

November 2017

Handbok för *ipsogen*[®]

PML-RARA bcr1-kit



Version 1

Kvantitativ in vitro-diagnostik

För användning med Rotor-Gene[®] Q, ABI PRISM[®], Applied Biosystems[®] 7500 Real-Time PCR System, LightCycler[®] och SmartCycler[®]-instrument



672123

QIAGEN GmbH

QIAGEN Strasse 1,

40724 Hilden

TYSKLAND



1108718SV

Innehåll

Användningsområde	4
Sammanfattning och förklaring	4
Testprincip	6
Material som medföljer	9
Satsinnehåll	9
Material som behövs men inte medföljer	10
Varningar och försiktighet	12
Allmänna försiktighetsåtgärder	12
Förvaring och hantering av reagens	14
Procedur	15
Beredning av prov-RNA	15
Protokoll: Rekommenderad standardiserad EAC omvänd transkription	15
Protokoll: qPCR på Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM- eller Rotor-Gene Q 5plex HRM- instrument med 72-rörsrotor	18
Protokoll: qPCR på ABI PRISM 7000, 7700 och 7900HT SDS, Applied Biosystems 7500 Real-Time PCR System och LightCycler 480-instrument	22
Protokoll: qPCR på LightCycler 1.2- och 2.0-instrument	27
Protokoll: qPCR på SmartCycler-instrumentet	31
Tolkning av resultat	35
Dataanalysprincip	35
Resultat	36
Felsökningshandbok	40

Kvalitetskontroll	43
Begränsningar.....	43
Prestandaegenskaper	44
Icke-kliniska studier	44
Kliniska studier	47
Litteraturhänvisningar	51
Symboler	52
Beställningsinformation.....	53

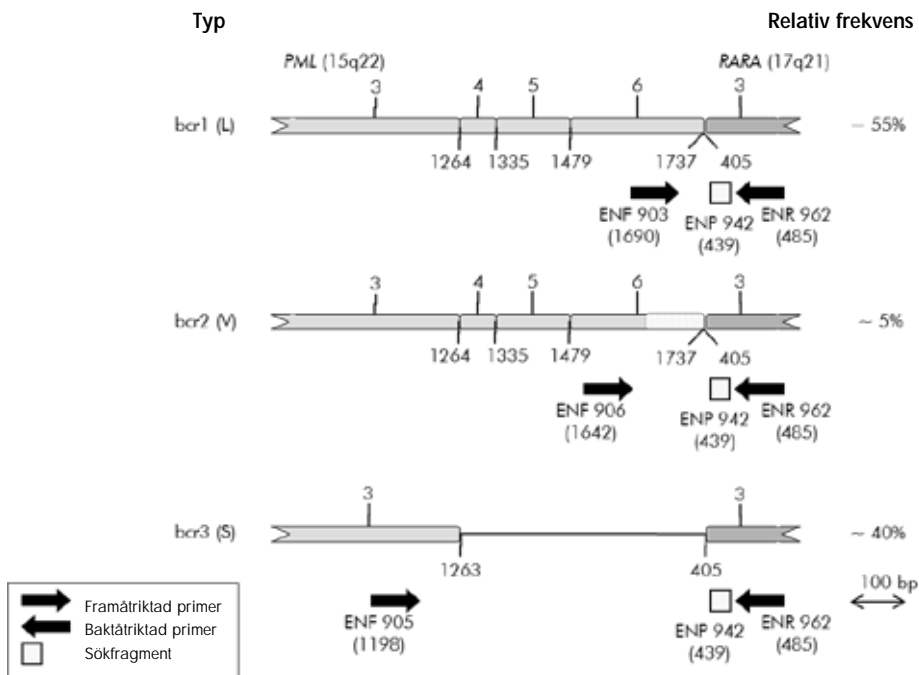
Användningsområde

ipsogen PML-RARA bcr1-kitet är avsett för kvantifieringen av PML-RARA-typ bcr1-fusionstranskript i benmärg eller prover på perifert blod i en delgrupp av patienter med akut myeloisk leukemi (AML) som fått diagnosen M3-cytomorfologi och t(15;17)(q22;q21)-translokation, med en brytpunkt i PML-intron 6. Resultaten som erhållits är avsedda att användas som ett hjälpmedel för att övervaka effekten av behandlingar hos patienter som genomgår terapi, och för uppföljning av MRD (minimal residual disease) för att övervaka sjukdomsåterfall.

Sammanfattning och förklaring

Transkript av PML-RARA-fusionsgenen (FG), vilka är det molekylära resultatet av t(15;17)(q22;q21)-translokationen, associeras med majoriteten av fallen med akut progranulocytisk leukemi (APL) (>90 %), en tydlig AML-delgrupp med M3-cytomorfologi som står för 10–15 % av alla AML-fall. Den balanserade reciproka translokationen t(15;17) leder till fusionen av den promyelocytiska leukemigenen (PML) med retinolsyrareceptorn alfa (RARA) för att framställa fusionsproteinet PML-RARA. Det chimära PML-RARA-proteinet är en transkriptionell repressor. Dess uttryck associeras med försvagad myeloisk differentiering, på grund av ökad affinitet för det nukleära repressorproteinkomplexet (NcoR), förändring av kromatinstrukturen med histondeacetylas (HDAC) och inhibition av transkription. Behandling med all-trans-retinolsyra (ATRA) är mycket effektiv vid APL och verkar som ett differentierande medel genom att främja frisättning av NCoR/HDAC-komplexet, varigenom normal transkription återställs.

RARA-brytpunkter uppstår alltid i intron 2. Beroende på var brytpunkter är lokaliserade inom PML-stället, intron 6, exon 6 och intron 3, kan respektive PML-RARA-transkriptsubtyper som benämns som långa (L eller bcr1), variant (V eller bcr2) och korta (S eller bcr3), bildas (Figur 1). Dessa transkriptsubtyper representerar 55 %, 5 % respektive 40 % av fallen.



Figur 1. Schematiskt diagram över PML-RARA FG-transkriptet täckt av EAC qPCR-primers- och sökfragmentuppsättningen. För typ bcr1 (L): ENF903–ENP942–ENR962. För typ bcr2 (V): ENF906–ENP942–ENR962. För typ bcr3 (S): ENF905–ENP942–ENR962. Numret under primers och sökfragment avser deras nukleotidposition i det normala gentranskriptet. Relativ frekvens avser proportionen av varje typ av FG-transkript bland PML-RARA-varianter.

Kombinerad behandling med antracyklinbaserad kemoterapi och ATRA är mycket framgångsrik vid APL, och ger långvariga remissioner och ett troligt tillfrisknande hos upp till 70 % av nydiagnostiserade patienter. Återfall och låga överlevnadsfrekvenser ses dock fortfarande hos 15–25 % av patienterna. Detektionen av den unika PML-RARA-fusionsgenen med konventionell kvalitativ omvänd transkription-polymeraskedjereaktion (RT-PCR) har använts brett för snabb diagnos och prediktion av terapisvar. Denna teknik har dock vissa negativa sidor och dess känslighet är relativt låg.

Kvantifiering av PML-RARA-kopieantal med realtids kvantitativ PCR (qPCR) innebär flera fördelar. Det är en mycket känslig och reproducerbar teknik som även möjliggör en bedömning av kinetik. Analysen av det prognostiska värdet av ett väletablerat standardiserat qPCR-protokoll (EAC-program) för APL-patienter under olika behandlingsfaser har visat att denna metod är ett hållbart alternativ för bedömning av MRD, och att återfallsriskstratifiering kan fastställas baserat på PML-RARA-normaliserat kopieantal. Under post-konsolideringsanalys är positiv qPCR-analys en stark prediktor för påföljande hematologiskt återfall. Under underhållsterapi, och efter avslutad behandling, associeras ett positivt qPCR-test med en högre återfallsrisk och kortare överlevnadstid. Återfallsriskstratifieringen baserad på kvantifiering av PML-RARA-normaliserat kopieantal (normalized copy number, NCN) delar in patienter i 3 grupper: patienter med hög återfallsrisk, medelstor återfallsrisk och låg återfallsrisk (1). PML-RARA-övervakning via sensitiv detektion av transkriptet betraktas som en väsentlig del av den totala behandlingsstrategin vid APL (se litteraturhänvisning 2 och 3 för närmare information), varigenom behandlingstypen och -intensiteten moduleras hos patienter med olika återfallsrisker under uppföljning.

Standardisering och validering av MRD-kvantifieringsmetoden har fastställts i ett multicenterprojekt som utfördes av EAC och publicerades år 2003 (4, 5). *ipsogen* PML-RARA bcr1-kitet baseras på denna teknik.

