PBSC). (15)

Trükkimiseks saadud luba: Cilloni, D. et al: Real-time quantitative polymerase chain reaction detection of minimal residual disease by standardized WT1 assay to enhance risk stratification in acute myeloid leukemia: A European LeukemiaNet Study: *J Clin Oncol* 27(31):5195-201. Epub 2009 Sep 1. © 2009, American Society of Clinical Oncology, All rights reserved.

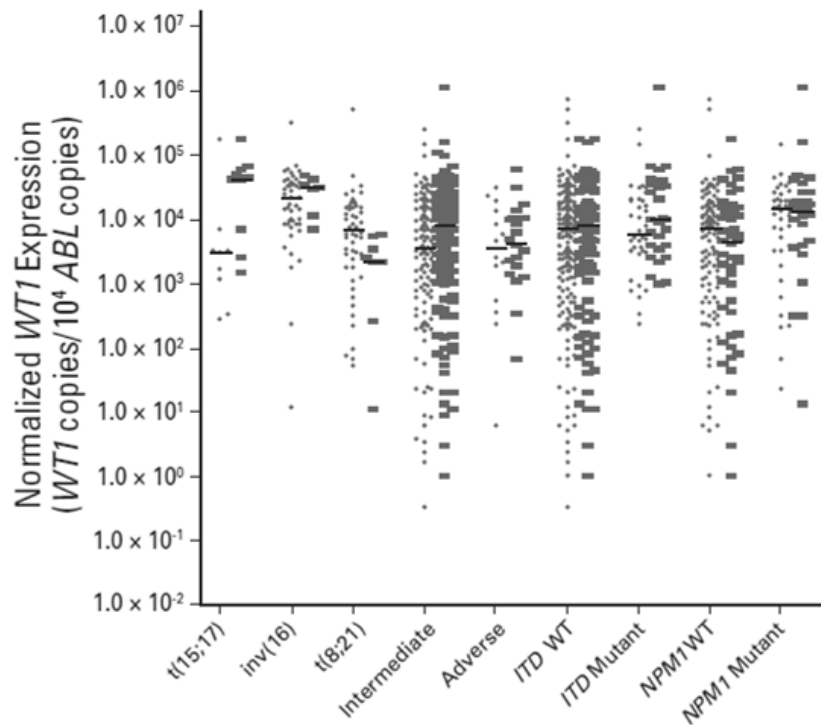
WT1 ekspressiooni määramine standardiseeritud ELN qPCR-i analüüsi abil ravieelsetes AML-proovides.

Komplektis *ipsogen* WT1 ProfileQuant kasutatud ELN-analüüsi rakendatavuse hindamiseks MRD tuvastamisel analüüsiti 504 patsiendilt saadud 620 ravieelset proovi (238 perifeerses verest ja 382 luuüdist).

WT1 oli üle ekspresseeritud taustkontsentratsioonist kõrgemal (määratletud kui > 250 ja > 50 WT1 koopiat / 10^4 ABL-i koopiat vastavalt luuüdis ja perifeerses veres) 86%-l luuüdi ja 91%-l perifeerse vere diagnostilistest AML-i proovidest (näidatud ka joonisel 10).

Mediaanväärtus WT1 koopiat / 10^4 ABL-i koopiat oli 2505, (vahemik $0-7,5 \times 10^5$) luuüdis ($p < 0,0001$ normaalse luuüdigaga võrreldes) ja 3107 (vahemik $0-1,13 \times 10^6$) perifeerses veres ($p < 0,0001$ normaalse perifeerse verega võrreldes). Puudus märkimisväärne erinevus ekspressioonis perifeerse vere ja luuüdi proovide vahel kogu kohordis, seda kinnitasid ka tulemused, mis saadi patsientidelt, kellelt võeti paarisanalüüsid perifeerses verest ja luuüdist, vt Cilloni, D. et al., *J Clin Oncol*, joonis A3 lisas. (15)

Varieeruvust normaliseeritud WT1 ekspressiooni taseme juures jälgiti vastavalt tsütogeneetikale (joonis 11, $p < 0,001$), kus olid eriti kõrged kontsentratsioonid juhtudel, kus $inv(16)(p13q22)/t(16;16)(p13;q22)$ (mediaanväärtus $2,31 \times 10^4$, vahemik $12-3,14 \times 10^5$). Märkimisväärselt kõrgemad WT1 tasemed tuvastati ka AML-i puhul, kus esinesid NPM1 mutatsioonid (NPM1 mutatsioon: mediaanväärtus $1,44 \times 10^4$, vahemik $0-1,13 \times 10^6$; NPM1 „metsikut tüüpi“: mediaanväärtus 6566, vahemik $0-7,5 \times 10^5$, $p = 0,005$).



Joonis 11. WT1 ekspressiooni varieeruvus vastavalt tsütogeneetikale (15)

Trükkimiseks saadud luba: Cilloni, D. et al: Real-time quantitative polymerase chain reaction detection of minimal residual disease by standardized WT1 assay to enhance risk stratification in acute myeloid leukemia: A European LeukemiaNet Study: *J Clin Oncol* 27(31):5195-201, 2009. © 2009, American Society of Clinical Oncology, All rights reserved.