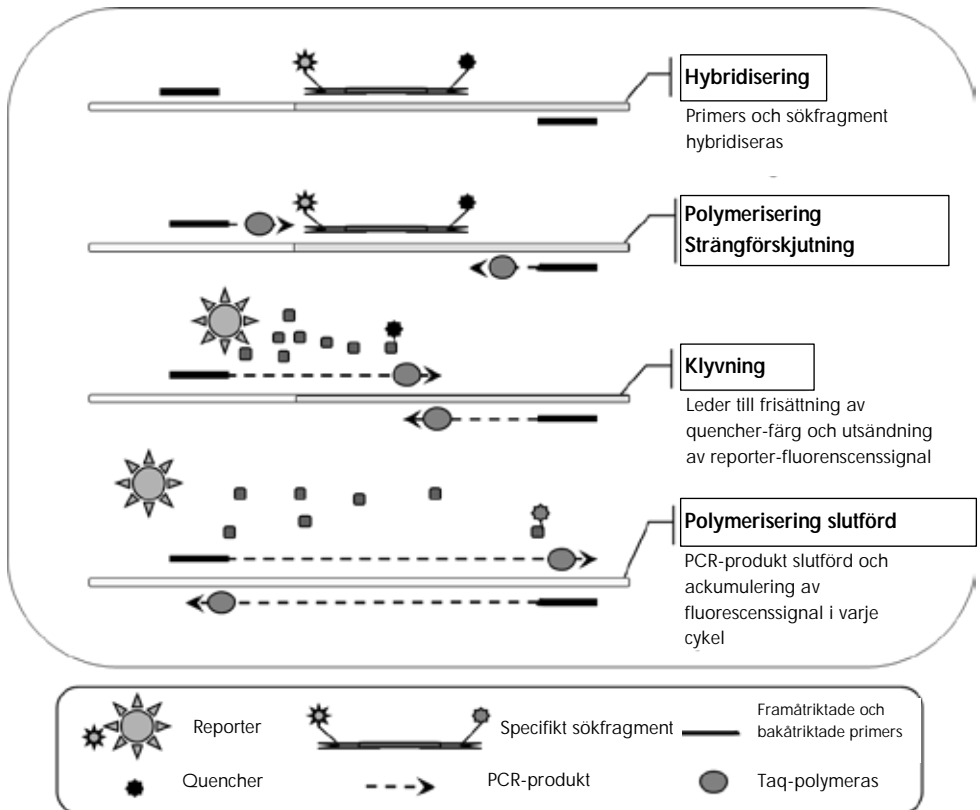
Testprincip

Med qPCR-tekniken går det att göra en noggrann kvantifiering av PCR-produkter under den exponentiella fasen i PCR-amplifieringsprocessen. Dessutom kan qPCR-data erhållas snabbt, utan någon behandling efter PCR, genom realtidsdetektion av fluorescenssignaler under och/eller direkt efter PCR-cykling, vilket drastiskt minskar risken för att PCR-produkter ska kontamineras. För närvarande finns det 3 huvudtyper av qPCR-tekniker att välja på: qPCR-analys med SYBR® Green I-färg, qPCR-analys med hydrolyssökfragment och qPCR-analys med hybridiseringsökfragment.

I denna analys utnyttjas principen för qPCR-dubbelfärgad oligonukleotidhydrolys. Under PCR hybridiseras framåtriktade och bakåtriktade primers till en specifik sekvens. En dubbelfärgad oligonukleotid ingår i samma blandning. Detta sökfragment, vilket består av en oligonukleotid märkt med en 5'-reporter-färg och en nedströms 3'-quencher-färg, hybridiseras till en målsekvens inom PCR-produkten. Vid qPCR-analys med hydrolyssökfragment utnyttjas 5'→3'-exonukleasaktiviteten hos DNA-polymeraset för *Thermus aquaticus* (*Taq*). När sökfragmentet är intakt, leder närheten mellan reporter-färgen och quencher-färgen till suppression av reporter-fluorescensen, primärt genom energiöverföring av Förster-typ.

Under PCR, om det intressanta målet förekommer, hybridiseras sökfragmentet specifikt mellan ställena för den framåtriktade och bakåtriktade primern. DNA-polymerasets 5'→3'-exonukleasaktivitet gör att sökfragmentet klyvs mellan reporter och quencher, men endast om sökfragmentet hybridiseras till målet. Sökfragmenten förskjuts sedan från målet, och polymeriseringen av strängen fortsätter. Sökfragmentets 3'-ände är blockerad för att förhindra att sökfragmentet förlängs under PCR (figur 2). Denna process sker i varje cykel och stör inte den exponentiella ackumuleringen av produkt.

Ökningen av fluorescenssignal detekteras endast om målsekvensen är komplementär till sökfragmentet och alltså amplifieras under PCR. På grund av dessa krav sker ingen detektering av icke-specifik amplifiering. Ökningen av fluorescens är alltså direkt proportionell till målamplifieringen under PCR.



Figur 2. Reaktionsprincip. Totalt RNA transkriberas omvänt, och det framställda cDNA:t amplifieras med PCR med hjälp av ett par specifika primers och ett specifikt internt dubbelfärg-sökfragment (FAM™–TAMRA™™). Sökfragmentet binds till amplikonet under varje hybridiseringssteg för PCR. När *Taq* förlängs från primern som är bunden till amplikonet, förskjuter den 5'-ändan av sökfragmentet, vilket sedan bryts ned av 5'→3'-exonukleasaktiviteten hos *Taq*-DNA-polymeraset. Klyvning fortsätter tills det återstående sökfragmentet smälter bort från amplikonet. Denna process frisätter fluoroforen och quenchern i lösning, vilket skiljer dem åt spatialt och leder till en ökad fluorescens från FAM och en minskad fluoescens från TAMRA.

Material som medföljer

Satsinnehåll

<i>ipsogen PML-RARA bcr1 Kit</i>		(24)
Katalognr		672123
Antal reaktioner		24
Komponent	Namn	Mängd
ABL Control Gene Standard Dilution (Standardlösning för ABL-kontrollgen) (10^3 kopior/5 μ l)	C1-ABL	50 μ l
ABL Control Gene Standard Dilution (Standardlösning för ABL-kontrollgen) (10^4 kopior/5 μ l)	C2-ABL	50 μ l
ABL Control Gene Standard Dilution (Standardlösning för ABL-kontrollgen) (10^5 kopior/5 μ l)	C3-ABL	50 μ l
PML-RARA bcr1 Fusion Gene Standard Dilution (Standardlösning för PML-RARA bcr1-fusionsgen) (10^1 kopior/5 μ l)	F1-PML-RARA bcr1	50 μ l
PML-RARA bcr1 Fusion Gene Standard Dilution (Standardlösning för PML-RARA bcr1-fusionsgen) (10^2 kopior/5 μ l)	F2-PML-RARA bcr1	50 μ l
PML-RARA bcr1 Fusion Gene Standard Dilution (Standardlösning för PML-RARA bcr1-fusionsgen) (10^3 kopior/5 μ l)	F3-PML-RARA bcr1	50 μ l
PML-RARA bcr1 Fusion Gene Standard Dilution (Standardlösning för PML-RARA bcr1-fusionsgen) (10^5 kopior/5 μ l)	F4-PML-RARA bcr1	50 μ l
PML-RARA bcr1 Fusion Gene Standard Dilution (Standardlösning för PML-RARA bcr1-fusionsgen) (10^6 kopior/5 μ l)	F5-PML-RARA bcr1	50 μ l
Primers and Probe Mix ABL* (Primers och sökfragmentblandning ABL*)	PPC-ABL 25x	90 μ l
Primers and Probe Mix PML-RARA bcr1 Fusion Gene (Primers och sökfragmentblandning för PML-RARA bcr1-fusionsgen) †	PPF-PML-RARA bcr1 25x	110 μ l
Handbok för <i>ipsogen PML-RARA bcr1-kit</i> (engelska)		1

* Blandning av specifika bakåtriktade och framåtriktade primers för ABL-kontrollgenen plus ett specifikt FAM-TAMRA-sökfragment.

† Blandning av specifika bakåtriktade och framåtriktade primers för PML-RARA bcr1-fusionsgenen plus ett specifikt FAM-TAMRA-sökfragment.

Obs! Centrifugera standardlösningar, primers och sökfragmentblandningar kortvarigt före användning.

Material som behövs men inte medföljer

Använd alltid lämplig laboratorierock, engångshandskar och skyddsglasögon vid hantering av kemikalier. Om du vill ha mer information hänvisas till tillämpliga säkerhetsdatablad (SDS) som kan erhållas från produktleverantören.

Säkerställ att instrumenten är kontrollerade och kalibrerade enligt tillverkarens rekommendationer.

Reagenser

- I Nukleasfritt vatten av PCR-grad
- I Reagenser för omvänd transkription: Det validerade reagentet är Superscript® II (eller Superscript) Reverse Transcriptase (omvänt transkriptas), innefattar 5x förstasträngsbuffert, 100 mM DTT (Life Technologies, art. nr 18064-022)
- I RNase-hämmare Det validerade reagentet är RNaseOUT™ (Life Technologies, art. nr 10777-019)
- I Uppsättningar med dNTPs, PCR-grad
- I Random (slumpmässig) hexamer
- I MgCl₂
- I Buffert och *Taq* DNA-polymeras: De validerade reagenterna är TaqMan® Universal PCR Master Mix (Master Mix PCR 2x) (Life Technologies, art. nr 4304437) och LightCycler TaqMan Master (Master Mix PCR 5x) (Roche, art. nr 04535286001)

Förbrukningsartiklar

- I Nukleasfria, aerosolresistenta, sterila PCR-pipettspetsar med hydrofoba filter
- I 0,5 ml eller 0,2 ml RNase- och DNase-fria PCR-rör
- I Is

Utrustning

- I Mikroliterpipett* avsedd för PCR (1–10 µl; 10–100 µl; 100–1000 µl)
- I Bänkcentrifug* med rotor för 0,2 ml/0,5 ml reaktionsrör (med en maximal hastighet på 13 000/14 000 varv/minut)
- I Realtids-PCR-instrument:* Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM eller annat RotorGene-instrument; LightCycler 1.2, 1.5, 2.0 eller 480; ABI PRISM 7000, 7700, or 7900HT SDS; Applied Biosystems 7500 Real-Time PCR System; eller SmartCycler; och tillhörande specifikt material
- I Termocykel* eller vattenbad* (för steget med omvänd transkription)

Kompletterande reagenser

- I *ipsogen* PML-RARA bcr1 Controls Kit (kontrollkit för *ipsogen* PML-RARA bcr1) (kat. nr 672091) endast för forskning, bestående av cellinjer med negativt, högt och lågt positivt uttryck av PML-RARA bcr1-fusionsgenen för den kvalitativa valideringen av RNA-extraheringen och den omvända transkriptionen

Varningar och försiktighet

För in vitro-diagnostisk användning

Använd alltid lämplig laboratorierock, engångshandskar och skyddsglasögon vid hantering av kemikalier. Se lämpligt säkerhetsdatablad (SDS) för mer information. Dessa är tillgängliga online i praktiskt och kompakt PDF-format på www.qiagen.com/safety där du kan hitta, granska och skriva ut datablad för alla satser och satskomponenter från QIAGEN.

Kassera prov- och analysavfall enligt lokala säkerhetsregler.

Allmänna försiktighetsåtgärder

Vid qPCR-tester krävs god laboratoriesed, inklusive utrustningsunderhåll, som är särskilt inriktad på molekylärbiologi och följer gällande regler och relevanta standarder.

Detta kit är avsett för in vitro-diagnostisk användning. Reagenser och instruktioner som medföljer detta kit har validerats för optimal prestanda. Ytterligare spädning av reagenserna eller förändring av inkuberingstider och -temperaturer kan leda till felaktiga eller oförenliga data. PPC- och PPF-reagenser kan förändras om de utsätts för ljus. Alla reagenser är formulerade specifikt för användning med detta test. För att få en optimal testprestanda får inget ersättningsmaterial användas.

För bestämning av transkriptnivåer med qPCR krävs både den omvända transkriptionen av mRNA:t och amplifieringen av det framställda cDNA:t med PCR. Därför måste hela analysproceduren utföras under RNAs-/DNAs-fria förhållanden.

Var mycket försiktig för att förhindra:

- I RNAs-/DNAs-kontaminering, vilket kan bryta ned templat-mRNA:t och det framställda cDNA:t
- I mRNA- eller PCR-överföringskontaminering som leder till falsk positiv signal

Därför rekommenderar vi följande:

- I Använd nukleasfria laboratorieartiklar (t.ex. pipetter, pipettspetsar, reaktionsflaskor) och använd handskar när du utför analysen.
- I Använd färska aerosolresistenta pipettspetsar vid alla pipetteringssteg för att undvika korskontaminering av prover och reagenser.
- I Bered pre-PCR-masterblandningen med särskilt material (pipetter, spetsar osv.) i ett särskilt område där inga DNA-matriser (cDNA, DNA, plasmid) förs in. Tillsätt templat i en separat zon (helst i ett separat rum) med specifikt material (pipetter, spetsar osv.).
- I Hantera standardspädningarna (C1–3 och F1–5) i ett separat rum.

Förvaring och hantering av reagens

Kiten skickas på kolsyreis och måste förvaras vid -30 °C till -15 °C efter leverans.

- I Minimera primers och sökfragmentblandningars exponering för ljus (PPC- och PPF-rör).
- I Blanda och centrifugera rören försiktigt innan de öppnas.
- I Förvara alla kitkomponenter i originalbehållarna.

Dessa förvaringsvillkor gäller både öppnade och oöppnade komponenter. Komponenter som förvaras under andra villkor än de som anges på etiketterna fungerar eventuellt inte på rätt sätt och detta kan påverka analysresultatet negativt.

Utgångsdatum för varje reagens anges på de enskilda komponentetiketterna. Under korrekta förvaringsvillkor behåller produkten sin prestanda fram till utgångsdatumet som står tryckt på etiketten.

Det finns inga uppenbara tecken som visar att denna produkt är instabil. Positiva och negativa kontroller ska dock köras samtidigt med okända patientprover.

Procedur

Beredning av prov-RNA

RNA-beredning från patientprover (blod eller benmärg) måste ha utförts med en validerad procedur. Analysens kvalitet beror till stor del på kvaliteten hos det inmatade RNA:t. Därför rekommenderar vi att det renade RNA:t kvalificeras med agaros**-gel-elektrofores eller med användning av Agilent® Bioanalyzer® före analys.

Protokoll: Rekommenderad standardiserad EAC omvänd transkription

Saker som ska utföras före start

- I Bered dNTP:er, 10 mM i varje. Förvaras vid –20 °C i aliquoter.
- I Bered random (slumpmässig) hexamer, 100 µM. Förvaras vid –20 °C i aliquoter.
- I Bered MgCl₂, 50 mM. Förvaras vid –20 °C i aliquoter.

Procedur

1. Tina alla nödvändiga komponenter och placera dem på is.
2. Inkubera 1 µg RNA (1–4 µl) i 10 minuter vid 70 °C och kyl omedelbart på is i 5 minuter.
3. Centrifugera kortvarigt (cirka 10 sekunder, 10 000 varv/minut) för att samla upp vätskan i botten på röret. Förvara sedan på is.
4. Bered nedanstående RT-blandning enligt antalet prover som ska behandlas (tabell 1).

* Använd alltid lämplig laboratorierock, engångshandskar och skyddsglasögon vid hantering av kemikalier.

Tabell 1. Beredning av RT-blandning

Komponent	Volym per prov (µl)	Slutlig koncentration
Förstasträngsbuffert (medföljer Superscript II omvänt transkriptas), 5x	4.0	1x
MgCl ₂ (50 mM)	2.0	5 mM
dNTP:er (10 mM i varje, ska beredas i förväg och förvaras vid -20 °C i alikvoter)	2.0	1 mM
DTT (100 mM, medföljer Superscript II omvänt transkriptas)	2.0	10 mM
RNas-hämmare (40 E/µl)	0.5	1 E/µl
RNas-hämmare (40 E/µl)	0.5	1 E/µl
Random (slumpmässig) hexamer (100 µM)	5.0	25 µM
SuperScript II eller SuperScript III omvänt transkriptas (200 E/µl)	0.5	5 E/µl
Uppvärt RNA-prov (tillsätts i steg 5)	1.0–4.0	50 ng/µl
Nukleasfritt vatten av PCR-grad (tillsätts i steg 5)	0.0–3.0	—
Slutlig volym	20.0	—

5. Pipettera 16 µl RT-blandning i varje PCR-rör. Tillsätt sedan 1–4 µl (1 µg) RNA (från steg 3) och justera volymen till 20 µl med nukleasfritt vatten av PCR-grad (se tabell 2).

Tabell 2. Beredning av omvänd transkriptionsreaktion

Komponent	Volym (µl)
RT-blandning	16
Uppvärmrt prov-RNA (1 µg)	1–4
Nukleasfritt vatten av PCR-grad	0–3
Slutlig volym	20

6. Blanda väl och centrifugera kortvarigt (cirka 10 sekunder, 10 000 varv/minut), för att samla upp vätskan i botten på röret.
7. Inkubera vid 20 °C i 10 minuter.
8. Inkubera vid 42 °C i en termocykel i 45 minuter och sedan omedelbart vid 99 °C i 3 minuter.
9. Kyl på is (för att stoppa reaktionen) i 5 minuter.
10. Centrifugera kortvarigt (cirka 10 sekunder, 10 000 varv/minut) för att samla upp vätskan i botten på röret. Förvara sedan på is.
11. Späd det slutliga cDNA:t med 30 µl nukleasfritt vatten av PCR-grad så att den slutliga volymen är 50 µl.
12. Utför qPCR enligt nedanstående protokoll, enligt ditt qPCR-instrument.

Protokoll: qPCR på Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM- eller Rotor-Gene Q 5plex HRM-instrument med 72-rörsrotor

När detta instrument används rekommenderar vi att alla mätningar görs i duplikat, så som anges i tabell 3.

Tabell 3. Antal reaktioner för Rotor-Gene Q-instrument med 72-rörsrotor

Prover	Reaktioner
Med ABL-primers och sökfragmentblandning (PPC-ABL)	
n cDNA-prover	n x 2 reaktioner
ABL-standard	2 x 3 reaktioner (3 spädningar, var och en testad i duplikat)
Vattenkontroll	2 reaktioner
Med PML-RARA bcr1-primers och sökfragmentblandning (PPF-PML-RARA bcr1)	
n cDNA-prover	n x 2 reaktioner
PML-RARA-standard	2 x 5 reaktioner (5 spädningar, var och en testad i duplikat) 2 x 5 reaktioner (5 spädningar, var och en testad i duplikat)
Vattenkontroll	2 reaktioner

Provbehandling på Rotor-Gene® Q-instrument med 72-rörsrotor

Vi rekommenderar att minst 8 cDNA-prover testas i samma experiment för att optimera användningen av standarder, primers och sökfragmentblandningar.

qPCR på Rotor-Gene Q-instrument med 72-försrotor

Obs! Utför alla steg på is.

Procedur

1. Tina alla nödvändiga komponenter och placera dem på is.
2. Bered nedanstående qPCR-blandning enligt antalet prover som ska behandlas.

Alla koncentrationer avser den slutliga volymen av reaktionen.

I tabell 4 beskrivs pipetteringsschemat för beredningen av en reagensblandning, beräknad att uppnå en slutlig reaktionsvolym på 25 µl. En pre-mix kan beredas, enligt antalet reaktioner, med samma primers och sökfragmentblandning (antingen PPC-ABL eller PPF-PML-RARA bcr1). Extra volymer är inkluderade för att kompensera för pipetteringsfel.

Tabell 4. Beredning av qPCR-blandning

Komponent	1 reaktion (µl)	ABL: 24 + 1 reaktioner (µl)	PML-RARA bcr1: 28 + 1 reaktioner (µl)	Slutlig koncentration
TaqMan Universal PCR Master Mix, 2x	12.5	312.5	362.5	1x
Primers och sökfragmentblandning, 25x	1	25	29	1x
Nukleasfritt vatten av PCR-grad	6.5	162.5	188.5	--
Prov (tillsätts i steg 4)	5	5 vardera	5 vardera	--
Total volym	25	25 vardera	25 vardera	--

3. Dispensera 20 µl av qPCR-pre-mixen per rör.
4. Tillsätt 5 µl av den RT-produkt (cDNA, 100 ng RNA-ekvivalent) som erhållits vid den omvända transkriptionen (se "Protokoll: Rekommenderad standardiserad EAC omvänd transkription", sida 15) i det motsvarande röret (total volym 25 µl).
5. Blanda försiktigt genom att pipettera upp och ned.
6. Placera rören i termocykeln enligt tillverkarens rekommendationer.
7. Programmera Rotor-Gene Q-instrumentet med det termocykelprogram som anges i tabell 5.

Tabell 5. Temperaturprofil

Analyssätt	Kvantifiering
Uppehåll	Temperatur: 50 grader Tid: 2 minuter
Uppehåll 2	Temperatur: 95 grader Tid: 10 minuter
Cykling	50 gånger 95 grader i 15 sek. 60 grader i 1 min. med insamling av FAM-fluorescens i kanal Green (grön): Enkel

8. Starta termocykelprogrammet så som anges i tabell 5.
9. För Rotor-Gene Q-instrument väljer du "Slope Correct" (lutning korrekt) för analysen. Vi rekommenderar att tröskeln ställs in på 0,03.