WT1 ekspressiooni tase oli vastavalt ELN-analüüsina määratletud 15 juhul, kus mutatsioonid esinesid WT1 geeni eksonis 7 ja 9, võrreldes „metsikut tüüpi“ WT1 geeniga ($p = 0,2$). Siiski näitas järjestuse analüüs 32 juhtumi seerias, kus ELN-analüüs lubas eeldada madalat WT1 transkriptsiooni ekspressiooni (< 250 koopiat / 10^4 ABL-i koopiat), et 3 juhul (9,4%) oli see madal ekspressioonitase seotud mutatsioonidega, mis katkestasid päripidise praimeri seondumiskoha, vt Cilloni, D. et al., *J Clin Oncol*, joonis A4 lisas. (15)

Viited

QIAGENi suur ajakohane veebiandmebaas sisaldab teaduspublikatsioone, mis on tehtud ettevõtte QIAGEN toodete kohta. Nüüdisaegsed otsinguvõimalused võimaldavad teil leida vajalikke artikleid kas lihtsa võtmesõna otsimise abil või rakenduse, uurimisala, pealkirja jne järgi.

Täieliku viidete loendi leiate andmebaasist QIAGEN Reference Database (QIAGENi viidete andmebaas) veebis www.qiagen.com/RefDB/search.asp; võite võtta ühendust ka QIAGENi tehnilise teeninduse või kohaliku edasimüüjaga.

Tsiteeritud viited

1. Cheson, B.D. et al. (2003) Revised recommendations of the international working group for diagnosis, standardization of response criteria, treatment outcomes, and reporting standards for therapeutic trials in acute myeloid leukemia. *J. Clin. Oncol.* **21**, 4642.
2. Estey, E. and Döhner, H. (2006) Acute myeloid leukemia. *Lancet* **368**, 1894.
3. Grimwade D. (2001) The clinical significance of cytogenetic abnormalities in acute myeloid leukaemia. *Best. Pract. Res. Clin. Haematol.* **14**, 497.
4. Schlenk, R.F. et al (2008) Mutations and treatment outcome in cytogenetically normal acute myeloid leukemia. *N. Engl. J. Med.* **358**, 1909.
5. Wheatley, K. et al. (1999) A simple, robust, validated and highly predictive index for the determination of risk-directed therapy in acute myeloid leukaemia derived from the MRC AML 10 trial. United Kingdom Medical Research Council's Adult and Childhood Leukaemia Working Parties. *Br. J. Haematol.* **107**, 69.
6. Freeman, S.D., Jovanovic, J.V., and Grimwade D. (2008) Development of minimal residual disease-directed therapy in acute myeloid leukemia. *Semin. Oncol.* **4**, 388.
7. Sugiyama, H. (2001) Wilms' tumor gene WT1: its oncogenic function and clinical application. *Int. J. Hematol.* **73**, 177.
8. Liu-Yin, J.. et al. (2008) Predictive value of minimal residual disease (MRD) monitoring by RQ-PCR in WT1 positive patients entered in the UK MRC AML-15 Trial. *Blood* **112**, 259.
9. Van Dijk J.P. et al. (2003) Abnormal WT1 expression in the CD34-negative compartment in myelodysplastic bone marrow. *Br. J. Haematol.* **118**, 1027.
10. 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.
11. 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.

12. van der Velden, V.H. et al. (2003) Detection of minimal residual disease in hematologic malignancies by real-time quantitative PCR: principles, approaches, and laboratory aspects. *Leukemia* **17**, 1013.
13. 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.
14. Cilloni, D. et al., American Society of Hematology (ASH) Annual Meeting, 2007.
15. Cilloni D. et al., Real-time quantitative polymerase chain reaction detection of minimal residual disease by standardized *WT1* assay to enhance risk stratification in acute myeloid leukemia: a European LeukemiaNet Study. *J Clin Oncol* **27**, 5195.

Sümbolid

Pakenditel ja etiketidel võivad esineda järgmised sümbolid.



Sisaldab reaktiivi <N> reaktsiooni jaoks



Kõlblik kuni



In vitro diagnostiline meditsiiniseade



Kataloogi nr



Partii number



Materjali number



Globaalne kaubaartikli number (GTIN)



Temperatuuripiirang



Tootja



Vt kasutusjuhendit

Kontaktandmed

Tehnilist ja muud teavet saate meie tehnilise toe leheküljelt veebis www.qiagen.com/Support või telefonil 00800-22-44-6000; võite ühendust võtta QIAGENi tehnilise teeninduse osakonna või kohaliku edasimüüjaga (vt tagakaant või külastage veebilehte www.qiagen.com).