Protokoll: qPCR på ABI PRISM 7000, 7700 och 7900HT SDS, Applied Biosystems 7500 Real-Time PCR System och LightCycler 480-instrument

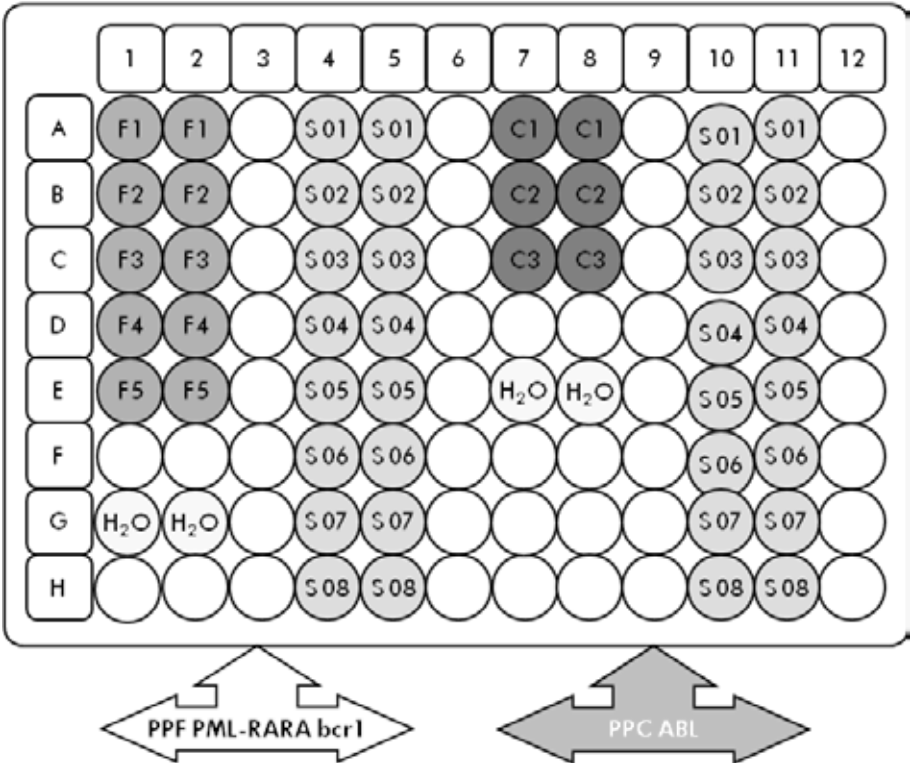
När utrustningen för qPCR med 96-brunnsplattor används rekommenderar vi att alla mätningar görs i duplikat, så som anges i tabell 6.

Tabell 6. Antal reaktioner med användning av utrustning för qPCR med 96-brunnsplattor

Prover	Reaktioner
Med ABL-primers och sökfragmentblandning (PPC-ABL)	
n cDNA-prover	n x 2 reaktioner
ABL-standard	2 x 3 reaktioner (3 spädningar, var och en testad i duplikat)
Vattenkontroll	2 reaktioner
Med PML-RARA bcr1-primers och sökfragmentblandning (PPF-PML-RARA bcr1)	
n cDNA-prover	n x 2 reaktioner
PML-RARA bcr1-standard	2 x 5 reaktioner (5 spädningar, var och en testad i duplikat) 2 x 5 reaktioner (5 spädningar, var och en testad i duplikat)
Vattenkontroll	2 reaktioner

Provbehandling på ABI PRISM 7000, 7700 och 7900 SDS, Applied Biosystems 7500 Real-Time PCR System och LightCycler 480-instrument

Vi rekommenderar att minst 8 cDNA-prover testas i samma experiment för att optimera användningen av standarder, primers och sökfragmentblandningar. Plattschemat i figur 4 visar ett exempel på ett sådant experiment.



Figur 4. Rekommenderad plattuppställning för ett (1) experiment. S: cDNA-prov; F1–5: PML-RARA bcr1-standarder; C1–3: ABL-standarder; H₂O: vattenkontroll.

qPCR på ABI PRISM 7000, 7700 och 7900 SDS, Applied Biosystems 7500 Real-Time PCR System och LightCycler 480-instrument

Obs! Utför alla steg på is.

Procedur

1. Tina alla nödvändiga komponenter och placera dem på is.
2. Bered nedanstående qPCR-blandning enligt antalet prover som ska behandlas.
Alla koncentrationer avser den slutliga volymen av reaktionen.

I tabell 7 beskrivs pipetteringsschemat för beredningen av en reagensblandning, beräknad att uppnå en slutlig reaktionsvolym på 25 µl. En pre-mix kan beredas, enligt antalet reaktioner, med samma primers och sökfragmentblandning (antingen PPC-ABL eller PPF-PML-RARA bcr1). Extra volymer är inkluderade för att kompensera för pipetteringsfel.

Tabell 7. Beredning av qPCR-blandning

Komponent	1 reaktion (µl)	ABL: 24 +1 reaktioner (µl)	PML-RARA bcr1: 28 +1 reaktioner (µl)	Slutlig koncentration
TaqMan Universal PCR Master Mix, 2x	12.5	312.5	362.5	1x
Primers och sökfragment- blandning, 25x	1	25	29	1x
Nukleasfritt vatten av PCR-grad	6.5	162.5	188.5	--
Prov (tillsätts i steg 4)	5	5 vardera	5 vardera	--
Total volym	25	25 vardera	25 vardera	--

3. Dispensera 20 µl av qPCR-pre-mixen per brunn.
4. Tillsätt 5 µl av den RT-produkt (cDNA, 100 ng RNA-ekvivalent) som erhållits vid den omvända transkriptionen (se "Protokoll: Rekommenderad standardiserad EAC omvänd transkription", sida 15) i den motsvarande brunnen (total volym 25 µl).
5. Blanda försiktigt genom att pipettera upp och ned.

6. Förslut plattan och centrifugera kortvarigt (300 x g, cirka 10 sekunder).
7. Placera plattan i termocykeln enligt tillverkarens rekommendationer. Programmera termocykeln med termocykelprogrammet så som anges i tabell 8 för ABI PRISM 7000, 7700 och 7900HT SDS, och Applied Biosystems 7500 Real-Time PCR System, eller tabell 9 för LightCycler 480-instrumentet.

Tabell 8. Temperaturprofil för ABI PRISM 7000, 7700 och 7900HT SDS, och Applied Biosystems 7500 Real-Time PCR System

Analyssätt	Standardkurva – absolut kvantifiering
Uppehåll	Temperatur: 50 °C Tid: 2 minuter
Uppehåll 2	Temperatur: 95 °C Tid: 10 minuter
Cykling	50 gånger 95 °C i 15 sekunder 60 °C i 1 minut med insamling av FAM-fluorescens; quencher: TAMRA

Tabell 9. Temperaturprofil för LightCycler 480-instrument

Analyssätt	Absolut kvantifiering ("Abs kvant")
Detektionsformat	Välj "Simple Probe" (enkelt sökfragment) i fönstret Detection formats (detektionsformat)
Uppehåll	Temperatur: 50 °C Tid: 2 minuter
Uppehåll 2	Temperatur: 95 °C Tid: 10 minuter
Cykling	50 gånger 95 °C i 15 sekunder 60 °C i 1 minut med insamling av FAM-fluorescens motsvarande (483–533 nm) för LC-version 01 och (465–510 nm) för LC-version 02

8. För ABI PRISM 7000, 7700 och 7900HT SDS, och Applied Biosystems 7500 Real-Time PCR System, följ steg 8a. För LightCycler 480, följ steg 8b.
- 8a. ABI PRISM 7000, 7700 och 7900HT SDS, och Applied Biosystems 7500 Real-Time PCR System: Vi rekommenderar en tröskelinställning på 0,1 så som beskrivs i EAC-protokollet i analyssteget och en baslinjeinställning mellan cykel 3 och 15. Starta cyklingsprogrammet så som anges i tabell 8.
- 8b. LightCycler 480: Vi rekommenderar ett Fit point-analyssätt med bakgrund vid 2,0 och tröskel vid 2,0. Starta termocykelprogrammet så som anges i tabell 9.

Protokoll: qPCR på LightCycler 1.2- och 2.0-instrument

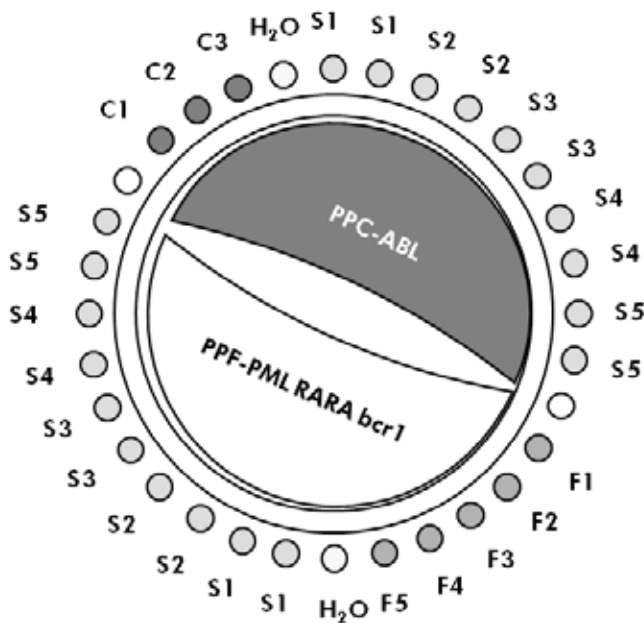
När kapillärinstrument används rekommenderar vi att prover mäts i duplikat och kontroller endast en gång, så som anges i tabell 10.

Tabell 10. Antal reaktioner för LightCycler 1.2- och 2.0-instrument

Prover	Reaktioner
Med ABL-primers och sökfragmentblandning (PPC-ABL)	
n cDNA-prover	n x 2 reaktioner
ABL-standard	1 x 3 reaktioner (3 standardspädningar, var och en testad en gång)
Vattenkontroll	1 reaktion
Med PML-RARA bcr1-primers och sökfragmentblandning (PPF-PML-RARA bcr1)	
n cDNA-prover	n x 2 reaktioner
PML-RARA bcr1-standard	1 x 5 reaktioner (5 standardspädningar, var och en testad en gång)
Vattenkontroll	1 reaktion

Provbehandling på LightCycler 1.2- och 2.0-instrument

Vi rekommenderar att minst 5 cDNA-prover testas i samma experiment för att optimera användningen av standarder, primers och sökfragmentblandningar. Kapillärschemat i figur 5 visar ett exempel på ett experiment.



Figur 5. Rekommenderad rotoruppställning för varje experiment med *ipsogen* PML-RARA bcr1-kitet. F1–5: PML-RARA bcr1-standarder; C1–3: ABL-standarder; S: okänt DNA-prov som ska analyseras; H₂O: vattenkontroll.

qPCR på LightCycler 1.2- och 2.0-instrument

Obs! På grund av särskilda tekniska krav måste LightCycler-experiment utföras med specifika reagenser. Vi rekommenderar att LightCycler TaqMan Master används samt att man följer tillverkarens anvisningar om beredningen av Master Mix 5x.

Obs! Utför alla steg på is.

Procedur

1. Tina alla nödvändiga komponenter och placera dem på is.
2. Bered nedanstående qPCR-blandning enligt antalet prover som ska behandlas.

Alla koncentrationer avser den slutliga volymen av reaktionen.

I tabell 11 beskrivs pipetteringsschemat för beredningen av en reagensblandning, beräknad att uppnå en slutlig reaktionsvolym på 20 µl. En pre-mix kan beredas, enligt antalet reaktioner, med samma primers och sökfragmentblandning (antingen PPC-ABL eller PPF-PML-RARA bcr1). Extra volymer är inkluderade för att kompensera för pipetteringsfel.

Tabell 11. Beredning av qPCR-blandning

Komponent	1 reaktion (µl)	ABL: 14 + 1 reaktioner (µl)	PML-RARA bcr1: 16 + 1 reaktioner (µl)	Slutlig koncentration
Färskt beredd LightCycler TaqMan Master Mix, 5x	4.0	60	68.0	1x
Primers och sökfragment- blandning, 25x	0.8	12	13.6	1x
Nukleasfritt vatten av PCR-grad	10.2	153	173.4	--
Prov (tillsätts i steg 4)	5.0	5 vardera	5,0 vardera	--
Total volym	20.0	20 vardera	20,0 vardera	--

3. Dispensera 15 µl av qPCR-pre-mixen per kapillär.
4. Tillsätt 5 µl av den RT-produkt (cDNA, 100 ng RNA-ekvivalent) som erhållits vid den omvända transkriptionen (se "Protokoll: Rekommenderad standardiserad EAC omvänd transkription", sida 15) i det motsvarande röret (total volym 20 µl).

5. Blanda försiktigt genom att pipettera upp och ned.
6. Placera kapillärerna i adaptrarna som medföljde apparaten och centrifugera kortvarigt (700 x g, cirka 10 sekunder).
7. Ladda kapillärerna i termocykeln enligt tillverkarens rekommendationer.
8. Programmera LightCycler 1.2- eller 2.0-instrumentet med det termocykelprogram som anges i tabell 12.

Tabell 12. Temperaturprofil

Analyssätt	Kvantifiering
Uppehåll	Temperatur: 95 °C Tid: 10 minuter Ramp: 20
Cykling	50 gånger 95 °C i 10 sekunder; ramp: 20 60 °C i 1 minut; ramp: 20; med insamling av FAM-fluorescens: Enkel
Uppehåll 2	45 °C i 1 minut; ramp: 20

9. För LightCycler 1.2, följ steg 9a. För LightCycler 2.0, följ steg 9b.
 - 9a. LightCycler 1.2: Läget F1/F2 och "2nd derivative analysis" (2:a derivatanalys) rekommenderas. Starta termocykelprogrammet så som anges i tabell 12.
 - 9b. LightCycler 2.0: Vi rekommenderar användningen av automatiserad (F''max) analys på LightCycler 2.0 programversion 4.0 för att erhålla reproducerbara resultat. Starta termocykelprogrammet så som anges i tabell 12.

Protokoll: qPCR på SmartCycler-instrumentet

När detta instrument används rekommenderar vi att prover mäts i duplikat och kontroller endast en gång, så som anges i tabell 13.

Tabell 13. Antal reaktioner för SmartCycler-instrumentet

Prover	Reaktioner
Med ABL-primers och sökfragmentblandning (PPC-ABL)	
n cDNA-prover	n x 2 reaktioner
ABL-standard	1 x 3 reaktioner (3 standardspädningar, var och en testad en gång)
Vattenkontroll	1 reaktion
Med PML-RARA bcr1-primers och sökfragmentblandning (PPF-PML-RARA bcr1)	
n cDNA-prover	n x 2 reaktioner
PML-RARA bcr1-standard	1 x 5 reaktioner (5 standardspädningar, var och en testad en gång)
Vattenkontroll	1 reaktion

Provbehandling på SmartCycler-instrumentet

Vi rekommenderar att minst 5 cDNA-prover testas i samma experiment för att optimera användningen av standarder, primers och sökfragmentblandningar. Tvåblocksschemat i figur 6 visar ett exempel.



Alla analyser på det första blocket utförs med PPC-ABL



Alla analyser på detta andra block utförs med PPF-PML-RARA bcr1

Figur 6. Rekommenderad plattuppställning för ett (1) experiment. S: cDNA-prov; F1–5: PML-RARA bcr1-standarder; C1–3: ABL-standarder; H₂O: vattenkontroll.

qPCR på SmartCycler-instrumentet

Obs! Utför alla steg på is.

Procedur

1. Tina alla nödvändiga komponenter och placera dem på is.
2. Bered nedanstående qPCR-blandning enligt antalet prover som ska behandlas.

Alla koncentrationer avser den slutliga volymen av reaktionen.

I tabell 14 beskrivs pipetteringsschemat för beredningen av en reagensblandning, beräknad att uppnå en slutlig reaktionsvolym på 25 µl. En pre-mix kan beredas, enligt antalet reaktioner, med samma primers och sökfragmentblandning (antingen PPC-ABL eller PPF-PML-RARA bcr1). Extra volymer är inkluderade för att kompensera för pipetteringsfel.

Tabell 14. Beredning av qPCR-blandning

Komponent	1 reaktion (μ l)	ABL: 14 + 1 reaktioner (μ l)	PML-RARA bcr1: 16 + 1 reaktioner (μ l)	Slutlig koncentration
TaqMan Universal PCR Master Mix, 2x	12.5	187.5	212.5	1x
Primers och sökfragment- blandning, 25x	1	15	17	1x
Nukleasfritt vatten av PCR-grad	6.5	97.5	110.5	--
Prov (tillsätts i steg 4)	5	5 vardera	5 vardera	--
Total volym	25	25 vardera	25 vardera	--

3. Dispensera 20 μ l av qPCR-pre-mixen per brunn.
4. Tillsätt 5 μ l av den RT-produkt (cDNA, 100 ng RNA-ekvivalent) som erhållits vid den omvända transkriptionen (se "Protokoll: Rekommenderad standardiserad EAC omvänd transkription", sida 15) i det motsvarande röret (total volym 25 μ l).
5. Blanda försiktigt genom att pipettera upp och ned.
6. Ladda proverna i termocykeln enligt tillverkarens rekommendationer.
7. Programmera SmartCycler-instrumentet med det termocykelprogram som anges i tabell 15.

Tabell 15. Temperaturprofil

Uppehåll	Temperatur: 50 °C Tid: 2 minuter
Uppehåll 2	Temperatur: 95 °C Tid: 10 minuter
Cykling	50 gånger 95 °C i 15 sekunder 60 °C i 1 minut med insamling: Enkel

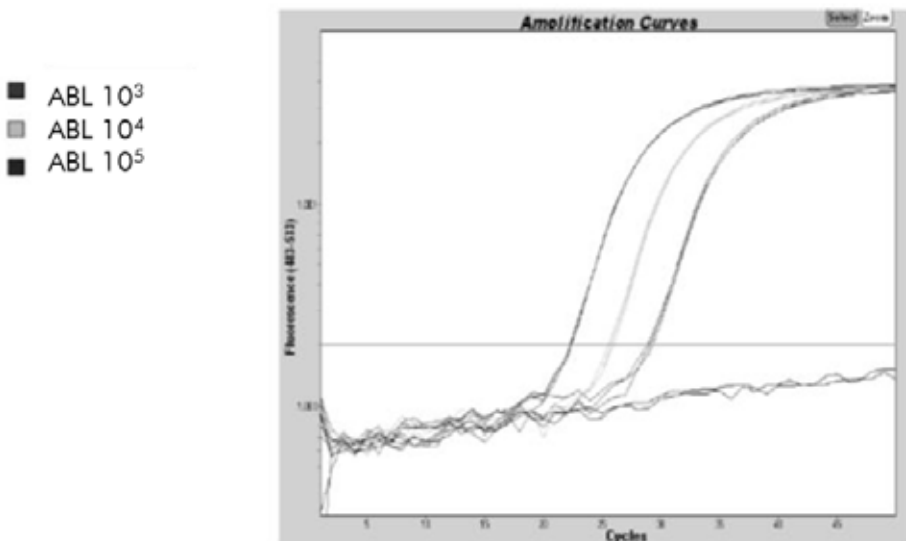
8. Vi rekommenderar en tröskelinställning på 30. Starta termocykelprogrammet så som anges i tabell 15.

Tolkning av resultat

Dataanalysprincip

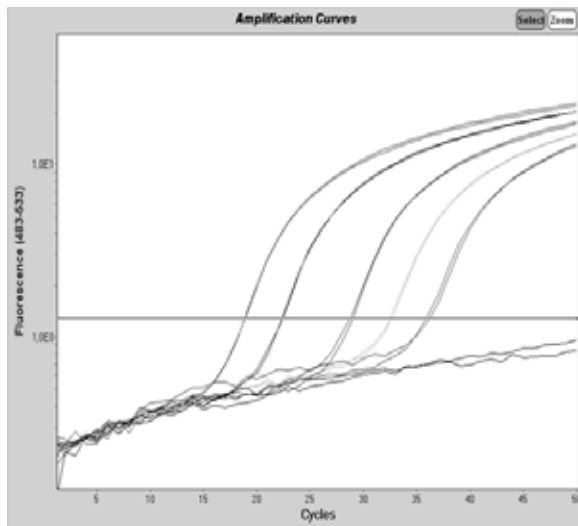
När TaqMan-tekniken används, kallas antalet PCR-cykler som behövs för att detektera en signal ovanför tröskeln för tröskelcykeln (C_T) och är direkt proportionell till mängden mål som finns i början av reaktionen.