Tellimisinfo

Toode	Sisu	Kat nr
<i>ipsogen</i> WT1 ProfileQuant (24)	24 reaktsiooni jaoks: ABL Control Gene Standards (kontrollgeeni standardlahused), WT1 (ekson 1-2) Gene Standards (geeni standardlahused), Primers and Probe Mix ABL (praimerite ja proovi segu ABL), Primers and Probe Mix (praimerite ja proovi segu) PPP-WT1	676923
Rotor-Gene Q MDx – IVD-valideeritud reaalaajaliseks PCR-analüüsiks kliinilistes rakendustes		
Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM Platform	Reaalaajaline PCR-tsükler ja High Resolution Melt analüsaator 5 kanaliga (roheline, kollane, oranž, punane, lilla), lisaks HRM-kanal, sülearvuti, tarkvara, lisatarvikud, 1-aastane garantii osade ja töö osas, paigaldamist ja koolitust ei sisalda.	9002032
Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM System	Reaalaajaline PCR-tsükler ja High Resolution Melt analüsaator 5 kanaliga (roheline, kollane, oranž, punane, lilla), lisaks HRM-kanal, sülearvuti, tarkvara, lisatarvikud, 1-aastane garantii osade ja töö osas, sisaldab paigaldamist ja koolitust.	9002033

Ajakohase litsentseerimisteabe ja tootespetsiifiliste kaebuste puhul vt vastava QIAGENi komplekti käsiraamatut või kasutusjuhendit. QIAGENi komplektide käsiraamatud ja kasutusjuhendid on saadaval veebilehel www.qiagen.com ja neid saab tellida QIAGENi tehnilise teeninduse osakonnast või teie kohaliku edasimüüja käest.

See leht on teadlikult tühjaks jäetud

See leht on teadlikult tühjaks jäetud

Käesolev toode on mõeldud *in vitro* diagnostiliseks kasutamiseks. *ipsogen*’i tooteid ei või edasi müüa, edasimüügiks muuta ega kasutada komertstoodete tootmiseks ilma ettevõtte QIAGEN kirjaliku loata.

Selles dokumendis sisalduvat teavet võidakse ilma etteatamata muuta. QIAGEN ei vastuta käesolevas dokumendis esineda võivate vigade eest. Me usume, et dokument oli avaldamise hetkel täielik ja täpne. Mingil juhul ei vastuta QIAGEN juhuslike, sihilike, korduvate või põhjuslike kahjustuste eest, mis võivad tekkida selle dokumendi tõttu.

ipsogen’i toodete puhul on garanteeritud vastavus märgitud tehnilistele nõuetele. QIAGENi ainsaks kohustuseks kliendi ees ja kohustuse ainsaks vahendiks on toote tasuta asendamine juhul, kui toode ei toimi vastavalt garantiile.

Kaubamärgid: QIAGEN[®], *ipsogen*[®], ProfileQuant[®], Rotor-Gene[®] (QIAGEN Group); ABI PRISM[®], Applied Biosystems[®], FAM[™], RNaseOUT[™], SuperScript[®], SYBR[®], TAMRA[™] (Life Technologies Corporation); Agilent[®], Bioanalyzer[®] (Agilent Technologies, Inc); Excel[®] (Microsoft Corporation); LightCycler[®], TaqMan[®] (Roche Group).

Piiratud litsentsileping

Komplekti *ipsogen* WT1 ProfileQuant ostja või kasutaja nõustub selle toote kasutamisel alljärgnevate tingimustega.

1. *ipsogen* WT1 ProfileQuant komplekti võib kasutada vaid vastavalt *ipsogen* WT1 ProfileQuant komplekti käsiraamatule ja ainult koos komplektis sisalduvate komponentidega. QIAGEN ei anna luba enda intellektuaalomandi piires ega luba kasutada komplektis olevaid komponente muude komplektis mittedisaldavate komponentidega, v.a juhtudel, mis on kirjeldatud *ipsogen* WT1 ProfileQuant komplekti käsiraamatus ja aadressil www.qiagen.com leiduvates lisaprotokollides.
2. QIAGEN ei anna mingit garantiid, et komplekt ja/või selle kasutusala ei riku kolmandate osaliste õigusi, v.a selgesõnalistes litsentsides mainitud juhtudel.
3. Komplekt ja selle komponendid on litsentseeritud ühekordseks kasutamiseks ning neid ei tohi uuesti kasutada, värskendada ega edasi müüa.
4. QIAGEN keeldub kõikidest muudest otsestest või kaudsetest litsentsidest, v.a neist, mida on selgesõnaliselt väljendatud.
5. Komplekti ostja ja kasutaja nõustub mitte lubama kellelgi teisel teha midagi, mis võib põhjustada või soodustada mõnda ülaltoodud keelatud toimingutest. QIAGEN võib piiratud litsentsilepingu keelud kinnitada suvalises kohtus ning tagab kõik uurimisega seotud ja kohtukulud, sh advokaaditasud, iga kord, kui on vaja piiratud litsentsilepingut või enda õigust intellektuaalomandile (mis on seotud komplekti ja/või selle komponentidega) jõustada.

Värskeid litsentsitingimusi vt www.qiagen.com.

HB-1355-002 © 2013-2015 QIAGEN, kõik õigused kaitstud.

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