När man använder standarder med ett känt antal molekyler, kan man fastställa en standardkurva och bestämma den exakta mängden mål som finns i testprovet. Standardkurvorna för *ipsogen* är plasmidbaserade; vi använder 3 plasmidstandardspädningar för ABL-kontrollgenen (CG), och 5 standardspädningar för fusionsgenen (PML-RARA *bcr1*) för att säkert få noggranna standardkurvor. I figur 7 och 8 visas ett exempel på TaqMan-amplifieringskurvor som erhållits med *ipsogen* PML-RARA *bcr1*-kitet.



Figur 7. Detektion av ABL-standarder (C1, C2, C3). 10³, 10⁴ och 10⁵ kopior/5 µl.

- PML-RARA bcr1 10¹
- PML-RARA bcr1 10²
- PML-RARA bcr1 10³
- PML-RARA bcr1 10⁵
- PML-RARA bcr1 10⁶



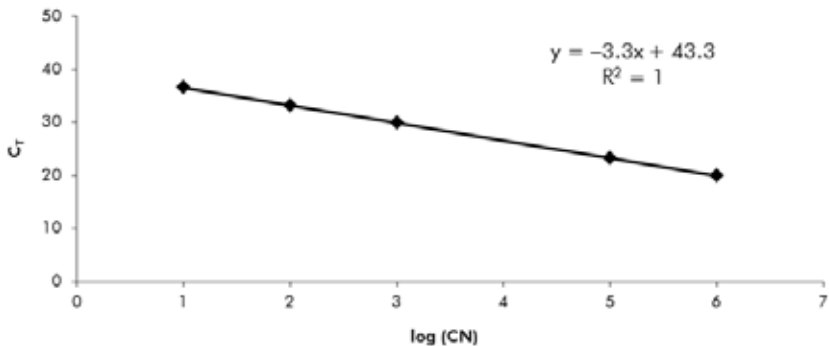
Figur 8. Detektion av PML-RARA bcr1-standarddetektion (F1–F5). 10¹, 10², 10³, 10⁵ och 10⁶ kopior/5 µl.

Resultat

Standardkurva och kvalitetskriterier

Rådata kan klistras in i en Excel[®]-fil för att analyseras.

För varje gen (ABL och PML-RARA), ritas råa C_T-värden in som erhållits från plasmidstandardspädningar i enlighet med log-kopians nummer (3, 4 och 5 för C1, C2 och C3; 1, 2, 3, 5 och 6 för F1, F2, F3, F4 och F5). I figur 9 visas ett exempel på den teoretiska kurvan som beräknats på 5 standardspädningar.



Figur 9. Teoretisk kurva som beräknats från 5 standardspädningar. En linjär regressionskurva ($y = ax + b$) beräknas för varje gen (ABL och PML-RARA), där a är linjens lutning och b är y-skärningspunkten, vilket är y-koordinaten för den punkt där linjen korsar y-axeln. Dess ekvation och bestämningskoefficient (R^2) är tryckta på grafen.

Eftersom standarder är tiofaldiga spädningar, är kurvans teoretiska lutning $-3,3$. En lutning mellan $-3,0$ och $-3,9$ är acceptabel så länge som R^2 är $>0,95$ (6). Ett värde för R^2 som är $>0,98$ är dock önskvärt för att få exakta resultat (7).

Normaliserat kopieantal (normalized copy number, NCN)

Ekvationen för ABL-standardkurvan ska användas för att omvandla råa C_T -värden (erhållna med PPC-ABL) för de okända proven till ABL-kopieantal (ABL_{CN}).

Ekvationen för PML-RARA-standardkurvan ska användas för att omvandla råa C_T -värden (erhållna med PPF-PML-RARA) för de okända proven, till APML-RARA-kopieantal ($PML-RARA_{CN}$).

Kvoten för dessa CN-värden ger det normaliserade kopieantalet (NCN):

$$NCN = \frac{PML-RARA_{CN}}{ABL_{CN}}$$

MRD-värde

Värdet för MRD (minimal residual disease) är kvoten mellan CG-normaliserat uttryck för FG:t vid uppföljning $(FG_{CN}/CG_{CN})_{FUP}$ och diagnostiska prover $(FG_{CN}/CG_{CN})_{DX}$.

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

Känslighet

Känsligheten eller sensitiviteten (SENS_v) beräknas enligt det relativa uttrycket av FG vid diagnosen $(FG_{CN}/CG_{CN})_{DX}$ och CG-uttryck $(CG_{CN,FUP})$ i uppföljningsprovet.

$$\text{Känslighet (SENSv)} = \frac{CG_{CN,DX}}{CG_{CN,FUP} \times FG_{CN,DX}}$$

Kvalitetskontroll på ABL-värden

Dålig kvalitet för RNA eller problem under qPCR-stegen leder till låga ABL_{CN} . Vi rekommenderar att man kasserar resultat från prover som ger $ABL_{CN} < 1318$ (lägre värde för 95 % KI från patientprover i EAC-studien, litteraturhänvisning 5).

Reproducerbarhet mellan replikat

Variationen i C_T -värden mellan replikat ska vara < 2 , vilket motsvarar en fyrfaldig förändring av kopiaantalvärdena.

Variation i C_T -värden mellan replikat är generellt $< 1,5$ om det genomsnittliga C_T -värdet för replikaten är < 36 (6).

Obs! Varje användare bör mäta den egna reproducerbarheten i sitt laboratorium.

Vattenkontroller

Negativa kontroller ska ge noll CN.

En positiv vattenkontroll är följden av en korskontamination. Se "Felsökningshandbok" nedan för att hitta en lösning.

Felsökningshandbok

Denna felsökningshandbok kan vara till hjälp för att lösa eventuella problem som uppstår. För mer information, kontakta din kliniska koordinator eller besök www.qiagen.com.

Kommentarer och förslag

Negativt resultat för kontrollgenen (ABL) och PML-RARA bcr1 i alla proverna – acceptabel standard

- | | |
|---|---|
| a) Dålig RNA-kvalitet | Kontrollera alltid RNA-kvalitet och -koncentration innan du börjar.
Kör en positiv kontroll för cellinje-RNA (<i>ipsogen</i> PML-RARA bcr1 Controls Kit [PML-RARA bcr1-kontrollkit], kat. nr 672091*) parallellt. |
| b) Steget för omvänd transkription misslyckas | Kontrollera alltid RNA-kvalitet och -koncentration innan du börjar.
Kör en positiv kontroll för cellinje-RNA (<i>ipsogen</i> PML-RARA bcr1 Controls Kit [PML-RARA bcr1-kontrollkit], kat. nr 672091*) parallellt. |

Negativt resultat för kontrollgenen (ABL) i proverna – acceptabel standard

- | | |
|---|---|
| a) Dålig RNA-kvalitet | Kontrollera alltid RNA-kvalitet och -koncentration innan du börjar.
Kör en positiv kontroll för cellinje-RNA (<i>ipsogen</i> PML-RARA bcr1 Controls Kit [PML-RARA bcr1-kontrollkit], kat. nr 672091*) parallellt. |
| b) Steget för omvänd transkription misslyckas | Kontrollera alltid RNA-kvalitet och -koncentration innan du börjar.
Kör en positiv kontroll för cellinje-RNA (<i>ipsogen</i> PML-RARA bcr1 Controls Kit [PML-RARA bcr1-kontrollkit], kat. nr 672091*) parallellt. |

Kommentarer och förslag

Standardsignal negativ

- | | |
|--|--|
| a) Pipetteringsfel | Kontrollera pipetteringsschema och uppställningen av reaktionen.
Upprepa PCR-körningen. |
| b) Felaktig förvaring av kit-komponenter | Förvara <i>ipsogen</i> PML-RARA bcr1-kitet vid –15 till –30 °C och skydda primers och sökfragmentblandningar (PPC och PPF) mot ljus. Se "Förvaring och hantering av reagens", sidan 14.
Undvik upprepad frysning och tining.
Alikvotera reagenser för förvaring. |

Negativa kontroller är positiva

- | | |
|-------------------|--|
| Korskontamination | Byt ut alla viktiga reagenser.
Upprepa experimentet med nya aliquoter av samtliga reagenser.
Hantera alltid prover, kit-komponenter och förbrukningsartiklar i enlighet med allmänt vedertagna rutiner för att förhindra överföringskontamination. |
|-------------------|--|

Ingen signal, även i standardkontroller

- | | |
|---|--|
| a) Pipetteringsfel eller utelämnade reagenser | Kontrollera pipetteringsschema och uppställningen av reaktionen.
Upprepa PCR-körningen. |
| b) Hämmande effekter av provmaterialet, orsakade av otillräcklig rening | Upprepa RNA-beredningen. |
| c) LightCycler: Felaktig detektionskanal valdes | Ställ in kanalinställningen på F1/F2 eller 530 nm/640 nm. |
| d) LightCycler: Ingen datainsamling är programmerad | Kontrollera cykelprogrammen.
Välj insamlingsläget "single" (enkelt) i slutet av varje hybridiseringssegment för PCR-programmet. |

Kommentarer och förslag

Ingen eller låg signal i prover men standardkontroller är utan anmärkning

- a) Dålig RNA-kvalitet eller låg koncentration Kontrollera alltid RNA-kvalitet och -koncentration innan du börjar.
Kör en positiv kontroll för cellinje-RNA (*ipsogen* PML-RARA bcr1 Controls Kit [PML-RARA bcr1-kontrollkit], kat. nr 672091*) parallellt.
- b) Steget för omvänd transkription misslyckas Kontrollera alltid RNA-kvalitet och -koncentration innan du börjar.
Kör en positiv kontroll för cellinje-RNA (*ipsogen* PML-RARA bcr1 Controls Kit [PML-RARA bcr1-kontrollkit], kat. nr 672091*) parallellt.

Fluorescensintensiteten är för låg

- a) Felaktig förvaring av kit-komponenter Förvara *ipsogen* PML-RARA bcr1-kitet vid –15 till –30 °C och skydda primers och sökfragmentblandningar (PPC och PPF) mot ljus. Se "Förvaring och hantering av reagens", sidan 14. Undvik upprepade frysning och tining. Alikvotera reagenser för förvaring.
- b) Mycket låg initial mängd av mål-RNA Öka mängden prov-RNA.
Obs! Beroende på vilken metod som valts för RNA-beredning kan hämmande effekter uppstå.

LightCycler: Fluorescensintensiteten varierar

- a) Pipetteringsfel Variabilitet som orsakas av så kallat "pipetteringsfel" kan reduceras om data analyseras i läget F1/F2 eller 530 nm/640 nm.
- b) Otillräcklig centrifugering av kapillärerna Den beredda PCR-blandningen kan fortfarande vara kvar i kapillärens övre kärl, eller en luftbubbla kan sitta kvar i kapillärspetsen.
Centrifugera alltid kapillärer som laddats med reaktionsblandningen så som beskrivs i den specifika användarhandboken till apparaten.

Kommentarer och förslag

-
- | | |
|--|---|
| c) Utsidan på kapillärspetsen är smutsig | Använd alltid handskar vid hantering av kapillärerna. |
|--|---|

LightCycler: Fel i standardkurvan

Pipetteringsfel

Variabilitet som orsakas av så kallat "pipetteringsfel" kan reduceras om data analyseras i läget F1/F2 eller 530 nm/640 nm.

* *ipsogen* PML-RARA bcr1 Controls Kit, katalognr 672091, är endast avsedd för forskning. Får ej användas i diagnostiskt syfte. Ingen garanti eller inget framställande är avsedd/avsett för instrumentets användning för att tillhandahålla information för diagnos, förebyggande eller behandling av en sjukdom.

Kvalitetskontroll

Hela kitet har kvalitetskontrollerats på ett LightCycler 480-instrument. Detta kit är tillverkat enligt standarden ISO 13485:2003. Analyscertifikat kan beställas på www.qiagen.com/support/.

Begränsningar

Användarna måste vara utbildade i och förtrogna med denna teknologi innan produkten används. Kitet ska användas i enlighet med anvisningarna i denna handbok, i kombination med ett validerat instrument som omnämns i "Material som behövs men inte medföljer", sida 10.

Alla diagnostiska resultat som erhålls måste tolkas tillsammans med övriga kliniska fynd eller laboratoriefynd. Det är användarnas ansvar att validera systemets prestanda för eventuella procedurer som används i deras laboratorium som inte ingår i QIAGENS prestandastudier.

Var noga med att uppmärksamma de utgångsdatum som är angivna på kartongen och etiketterna för alla komponenter. Använd inte utgångna komponenter.

Obs! Kitet har utformats i enlighet med studierna "Europe Against Cancer" (EAC) (4, 5). Det ska användas i enlighet med anvisningarna i denna handbok, i kombination med validerade reagenser och instrument. Om denna produkt används utanför indikationen och/eller om komponenterna modifieras, upphör ansvarsskyldigheten för QIAGEN.

Prestandaegenskaper

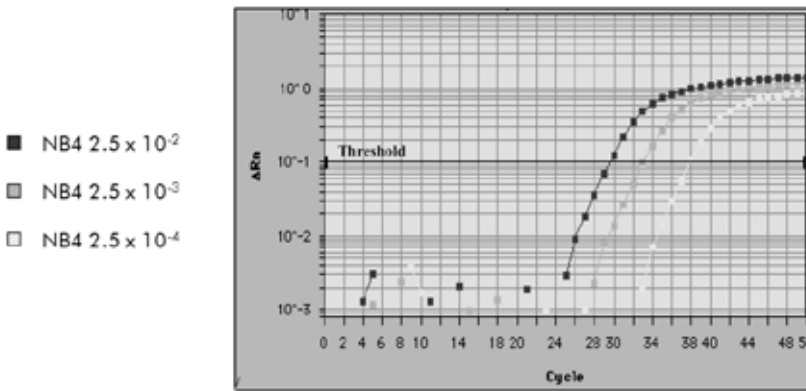
Icke-kliniska studier

Material och metoder

Prestandautvärdering utfördes på ett ABI PRISM 7700 SDS i kombination med reagenser som anges i "Material som behövs men inte medföljer", sida 10. Ekvivalensstudier utfördes på följande instrument för att validera dess användning: ABI PRISM 7000 och 7900HT SDS, LightCycler 1.2 och 480, RotorGene 3000 och SmartCycler.

Icke-kliniska studier har utförts för att fastställa den analytiska prestandan för *ipsogen* PML-RARA bcr1-kitet. Dessa icke-kliniska laboratoriestudier utfördes på totalt RNA från NB4-cellinjen utspädd i en konstant slutlig mängd av totalt RNA från MV4-11-cellinje.

För att bestämma analysens upprepningsbarhet blev 5 olika koncentrationer av NB4 totalt RNA (5 ng, 500 pg, 50 pg, 5 pg och 0,5 pg) utspädda i MV4-11 totalt RNA, i en konstant slutlig total mängd på 200 ng, och analyserade i 5 replikat per körning och i 4 olika körningar. Proverna med 5 pg och 0,5 pg NB4 RNA i MV4-11 RNA var för låga för att ge några resultat (figur 10).



Figur 10. Amplifieringskurvor för $2,5 \times 10^{-2}$ (5 ng), $2,5 \times 10^{-3}$ (0,5 ng) och $2,5 \times 10^{-4}$ (0,05 ng) spädningar av NB4 totalt RNA i MV4-11-negativt totalt RNA.

Analysdata

I tabell 16–19 visas analyserna av jämförelser mellan olika analyser med genomsnittlig tröskelcykel (C_T), standardavvikelse (SD), antal prover (n), variationskoefficient (CV), genomsnittligt antal kopior (CN) och genomsnittligt normaliserat antal kopior (NCN).

Tabell 16. Analys av jämförelser mellan olika och inom analyser – cellinjer PML-RARA och ABL

Cellinje	Spädning	Analys av jämförelse mellan olika analyser				Analys av jämförelse inom en analys	
		Medel- C_T	SD	n	CV (%)	Min. CV	Max. CV
PML-RARA	5 ng	29.86	0.29	20	0.98	0.32	1.42
	0,5 ng	33.70	0.48	20	1.42	0.56	2.16
	0,05 ng	37.03	0.37	18	1.01	1.07	2.03
ABL	---	24.06	0.22	100	0.92	0.15	2.31

Table 17. Analys av jämförelse mellan olika analyser – plasmider

Gen	Plasmid	Medel-C _T	SD	n	CV (%)
PML-RARA	F1 (10 ¹ kopior)	35.95	0.29	8	0.79
	F2 (10 ² kopior)	32.25	0.59	8	1.84
	F3 (10 ³ kopior)	28.71	0.55	8	1.90
	F4 (10 ⁵ kopior)	22.14	0.49	7	2.23
	F5 (10 ⁶ kopior)	18.64	0.72	8	3.84
ABL	C1 (10 ³ kopior)	28.85	0.76	7	2.62
	C2 (10 ⁴ kopior)	25.25	0.71	8	2.82
	C3 (10 ⁵ kopior)	21.74	0.81	8	3.74

Tabell 18. Analys av jämförelse mellan olika analyser – cellinjer PML-RARA bcr1 och ABL (medel-CN)

Cellinje	Spädning	Medel-CN	SD	n	CV (%)
PML-RARA bcr1	2,5 x 10 ⁻² (5 ng/200 µg)	583.95	149.19	20	25.55
	2,5 x 10 ⁻³ (0,5 ng/200 ng)	44.98	12.25	20	27.23
	2,5 x 10 ⁻⁴ (0,05 ng/200 ng)	4.91	1.55	19	31.52
ABL	--	35,171.47	22,448.3	99	63.83

Table 19. Analys av jämförelse mellan olika analyser – cellinje PML-RARA bcr1 (medel-NCN)

Cellinje	Spädning	Medel-NCN*	SD	n	CV (%)
PML-RARA bcr1	2,5 x 10 ⁻² (5 ng/200 ng)	271.4	150.00	20	55.56
	2,5 x 10 ⁻³ (0,5 ng/200 ng)	15.35	8.12	20	52.87
	2,5 x 10 ⁻⁴ (0,05 ng/200 ng)	1.66	0.91	18	55.14
ABL	--	35,171.47	22,448.3	99	63.83

* Endast för dessa studieresultat anges NCN som $\frac{\text{PML-RARA bcr1}_{\text{CN}}}{\text{ABL}_{\text{CN}}} \times 10\,000$.

Kliniska studier

Prestandautvärdering utfördes på ett ABI PRISM 7700 SDS i kombination med reagenser som anges i "Material som behövs men inte medföljer", sida 10. Ekvivalensstudier utfördes på följande instrument för att validera dess användning: ABI PRISM 7000 och 7900HT SDS, LightCycler 1.2 och 480, RotorGene 3000 och SmartCycler.

En grupp med 26 laboratorier, i 10 europeiska länder, som deltog i en gemensam aktion med EAC, använde plasmider som tillhandahållits av *ipsogen* för att fastställa ett standardiserat protokoll för qPCR-analys av de viktigaste leukemiasocierade fusionsgenerna i den kliniska miljön. PML-RARA bcr1-transkriptet var en av fusionsgenerna (FG) som ingick i studien. Här presenteras en sammanfattning av denna valideringsstudie; de fullständiga resultaten publicerades 2003 (4, 5).

Reproducerbarhet mellan olika laboratorier för CG- och FG-plasmidstandarder

Totalt 11 laboratorier utförde ett reproducerbarhetsexperiment mellan olika laboratorier för att bedöma variabiliteten i mätningen av CG- och FG-plasmidstandardspädningarna. Spädningar utfördes i duplikat på varje laboratorium. I tabell 20 rapporteras genomsnitt, standardavvikelse och CV (%) för varje spädning.

Table 20. Reproducerbarhet mellan olika laboratorier för CG- och FG-plasmidstandarder

Gen	Spädning	Medelvärde	C _T SD	CV (%)
ABL-kontrollgen	C1	29.26	0.69	2.31
	C2	25.79	0.65	2.53
	C3	22.40	0.61	2.70
PML-RARA bcr1-fusionsgen	F1	35.84	0.79	2.21
	F2	32.47	0.49	1.50
	F3	28.91	0.34	1.17
	F4	21.82	0.30	1.40
	F5	18.47	0.29	1.55

Uttrycksvärden för PML-RARA bcr1 FG-transkriptet

I tabell 21 och 22 visas uttrycksvärdena för PML-RARA bcr1 FG-transkriptet och ABL CG, för NB4-cellinjen, APL-patienter vid diagnosen, samt för negativa kontrollpatienter.

Tabell 21. Uttrycksvärden för PML-RARA bcr1 FG-transkriptet och ABL CG – C_T-värden

	C _T -värden (95 % intervall)	
	PML-RARA bcr1	ABL
NB4-cellinje	24.7	23.7
APL-patientprover		
Benmärg (n = 14)	25.6 (23.1–27.5)	24.5 (21.7–28.5)
Perifert blod (n = 9)	25.7 (23.7–29.4)	24.6 (22.0–27.4)
Negativa patientprover		
Benmärg (n = 26)	--	25.35 (24.68–26.02)
Perifert blod (n = 74)	--	25.15 (24.83–25.48)

ABL CT-värden skilde sig inte signifikant mellan normala prover och leukemiprover, inte heller mellan provtyper (PB eller BM) eller leukemiprover från patienter som fått diagnosen APL.

Tabell 22. Uttrycksvärden för PML-RARA bcr1 FG-transkriptet och ABL CG – CN- och NCN-värden

	CN-värden (95 % intervall)		NCN-värden (95 % intervall)
	PML-RARA bcr1	ABL	CN bcr1/ CN ABL
Patientprover			
Benmärg (n = 14)	5129 (1480–25,704)	1538.7 (133.2–46,781.28)	0.30 (0.09–1.82)
Perifert blod (n = 9)	3891 (475–14,454)	1400.76 (50.27–11,274)	0.36 (0.11–0.78)
Negativa patientprover			
Benmärg (n = 26)	--	19,201 (12,922–25,480)	--
Perifert blod (n = 74)	--	21,136 (17,834–24,437)	--

Falska negativa och falska positiva frekvenser

Falska negativa och falska positiva frekvenser beräknades med användning av följande kontroller:

- I Positiva kontroller: NB4-celler, en cellinje som är välkänd för dess positivitet för PML-RARA bcr1 FG; patientprover är redan bedömda avseende PML-RARA bcr1-positivitet
- I Negativa kontroller: Negativa RNA-prover, kontroller utan amplifiering (no amplification controls, NAC) av RNA från *E. coli* istället för humant RNA för att kontrollera eventuell PCR-kontaminering, och kontroller utan templat (no template controls, NTC), som innehöll vatten istället för humant RNA

Amplifiering på RNA-prover av FG gjordes i triplikat samt i duplikat för CG.

Ett falskt negativt prov definierades som ett positivt RNA-prov med mindre än 50 % positiva brunnar (0/2, 0/3 eller 1/3).

Ett falskt positivt prov definierades som ett negativt RNA-prov med minst 50 % positiva brunnar (1/2, 2/3 eller 3/3).

I tabell 23 visas antalet och procenten för falska negativa och falska positiva prover.

Tabell 23. Falska negativa och falska positiva prover

Falsk negativitet		Falsk positivitet	
10^{-3}	10^{-4}	FG-negativ kontroll	NAC/NTC
0% (0/29)	0% (0/28)	11% (5/45)	5% (5/100)

Litteraturhänvisningar

1. Santamarie, C. et al. (2007) Using quantification of the PML-RARalpha transcript to stratify the risk of relapse in patients with acute promyelocytic leukemia. *Haematologica* **92**, 315.
2. Kern, W. et al. (2004) Monitoring of minimal residual disease in acute myeloid leukemia. *Atlas Genet. Cytogenet. Oncol. Haematol.* **112**, 4.
3. Lo-Coco, F. and Ammantuna, E. (2006) The biology of acute promyelocytic leukemia and its impact on diagnosis and treatment. *Hematology ASH Educ. Program* **514**, 156.
4. 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.
5. 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.
6. 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.
7. Branford, S. et al. (2006) Rationale for the recommendations for harmonizing current methodology for detecting BCR-ABL transcripts in patients with chronic myeloid leukemia. *Leukemia* **20**, 1925.

Symboler

Följande symboler kan förekomma på förpackning och märkning:



<N>

Innehåller reagenser som räcker för <N> reaktioner



Använd före



Medicinsk utrustning för in vitro-diagnostik



Katalognummer



Lotnummer



Materialnummer (till exempel komponentmärkning)



Globalt nummer på handelsvara



Temperaturbegränsningar



Tillverkare



Konsultera bruksanvisningen

Dokumentrevisioner

R5, november 2017

Noteringar har lagts till att *ipsogen* PML-RARA bcr1-kontrollkit, katnr. 672091, enbart är för forskningsändamål; smärre skrivfel har korrigerats.

Beställningsinformation

Produkt	Innehåll	Kat.nr
<i>ipsogen</i> PML-RARA bcr1 Kit (24)	För 24 reaktioner: ABL Control Gene Standards (ABL-kontrollgenstandarder), PML-RARA bcr1 Fusions Gene Standards (PML-RARA bcr1-fusionsgenstandarder), Primers and Probe Mix ABL (primers och sökfragmentblandning ABL), Primers and Probe Mix PML-RARA bcr1 Fusion Gene (primers och sökfragmentblandning PML-RARA bcr1-fusionsgen)	672123
Rotor-Gene Q MDx — för IVD-validerad realtids PCR-analys i kliniska applikationer		
Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM Platform	PCR-cykler i realtid och analysator med högupplösningssmältning och fem kanaler (grön, gul, orange, röd och karmosinröd) plus HRM-kanal, laptopdator, program, tillbehör och ett års garanti på reservdelar och arbete, installation och utbildning ingår inte	9002032
Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM System	PCR-cykler i realtid och analysator med högupplösningssmältning och fem kanaler (grön, gul, orange, röd och karmosinröd) plus HRM-kanal, laptopdator, program, tillbehör och ett års garanti på reservdelar och arbete, installation och utbildning	9002033
<i>ipsogen</i> PML-RARA bcr1 Controls Kit (<i>ipsogen</i> PML-RARA bcr1-kontrollkit) – för kvalitativ validering av RNA-extrahering och omvänd transkription av PCR-RARA bcr1-fusionsgenen		
<i>ipsogen</i> PML-RARA bcr1 Controls Kit	Cellinjer med negativt, högt och lågt positivt uttryck av PML-RARA bcr1-fusionsgenen	672091*

* *ipsogen* PML-RARA bcr1 Controls Kit, katalognr 672091, är endast avsedd för forskning. Får ej användas i diagnostiskt syfte. Ingen garanti eller inget framställande är avsedd/avsett för instrumentets användning för att tillhandahålla information för diagnos, förebyggande eller behandling av en sjukdom.

Uppdaterad licensinformation och produktspecifika friskrivningsklausuler: se respektive QIAGEN-kithandbok eller användarhandbok. Handböcker och användarhandböcker för QIAGEN-kit finns på www.qiagen.com eller kan beställas från QIAGENS tekniska support eller från lokal distributör.

Denna produkt är avsedd att användas för In vitro-diagnostik. *Ipsogen*-produkter får inte återförsäljas, modifieras för återförsäljning eller användas för att tillverka kommersiella produkter utan skriftligt godkännande från QIAGEN.

Informationen i detta dokument kan ändras utan föregående meddelande. QIAGEN tar inget ansvar för eventuella fel som kan finnas i detta dokument. Detta dokument betraktas som komplett och riktligt vid tiden för publicering. Under inga omständigheter är QIAGEN ansvarigt för tillfälliga, speciella eller multipa skador eller följdskador i samband med, eller på grund av användningen av detta dokument.

Ipsogen-produkter är garanterade att motsvara deras angivna specifikationer. QIAGENS enda åtagande och kundens enda gottgörelse är begränsad till ersättning av produkter utan kostnad om produkter inte skulle fungera enligt garantin.

Varumärken: QIAGEN®, *Ipsogen*®, 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); SmartCycler® (Cepheid).

Avtal om begränsad licens för *Ipsogen* PML-RARA bcr1-kitet

Användning av den här produkten innebär att köpare eller användare av produkten godkänner följande villkor:

1. Produkten får endast användas i enlighet med de protokoll som medföljer produkten och den här handboken och får endast användas med komponenterna som ingår i kitet. QIAGEN ger ingen licens för någon av sina immateriella tillgångar för att använda eller inkludera komponenterna i detta kit med komponenter som inte ingår i detta kit förutom vad som beskrivs i de protokoll som medföljer produkten, den här handboken och ytterligare protokoll som finns på www.qiagen.com. Vissa av de här ytterligare protokollen har tillhandahållits av QIAGEN-användare för andra QIAGEN-användare. De här protokollen har inte testats noggrant eller optimerats av QIAGEN. QIAGEN garanterar inte att de inte kränker tredje parts rättigheter.
2. Förutom de uttryckligen angivna licenserna kan QIAGEN inte garantera att detta kit och/eller dess användning inte kränker oberoende tredje parts rättigheter.
3. Detta kit och dess komponenter är licensierade för engångsbruk och får inte återanvändas, renoveras eller säljas vidare.
4. QIAGEN fransäger sig specifikt alla andra licenser, uttryckliga eller underförstådda, bortsett från dem som uttryckligen angivits.
5. Inköparen och användaren av detta kit samtycker till att inte vidta eller tillåta att någon annan vidtar några steg som kan leda till eller underlätta några åtgärder som är förbjudna enligt ovan. QIAGEN kan kräva upphävande av detta begränsade licensavtal i domstol och ska ersättas för alla undersöknings- och rättegångskostnader, inklusive advokatkostnader, vid eventuellt försök att upprätthålla detta begränsade licensavtal eller någon av sina immateriella rättigheter avseende kitet och/eller någon av dess komponenter.

För uppdaterade licensvillkor, se www.qiagen.com.

HB-1358-005 1108718 Nov-2017 © 2013-2017 QIAGEN, med ensamrätt.

